

Received: 2007.02.28
Accepted: 2007.12.04
Published: 2007.12.14

Rola onkogennych kinaz tyrozynowych w odpowiedzi komórek na terapię przeciwnowotworową

The role of oncogenic tyrosine kinases in the cellular response to anticancer therapy

Artur Słupianek¹, Dariusz Pytel², Ireneusz Majsterek³

¹ Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Temple University School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

² Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

³ Zakład Chronofarmakologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Onkogenne kinazy tyrozynowe (OTKs), ulegające ekspresji w nowotworach złośliwych, hamują procesy apoptozy oraz stymulują niezależną od czynników wzrostu proliferację komórek. Stwierdza się udział, co najmniej trzech mechanizmów w odpowiedzi komórek nowotworowych z ekspresją OTKs na chemio- i radioterapię: wzrost poziomu białek antyapoptotycznych np. Bcl-xL i Bcl-2 oraz hamowanie aktywacji białek proapoptotycznych np. kaspaza 3, zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie G2/M oraz modulowanie mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Ponadto, OTKs zwiększają ilość spontanicznych uszkodzeń DNA w komórce poprzez nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS). Nagromadzenie mutacji w materiale genetycznym prowadzi do wzrostu potencjału metastatycznego i dalszego rozwoju choroby nowotworowej oraz oporności na współczesną terapię. Oksydacyjnie uszkodzone zasady azotowe DNA są głównie naprawiane przez mechanizm wycinania zasad (BER) lub wycinania nukleotydów (NER). Jednakże, w czasie replikacji DNA, część z nich ulega przetworzeniu w podwójne pęknięcia nici DNA (DSBs), za których naprawę odpowiada mechanizm niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) oraz mechanizm rekombinacji homologicznej (HRR). W komórkach z ekspresją OTKs ten ostatni podlega znacznej aktywacji dzięki wzrostowi poziomu białka Rad51. Ponadto, w procesie tym istotną rolę odgrywają enzymy z grupy helikaz RecQ. Wydaje się, że dokładne poznanie mechanizmów aktywowanych przez OTKs, może pomóc w poszukiwaniu nowych rozwiązań terapeutycznych wykorzystujących jako cel kinazy tyrozynowe.

Słowa kluczowe:

onkogenne kinazy tyrozynowe • naprawa DNA • apoptoza • leki przeciwnowotworowe

Summary

Oncogenic tyrosine kinases (OTKs) expressed in malignant tumors stimulate cell proliferation, inhibition of apoptosis, and drug resistance. There are at least three mechanisms of response to chemo- and radiotherapy in OTK-positive cells: overexpression of anti-apoptotic proteins (such as Bcl-xL and Bcl-2) and blocking of the activation of pro-apoptotic proteins (such as caspase 3), arrest in the G2/M phase of the cell cycle, and modulation of DNA repair mechanisms. Furthermore, OTKs elevate the level of reactive oxygen species (ROS)-dependent spontaneous DNA damage. The accumulation of mutations in genetic material increases the metastatic potential following further cancer development. Oxidation-damaged DNA bases are repaired primarily via the mechanisms of base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER). However, during DNA replication, the areas of single-stranded DNA produced by BER and NER can be converted to double-strand breaks (DSBs), which are then repaired via non-homologous

end-joining (NHEJ) and homologous recombination repair (HRR) mechanisms. The HRR pathway is activated in OTK-positive cells due to the elevated level of RAD51 protein expression. In addition, RecQ helicases, such as BLM, play a significant role in this process. Understanding the mechanisms activated by OTKs may help in the development of novel therapeutic strategies that use OTKs as a target.

Key words: oncogenic tyrosine kinases • DNA repair • apoptosis • anticancer drugs

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/11522.pdf

Word count: 3089

Tables: –

Figures: 4

References: 51

Adres autora: prof. nadzw. dr hab. Ireneusz Majsterek; Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: imajst@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ALL** – ostra białaczka limfocytarna; **AML** – ostra białaczka szpikowa; **PBSz** – przewlekła białaczka szpikowa; **DSBs** – podwójne pęknięcia nici DNA; **HRR** – naprawa przez rekombinację homologiczną; **MMNG** – *N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna; **NER** – naprawa przez wycinanie nukleotydów; **NHEJ** – naprawa przez niehomologiczne łączenie końców; **OTKs** – onkogenne kinazy tyrozynowe; **Ph** – chromosom Filadelfia.

WPROWADZENIE

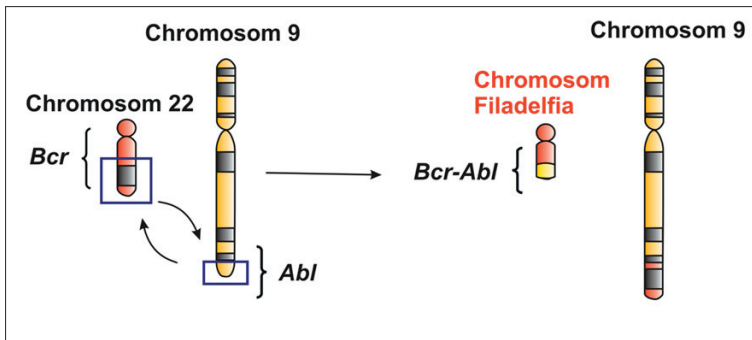
W 1960 roku w komórkach szpiku pobranych od pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową (PBSz) zidentyfikowany został chromosom Filadelfia (Ph – Philadelphia chromosome) powstający w wyniku translokacji fragmentu chromosomu 9 do chromosomu 22 [t(9;22)] [37]. Dopiero kilka lat później w 1983 r. udało się stwierdzić, że do pęknięcia dochodzi w pobliżu końca dłuższego ramienia chromosomu 9 (9q34) oraz w dłuższym ramieniu chromosomu 22 (22q11) [4]. Kluczowym dla dalszego rozwoju wiedzy na temat roli onkogennych kinaz tyrozynowych w patologii ludzkich chorób stało się określenie, że translokacja powoduje przeniesienie i aktywację fragmentu protoonkogenu komórkowego *c-ABL* z chromosomu 9 i połączenie go z genem *BCR* w chromosomie 22 [20]. Geny tworzą funkcjonalną hybrydę *BCR/ABL* kodującą fuzyjne białko wykazującą aktywność cytosolowej kinazy tyrozynowej (ryc. 1) [29].

Onkogenne kinazy tyrozynowe (OTKs – oncogenic tyrosine kinases) powstające na skutek translokacji chromosomalnych, takie jak *BCR/ABL*, uczestniczą w przesyłaniu sygnałów związanych z podstawowymi funkcjami komórki w tym ze wzrostem, podziałem, migracją i apoptozą [25]. Na skutek działania czynników genotoksycznych, w tym leków przeciwnowotworowych powstają uszkodzenia DNA, co jest przyczyną zahamowania podziałów, a w konsekwencji śmierci komórek nowotworowych. Onkogenne kinazy tyrozynowe chronią komórki nowotworowe przed śmiercią, a mechanizm ten jest nie do końca poznany [7]. Obecna praca jest uaktualnieniem dotychczasowej wiedzy na temat udziału OTKs w procesie nowotworzenia opisanych w 2005 r. w *Postepach Biochemii* [32].

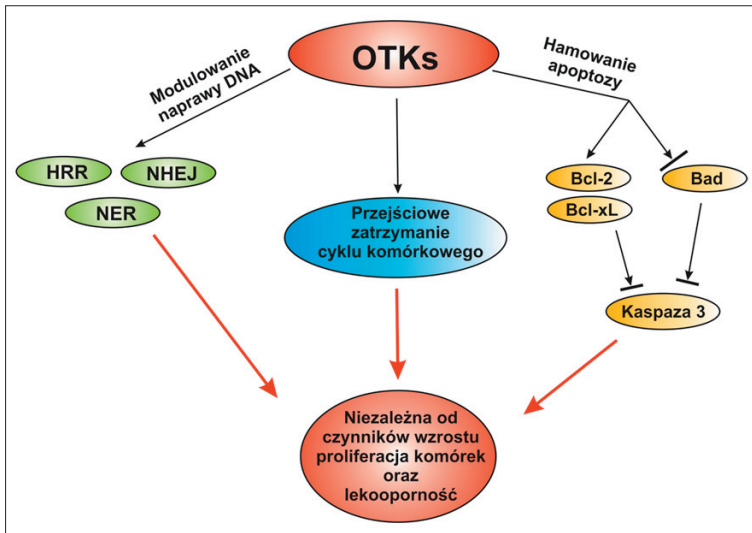
ONKOGENNE KINAZY TYROZYNOWE

Istnieje cała grupa onkogennych kinaz tyrozynowych zaliczanych – ze względu na podobieństwo strukturalne – do rodziny białek fuzyjnych. Wszystkie one wykazują podobieństwo strukturalne z *BCR/ABL*, które obejmuje N-końcowy region oligomeryzacji odpowiedzialny za konstytutywną aktywację, domenę katalityczną enzymu oraz C-końcowy region odpowiedzialny za wiązanie substratów. Stwierdzono, że poziom ekspresji OTKs ma zasadniczy wpływ na przebieg transformacji blastycznej w białaczkach u ludzi.

Kinaza fuzyjna *TEL/ABL* jest wynikiem translokacji t(9;12), występującej w ostrej białaczce limfoblastycznej (acute lymphoblastic leukemia – ALL), atypowej CML oraz ostrej białaczce szpikowej (acute myeloid leukemia – AML) i zawiera N-końcowy fragment *TEL* związany z C-końcowym fragmentem *ABL* [16]. Kinaza *TEL/JAK2* została scharakteryzowana jako produkt translokacji t(9;12), który powoduje przeniesienie domeny oligomeryzacji *TEL* na domenę katalityczną *JAK2* i stwierdzona w przypadkach ALL [40]. Kinaza *TEL/PDGFR* jest związana z translokacją t(5;12), która wiąże N-końcowy region *TEL* z międzybłonowym fragmentem receptorowej kinazy tyrozynowej zależnym od płytek czynnika wzrostu β (*PDGFR*) i występuje w przewlekłej białaczce mielomonocytovej [15]. Konsekwencją translokacji t(12;15) jest ekspresja fuzyjnej kinazy tyrozynowej *TEL/TRK(L)* związanej z AML, niemowlęcym włóknakiomięśniakiem i wrodzonym mezo-blastycznym rakiem nerki. Fuzja *TEL/TRK(L)* wiąże eksony 1 i 4 sekwencji *TEL* z niemal całą domeną kinazy *TRK* [27]. Gen fuzyjny *NPM/ALK* powstaje w wyniku translokacji t(2;5) i bierze udział w patogenezie rozległego chłoniaka anaplastycznego (anaplastic large cell lymphoma – ALCL). *NPM/ALK* koduje białko hybrydo-



Ryc. 1. Molekularne konsekwencje translokacji t(9q+;22q-) prowadzącej do powstania chromosomu Filadelfia kodującego onkogenną kinazę tyrozynową BCR/ABL



Ryc. 2. Mechanizmy oporności komórek z ekspresją onkogennych kinaz tyrozynowych (OTKs); uproszczony schemat systemów aktywowanych przez OTKs: oddziaływanie na naprawę DNA poprzez regulację mechanizmów replikacji homologicznej (HRR), niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) i wycinania nukleotydów (NER), zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie kontrolnym G2/M, aktywację białek antyapoptotycznych (Bcl-xL) oraz hamowanie proapoptotycznych składników apoptozy (Bad)

we 75 kDa, zawierające N-końcowy fragment sekwencji NPM związany z cytoplazmatyczną domeną receptorowej kinazy tyrozynowej ALK [34].

NIESTABILNOŚĆ GENETYCZNA W KOMÓRKACH PRZEWLEKLEJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ

Niestabilność genetyczna, objawiająca się nagromadzeniem aberracji chromosomalnych, jest jednym z głównych zjawisk charakterystycznych dla nowotworów. Zdrowe komórki, w których naprawa uszkodzeń materiału genetycznego jest niewydajna, są eliminowane przez mechanizmy apoptotyczne, podczas gdy komórki nowotworowe z ekspresją OTKs są lepiej przystosowane do walki z uszkodzeniami DNA, przeżywając nawet wtedy, gdy mechanizmy naprawy nie są zdolne uniknąć pomyłek. Za jedną z przyczyn niestabilności genetycznej uważa się wysoki poziom wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (reactive oxygen species – ROS), które – modyfikując DNA – są potencjalnym źródłem mutacji [23]. Dotychczas wykazano, że kinaza BCR/ABL indukuje wzrost wytwarzania ROS [42] poprzez aktywację szlaku kinaz PI-3k/mTOR [24]. Ponadto, indukowane przez BCR/ABL, wolnorodnikowe uszkodzenia DNA są przetwarzane w podwójne pęknięcia nici DNA (DSBs), naprawiane niewydajnie przez mechanizm niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) oraz mechanizm rekombinacji homologicznej (HRR) [38]. Podobny mechanizm zaobserwowano w liniach komórkowych transfekowanych BCR/ABL, które poddano napro-

mienianiu [48]. Nieskuteczna naprawa DNA w komórkach z ekspresją BCR/ABL sprzyja powstawaniu mutacji nie tylko w genach supresorowych, ale także w obrębie samego BCR/ABL prowadząc do zwiększonej niestabilności genomu, a w konsekwencji do oporności na terapię antynowotworową [26].

ROLA ONKOGENNYCH KINAZ TYROZYNOWYCH W INDUKOWANIU ZJAWISKA LEKOOPORNOŚCI

Stwierdzono, że onkogenne kinazy tyrozynowe, w porównaniu z białkami komórek prawidłowych, wykazują zwiększoną aktywność enzymatyczną [5]. Ponadto wykazano, że komórki nowotworowe z ekspresją OTKs – w odpowiedzi na leki genotoksycznie aktywne (czyli uszkodzające DNA) – wykazują wczesną lekooporność, która jest jednym z powodów niepowodzenia terapii przeciwnowotworowej [18]. Wyniki wielu badań łączą aktywność OTKs ze wzmoczoną naprawą DNA. Istnieje podstawowa korelacja pomiędzy ekspresją białek związanych z naprawą DNA i efektywnością terapii z zastosowaniem leków przeciwnowotworowych oraz promieniowania [39]. Onkogeny, które zmieniają ekspresję, fosforylację i/lub funkcję tych białek mogą zwiększać wydajność naprawy DNA. Wykazano, że BCR/ABL może aktywować czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT5. Prawdopodobnie istnieje również współdziałanie między naprawą oraz innymi mechanizmami komórkowymi w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, takimi jak zahamowanie apoptozy, modulowanie cyklu komórkowe-

go i tempa proliferacji komórek. Stwierdzono, że kinaza BCR/ABL może podwyższać ekspresję białek antyapoptotycznych [1] i/lub hamować aktywność białek proapoptotycznych [41]. Wydaje się, że wszystkie te procesy mogą mieć swój udział w indukowaniu zjawiska lekooporności komórek z ekspresją OTKs (ryc. 2).

MODULOWANIE WRAŻLIWOŚCI KOMÓREK NA TERAPIĘ PRZECIWNOWOTWOROWĄ PRZEZ ONKOGENNE KINAZY TYROZYNOWE

Ekspresja onkogennej kinazy tyrozynowej BCR/ABL wywołuje aktywację wielu wewnątrzkomórkowych kaskad transmisji sygnału w szlakach RAS, JAK/STAT, PLC γ oraz kinazy PI3K. Ekspresja BCR/ABL aktywuje białka MAP. BCR/ABL wykazuje również silne właściwości proliferacyjne zależne od aktywności kinazy fosfatydoinozytolu PI3K. Przekaznikiem w kaskadzie PI3K jest kinaza serynowo-treoninowa AKT, dla której substratem jest proapoptotyczne białko Bad [12]. Szeroki zakres aktywności kinazy BCR/ABL sprawia, że jej ekspresja wyraźnie różnicuje odpowiedź komórki na działanie leków przeciwnowotworowych, zwłaszcza genotoksycznie aktywnych – uszkadzających strukturę DNA. Wykazaliśmy, że po działaniu idarubicyny zarówno w komórkach prawidłowych jak i z ekspresją BCR/ABL powstają uszkodzenia DNA [15]. Jednocześnie zastosowanie naturalnych antyoksydantów – witaminy C oraz leków o działaniu osłonowym – amifostyny, powodowało obniżenie poziomu uszkodzeń DNA tylko w limfocytach, podczas gdy nie wpływało na poziom uszkodzeń w komórkach BaF3 mysiej linii pro-B limfoidalnej z ekspresją BCR/ABL [15]. Idarubicyna jest lekiem z grupy antybiotyków antracyklinowych stosowanych w leczeniu białaczek, który oprócz pęknięć dwuniciowych DNA (DSBs) może powodować metylację zasad azotowych [6]. Wynika z tego, że onkogenna kinaza BCR/ABL różnicuje odpowiedź komórek patologicznych z ekspresją OTKs na uszkodzenia DNA.

Zjawisko lekooporności charakterystyczne dla komórek z ekspresją OTKs stanowi ważny element dociekań na temat ich udziału w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Przeprowadzone badania wykazały jednoznacznie, że ekspresja OTKs zasadniczo zmienia charakter odpowiedzi komórek na działanie związków genotoksycznie aktywnych w stosunku do komórek prawidłowych. Eksperymenty *in vitro* wykazały, że komórki transfekowane OTKs wytwarzają więcej kolonii po działaniu cytostatyków i wykazują właściwości proliferacyjne nawet przy stężeniach leków, które eliminują wszystkie kolonie komórek macierzystych [21]. Testy przeżywalności MTT oraz barwienia przyżyciowe z błękitem trypanu wykazały, że zarówno mysie komórki BaF3 transfekowane OTKs, jak i komórki K562, ludzkiej CML z ekspresją BCR/ABL są odporne na działanie idarubicyny, MNNG (*N*-metylo-*N'*-nitro-*N*-nitrozoguanidyna) oraz promieniowania UV i γ , które uszkadzają DNA [30,31,33].

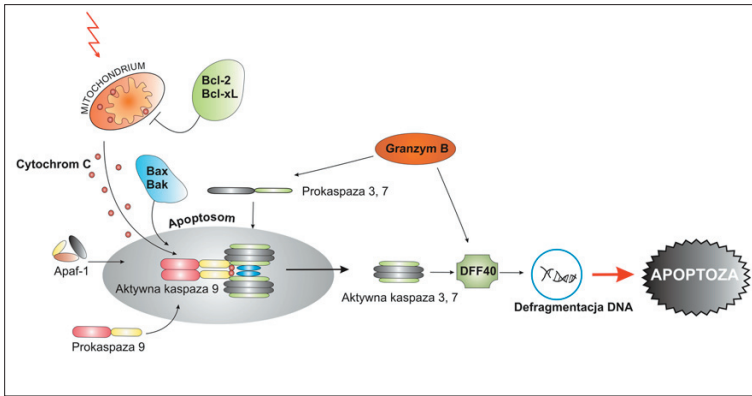
Udział onkogennej kinazy tyrozynowej w regulacji cyklu komórkowego

Prawidłowy przebieg cyklu komórkowego jest warunkiem utrzymania homeostazy organizmu. Naruszenie integralności genomu jest główną przyczyną zaburzeń cyklu komórkowego, a w odpowiedzi na działanie czynników genotoksycznych może dojść do jego zahamowania. W wyniku

akumulacji uszkodzeń DNA dochodzi do zablokowania cyklu komórkowego w jednym z dwóch możliwych punktów kontrolnych (cell cycle checkpoints): G1 (G1 \rightarrow S) przed replikacją DNA lub G2 (G2 \rightarrow M) bezpośrednio przed podziałem komórki [11]. Punkty kontrolne cyklu komórkowego aktywują system kinaz białkowych, które fosforylują białka biorące udział w transporcie do miejsc uszkodzenia DNA i w jego naprawie. W badaniach z zastosowaniem modelu mysich komórek linii pro-B limfoidalnej transfekowanych kinazami OTKs (BCR/ABL, TEL/ABL, TEL/JAK2, TEL/PDGFR β , TEL/TLKCR(L), NPM/ALK) rosnących w obecności cytotstatyków – mitomycyny C i cisplatiny zaobserwowano, że wszystkie one zatrzymują cykl komórkowy w punkcie G2 \rightarrow M [47]. Oba związki stosowane są jako leki przeciwnowotworowe i mają właściwości sieciowania DNA. Wykazano również, że zatrzymaniu cyklu komórkowego towarzyszy akumulacja białka supresorowego p53, które uczestniczy w indukowaniu zjawiska lekooporności [50]. Ponadto, komórki z ekspresją BCR/ABL mają zdolność aktywacji fazy S cyklu poprzez stymulację szlaku kinaz ATR-Chk1 [35].

Udział onkogennej kinazy tyrozynowej w regulacji apoptozy

Apoptoza jest genetycznie zaprogramowanym procesem śmierci komórki, który może być inicjowany w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Proces ten może przebiegać w dwóch szlakach: zależnym od receptora TNFR (death receptor pathway) oraz w wyniku uwolnienia cytochromu C z mitochondrium (mitochondrial pathway), których wspólnym etapem jest aktywacja proteaz cysteinowych z rodziny enzymów ICE – kaspaz. Enzymy te na zasadzie kaskady indukują endonukleazy katalizujące apoptotyczną fragmentację DNA komórki związaną głównie z aktywacją endonukleazy DFF40 (DN-aza zależna od kaspazy) przez kaspazę 3, 7 lub granzym B. Jeżeli naprawa DNA jest nieefektywna dochodzi do inicjacji apoptozy związanej z uwolnieniem cytochromu C z mitochondrium, aktywacją białek proapoptotycznych oraz hamowaniem antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-xL, prowadzącą w konsekwencji do aktywacji kaspazy 3 (ryc. 3). OTKs mogą hamować proces apoptozy indukowany w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Wykazano, że komórki ludzkiej białaczki K562 z ekspresją kinazy BCR/ABL, są odporne na działanie idarubicyny, a proces ten może być związany z hamowaniem apoptozy [31]. Poziom kaspazy 3 w komórkach K562 po działaniu idarubicyny był średnio 3-krotnie niższy niż w limfocytach. Potwierdza to wcześniejsze spostrzeżenia, że BCR/ABL może hamować apoptozę w szlaku zależnym od aktywacji kaspazy 3 [1,2,14]. Zespół Dubreza i wsp. (1998) wykazał, że aktywacja antyapoptotycznego sygnału w szlaku zależnym od BCR/ABL występuje przed aktywacją prokaspazy 3 [14]. Mechanizm, w którym OTKs hamują proces apoptozy zaobserwowano w modelu mysich komórek linii pro-B limfoidalnej transfekowanych OTKs. Dalsze badania z wykorzystaniem wyselekcjonowanych stabilnych klonów komórek BaF3 z ekspresją OTKs wykazały, że kinazy oddziałują z antyapoptotycznym białkiem Bcl-xL oraz pośrednio z proapoptotycznym Bad [47]. Najbardziej prawdopodobny jest mechanizm, w którym fosforylowane przez BCR/ABL proapoptotyczne białko Bad tworzy kompleks z białkami adaptorowymi frakcji cytoplazmatycznej z rodziny I4-3-3 w wyniku, czego nie może wiązać czynników antyapoptotycznych w tym Bcl-xL [10].



Ryc. 3. Schemat przebiegu szlaku apoptozy związanego z uwolnieniem cytochromu C z mitochondrium (szlak mitochondrialny). Jeśli naprawa DNA jest nieefektywna dochodzi do powstania aktywnego kompleksu apoptosom: kaspaza 9/Apaf1/cytochrom C, towarzyszy temu aktywacja białek proapoptotycznych Bax i Bak oraz hamowanie antyapoptotycznych białek Bcl-2 i Bcl-xL. Mechanizm ten prowadzi w konsekwencji do aktywacji kaspaz 3, 7 lub granzymu B. Enzymy te na zasadzie kaskady indukują endonukleazy DFF40 (DN-azy zależne od kaspaz) katalizujące apoptotyczną fragmentację DNA komórki

W konsekwencji OTKs mogą blokować uwolnienie cytochromu C z mitochondriów, aktywację kaspazy 3 i hamować proces apoptozy.

WPLYW ONKOGENNYCH KINAZ TYROZYNOWYCH NA MECHANIZMY NAPRAWY DNA

W zachowaniu integralności genomu zasadniczą rolę odgrywają mechanizmy naprawy DNA. Naprawa wspólnie z procesami związanymi z indukcją apoptozy oraz kontroli cyklu komórkowego może uczestniczyć w odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA. Następnie wykazano, że komórki z ekspresją OTKs, zawierają (z wyjątkiem TEL/TRKC(L)) pięć do dziesięciu razy więcej Rad51 niż komórki macierzyste [47]. Białko Rad51 uczestniczy w naprawie rekombinacyjnej (homologous recombination repair – HRR), przypisuje mu się również funkcję regulatora w procesach naprawy DNA przez wycinanie (NER), transkrypcji oraz procesach replikacji [44,49]. Ludzkie białko Rad51 oddziałuje z białkiem supresorowym p53, które bierze udział w regulacji cyklu komórkowego i apoptozy [51]. Ponadto sugerowany jest bezpośredni udział białek z rodziny Rad51 w kontroli wzrostu komórek [19].

Nasze badania z zastosowaniem modelu komórek Draa40 wskazują na stymulację systemu naprawy HRR przez OTKs. Wprowadzona do komórek Draa40 sekwencja DR-GFP jest substratem dla naprawy DSBs. Zawiera ona dwa – w różny sposób zmutowane – geny dla białka GFP (green fluorescent protein – GFP): *SceGFP* z dodatkową sekwencją rozpoznawaną przez endonukleazę *SceI* oraz *iGFP* ze środkowym regionem homologicznym prawidłowego białka GFP, ale pozbawionym końcowych sekwencji 5' oraz 3'. Sygnałem do naprawy jest cięcie podwójnej nici DNA (DSB) wywołane dostarczeniem do komórek drogą elektroporacji plazmidu kodującego endonukleazę *SceI*. Ekspresja funkcjonalnego białka GFP jest możliwa, jeśli nastąpi naprawa DSBs na matrycy *iGFP*. Pomiar sygnału fluorescencji potwierdził założenie, że komórki z ekspresją kinaz OTKs charakteryzują się znacząco wyższą efektywnością naprawy DSBs. Ponadto zbadano, iż kotransfekcja komórek Draa40 wektorem z sekwencją antysensową dla genu Rad51 znacząco obniża efektywność naprawy, co świadczy o głównej roli Rad51 w stymulowanej przez OTKs naprawie DNA [47].

W komórkach z ekspresją OTKs regulacji ulega nie tylko naprawa rekombinacyjna. Najprawdopodobniej w napra-

wie DNA uczestniczą również inne mechanizmy, takie jak NER, BER, MMR [9,13]. Przeprowadzone badania na modelu pro-B limfoidalnych komórek BaF3 transfekowanych OTKs wykazały, iż po działaniu czynników genotoksycznych, które powodowały aktywację systemów NER, BER oraz MMR, uszkodzenia DNA były w stosunku do komórek rodzicielskich BaF3 efektywniej naprawiane w komórkach z kinazami OTKs [30]. Zastosowanie do hodowli komórek medium wzbogaconego mieszaniną nukleotydów dNTP lub każdym z nukleotydów osobno (dATP, dGTP, dCTP, TTP) zwiększało wydajność naprawy w komórkach z ekspresją kinazy TEL/ABL [33]. Podstawowymi uszkodzeniami po działaniu promieniowania UV są dimery pirymidynowe T-T, T-C, usuwane w mechanizmie NER. Zaobserwowaliśmy, że mieszanina nukleotydów dCTP lub TTP znacząco podnosiła efektywność naprawy dimerów pirymidynowych w komórkach z ekspresją OTKs. Eksperymenty z zastosowaniem MNNG, który wprowadza metylację DNA i prowadzi do błędnego sparowania zasad wykazały, że uszkodzenia te mogą być również efektywniej naprawiane w komórkach z ekspresją OTKs, co może świadczyć o stymulacji systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR) [21]. Zaobserwowaliśmy również, że w komórkach z ekspresją kinazy BCR/ABL ilość utlenionych zasad azotowych powstałych na skutek działania nadtlenu wodoru, jest znacznie mniejsza niż w komórkach kontrolnych. Świadczyć to może o tym, że obecność kinazy BCR/ABL aktywuje również mechanizmy naprawy BER [33]. Nasze badania wykazują, iż ekspresja fuzyjnych kinaz tyrozynowych może aktywować wiele szlaków naprawy DNA.

Udział helikaz w procesach naprawy DNA w komórkach z ekspresją onkogennych kinaz tyrozynowych

Naprawa dwuniciowych pęknięć w mechanizmie HRR jest związana z koniecznością rozdzielenia nici prowadzącą do powstania jednoniciowych fragmentów DNA (single strand DNA – ssDNA). Enzymami mającymi zdolność rozwijania helisy DNA są białka określane jako helikazy [28]. Rodzina helikaz RecQ zapożyczyła swą nazwę od genu *recQ* odkrytego w bakteriach *E. coli*. U ludzi poznano 5 genów kodujących helikazy DNA RecQ, mutacje spotykane u trzech z nich: BLM, WRN i RTS są przyczyną rzadkich chorób genetycznych o charakterze recesywnym: zespołów Blooma, Wernera i Rothmunda-Thomsona. Wspólną cechą tych chorób jest niestabilność genetyczna, objawiająca się zwiększoną podatnością na różne typy nowotworów

[3]. Komórki uzyskane od pacjentów z zespołem Blooma są bardziej wrażliwe na zewnętrzne czynniki uszkodzające DNA, takie jak promieniowanie UV oraz związki chemiczne: etopozyd, bleomycyna, hydroksymocznik, cisplatyne, mitomycyna C, kamptotecyna [22]. Ponadto cechuje je zwiększona (ok.10 razy) liczba wymiany siostrzanych chromatyd (SCE), które to zjawisko jest markerem naprawy rekombinacyjnej dwuniciowych pęknięć DNA – HRR. W konsekwencji gromadzą one więcej błędów w DNA.

Badania prowadzone na materiale otrzymanym od chorych na przewlekłą białaczkę szpikową wykazały, że BCR/ABL zwiększa poziom ekspresji helikaz BLM, WRN, RTS i RecQL1, ale obniża poziom RecQL5 [46]. Również inne białka fuzyjne z grupy onkogennych kinaz tyrozynowych zwiększają ekspresję białka BLM. Mechanizm tego zjawiska wskazuje na rolę BCR/ABL w hamowaniu kaspazy 3, która ma zdolność degradacji białka BLM, ale tylko w komórkach typu dzikiego, nietransfekowanych przez BCR/ABL. Towarzyszy temu wzrost aktywności helikazowej białka BLM regulowany przez kinazę BCR/ABL oraz zwiększona wrażliwość na działanie cisplatyne w komórkach BCR/ABL-pozytywnych dodatkowo transfekowanych wektorem z sekwencją antysens BLM. Ponadto szpik kostny izolowany od myszy heterozygot BLM^{+/+} i infekowany przez BCR/ABL wykazuje zwiększoną wrażliwość na działanie cisplatyne w porównaniu ze szpikiem uzyskanym od myszy kontrolnych (BCR/ABL-pozytywnych). Rolę białka BLM w procesie naprawy uszkodzeń DNA kierowanym przez BCR/ABL ugruntowuje zwiększone oddziaływanie białek Rad51 i BLM. Dzięki temu komórki białaczkowe, mimo akumulacji uszkodzeń DNA [48], charakteryzuje znacznie większa efektywność naprawy toksycznych struktur pośrednich powstających w trakcie HRR.

Współdziałanie naprawy DNA z innymi mechanizmami odpowiedzi komórkowej w komórkach z ekspresją onkogennych kinaz tyrozynowych

W komórkach prawidłowych procesy związane z naprawą DNA, apoptozą oraz zatrzymaniem cyklu komórkowego są regulowane niezależnie od siebie. Jednakże w białaczkach, jak się wydaje, mogą one współdziałać w ochronie komórek z ekspresją BCR/ABL przed uszkodzeniami DNA [5]. Podwyższony poziom białek antyapoptotycznych i zahamowanie cyklu komórkowego należy rozważać jako mechanizmy ściśle współdziałające w odpowiedzi na uszkodzenia DNA [47]. Ponadto w komórkach z ekspresją OTKs odnajduje się stałą aktywację szlaku JAK/STAT, w którym czynnik transkrypcyjny STAT5 jest regulowany przez różne OTKs i pełni niezbędną rolę we wzroście i różnicowaniu komórek białaczkowych [36,45]. Podstawą tego zjawiska jest niezależna od kinazy JAK fosforylacja STAT5 stymulowana przez BCR/ABL. W mechanizmie odpowiedzi na uszkodzenia DNA aktywowane są więc również czynniki transkrypcyjne i prawdopodobnie wzrost aktywności Rad51 w komórkach z OTKs jest skutkiem zachodzącej za pośrednictwem STAT5 transaktywacji promotora Rad51 [47]. Wykazano, że ekspresja Rad51 w komórkach z TEL/TRKC(L) jest znacząco mniejsza w porównaniu z komórkami zawierającymi inne OTKs (BCR/ABL, TEL/ABL, TEL/JAK2, TEL/PDGFR, i NPM/ALK), co jest zgodne z faktem, że w porównaniu z innymi OTKs, kinaza TEL/TRKC(L) nie aktywuje STAT5 [27]. Sugeruje się więc następujący szlak

odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA: OTKs → STAT5 → dalszy efektor (np. Rad51).

ONKOGENNE KINAZY TYROZYNOWE JAKO CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Poznanie mechanizmów odpowiedzi komórkowej indukowanej przez onkogenne kinazy tyrozynowe było impulsem do poszukiwania inhibitorów uniwersalnych dla tej rodziny białek. W 2001 r. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration – FDA) zatwierdziła nowy lek - Imatinib (CGP57148B, STI571, Gleevec), który zrewolucjonizował leczenie PBSz. Imatinib jest chemicznym związkiem 2-fenylaminopirymidyny, który ma właściwość blokowania domeny ATP niezbędnej do aktywności kinazowej białka BCR/ABL [8]. Jest on również wykorzystywany do wyciszenia aktywności innych OTKs, w tym z porównywalną do BCR/ABL efektywnością dla TEL/PDGFR. Najnowsze badania dowodzą, że Imatinib skutecznie przyczynia się do przełamania oporności komórek białaczkowych, a jednym z mechanizmów jest hamowanie stymulowanej przez OTKs naprawy DNA. Ponadto Imatinib uczy komórki, w których zachodzi ekspresja BCR/ABL, na działanie promieniowania oraz leków uszkodzających strukturę DNA [32]. Niestety, stosowany w zaawansowanych stanach choroby (faza akceleracji i kryza blastyczna) Imatinib jest znacznie mniej skuteczny niż u pacjentów w fazie przewlekłej PBSz [43]. Istnieją dwie przyczyny oporności na terapię Imatinibem: obecność mutacji punktowych w domenie kinazowej BCR/ABL oraz amplifikacja genu BCR/ABL [17]. Wydaje się, że indukcja automutagenyzy w BCR/ABL poprzez wzrost wytwarzania ROS jest głównym mechanizmem oporności komórek PBSz na Imatinib [26].

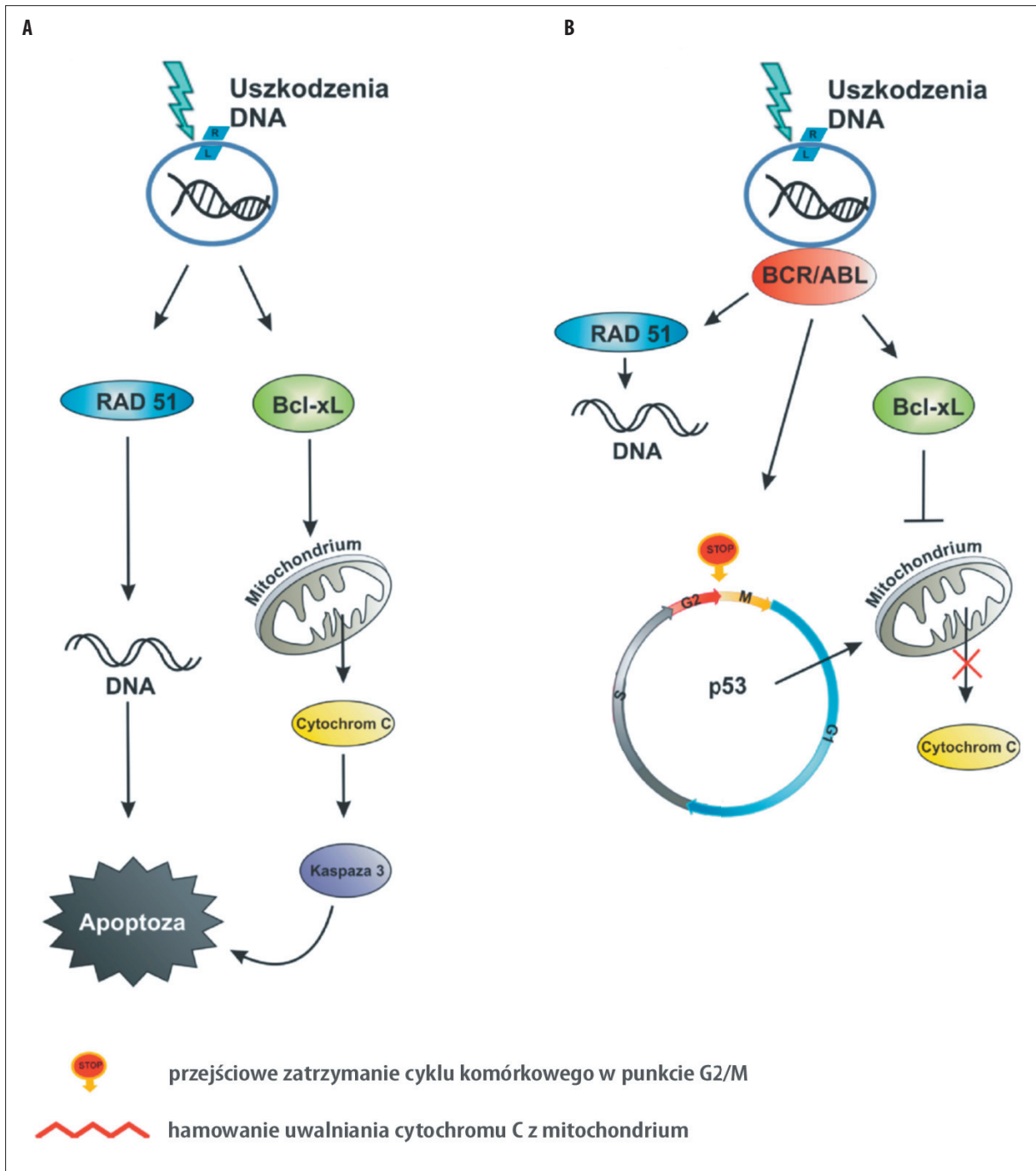
Sukces terapii z zastosowaniem Imatinibu przyczynił się do rozwinięcia nowej strategii w leczeniu białaczek, tzw. „combi-target strategy”, która ma na celu stworzenie leku o właściwościach genotoksycznych mającego jednocześnie właściwość selektywnego hamowania kinazy BCR/ABL. Pierwszym związkiem z grupy nowych inhibitorów jest 3-metylo-1,2,3-triazen (ZRCM5). Dwuskładnikowy kompleks ZRCM5 oparty jest na strukturze cząsteczki 2-fenylaminopirymidyny (podobnie jak Imatinib), która blokuje kinazę BCR/ABL, ale która zawiera dodatkowo triazenowy łańcuch przekształcany w procesie hydrolizy do metylodiazonu uszkodzającego DNA. Wydaje się, że terapia białaczek oparta na zastosowaniu leków typu ZRCM5 może być pomocna w przypadkach nabywania oporności na stosowanie tradycyjnych inhibitorów w onkogennych postaciach kinaz tyrozynowych spotykanych w różnych postaciach raka [32].

PODSUMOWANIE

Ekspresja onkogennych kinaz tyrozynowych różnicuje reakcje komórek na działanie czynników uszkodzających DNA. W procesie tym swój udział mogą mieć co najmniej trzy z możliwych mechanizmów:

- wzrost ekspresji białek antyapoptotycznych,
- przejściowe zatrzymanie cyklu komórkowego oraz
- modulowanie naprawy DNA.

Uszkodzenia DNA powstające na skutek działania związków genotoksycznie aktywnych są główną przyczyną za-



Ryc. 4. Mechanizmy aktywowane przez onkogenne kinazy tyrozynowe (OTKs) w odpowiedzi na uszkodzenia DNA; **A** – w prawidłowych komórkach niski poziom białka antyapoptotycznego Bcl-xL nieefektywnie hamuje uwalnianie cytochromu C z mitochondrium, co jest sygnałem do aktywacji proteaz cysteinowych – kaspaz. Aktywna postać kaspazy 3 jest zdolna degradować RAD51 oraz inne białka odpowiedzialne za naprawę DNA, a niewydajny proces naprawy kieruje komórkę na drogę apoptozy; **B** – w komórkach z ekspresją OTKs hamowanie aktywacji kaspazy 3 poprzez wzrost poziomu antyapoptotycznego białka Bcl-xL podnosi ekspresję białka RAD51. Ponadto, przejściowe zatrzymanie cyklu komórkowego w punkcie G2/M dostarcza dodatkowego czasu na naprawę uszkodzeń DNA; w konsekwencji komórki nowotworowe z ekspresją OTKs nie wchodzi na drogę apoptozy i nabierają zdolności tolerowania uszkodzeń DNA

hamowania podziałów komórek nowotworowych, a zatem stymulacja mechanizmów naprawy DNA może się przyczyniać do indukowania lekooporności w komórkach białaczkowych. Uszkodzenie DNA może powodować aktywację punktu kontrolnego G2/M cyklu komórkowego. W wyniku tego czas przejścia przez kolejne fazy cyklu ko-

mórkowego może zostać wydłużony, dając komórce możliwość naprawy DNA. Przejściowe opóźnienie G2/M wydaje się niezbędnym elementem oporności na uszkodzenia DNA. OTKs mogą wzmacniać ekspresję antyapoptotycznych białek, takich jak Bcl-xL oraz hamować proapoptotyczną funkcję białka Bad. Nadekspresja Bcl-xL może

zapobiegać uwalnianiu cytochromu C z mitochondrium i hamować kaspazę 3. Wzajemne współdziałanie tych mechanizmów może leżeć u podstaw zjawiska lekooporności indukowanej w odpowiedzi na terapię przeciwnowotworową (ryc. 4).

Istotny udział w modulowaniu tej odpowiedzi może mieć stosowanie inhibitorów, takich jak Imatinib, który hamuje stymulowaną przez onkogeną kinazę BCR/ABL naprawę DNA i zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na leki oraz promieniowanie.

PIŚMIENICTWO

- [1] Amarante-Mendes G.P., McGahon A.J., Nishioka W.K., Afar D.E., Witte O.N., Green D.R.: Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*, 1998; 16: 1383–1390
- [2] Amarante-Mendes G.P., Naekyung Kim C., Liu L., Huang Y., Perkins C.L., Green D.R., Bhalla K.: Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*, 1998; 91: 1700–1705
- [3] Bachrati C., Hickson I.: RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J*, 2003; 374: 577–606
- [4] Bartram C.R., de Klein A., Hagemeijer A., van Agthoven T., Geurts van Kessel A., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M.A., Davies T., Stone M.: Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 1983; 306: 277–280
- [5] 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
- [6] Blasiak J., Gloc E., Wozniak K., Mlynarski W., Stolarska M., Skorski T., Majsterek I.: Genotoxicity of idarubicin and its modulation by vitamins C and E and amifostine. *Chem. Biol. Interact.*, 2002; 140: 1–18
- [7] Blume-Jensen P., Hunter T.: Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 2001; 411: 355–365
- [8] Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Müller M., Druker B.J., Lydon N.B.: Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase *in vitro* and *in vivo* by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.*, 1996; 56: 100–104
- [9] Canitrot Y., Falinski R., Louat T., Laurent G., Cazaux C., Hoffmann J.S., Lautier D., Skorski T.: p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood*, 2003; 102: 2632–2637
- [10] Chan T.A., Hermeking H., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.: 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 1999; 401: 616–620
- [11] Dasika G.K., Lin S.C., Zhao S., Sung P., Tomkinson A., Lee E.Y.: DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene*, 1999; 18: 7883–7899
- [12] Deininger M., Goldman J., Melo J.: The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2000; 96: 3343–3356
- [13] Deutsch E., Dugray A., Abdulkarim B., Marangoni E., Maggiorella L., Vaganay S., M'Kacher R., Rasy S.D., Eschwege F., Vainchenker W., Turhan A.G., Bourhis J.: BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood*, 2001; 97: 2084–2090
- [14] Dubrez L., Eymen B., Sordet O., Droin N., Turhan A.G., Solary E.: BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood*, 1998; 91: 2415–2422
- [15] Golub T.R., Barker G.F., Lovett M., Gilliland D.G.: Fusion of PDGFR beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 1994; 77: 307–316
- [16] Golub T.R., Goga A., Barker G.F., Afar D.E., McLaughlin J., Bohlander S.K., Rowley J.D., Witte O.N., Gilliland D.G.: Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol. Cell Biol.*, 1996; 16: 4107–4116
- [17] Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P.N., Sawyers C.L.: Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001; 293: 876–880
- [18] Harrison D.J.: Molecular mechanisms of drug resistance in tumours. *J. Pathol.*, 1995; 175: 7–12
- [19] Havre P., Rice M., Noe M., Kmiec E.: The human REC2/RAD51B gene acts as a DNA damage sensor by inducing G1 delay and hypersensitivity to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.*, 1998; 58: 4733–4739
- [20] Heisterkamp N., Stephenson J.R., Groffen J., Hansen P.F., de Klein A., Bartram C.R., Grosveld G.: Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukemia. *Nature*, 1983; 306: 239–242
- [21] Hoser G., Majsterek I., Romana D.L., Slupianek A., Blasiak J., Skorski T.: Fusion oncogenic tyrosine kinases alter DNA damage and repair after genotoxic treatment: role in drug resistance? *Leuk. Res.*, 2003; 27: 267–273
- [22] Imamura O., Fujita K., Shimamoto A., Tanabe H., Takeda S., Furuichi Y., Matsumoto T.: Bloom helicase is involved in DNA surveillance in early S phase in vertebrate cells. *Oncogene*, 2001; 20: 1143–1151
- [23] Jackson A.L., Loeb L.A.: The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, 2001; 477: 7–21
- [24] Kim J.H., Chu S.C., Gramlich J.L., Pride Y.B., Babendreier E., Chauhan D., Salgia R., Podar K., Griffin J.D., Sattler M.: Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood*, 2005; 105: 1717–1723
- [25] Kolibaba K.S., Druker B.J.: Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997; 1333: F217–F248
- [26] Koptyra M., Falinski R., Nowicki M.O., Stoklosa T., Majsterek I., Nieborowska-Skorska M., Blasiak J., Skorski T.: BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*, 2006; 108: 319–327
- [27] Liu Q., Schwaller J., Kutok J., Cain D., Aster J.C., Williams I.R., Gilliland D.G.: Signal transduction and transforming properties of the TEL-TRKC fusions associated with t(12;15)(p13;q25) in congenital fibrosarcoma and acute myelogenous leukemia. *EMBO J.*, 2000; 19: 1827–1838
- [28] Lohman T., Bjornson K.: Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996; 65: 169–214
- [29] Majsterek I., Blasiak J.: Chromosom Filadelfia. *Post. Biochem.*, 2002; 48: 156–166
- [30] Majsterek I., Blasiak J., Mlynarski W., Hoser G., Skorski T.: Does the bcr/abl-mediated increase in the efficacy of DNA repair play a role in the drug resistance of cancer cells? *Cell. Biol. Int.*, 2002; 26: 363–370
- [31] Majsterek I., Gloc E., Blasiak J., Reiter R.: A comparison of the action of amifostine and melatonin on DNA-damaging effects and apoptosis induced by idarubicin in normal and cancer cells. *J. Pineal Res.*, 2005; 38: 254–263
- [32] Majsterek I., Pytel D., Blasiak J.: Tyrosine kinases. New target of anticancer therapy. *Post. Biochem.*, 2005; 51: 251–260
- [33] Majsterek I., Slupianek A., Hoser G., Skórski T., Blasiak J.: ABL-fusion oncoproteins activate multi-pathway of DNA repair: role in drug resistance? *Biochimie*, 2004; 86: 53–65
- [34] Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B., Dittmer K.G., Shapiro D.N., Saltman D.L., Look A.T.: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 1994; 263: 1281–1284
- [35] Nieborowska-Skorska M., Stoklosa T., Datta M., Czechowska A., Rink L., Slupianek A., Koptyra M., Seferynska I., Krszyna K., Blasiak J., Skorski T.: ATR-Chk1 axis protects BCR/ABL leukemia cells from the lethal effect of DNA double-strand breaks. *Cell Cycle*, 2006; 5: 994–1000
- [36] Nieborowska-Skorska M., Wasik M.A., Slupianek A., Salomoni P., Kitamura T., Calabretta B., Skorski T.: Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 1229–1242
- [37] Nowell P.C., Hungerford D.A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960; 132: 1497–1451
- [38] Nowicki M.O., Falinski R., Koptyra M., Slupianek A., Stoklosa T., Gloc E., Nieborowska-Skorska M., Blasiak J., Skorski T.: BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood*, 2004; 104: 3746–3753

- [39] Ohnishi T., Taki T., Hiraga S., Arita N., Morita T.: *In vitro* and *in vivo* potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 245: 319–324
- [40] Peeters P., Raynaud S.D., Cools J., Wlodarska I., Grosgeorge J., Philip P., Monpoux F., Van Rompaey L., Baens M., Van den Berghe H., Marynen P.: Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*, 1997; 90: 2535–2540
- [41] Salomoni P., Condorelli F., Sweeney S.M., Calabretta B.: Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood*, 2000; 96: 676–684
- [42] Sattler M., Verma S., Shrikhande G., Byrne C.H., Pride Y.B., Winkler T., Greenfield E.A., Salgia R., Griffin J.D.: The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 24273–24278
- [43] Sawyers C.L., Hochhaus A., Feldman E., Goldman J.M., Miller C.B., Ottmann O.G., Schiffer C.A., Talpaz M., Guilhot F., Deininger M.W., Fischer T., O'Brien S.G., Stone R.M., Gambacorti-Passerini C.B., Russell N.H., Reiffers J.J., Shea T.C., Chapuis B., Coutre S., Tura S., Morra E., Larson R.A., Saven A., Peschel C., Gratwohl A., Mandelli F., Ben-Am M., Gathmann I., Capdeville R., Paquette R.L., Druker B.J.: Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*, 2002; 99: 3530–3539
- [44] Sharan S., Morimatsu M., Albrecht U., Lim D., Regel E., Dinh C., Sands A., Eichele G., Hasty P., Bradley A.: Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, 1997; 386: 804–810
- [45] Sillaber C., Gesbert F., Frank D.A., Sattler M., Griffin J.D.: STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*, 2000; 95: 2118–2125
- [46] Slupianek A., Gurdek E., Koptyra M., Nowicki M.O., Siddiqui K.M., Groden J., Skorski T.: BLM helicase is activated in BCR/ABL leukemia cells to modulate responses to cisplatin. *Oncogene*, 2005; 24: 3914–3922
- [47] Slupianek A., Hoser G., Majsterek I., Bronisz A., Malecki M., Blasiak J., Fishel R., Skorski T.: Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 4189–4201
- [48] Slupianek A., Nowicki M.O., Koptyra M., Skorski T.: BCR/ABL modifies the kinetics and fidelity of DNA double-strand breaks repair in hematopoietic cells. *DNA Repair (Amst)*, 2006; 5: 243–250
- [49] Slupianek A., Schmutte C., Tomblin G., Nieborowska-Skorska M., Hoser G., Nowicki M.O., Pierce A.J., Fishel R., Skorski T.: BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol. Cell.*, 2001; 8: 795–806
- [50] Stoklosa T., Slupianek A., Datta M., Nieborowska-Skorska M., Nowicki M., Koptyra M., Skorski T.: BCR/ABL recruits p53 tumor suppressor protein to induce drug resistance. *Cell Cycle*, 2004; 3: 1463–1472
- [51] Sturzbecher H.W., Donzelmann B., Henning W., Knippschild U., Buchhop S.: p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.*, 1996; 15: 1992–2002