

Received: 2007.03.05
Accepted: 2007.06.22
Published: 2007.07.09

Rodzaje śmierci komórki

The types of cell death

Aleksandra Stępień, Magdalena Izdebska, Alina Grzanka

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

Streszczenie

Przez długi okres apoptoza uważana była za główny rodzaj programowanej śmierci komórki. Wyniki prowadzonych w ostatnich latach eksperymentów dowodzą jednak, że stosowane chemioterapeutyki, a także wiele innych czynników, indukować mogą inne od apoptozy typy śmierci komórki. Zalicza się do nich autofagię, katastrofę mitotyczną oraz nekrozę, a w kontekście terapii przeciwnowotworowej, również starzenie. Niniejsza praca ma na celu ogólną charakterystykę wymienionych procesów.

Słowa kluczowe:

apoptoza • nekroza • katastrofa mitotyczna • autofagia • starzenie

Summary

Apoptosis was long considered the major mechanism of programmed cell death. However, results obtained during the last years have proved that chemotherapeutics as well as a number of other factors may induce modes of cell death different from apoptosis. The identified mechanisms include mitotic catastrophe, autophagy, necrosis and, in the context of cancer therapy, senescence. The purpose of the following review is a general description of these processes.

Key words:

apoptosis • necrosis • mitotic catastrophe • autophagy • senescence

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10666.pdf

Word count:

3589

Tables:

1

Figures:

1

References:

98

Adres autorki:

mgr Aleksandra Stępień, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu, ul. Karłowicza, 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: a_stepien@cm.umk.pl



WSTĘP

Najlepiej dotąd poznaną postacią programowanej śmierci komórki była apoptoza, zjawisko niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów fizjologicznych, m.in. rozwoju embrionalnego, funkcjonowania systemu immunologicznego oraz utrzymania homeostazy organizmu. Za nieapoptotyczne rodzaje śmierci komórek uznano katastrofę mitotyczną, nekrozę oraz autofagię. Autofagia wraz z apoptozą są zaliczane do mechanizmów „programowanych”, podczas gdy katastrofa mitotyczna i nekroza uważane były dotychczas za procesy pasywne [63,72]. W kontekście terapii przeciwnowotworowej, do nieapoptotycznych rodzajów śmierci zalicza się również starzenie [72,73]. W pracy skoncentrowano się na ogólnej charakterystyce apoptozy, autofagii, katastrofy mitotycznej, nekrozy oraz starzenia. Klasyfikację wymienionych rodzajów śmierci oparto na różnicach w morfologii oraz cechach biochemicznych umierających komórek (tabela 1).

APOPTOZA

Apoptoza, nazywana programowaną śmiercią komórki, jest procesem fizjologicznym warunkującym prawidłowe funkcjonowanie organizmu, zarówno na etapie embrionalnym, jak i w późniejszym okresie. Już w połowie XIX w. Rudolf Virchow zaobserwował destrukcyjne zmiany na poziomie komórkowym, jednakże nazwał je degeneracją [23,92]. Wprowadzenie stosowanego obecnie terminu przypisuje się Kerrowi oraz jego współpracownikom Wyllie i Currie, którzy opisali przebieg procesu programowanej śmierci oraz zaproponowali obecną nazwę, pochodzącą od greckiego słowa *apoptosis* [35]. W latach 80. i 90. poprzedniego stulecia badania nad apoptozą przeżywały swój rozkwit, a złożoność tego procesu oraz duże znaczenie w nowotworzeniu spowodowały, że obecnie śmiercią komórki zajmują się wiele grup badawczych na świecie.

Proces apoptozy przebiega zawsze według określonego schematu. Pierwszym morfologicznym objawem świadczącym o rozpoczęciu procesu samobójczej śmierci komórki są zmiany na poziomie jądra. Chromatyna ulega kondensacji i umiejscowieniu tuż pod błoną komórkową, następnie dochodzi do obkurczenia całego jądra oraz jego fragmentacji. Kolejny etap „umierania” to kondensacja cytoplazmy oraz tworzenie charakterystycznych pęcherzyków na powierzchni komórki. Z uwypukleń błony komórkowej tworzą się ciała apoptotyczne, które są strukturami zawierającymi chromatynę, cytoplazmę oraz organelle komórkowe. Ostatecznym etapem jest fagocytoza powstałych ciałek [84].

Jak już wcześniej wspomniano, programowana śmierć komórki jest procesem czynnym, wymagającym aktywacji wielu genów oraz nakładu energii. W zależności od rodzaju komórki oraz czynnika indukującego, proces ten może przebiegać w różny sposób, angażując odmienne organelle komórkowe. Dwie najlepiej poznane ścieżki to szlak zewnętrzny (receptorowy), związany z błoną komórkową oraz wewnętrzny przebiegający z udziałem mitochondrium. Wśród innych dróg sygnałowych apoptozy, wymienia się również zaobserwowany w cytotoksycznych limfocytach T oraz komórkach NK – szlak pseudoreceptorowy angażujący perforyny i granzym B, szlak sfingo-

mielinowo-ceramidowy oraz opisany w 2000 r. – związany z reticulum endoplazmatycznym szlak indukowany stresem [8,10,57,72]. Niezależnie od rodzaju przebiegu apoptozy, elementem łączącym wszystkie te szlaki są kaspazy (proteazy cisteinowe), które w zależności od etapu apoptozy, w którym biorą udział, dzielimy na inicjatorowe (indukujące) oraz wykonawcze (efektorowe) [36,81].

ZEWNETRZNY SZLAK APOPTOZY

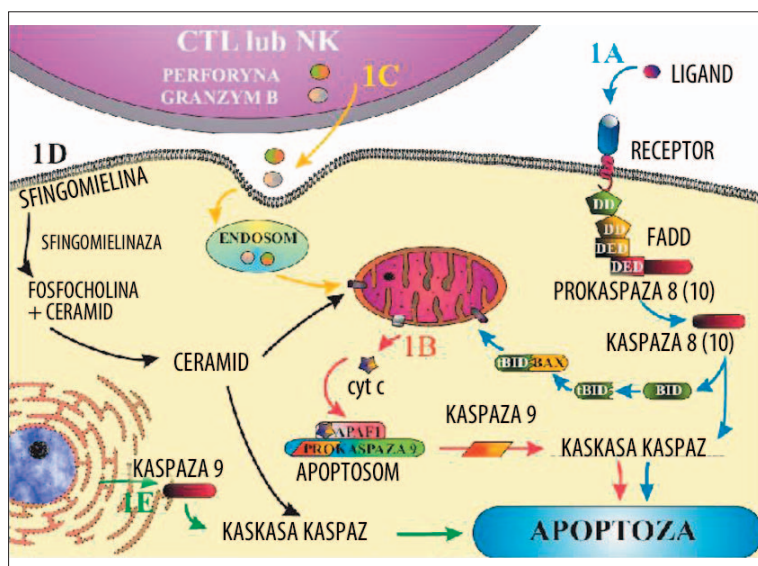
Zewnętrzny szlak programowanej śmierci opiera się głównie na receptorach błonowych oraz ich ligandach. Do receptorów śmierci zaliczamy białka nadrodziny receptorów czynnika nekrozy TNF (tumor necrosis factor), m.in. TNFR1, TNFR2, Fas/CD95/Apo1 lub też TRAIL/Apo2, które są zbudowane z zewnątrzkomórkowych, transbłonowych i cytoplazmatycznych domen [42,47,68]. Po związaniu odpowiedniego liganda z receptorem błonowym (TNF- α , FasL, TRAIL/Apo2L) sygnał śmierci jest przekazywany do białka adaptorowego FADD, które dzięki obecności C-końcowej domeny DD (death domain) łączy się z domeną DD receptora. Na N-końcu łańcucha polipeptydowego białka FADD znajduje się domena DED (death effector domain), która umożliwia połączenie z odcinkiem DED prokaspazy 8 lub 10 (białko efektorowe) [15,37]. Aktywowane kaspazy zapoczątkowują działanie kaskady kaspaz wykonawczych prowadzących do śmierci komórki. Szlak receptorowy może się łączyć z opisywanym poniżej szlakiem wewnętrznym poprzez białko Bid, które ulega proteolizie z powstaniem postaci tBid (truncated Bid). Skrócona postać peptydu przemieszcza się do powierzchni mitochondrium i wpływa na uwalnianie cytochromu c, a tym samym aktywuje szlak wewnętrzny apoptozy [43,91] (ryc. 1A).

WENĘTRZNY SZLAK APOPTOZY

Szlak mitochondrialny jest aktywowany w wyniku wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu (ROS-reactive oxygen species), stresu oksydacyjnego, uszkodzeń DNA, zaburzeń transportu elektrolitów oraz wzrostu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [18,62]. Najważniejszym elementem tego szlaku są oczywiście mitochondria, a dokładniej megakanały (PTP – permeability transition pore) tych organeli, które są umiejscowione na styku dwóch błon. Hipotetycznych modeli budowy oraz powstawania porów mitochondrialnych jest wiele. Pierwszy z nich to PTP zbudowane z ANT (translokaza nukleotydów adeninowych) obecnych w błonie wewnętrznej mitochondrium oraz poryny VDAC i BRP (obwodowy receptor benzodiazepiny) umiejscowionych w błonie zewnętrznej. W odpowiedzi na stresogenne czynniki, kanały mitochondrialne ulegają otwarciu, dzięki czemu zostaje uwolniony do cytoplazmy cytochrom c (Apaf 2) [28,40]. Kolejna z hipotez przedstawia model oparty wyłącznie na działaniu ANT błony wewnętrznej z pęczniącym matriks, co w konsekwencji powoduje przerwanie błony zewnętrznej. Proapoptotycznymi czynnikami w przedstawionej hipotezie są jony wapnia oraz palmityniany. Wpływ na powstawanie porów mitochondrialnych mają również czynniki oddziałujące bezpośrednio z ANT, m.in. białka Bax, Bak oraz Bcl-2 [55]. Następny model opiera się na selektywnej permeabilizacji zewnętrznej błony mitochondrium, powiązanej z wzajemnym oddziaływaniem VDAC i białka Bax [79]. Jeszcze jedna teoria przedstawia działanie samego oligomerycznego

Tabela 1. Cechy charakterystyczne różnych rodzajów śmierci komórek (wg [57, 64])

	Jądro	Cytoplazma	Błona komórkowa	Cechy biochemiczne	Wybrane metody detekcji
Apoptoza	kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA, rozpad jądra	depolimeryzacja cytoskieletu, fragmentacja (formowanie ciałek apoptotycznych)	zaburzenie integralności, tworzenie pączków apoptotycznych	zależna od kaspaz	mikroskopia elektronowa, metoda TUNEL, metoda z zastosowaniem aneksyny V, detekcja spadku potencjału mitochondrialnego
Katastrofa mitotyczna	mikrojądra, fragmentacja jądra	–	–	na wczesnym etapie niezależna od kaspaz, anormalna aktywacja kompleksu CDK1/cykliny B	mikroskopia elektronowa, metoda TUNEL, ocena markerów mitotycznych
Starzenie	skupienia heterochromatyny	zwiększona granularność	splaszczanie, zwiększenie rozmiarów komórki	aktywność β -galaktozydazy	mikroskopia elektronowa, ocena aktywności β -galaktozydazy, oznaczanie ekspresji metaloproteinazy
Autofagia	częściowa kondensacja chromatyny, brak fragmentacji DNA	zwiększona liczba wakuol autofagowych, degradacja: polirybosomów, aparatu Golgiego, reticulum endoplazmatycznego	tworzenie pęcherzyków	niezależna od kaspaz, podwyższona aktywność lizosomów	mikroskopia elektronowa, ocena poziomu degradacji białek, ocena translokacji białek markerowych do błon autofagosomalnych
Nekroza	agregaty chromatyny, przypadkowa degradacja DNA	pęcznienie organelli	rozpad organelli, pęcznienie mitochondriów, wakuolizacja	–	mikroskopia elektronowa, detekcja stanu zapalnego



Ryc. 1. Szlaki apoptozy; 1A – szlak zewnętrzny, 1B – szlak wewnętrzny, 1C – szlak pseudoreceptorowy, 1D – szlak sfgingomielinowo-ceramidowy, 1E – szlak indukowany stresem

go białka Bax, które niezależnie od VDAC tworzy autonomiczny kanał, który prawdopodobnie może być regulowany jedynie przez białko Bid oraz jego krótszą formę tBid

[25]. Niezależnie od modelu budowy kanału, z wnętrza mitochondrium zostaje uwolniony cytochrom c. Związek ten po wypłynięciu z organelli, z udziałem energii, może się



połączyć z cytoplazmatycznym czynnikiem Apaf 1 oraz nieaktywną kaspazą 9. Powstały kompleks zwany apoptosomem lub kołem śmierci aktywuje kaspazę 9 [28,40]. Aktywna proteaza cysteinowa wpływa na działanie kaspaz wykonawczych prowadzących do proteolizy białek i zmian morfologicznych komórki charakterystycznych dla procesu programowanej śmierci.

Jak wszystkie szlaki apoptozy, także i wewnętrzny jest regulowany przez wiele czynników. Oprócz cytochromu c z mitochondrium wpływa około 40 innych białek, a niektóre z nich mają wpływ na dalsze etapy tego procesu [90]. Endonukleaza G oraz flawoproteina AIF są umiejscowione w opisywanej organelli, jednak pod wpływem czynników indukujących programowaną śmierć, przemieszczają się do jądra komórkowego i wpływają na apoptotyczne zmiany jądrowe [20,90,94]. Najliczniejszymi i najbardziej poznаныmi regulatorami apoptozy są białka z rodziny Bcl-2. Zaliczamy do nich zarówno inhibitory apoptozy (m.in. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1), jak i białka promujące programowaną śmierć komórki (m.in. Bid, Bad, Bak, Bax, Noxa) [7,48]. Czynniki antyapoptotycznymi wpływającymi hamująco na działanie kaspaz 3, 7 i 9 są białka IAP, natomiast białko p53 wykazuje właściwości proapoptyczne [41,53,56]. W odpowiedzi na stresogenne czynniki białkowy produkt genu p53 przemieszcza się do mitochondrium i wpływa na zwiększenie przepuszczalności błony oraz uwolnienie cytochromu c, poprzez indukcję ekspresji genów proapoptotycznych białek zależnych od p53, takich jak, Puma, Bax, Apaf-1 czy Noxa [93]. Białko p53 może również wpływać na zahamowanie ekspresji białek antyapoptotycznych do których należą m.in. Bcl-2 i surwiwina [32,96,97] (ryc. 1B).

SZLAK PSEUDORECEPTOROWY

Szlak pseudoreceptorowy zaobserwowano w cytotoksycznych limfocytach T (CTL) oraz w komórkach NK (natural killer), stanowiących istotny element układu immunologicznego człowieka [6,27]. Są kwestie sporne dotyczące zaliczenia tej ścieżki do klasycznej apoptozy w pojęciu programowanej genetycznie śmierci komórki, jednakże wiadomo, że w szlak pseudoreceptorowy są zaangażowane dwa białka – perforyna oraz granzym B (GrB). Początkowo naukowcy twierdzili, że uwalniana z NK lub limfocytów T perforyna tworzy w błonie komórek docelowych kanały, którymi przedostaje się GrB i aktywując kaspazy, wywołuje apoptozę [85]. Już w latach 90 ub.w. okazało się, że pseudoreceptorowa droga śmierci wcale nie jest taka prosta. Owszem, opisywane komórki wytwarzają ww. białka, jednakże udział perforyn we wnikaniu GrB do komórki nie jest taki oczywisty. Badania naukowców ujawniły, że GrB dostaje się do komórki za pośrednictwem endocytozy lub przenika przez błonę komórkową dzięki obecności w jej strukturze receptora mannozo-6-fosforanu [50,69,77]. Powstałe w komórce endosomy zawierają granzym B, który uwalniany tnie białko Bid do postaci tBid, wiążącej się z białkiem Bax. Następnym etapem aktywacji śmierci komórki jest przyłączenie białka Bax do powierzchni mitochondrium i uruchomienie ścieżki apoptozy z udziałem tej organelli [50] (ryc. 1C). W apoptotycznej śmierci komórki bierze udział także granzym A (GrA). Jest on także wytwarzany przez cytotoksyczne limfocyty T oraz komórki NK i wnika do komórki poprzez nie do końca jeszcze pozna-

ny mechanizm związany z perforynami. Śmierć komórki z udziałem granzymu A i porfiryny jest związana z jądrem komórkowym i nie angażuje kaspaz. Czynniki indukującymi ten rodzaj śmierci są przede wszystkim zaburzenia w potencjale błonowym mitochondrium oraz wzrost reaktywnych form tlenu (ROS). Podwyższony poziom ROS prawdopodobnie wpływa na translokację kompleksu SET (kompleks powiązany z reticulum endoplazmatycznym) do jądra komórkowego. Wspomniany kompleks zawiera związki będące substratami dla GrA – białko SET, HMG-2 oraz endonukleazę Ape1. Przeniesiony do jądra komórkowego granzym A tnie laminy, histon H1, końce rdzenia histonów oraz wspomniany wcześniej kompleks SET. Na tak „przygotowaną” chromatynę działa DNA-za, uaktywniana dzięki jednemu ze składników kompleksu SET. Pocięcie DNA powoduje zmiany w jądrze komórkowym, a tym samym jest pierwszym objawem morfologicznym apoptozy [45].

SZLAK SFINGOMIELINOWO-CERAMIDOWY

W wyniku narażenia komórek na działanie głównie promieniowania jonizującego, a także przy braku czynników wzrostu czy infekcjach wirusowych, może dojść do aktywowania szlaku sfingomielinowo-ceramidowego. Opisywany szlak apoptozy wiąże się ze wzrostem stężenia ceramidów w komórce, co jest wynikiem połączenia odpowiedniego liganda z receptorem rodziny TNF, m.in. FAS, IL-1, a następnie aktywacji kwaśniej lub obojętnej sfingomielinazy [46,88,89]. Enzym ten tnie jeden z lipidów błonowych – sfingomielinę na ceramid i fosfocholinę [5]. Pierwszy ze składników hydrolizy sfingomieliny, pod wpływem działania czynników apoptotycznych, syntetyzowany jest także *de novo*. Ceramid pełni rolę lipidowego, wtórnego przekaźnika śmierci, który może aktywować kinazy CAPK (ceramide-activated protein kinases), MAPK (mitogen-activated protein kinases), kaskady kinaz SAPK/JNK (stress associated protein kinase/Jun N-terminal kinase) oraz fosfatazy CAPP (ceramide-activated protein phosphatase) i fosfolipazę A₂ [66,67,75]. „Wybór” adaptera przez ceramid jest zależny od czynnika indukującego ten proces oraz rodzaju sfingomielinazy (kwaśna lub obojętna). Ceramidy mogą aktywować także inne procesy komórkowe, oraz wpływać na aktywację wewnętrznej ścieżki apoptozy poprzez zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c. Badania przeprowadzone w 2001 r. na komórkach HeLa ujawniły również, że wszystkie czynniki obniżające stężenie wapnia w reticulum endoplazmatycznym chronią komórki przed działaniem ceramidu, natomiast wzrost jonów CA²⁺ w ER działa odwrotnie [70] (ryc.1D).

SZLAK INDUKOWANY STRESEM

W 2000 r. przedstawiony został nowy mechanizm apoptozy [58]. W ten rodzaj śmierci zaangażowane są reticulum endoplazmatyczne i kaspaza 12, zlokalizowana w błonach ER. Powodem aktywacji programowanej śmierci komórki z udziałem tej organelli jest zaburzenie homeostazy jonów wapnia oraz nagromadzenie w niej nieprawidłowo zmodyfikowanych lub niewłaściwie sfałdowanych białek, które z powodu tych błędów nie są eksportowane z ER. Początkowo badania przeprowadzone na myszach z wyłączeniem kaspazy 12 ujawniły, że aktywacja tej proteazy

cysteinowej nie jest zależna od pozostałych ww. rodzajów śmierci komórkowej, a uaktywniona kaspaza 12 prawdopodobnie bezpośrednio wpływa na kaspazy wykonawcze, które ostatecznie „realizują” proces apoptozy. W 2006 r. Shiraiishi i wsp. [80] wykazali jednak, że białko Apaf-1 oraz ścieżka mitochondrialna odgrywają ważną rolę w indukcji apoptozy z udziałem ER. Badania tych naukowców ujawniły, że w mysich fibroblastach Apaf-1^{-/-} stwierdzono mniejszą podatność na czynniki indukujące apoptozę zależną od kaspazy 12 [80].

Szlak indukowany stresem jest stosunkowo niedawno odkryty, jednak już wiadomo, że w przypadku choroby Alzheimera apoptoza neuronów przebiega właśnie tą drogą [58] (ryc. 1E).

NEKROZA

W odróżnieniu od programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy nekroza jest procesem biernym i patologicznym. Ten rodzaj śmierci zachodzi pod wpływem zarówno czynników fizycznych, chemicznych jak i biologicznych, m.in. wywołany jest przez niską i wysoką temperaturę, promieniowanie UV i γ , a także toksyny bakteryjne. Aby doszło do tego typu śmierci czas działania oraz natężenie szkodliwych czynników musi przekroczyć próg odporności tych komórek. Nekroza dotyczy grupy komórek, które pęcznią i tracą ciągłość błony komórkowej [52,87]. W komórkach, które mają ulec śmierci nekrotycznej drastycznie spada poziom ATP, który jest niezbędny do prawidłowego przebiegu wielu procesów. Deficyt ATP następuje w wyniku depolaryzacji błony mitochondrium, czego konsekwencją są zaburzenia w transporcie elektronów [86,87]. Nie tylko funkcja i budowa mitochondrium ulegają zmianom. Destrakcja dotyczy także innych organeli, m.in. reticulum endoplazmatycznego, polisomów, jądra komórkowego oraz lizosomów. W wyniku zaburzeń w strukturze błony komórkowej dochodzi do biernego napływu wody i jonów (głównie wapnia i sodu) do wnętrza komórki. Pojawienie się dużej ilości jonów Ca^{2+} w cytosolu (napływ z zewnątrz oraz wypływ z ER), jest uważane za typowy objaw nekrozy [4]. Wzrost stężenia ww. jonów wpływa na aktywację nukleaz, które tną DNA, a jądro komórkowe ulega dezintegracji. Zaburzeniu ulegają również inne struktury komórki, ponieważ zostają uwolnione enzymy hydrolityczne z pękających lizosomów. Napęczniała coraz bardziej komórka i jej organella ulegają rozpadowi, a cała zawartość jest uwalniana do przestrzeni międzykomórkowej. Rozlane składniki komórkowe wywołują odczyn zapalny, którego brak w przypadku apoptozy [72].

KATASTROFA MITOTYCZNA

Definicja katastrofy mitotycznej (śmierci mitotycznej) jest wciąż przedmiotem intensywnej dyskusji. Jedną z ostatnich zaproponowanych jest „śmierć komórki zachodząca podczas mitozy w rezultacie połączenia niesprawnego funkcjonowania punktów kontrolnych cyklu komórkowego i uszkodzenia komórki” [12]. W trakcie takiej mitozy nie zachodzi prawidłowa segregacja chromosomów oraz podział. Formowane są natomiast komórki tetraploidalne (w konsekwencji pojedynczego cyklu komórkowego), bądź o wyższej ploidalności (kilka cykli komórkowych) [2,34,54]. Część badaczy sugeruje, że katastrofa mitotycz-

na nie powinna być definiowana jako odrębny rodzaj śmierci, ale jako nieprawidłowa mitoza, która prowadzi do niej poprzez nekrozę bądź apoptozę [16,72].

Śmierć mitotyczną charakteryzuje brak bądź opóźnienie wejścia komórki w G_1/S – punkt kontrolny cyklu komórkowego, brak apoptozy związanej z G_1/S , zatrzymanie komórek w fazie G_2 cyklu. Objawami śmierci mitotycznej jest również pasmo aberracji chromosomowych, fragmentacja jądra oraz formowanie dużych komórek zawierających jedno duże jądro (mono-nucleated giant cells MONGC) bądź kilka mniejszych jąder (multi-nucleated giant cells MNOC) [22–24,63,72]. Komórki ulegające katastrofie mitotycznej nie wykazują fragmentacji DNA typowej dla apoptozy, czy pęknięć DNA wykrywanych metodą TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) [14,21,31,59,73]. Kaspazy oraz szlaki sygnałowe indukowane stresem, takie jak JNK, p38, NF- κ B, charakterystyczne dla apoptozy, pozostają nieaktywne podczas katastrofy mitotycznej [21]. Część badaczy sugeruje jednak, że apoptoza może zachodzić bez aktywacji kaspaz, a inhibicja tych białek, która nie zapobiega śmierci komórki, nie stanowi argumentu, który pozwałaby na postrzeganie tego rodzaju śmierci jako nieapoptotycznej [12].

Komórki eukariotyczne mają kompleksowy mechanizm monitorujący strukturę chromosomów, aktywujący w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wiele szlaków sygnałowych. Prowadzi to do zatrzymania cyklu komórkowego w określonych punktach kontrolnych i zahamowania jego progresji do czasu aż uszkodzenia DNA zostaną naprawione [72]. Wyodrębnia się następujące punkty kontrolne: G_1/S (decydujące o wejściu komórki w fazę S), intra-S lub replikacji, G_2/M (wejście w fazę M) oraz punkt kontrolny orientacji wrzeciona podziałowego [73,74,82]. Punkt G_1/S pozwala na naprawę DNA w okresie poprzedzającym replikację, natomiast G_2/M przed segregacją chromosomów. Gen supresorowy nowotworzenia p53 pełni integralną funkcję w mechanizmie regulującym funkcjonowanie punktów kontrolnych G_1/S i G_2/M . Indukuje transkrypcję wielu białek regulujących progresję cyklu komórkowego. Wśród nich wyodrębnia się p21^{WAF1} oraz 14-3-3 δ , które są aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenia genomu. P21^{WAF1} jest niezbędny do zatrzymania cyklu w fazie G_1 . Inhibicja progresji cyklu w fazie G_2 wymaga zarówno p21^{WAF1} jak i 14-3-3 δ [12,22].

Większość komórek nowotworowych ma nieaktywny punkt kontrolny na pograniczu faz G_1/S , co uniemożliwia zatrzymanie cyklu w fazie G_1 po zadziałaniu czynników uszkodzających DNA i prowadzi do przejściowej akumulacji komórek w fazie G_2 . Ze względu na to, że komórki nowotworowe mają również często nieaktywny G_2/M , stają się niezdolne do zatrzymania cyklu w fazie G_2 , co prowadzi do wejścia komórek na drogę mitozy, a w konsekwencji do śmierci mitotycznej [13,73]. W ostatnich latach kilka grup badawczych zwróciło uwagę na istnienie zależności między uszkodzeniem punktu kontrolnego orientacji wrzeciona podziałowego a opornością komórek na stosowane chemioterapeutyki skierowane przeciwko mikrotubulom [1,83]. Wskazuje się, że brak aktywnego genu p53, występujący wraz z jednoczesnym uszkodzeniem punktu kontrolnego orientacji wrzeciona podziałowego, może powodować oporność komórek na cytostatyki. Punkt ten wydaje



się niezbędny do zatrzymania komórek podczas metafazy, a ostatecznie do przebiegu katastrofy mitotycznej [61].

Najnowsze rezultaty kolejnych badań dowodzą, że nieprawidłowa mitozą zachodząca w odpowiedzi na uszkodzenia DNA może być powiązana z nieprawidłową duplikacją centrosomów, struktur będących ośrodkiem formowania mikrotubul wrzeciona podziałowego. Takie czynniki jak hipertermia czy promieniowanie mogą indukować wielokrotną duplikację centrosomów, a w konsekwencji wielobiegunową mitozę oraz formowanie komórek zawierających kilka mikrojąder [59,73].

Uszkodzenia prowadzące do śmierci mitotycznej to w szczególności czynniki powodujące hiperpolaryzację mikrotubul (takie jak taksany, epitolony) bądź powodujące ich depolimeryzację (takie jak alkaloidy vinca, kolchicina) [12]. Do indukatorów katastrofy mitotycznej zalicza się również hipertermię oraz promieniowanie jonizujące [33,51,59,73]. Może ona zostać ponadto wywołana przez supresję pewnych genów punktu kontrolnego G₂/M, m.in.: ATR, ATM, Chk1, Chk2, kinazy Plk 1, Plk 2, Plk 3, Pin 1, Mlh1 oraz 14-3-3 δ [12,63] a także przez zastosowanie chemicznych inhibitorów G₂/M, takich jak kofeina, UCN-01 oraz kwas okadaikowy [73]. Dowiedziono ponadto, że inaktywacja surwiwiny, białka zaangażowanego m.in. w regulację przebiegu podziału komórki, prowadzi do katastrofy mitotycznej niezależnie od Bcl-2 oraz p53, dzięki czemu stanowi obiecujący cel w terapii przeciwnowotworowej [63].

Sugerowane są dwa niezależne mechanizmy prowadzące do katastrofy mitotycznej w komórkach nowotworowych. Pierwszy z nich, tzw. „wczesna” postać katastrofy mitotycznej zachodzi w komórkach, które wchodzi w proces podziału zaraz po zadziałaniu czynnika uszkodzającego DNA, zanim zakończony zostanie proces replikacji materiału genetycznego oraz synteza białek kontrolujących prawidłowy przebieg mitozy. Potęgowana jest działaniem czynników osłabiających działanie punktu kontrolnego G₂/M cyklu komórkowego (m.in. kofeina, UCN-01). Drugim z zaproponowanych mechanizmów jest „opóźniona” katastrofa, występująca w komórkach nowotworowych wchodzących w cykl podziałowy, który został poprzedzony zatrzymaniem wzrostu komórek po zadziałaniu określonych czynników (m.in. taksolu). Uważa się, że zatrzymanie wzrostu komórek jest ściśle związane z ekspresją p21^{PWAF1} [73].

AUTOFAGIA

W prawidłowych komórkach zbędne białka ulegają degradacji z udziałem dwóch niezależnych mechanizmów. Jednym z nich jest proteoliza zależna od ubikwityny zachodząca w proteasomach, drugim – autofagia określana również jako II typ programowanej śmierci komórki (PCD) [78], mniej selektywny mechanizm kierujący białka o długim okresie półtrwania oraz inne komponenty organelli do lizosomów, gdzie ulegają degradacji [9,63].

Autofagia, będąca ewolucyjnie konserwatywnym procesem występującym we wszystkich komórkach eukariotycznych, aktywowana jest m.in. w odpowiedzi na niedobór czynników odżywczych, uszkodzenia powodowane przez toksyny komórkowe oraz na skutek działania czynników indukujących rozwój i różnicowanie [63,72]. W warunkach fizjolo-

gicznych występuje ona w niewielkim stopniu w większości tkanek. Przyczynia się do adaptacji komórek do warunków stresowych i tym samym do ich przeżycia [72].

Do głównych typów autofagii zalicza się makroautofagię oraz mikroautofagię. Makroautofagia zachodzi z formowaniem autofagosomu, który to, ulegając fuzji z pierwotnym lizosomem, tworzy autofagolizosom. Mikroautofagia jest definiowana natomiast jako proces inkorporacji komponentów cytoplazmatycznych poprzez inwaginację błony lizosomalnej [39].

Makroautofagia przez usuwanie zbędnych czy nieprawidłowych struktur komórkowych pełni znaczącą rolę w utrzymaniu homeostazy komórki. Istnieją dowody świadczące o powiązaniu tego procesu ze stanami chorobowymi. Zanotowano podwyższony poziom autofagii w neurodegeneracyjnej chorobie Parkinsona [3]. Spadek intensywności tego procesu dowiedziono natomiast w pewnych rodzajach nowotworów, czy chorobie serca (choroba Danone'a) [60,76]. Wyniki innych badań sugerują natomiast, że proces autofagii przyczynia się do wzrostu przeżywalności komórek nowotworowych w warunkach stresowych (promieniowanie jonizujące) poprzez eliminowanie uszkodzonych organelli [17,54].

Większość poznanych dotychczas genów kontrolujących proces autofagii (ATGs) zostało zidentyfikowanych podczas genetycznych analiz komórek drożdży. Wyodrębniono 16 genów regulujących autofagię u drożdży, z których duża część jest konserwatywna u innych organizmów [63]. Główną rolę autofagii w regulacji niekontrolowanego podziału komórek, charakterystycznego dla komórek nowotworowych wiąże się z genem supresorowym nowotworów beklina 1, niezbędnym w procesie formowania autofagosomu [44,72]. Dowiedziono, że beklina 1, będąca homologiem drożdżowego białka ATG6 oddziałuje z białkiem antyapoptotycznym Bcl-2, które zapobiega zależnemu od Bax uwolnieniu mitochondrialnego cytochromu c [38,65,78]. Wykazano, że zaburzenie funkcji genu beklina 1 prowadzi do podwyższonej karcenogenezy w komórkach myszy [71,98], a spadek poziomu kodowanego przez ten gen białka jest skorelowany z rozwojem nowotworów piersi [38].

STARZENIE

Hayflick i Moorehead wykazali, że komórki w hodowli ulegają ograniczonej liczbie podziałów, po których następuje trwałe zatrzymanie cyklu komórkowego [30]. Zasugerowano, że opisany proces, nazwany starzeniem replikacyjnym, zachodzi również *in vivo*, w ciągu całego życia organizmu. Obecnie uważa się, że starzenie replikacyjne jest wynikiem stopniowego skracania telomerów umiejscowionych na końcach chromosomów. Zjawisko to może ulec zahamowaniu, m.in. dzięki aktywności rybonukleoproteiny – telomerazy, co prowadzi do powstania „nieśmiertelnych” komórek nowotworowych [63,73]. Po każdym podziale telomery ulegają stopniowemu skracaniu, które zachodzi na skutek utraty sekwencji nukleotydów powtarzających się w telomerach (TTAGGG). Większość dojrziałych komórek somatycznych ma niewystarczającą ilość enzymu telomerazy, a co się z tym wiąże brak możliwości syntezy *de novo* powtórzeń telomerowych i przyłączania ich do końców chromosomów [29,72]. Uważa się, że skró-

cenie telomerów wykraczające poza określoną krytyczną wartość, prowadzi do uszkodzenia DNA i tym samym aktywuje punkt kontrolny regulowany przez białko p53 oraz zatrzymanie cyklu komórkowego [19,72].

Drugi rodzaj starzenia, nazywany „przedwczesnym”, „przyspieszonym”, bądź „starzeniem indukowanym stresem”, wywołany jest przez wiele czynników, m.in. nieodpowiednie warunki prowadzenia kultur komórkowych czy chemioterapeutyki, i zachodzi niezależnie od skracania sekwencji telomerowych [19,72,73]. Uważa się, że przedwczesne starzenie, stanowi – podobnie jak apoptoza – programowany mechanizm obronny komórek zdrowych, uruchamiany w odpowiedzi na działanie czynników indukujących powstawanie mutacji, a tym samym zapobiega rozwojowi nowotworu [11,49,73,95].

Pomimo znacznych różnic między starzeniem „replikacyjnym” a „przyspieszonym”, oba typy mają charakterystyczne cechy fenotypowe, takie jak: spłaszczenie komórki, zwiększenie jej rozmiarów, podwyższoną aktywność β -galaktozydazy [63,72,73].

Proces starzenia wymaga aktywacji wielu inhibitorów cyklu komórkowego, a komórka powinna zawierać funkcjonalne p53, P21^{WAF1} oraz p16^{INK4A} oraz białka retinoblastoma (Rb) [63]. Udział wymienionych supresorów procesu nowotworzenia w procesie starzenia potwierdza jego rolę jako mechanizmu mającego na celu powstrzymanie rozwoju nowotworu. Ze względu na często występujące braki aktywnej postaci genów p53, p16 oraz nadekspresję telomerazy w komórkach nowotworowych, nie ulegają one procesowi starzenia. Rezultaty wielu badań dowiodły jednak, że może on zostać wywołany w wielu nowotworowych liniach komórkowych przez traktowanie komórek

takimi czynnikami jak wywołujące zmiany w DNA: doxorubicyna, cisplatyna, promieniowanie jonizacyjne czy etopozyd. Czynniki oddziałujące na mikrotubule, m.in. winkrystyna i taksole indukują podobne zmiany, jednak w mniejszym stopniu [73]. Otrzymane rezultaty są zależne od dawek stosowanych terapeutów. Dowiedzono np, że śmierć komórek raka wątroby zachodząca po ich traktowaniu doxorubicyną o małym stężeniu, poprzedzona była występowaniem komórek starzejących się (podwyższona ekspresja β -galaktozydazy), które ostatecznie uległy katastrofie mitotycznej. Zastosowanie dużej dawki tego samego cytostatyku prowadziło do śmierci komórki w wyniku apoptozy [21].

PODSUMOWANIE

Informacje przedstawione w pracy dowodzą, że apoptoza stanowi jedynie jeden z mechanizmów śmierci komórki, a wiele komórek, w tym większość nowotworowych, umiera także w wyniku nekrozy, katastrofy mitotycznej czy autofagii. Co interesujące, doświadczenia przeprowadzone na kilku liniach nowotworowych wykazały, że inhibicja procesu apoptozy przy jednoczesnej indukcji nieapoptycznych rodzajów śmierci, nie zwiększyła przeżywalności komórek [73]. Wydaje się zatem, że strategia mająca na celu indukowanie innych rodzajów śmierci, może stanowić istotne uzupełnienie standardowo stosowanych terapii. Trzeba jednak podkreślić, że wiedza na ten temat pozostaje niekompletna. Istnieje szansa, że prowadzone szczegółowe analizy mające na celu poznanie molekularnych podstaw opisanych procesów oraz stopnia, w jakim pozostają one zależne, przyczynią się nie tylko do opracowania wydajnych metod leczenia nowotworów, ale również pozwolą zminimalizować działania nieporządane, stosowanych dotychczas.

PIŚMIENICTWO

- [1] Anand S., Penrhyn-Lowe S., Venkitesan A.R.: AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell*, 2003; 3: 51–62
- [2] Andreassen P.R., Lacroix F.B., Lohez O.D., Margolis R.L.: Neither p21^{WAF1} nor 14-3-3 δ prevents G₂ progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21^{WAF1} induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells. *Cancer Res.*, 2001; 61: 7660–7668
- [3] Anglade P., Vyas S., Hirsch E.C., Agid Y.: Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol. Histopathol.*: 1997; 12: 603–610
- [4] Bano D., Young K.W., Guerin C.J., Lefevre R., Rothwell N.J., Naldini L., Rizzuto R., Carafoli E., Nicotera P.: Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell*, 2005; 120: 275–285
- [5] Barak A., Morse L.S., Goldkorn T.: Ceramide: a potential mediator of apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42: 247–254
- [6] Barry M., Bleackley R.C.: Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 401–409
- [7] Borner C.: The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*, 2003; 39: 615–647
- [8] Bratton S.B., Walker G., Roberts D.L., Cain K., Cohen G.M.: Caspase-3 cleaves Apaf-1 into an approximately 30 kDa fragment that associates with an inappropriately oligomerized and biologically inactive approximately 1.4 MDa apoptosome complex. *Cell Death Differ.*, 2001; 8: 425–433
- [9] Broker L.E., Krut F.A., Giaccone G.: Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 3155–3162
- [10] Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M.: The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 2002; 84: 203–214
- [11] Campisi J.: Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo.*, 2000; 14: 183–188
- [12] Castedo M., Perfettini J.L., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemer G.: Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 2004; 23: 2825–2837
- [13] Chan T.A., Hermeking H., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B.: 14-3-3 δ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 1999; 401: 616–620
- [14] Chang B.D., Broude E.V., Dokmanovic M., Zhu H., Ruth A., Xuan Y., Kandel E.S., Lausch E., Christov K., Roninson I.B.: A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.*, 1999; 59: 3761–3767
- [15] Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M.: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 1995; 81: 505–512
- [16] Chu K., Teele N., Dewey M.W., Albright N., Dewey W.C.: Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3 δ and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiat. Res.*, 2004; 162: 270–286
- [17] Cuervo A.M.: Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell. Biol.*, 2004; 14: 70–77
- [18] Daniel P.T.: Dissecting the pathways to death. *Leukemia*, 2000; 14: 2035–2044
- [19] Dimri G.P.: What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, 2005; 7: 505–512



- [20] Dlamini Z., Mbata Z., Zungu M.: Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol. Ther.*, 2004; 101: 1–15
- [21] Eom Y.W., Kim M.A., Park S.S., Goo M.J., Kwon H.J., Sohn S., Kim W.H., Yoon G., Choi K.S.: Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*, 2005; 24: 4765–4777
- [22] Erenpreisa J., Cragg M.S.: Mitotic death: a mechanism of survival? A review. *Cancer Cell Int.*, 2001; 1: 1
- [23] Erenpreisa J., Kalejs M., Cragg M.S.: Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. *Cell Biol. Int.*, 2005; 29: 1012–1018
- [24] Erenpreisa J., Kalejs M., Ianzini F., Kosmacek E.A., Mackey M.A., Emzish D., Cragg M.S., Ivanov A., Illidge T.M.: Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe. *Cell Biol. Int.*, 2005; 29: 1005–1011
- [25] Eskes R., Desagher S., Antonsson B., Martinou J.C.: Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 929–935
- [26] Geske F.J., Gerschenson L.E.: The biology of apoptosis, *Human Pathol.*, 2001; 32: 1029–1038
- [27] Godfrey D.I., Hammond K.J., Poulton L.D., Smyth M.J., Baxter A.G.: NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today*, 2000; 21: 573–583
- [28] Grądzka I.: Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post. Biochem.*, 2000; 46: 2–16
- [29] Greenberg R.A.: Telomeres, crisis and cancer. *Curr. Mol. Med.*, 2005; 5: 213–218
- [30] Hayflick L., Moorhead P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 1961; 25: 585–621
- [31] He Q.Y., Liang Y.Y., Wang D.S., Li D.D.: Characteristics of mitotic cell death induced by enediyne antibiotic lidamycin in human epithelial tumor cells. *Int. J. Oncol.*, 2002; 20: 261–266
- [32] 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
- [33] Hut H.M., Kampinga H.H., Sibon O.C.: Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol. Biol. Cell*, 2005; 16: 3776–3785
- [34] Ivanov A., Cragg M.S., Erenpreisa J., Emzish D., Lukman H., Illidge T.M.: Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 4095–4106
- [35] 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
- [36] Kiljańska Z.M., Miśkiewicz A.: Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 129–152
- [37] Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., Peter M.E.: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.*, 1995; 14: 5579–5588
- [38] Klionsky D.J., Emr S.D.: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 2000; 290: 1717–1721
- [39] Klionsky D.J., Ohsumi Y.: Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1999; 15: 1–32
- [40] Kroemer G.: Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 433–435
- [41] LeBlanc A.C.: Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 2003; 27: 215–229
- [42] LeBlanc H.N., Ashkenazi A.: Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ.*, 2003; 10: 66–75
- [43] Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J.: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 1998; 94: 491–501
- [44] Liang X.H., Jackson S., Seaman M., Brown K., Kempkes B., Hibshoosh H., Levine B.: Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 1999; 402: 672–676
- [45] Lieberman J., Fan Z.: Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2003; 15: 553–559
- [46] Lin C.F., Chen C.L., Lin Y.S.: Ceramide in apoptotic signaling and anticancer therapy. *Curr. Med. Chem.*, 2006; 13: 1609–1616
- [47] Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J.: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001; 104: 487–501
- [48] Lucken-Ardjomande S., Martinou J.C.: Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *CR Biol.*, 2005; 328: 616–631
- [49] Lynch M.D. How does cellular senescence prevent cancer? *DNA Cell Biol.*, 2006; 25: 69–78
- [50] MacDonald G., Shi L., Vande Velde C., Lieberman J., Greenberg A.H.: Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 131–144
- [51] Mackey M.A., Ianzini F.: Enhancement of radiation-induced mitotic catastrophe by moderate hyperthermia. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2000; 76: 273–280
- [52] Majno G., Joris I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 1995; 146: 3–15
- [53] Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M.: Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 16202–16212
- [54] Margottin-Goguet F., Hsu J.Y., Loktev A., Hsieh H.M., Reimann J.D., Jackson P.K.: Prophase destruction of Emi1 by the SCF^{βTrCP/Slimb} ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev. Cell*, 2003; 4: 813–826
- [55] Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jurgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prevost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C., Kroemer G.: Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 1998; 281: 2027–2031
- [56] Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U.M.: p53 has a direct apoptogenic role at mitochondria. *Mol. Cell*, 2003; 11: 577–590
- [57] Mróz P., Młynarczuk I.: Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post. Biol. Kom.*, 2003; 30: 113–128
- [58] Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J.: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 2000; 403: 98–103
- [59] Nakahata K., Miyakoda M., Suzuki K., Kodama S., Watanabe M.: Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumor cells. *Int. J. Hyperthermia*, 2002; 18: 332–343
- [60] Nishino I., Fu J., Tanji K., Yamada T., Shimojo S., Koori T., Mora M., Riggs J.E., Oh S.J., Koga Y., Sue C.M., Yamamoto A., Murakami N., Shanske S., Byrne E., Bonilla E., Nonaka I., DiMauro S., Hirano M.: Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*, 2000; 406: 906–910
- [61] Nitta M., Kobayashi O., Honda S., Hirota T., Kuninaka S., Marumoto T., Ushio Y., Saya H.: Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene*, 2004; 23: 6548–6558
- [62] Ockner R.K.: Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2001; 16: 248–260
- [63] Okada H., Mak T.W.: Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 592–603
- [64] Paglin S., Hollister T., Delohery T., Hackett N., McMahon M., Spiccas E., Domingo D., Yahalom J.: A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.*, 2001; 61: 439–444
- [65] Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X.H., Mizushima N., Packer M., Schneider M.D., Levine B.: Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005; 122: 927–939
- [66] Perry D.K.: Ceramide and apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 1999; 27: 399–404
- [67] Perry D.K., Hannun Y.A.: The role of ceramide in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1436: 233–243
- [68] Peter M.E., Krammer P.H.: The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.*, 2003; 10: 26–35
- [69] Pinkoski M.J., Hobman M., Heibein J.A., Tomaselli K., Li F., Seth P., Froelich C.J., Bleackley R.C.: Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood*, 1998; 92: 1044–1054
- [70] Pinton P., Ferrari D., Rapizzi E., Di Virgilio F., Pozzan T., Rizzuto R.: The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.*, 2001; 20: 2690–2701

- [71] Qu X., Yu J., Bhagat G., Furuya N., Hibshoosh H., Troxel A., Rosen J., Eskelinen E.L., Mizushima N., Ohsumi Y., Cattoretti G., Levine B.: Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1809–1820
- [72] Ricci M.S., Zong W.X.: Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*, 2006; 11: 342–357
- [73] Roninson I.B., Broude E.V., Chang B.D.: If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updat.*, 2001; 4: 303–313
- [74] Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K., Linn S.: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004; 73: 39–85
- [75] Sawai H., Okazaki T., Yamamoto H., Okano H., Takeda Y., Tashima M., Sawada H., Okuma M., Ishikura H., Umehara H.: Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 27326–27331
- [76] Schulte-Hermann R., Bursch W., Grasl-Kraupp B., Marian B., Torok L., Kahl-Rainer P., Ellinger A.: Concepts of cell death and application to carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.*, 1997; 25: 89–93
- [77] Shi L., Mai S., Israels S., Browne K., Trapani J.A., Greenberg A.H.: Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J. Exp. Med.*, 1997; 185: 855–866
- [78] Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C.B., Tsujimoto Y.: Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.*, 2004; 6: 1221–1228
- [79] Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y.: Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999; 399:483–487
- [80] Shiraishi H., Okamoto H., Yoshimura A., Yoshida H.: ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 3958–3966
- [81] Smolewski P.: Rola kaspaz w procesie apoptozy. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2003; 57: 335–354
- [82] Su T.T.: Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu. Rev. Genet.*, 2006; 40: 187–208
- [83] Sudo T., Nitta M., Saya H., Ueno N.T.: Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2502–2508
- [84] Sulejczyk D.: Apoptoza i metody jej identyfikacji. *Post. Biol. Kom.*, 2000; 27: 527–568
- [85] Trapani J.A., Smyth M.J.: Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002; 2: 735–747
- [86] Trump B.F., Berezsky I.K.: Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.*, 1995; 9: 219–228
- [87] Trump B.F., Berezsky I.K., Chang S.H., Phelps P.C.: The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol.*, 1997; 25: 82–88
- [88] Van Blitterswijk W.J., Van der Luit A.H., Caan W., Verheij M., Borst J.: Sphingolipids related to apoptosis from the point of view of membrane structure and topology. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001; 29: 819–824
- [89] Van Blitterswijk W.J., Van der Luit A.H., Veldman R.J., Verheij M., Borst J.: Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.*, 2003; 369: 199–211
- [90] Van Gurp M., Festjens N., Van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P.: Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 304: 487–497
- [91] Van Mau N., Kajava A.V., Bonfils C., Martinou J.C., Harricane M.C.: Interactions of Bax and tBid with lipid monolayers. *J. Membr. Biol.*, 2005; 207: 1–9
- [92] Virchow R. Passive processes. Fatty degeneration, in *Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology*. London, England Dover Publications 1863, 356–382
- [93] Vousden K.H., Lu X.: Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 594–604
- [94] Widlak P., Li L.Y., Wang X., Garrard W.T.: Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and Dnase I. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 48404–48409
- [95] Wright W.E., Shay J.W.: Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001; 11: 98–103
- [96] 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
- [97] Yu J., Zhang L.: The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 331: 851–858
- [98] Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A.J., Heintz N.: Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 15077–15082

