

## **APOPTOZA – CEL UKIERUNKOWANEJ TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ\***

### **APOPTOSIS – TARGETED ANTICANCER THERAPY**

Małgorzata STAŃCZYK, Ireneusz MAJSTEREK

Katedra Genetyki Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,  
Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Apoptoza jest główną formą samobójczej śmierci komórek. Większość standardowych terapii przeciwnowotworowych jest oparta na stosowaniu leków, które pośrednio indukują proces apoptozy. Związki te ze względu na niską specyficzność wykazują działanie cytotoksyczne lub cytostatyczne nie tylko w stosunku do komórek nowotworowych, ale również zdrowych tkanek ustroju, co prowadzi do wystąpienia groźnych efektów ubocznych ze strony różnych narządów i układów. Nowym podejściem terapeutycznym jest zastosowanie substancji stymulujących produkcję cytokin, inhibitorów angiogenezy, terapii genowych, oligonukleotydów antysensownych czy przeciwciał monoklonalnych. Wiele z nowosyntetyzowanych związków, które obecnie są testowane w badaniach przedklinicznych lub w I i II fazie badań klinicznych, to związki bezpośrednio indukujące proces apoptozy. Takie podejście do chemioterapii pozwoli prawdopodobnie na wyeliminowanie wielu problemów związanych z niespecyficznym działaniem leków i ich mutagennością.

*Słowa kluczowe:* apoptoza, mitochondria, TNF, kaspazy, NF- $\kappa$ B, Akt/PKB, glutation, oligonukleotydy antysensowne, geny śmierci.

*Summary:* Apoptosis is the major form of cell suicide. Most conventional anticancer agents induce apoptosis indirectly. Although chemotherapeutic drugs should selectively kill only tumor cells, normal cells are often susceptible to cytotoxic or cytostatic effects of these agents. This is a reason of potentially harmful side effects including inflammation and damage to the surrounding normal tissue. A new therapeutic approach in cancer treatment is the use of substances that stimulate cytokine production, angiogenesis inhibitors, gene therapies, antisense oligonucleotides and monoclonal antibodies. Many of new agents tested in preclinical study or in I and II phase of clinical trials can induce apoptosis directly. This new approach allows probably to eliminate a lot of problems connecting with non-specific activity of anticancer drugs and their mutagenicity.

*Key words:* apoptosis, mitochondria, TNF, caspases, NF- $\kappa$ B, Akt/PKB, glutathione, antisense oligonucleotides, death genes.

\*Praca została sfinansowana z Grantu MNiSzW N301 099 32/3581.

## 1. WSTĘP

Apoptoza jest procesem fizjologicznym, niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów wielokomórkowych. Proces ten odgrywa ważną rolę zarówno w rozwoju tkanek i narządów, jak również w regulacji odpowiedzi immunologicznej i w naturalnej śmierci zróżnicowanych komórek [4, 43]. Apoptoza jest także ważnym celem terapii przeciwnowotworowych, mimo że większość leków stosowanych w chemioterapii indukuje apoptozę zarówno w komórkach nowotworowych, jak i prawidłowych [15]. Ponadto proces ten pozwala na eliminację zmienionych nowotworowo komórek bez wywoływania procesu zapalnego i uszkodzenia sąsiadujących tkanek. Analiza molekularnych mechanizmów, które wpływają na regulację apoptozy, wykazała, że czynniki chemioterapeutyczne powodują równoczesną aktywację kilku szlaków, które pozytywnie lub negatywnie regulują śmierć komórki [55]. Brak skuteczności wielu terapii przeciwnowotworowych wynika zarówno z ograniczeń w stosowaniu leków przeciwnowotworowych, jak również z uruchamiania przez komórki nowotworowe mechanizmów chroniących je przed apoptozą. Istnieją dwa szlaki prowadzące do apoptozy: szlak zależny od mitochondriów (szlak wewnętrzny) oraz szlak zależny od specyficznych receptorów błonowych z rodziny TNF (szlak zewnętrzny) (ryc. 1) [34, 66]. Szlaki te prowadzą do aktywacji kaspaz, enzymów, które odgrywają kluczową rolę w procesie apoptozy. Uruchomienie kaskady kaspaz powoduje proteolityczną destrukcję białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki, m.in. polimerazy poli(ADP)rybozy, białek otoczki jądrowej, białka Rb (ang. *Retinoblastoma protein*) oraz czynnika DFF45 (ang. *DNA Fragmentation Factor 45*) i DFF35, które są białkowymi inhibitorami endonukleazy DFF40/CAD (ang. *Caspase-Activated DNase*) odpowiedzialnej za fragmentację jądrowego DNA [23, 54, 67].

## 2. APOPTOZA ZALEŻNA OD MITOCHODRIÓW

W większości przypadków indukowana przez leki apoptoza prowadzi do zakłócenia prawidłowego funkcjonowania mitochondriów. Zmiany te związane są z produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) i załamaniem mitochondrialnego potencjału błonowego, co prowadzi do otwarcia kanałów mitochondrialnych – MPTP (ang. *Mitochondrial Permeability Transition Pore*). Budowa i skład kanałów nie zostały dotychczas dokładnie poznane. Wiadomo jednak, że są one zbudowane ze współdziałających ze sobą białek błony wewnętrznej, takich jak translokaza nukleotydów adeninowych – ANT (ang. *Adenine Nucleotide Translocator*) oraz białek błony zewnętrznej tworzących kanały anionowe zależne od napięcia – VDAC (ang. *Voltage-Dependent Anion Chanel*) [15, 51]. Otwarcie tych nieselektywnych kanałów prawdopodobnie wpływa na rozregulowanie objętości mitochondriów z powodu podwyższenia ciśnienia osmotycznego macierzy mitochondrialnej. Ze względu na różnice w wielkości powierzchni zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej, zwiększenie objętości macierzy mitochondrialnej może powodować

przerwanie błony zewnętrznej i uwolnienie z przestrzeni międzybłonowej do cytozolu białek aktywujących kaspazy. Uszkodzenie zewnętrznej błony mitochondrialnej może być również wynikiem bezpośredniego działania oksydantów lub patologicznego wzrostu poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu [19]. Wzrost przepuszczalności błon mitochondrialnych prowadzi do uwolnienia cytochromu C, który jest zlokalizowany w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [51]. Białko to pełni podwójną rolę, ponieważ jest ważnym składnikiem łańcucha oddechowego, a także czynnikiem indukującym proces apoptozy [6]. Występujący w nim łańcuch polipeptydowy i grupa prostetyczna hemu są niezbędne do aktywacji kaspaz. Po uwolnieniu do cytozolu cytochrom C łączy się z Apaf-1 (ang. *Apoptosis Protease-Activating Factor 1*) i prokaspazą 9 [28]. Powstały wielobiałkowy kompleks nazywany apoptosomem, powoduje aktywację kaspaz efektorowych [6]. Razem z cytochromem C uwalniane są również inne białka występujące w mitochondriach, takie jak: SMAC/DIABLO oraz Omi/HtrA2. Białka te wiążą się z czynnikiem XIAP, inhibitorem kaspazy 9, co prowadzi do zahamowania jego aktywności [14].

### 3. ROLA BIAŁEK PRO- I ANTYAPOPTOTYCZNYCH W INDUKCJI APOPTOZY

Proces apoptozy zależny od mitochondriów jest regulowany przez rodzinę białek Bcl-2, które są produktami onkogenów komórkowych. W zależności od pełnionych funkcji i ilości homologicznych domen Bcl-2 – BH (ang. *Bcl-2 homology domains*) białka te dzielą się na trzy grupy: białka hamujące proces apoptozy (Bcl-2, Bcl-XL, A1, Mcl-1), które zawierają 4 homologiczne domeny BH (BH1–BH4), białka aktywujące apoptozę (Bax, Bag, Bcl-XS, Bcl-2L1) zawierające 3 homologiczne domeny (BH1–BH3) oraz białka BH3 (Bid, Bim, PUMA, Noxa), które regulują aktywność białek Bcl-2. Ostatnia grupa białek wykazuje homologię z pozostałymi białkami z rodziny Bcl-2 jedynie w obrębie domeny BH3 [30, 42]. Ekspresja białek BH3 jest ściśle kontrolowana przez czynniki transkrypcyjne i mechanizmy posttranslacyjne. Białka należące do rodziny BH3 wiążą się do hydrofobowej kieszeni znajdującej się na powierzchni białek Bcl-2, utworzonej przez domeny BH1, BH2 i BH3 i w ten sposób hamują ich aktywność [75]. Wzajemne oddziaływania pomiędzy białkami pro- i antyapoptotycznymi są odpowiedzialne za uruchomienie procesów prowadzących do apoptozy zależnej od mitochondriów. Większość proapoptotycznych białek Bcl-2, takich jak Bax i Bad, występuje w cytoplazmie żywych komórek. Podczas procesu apoptozy białka te przechodzą szereg zmian konformacyjnych, które prowadzą do ich translokacji do zewnętrznej błony mitochondrialnej oraz retikulum endoplazmatycznego.

W zewnętrznej błonie mitochondrialnej białka proapoptotyczne ulegają oligomeryzacji, przyłączają się do kanałów anionowych zależnych od napięcia i modulują ich aktywność, co wpływa na uwolnienie z mitochondriów cytochromu C oraz innych czynników indukujących apoptozę. W retikulum endoplazmatycznym białko Bax jest włączone w regulację wypływu  $\text{Ca}^{2+}$ , który również może zapoczątkowywać zmiany

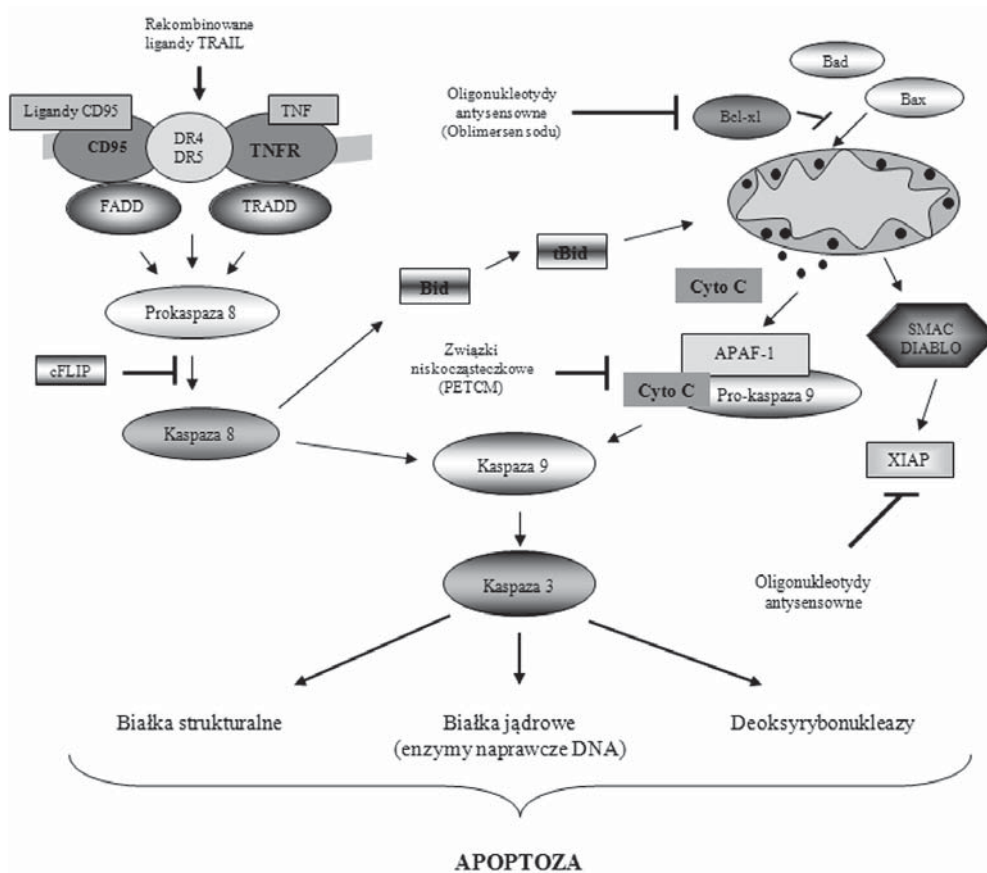
w przepuszczalności błon mitochondrialnych. Ostatnie badania wskazują na udział lipidów w procesie aktywacji białek Bax [52, 72]. Mutacje zachodzące w białku Bax są ważnym mechanizmem chroniącym komórki nowotworowe przed apoptozą. Potwierdzają to badania *in vitro*, które wykazały, że niedobór białka Bax w ludzkich komórkach raka okrężnicy prowadzi do całkowitego zahamowania apoptozy w odpowiedzi na sulfid sulindaku, indometacynę i niesteroidowe leki przeciwzapalne [64].

Białka antyapoptotyczne, takie jak Bcl-2 i Bcl-XL, chronią komórki przed cytotoksycznym działaniem wielu czynników, np. promieniowania UV, hipoksji, pozbawienia cytokin. Białka te hamują apoptozę poprzez tworzenie heterodimerów z proapoptycznymi białkami Bax/Bak [30]. W ten sposób zapobiegają zwiększonej przepuszczalności kanałów mitochondrialnych i załamaniu potencjału błonowego [6]. Większość białek Bcl-2 jest zlokalizowana w retikulum endoplazmatycznym i otocze jądrowej oraz częściowo w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. W zdrowych komórkach białka Bcl-xl występują w cytozolu w formie homodimerów lub są przyłączone do błony mitochondrialnej. Jedynie w trakcie apoptozy cytozolowa frakcja tych białek przyłącza się do błony mitochondrialnej [30]. Według niektórych hipotez antyapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 hamują apoptozę poprzez regulowanie potencjału redoks komórki, ale mechanizm tego procesu nie został dotychczas dokładnie wyjaśniony. Z jednej strony białka te pełnią rolę antyoksydantów, ponieważ powodują wzrost ilości glutationu i jego redystrybucję do różnych kompartmentów komórki, zapobiegają zwiększeniu produkcji RFT oraz zniszczeniu komórki w wyniku peroksydacji lipidów. Niektórzy autorzy sugerują jednak prooksydacyjne działanie białek Bcl-2 [6].

Białka Bcl-2 włączone są w rozwój nowotworów hematologicznych oraz innych typów nowotworów m.in. nowotworów piersi i trzustki, w których nadekspresja białek Bcl-2 i Bcl-XL ułatwia proces nowotworzenia *in vivo* [8].

### 3.1. Zastosowanie oligonukleotydów antysensownych w terapiach przeciwnowotworowych – modulacja aktywności białek Bcl-2

Aktywność antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 prowadzi do zahamowania procesu apoptozy i wpływa na oporność komórek nowotworowych na tradycyjną chemio- i radioterapię. Nową, obiecującą strategią pozwalającą na modulację aktywności białek Bcl-2 jest zastosowanie oligonukleotydów antysensownych (ryc. 1). Do I fazy badań klinicznych został zakwalifikowany oblimersen sodu – związek, który wiąże się specyficznie do ludzkiej sekwencji mRNA dla bcl-2, powoduje degradację tej sekwencji, a w konsekwencji zmniejszenie wydajności translacji białek Bcl-2. Wyniki wstępnych badań klinicznych sugerują, że oblimersen sodu wykazuje również działanie synergistyczne z niektórymi związkami cytotoksycznymi i immunoterapeutycznymi stosowanymi w leczeniu nowotworów hematologicznych oraz guzów litych. Celem prowadzonych obecnie badań z zastosowaniem oblimersenu sodu jest sprawdzenie skuteczności tego typu kombinacji leków w leczeniu chronicznej białaczki limfoblastycznej, szpiczaka mnogiego, czerniaka złośliwego oraz drobno-komórkowego raka płuc. Ponadto w fazie przedklinicznej sprawdzana jest



RYCINA 1. Szlaki prowadzące do apoptozy: szlak zależny od specyficznych receptorów błonowych z rodziny TNF (szlak zewnętrzny) i szlak zależny od mitochondriów (szlak wewnętrzny). W szlaku zewnętrznym dochodzi do pobudzenia powierzchniowych receptorów komórki przez specyficzne ligandy śmierci, co powoduje aktywację kaspazy 8. W przypadku słabej aktywacji tego enzymu następuje proteolityczna modyfikacja występującego w cytozolu białka Bid, które w skróconej formie jako tBid przekazuje sygnał do mitochondriów. W szlaku wewnętrznym w wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy białkami pro- i antyapoptycznymi dochodzi do otwarcia kanałów mitochondrialnych i uwolnienia cytochromu C, który w cytozolu łączy się z Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) i prokaspazą 9. Powstały wielobiałkowy kompleks nazywany apoptosom powoduje aktywację kaskady kaspaz, czego konsekwencją jest proteolityczna destrukcja białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki, takich jak: białka strukturalne i enzymy naprawcze DNA. Zastosowanie oligonukleotydów antysensownych lub związków niskocząsteczkowych pozwala na bezpośrednią aktywację kaspaz lub zahamowanie aktywności wewnętrzkomórkowych inhibitorów apoptozy

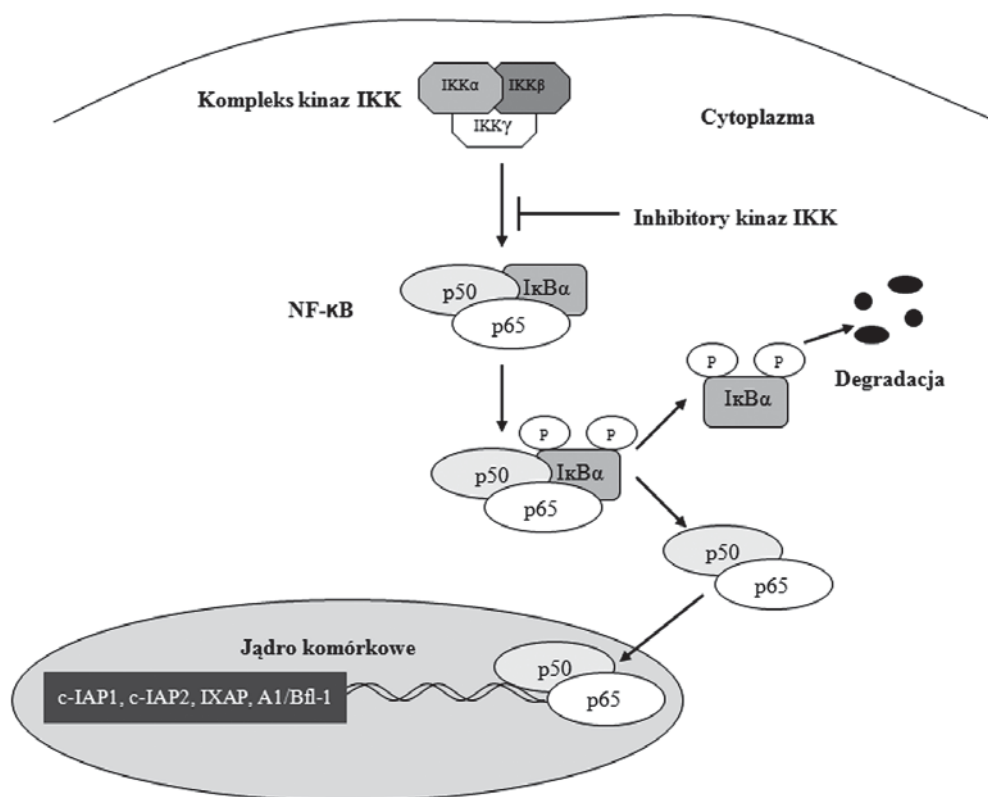
FIGURE 1. Two major pathways of apoptosis in mammalian cells: the extrinsic cell death pathway mediated by a subgroup of the TNF receptor superfamily and the mitochondrial or intrinsic pathway. The death receptor pathway is initiated by the interaction of cell surface death receptors with their cognate death ligands. This interaction results in the cleavage of procaspase 8 to yield active caspase 8. In certain cell systems, the activation of caspase 8 is insufficient to initiate the proteolytic cascade required for apoptosis. In this case caspase 8 can cleave the proapoptotic Bcl-2 family protein Bid, that as the truncated Bid (tBid) translocates to the mitochondria and triggers the release of cytochrome C. The intrinsic pathway is regulated by the permeabilization of mitochondrial membranes. The disturbance of balance between pro- and antiapoptotic protein cause the disruption of the mitochondrial inner transmembrane potential ( $\Delta\Psi$ ) as well as the so called permeability transition. This event leads to release of cytochrome C from the mitochondrial intermembrane space to the cytosol where the cytochrome C binds to Apaf-1 protein and procaspase-9 and form a structure known as apoptosom. This multiprotein complex mediate activation of caspases cascade. The consequence of this step is proteolytic destruction of key cellular components that are required for normal cellular function including structural proteins in the cytoskeleton and nuclear proteins such as DNA repair enzymes. The use of antisense oligonucleotide and small molecule leads to direct caspases activation or inhibition intracellular inhibitors of apoptosis

skuteczność oligonukleotydów antysensownych w leczeniu chronicznej białaczki szpikowej, nowotworów piersi, drobnokomórkowego raka płuc, raka żołądka, okrężnicy i pęcherza moczowego [40, 46].

#### 4. TERAPEUTYCZNY POTENCJAŁ SZLAKU NF- $\kappa$ B

Ważną rolę w aktywacji białek antyapoptotycznych, a tym samym w regulacji procesu apoptozy, odgrywa czynnik jądrowy  $\kappa$ B – NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*), jeden z podstawowych czynników transkrypcyjnych występujących w komórkach [36, 59]. Do białek antyapoptotycznych bezpośrednio aktywowanych przez NF- $\kappa$ B należą wewnątrzkomórkowe inhibitory apoptozy, takie jak: c-IAP1, c-IAP2 i IXAP, związane z receptorem TNF (TRAF1, TRAF2) oraz homologi białka Bcl-2 (A1/Bfl-1 i IEX-IL) [5, 62]. Mimo że rola NF- $\kappa$ B w procesie apoptozy nie została dotychczas dokładnie wyjaśniona, wiadomo jednak, że w wielu typach komórek nowotworowych czynnik ten występuje w formie konstytutywnie aktywnej, dzięki czemu odgrywa ważną rolę w ochronie komórek przed apoptozą i rozwojem oporności na niektóre czynniki chemioterapeutyczne. Zahamowanie aktywności NF- $\kappa$ B w komórkach nowotworowych może więc mieć kluczowe znaczenie w opracowaniu nowych terapii przeciwnowotworowych [36]. Najbardziej popularnym celem w szlaku sygnałowym prowadzącym do aktywacji NF- $\kappa$ B jest zahamowanie aktywności kinaz serynowo-treoninowych IKK odpowiedzialnych za fosforylację i degradację białek inhibitorowych I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ ), które w niestymulowanych komórkach występują w formie związanej z kompleksem NF- $\kappa$ B (ryc. 2). W wyniku fosforylacji dochodzi do ubikwitynacji i degradacji białek I $\kappa$ B, co powoduje uwolnienie kompleksu NF- $\kappa$ B. Konsekwencją tego procesu jest translokacja NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego i rozpoczęcia transkrypcji genów od niego zależnych [22, 50].

Zahamowanie szlaku NF- $\kappa$ B poprzez supresję I $\kappa$ B $\alpha$  zwiększa wrażliwość komórek na czynniki stymulujące apoptozę. W ciągu ostatnich kilku lat do I i II fazy badań klinicznych zostały zakwalifikowane związki niskocząsteczkowe, które hamują aktywność kinazy IKK w badaniach *in vitro*. Do substancji wykazujących takie działanie należy cyjanoguanidyna CHS 828, która hamuje podziały komórkowe w wielu nowotworowych liniach komórkowych, włączając komórki wykazujące wielolekową oporność. W przeciwieństwie do powszechnie stosowanych chemio-terapeutyków, CHS 828 jest mniej toksyczny dla prawidłowych fibroblastów i komórek śródbłonna niż dla komórek nowotworowych [41]. Ponadto związek ten może działać synergistycznie z innymi lekami przeciwnowotworowymi. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na ludzkich komórkach chłoniaka wykazano, że zastosowanie kilkugodzinnej preinkubacji z CHS 828, a następnie narażenie komórek na etopozyt powoduje znaczny wzrost aktywności kaspazy 3 oraz ilości komórek apoptotycznych [33]. Do związków hamujących aktywność kinazy IKK należą również substancje przeciwzapalne, takie jak: aspiryna, salicylan sodu, które specyficznie hamują aktywność IKK $\beta$ , niesteroidowe leki przeciwzapalne (ibuprofen i sulindak), a także związki pochodzenia roślinnego (partenolid) i aktywny biologicznie składnik propolisu – CAPE (ang. *Caffeic Acid Phenethyl Ester*) [38, 47, 65, 71, 73].



RYCINA 2. Zahamowanie aktywności kinaz serynowo-treoninowych IKK odpowiedzialnych za fosforylację i degradację białek inhibitorowych IκB ( $I\kappa B\alpha$ ,  $I\kappa B\beta$ ,  $I\kappa B\epsilon$ ), które w niestymulowanych komórkach występują w formie związanej z kompleksem NF- $\kappa$ B. Zastosowanie związków hamujących aktywność IKK uniemożliwia uwolnienie kompleksu NF- $\kappa$ B, jego translokację do jądra komórkowego i rozpoczęcie transkrypcji genów zależnych od NF- $\kappa$ B

FIGURE 2. The inhibition of IKK kinases responsible for phosphorylation and degradation IκB protein. IκB is inhibitory protein that in non-stymulated cells is bound to NF-κB. The use of compounds that inhibit IKK activity prevent the release of NF-κB, their translocation into the nucleus and activation of specific cellular genes

## 5. UDZIAŁ KINAZ SERYNOWO-TREONINOWYCH W PROCESIE APOPTOZY

Duże znaczenie w regulacji procesu apoptozy mają również szlaki sygnałowe kinaz serynowo-treoninowych, których zwiększoną aktywność stwierdzono w wielu typach komórek nowotworowych [58]. Do najważniejszych kinaz serynowo-treoninowych należy rodzina białkowych kinaz aktywowanych mitogenem – MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) i białkowa kinaza B – PKB (ang. *Protein Kinase B*) nazywana inaczej białkiem Akt [44]. Główną funkcją białka Akt jest zahamowanie apoptycznej śmierci komórkowej. Aktywacja tego białka odbywa się przy udziale kinazy 3-fosfatydiloinozytolu (PI3K), enzymu zaangażowanego w wiele ważnych procesów komórkowych, m.in. w proces

transkrypcji, migracji, angiogenezy, proliferacji i metabolizmu glukozy. PI3K powoduje fosforylację znajdujących się w błonie komórkowej dwufosforanów fosfatydyloinozytolu ( $PIP_2$ ) do trójfosforanów fosfatydyloinozytolu ( $PIP_3$ ).  $PIP_3$  wpływa na przemieszczenie PKB/Akt i zależnej od fosfoinozytolu kinazy-1 (PDK1) do błony komórkowej, w której zachodzi dalszy etap aktywacji Akt. Do pełnej aktywacji tego białka wymagana jest fosforylacja dwóch reszt regulatorkowych: treoninowej pod wpływem kinazy PDK1 oraz serynowej przez kompleks rictor-mTOR [48].

Szlak kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K/Akt) odgrywa decydującą rolę w ochronie komórek przed apoptozą, ponieważ proces fosforylacji odbywający się przy jego udziale zmienia aktywność wielu białek biorących udział w tym procesie, m.in. kaspazy 9 i białek należących do rodziny Bcl-2. Niektóre dane literaturowe wskazują również, że białko PKB/Akt jest włączone w pozytywną regulację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w niektórych typach komórek, m.in. w fibroblastach, embrionalnych komórkach nerkowych i komórkach JURKAT. Wykazano, że PKB powoduje fosforylację IKK $\alpha$ , co prowadzi do degradacji tej podjednostki, a w konsekwencji do translokacji kompleksu p65/p50 do jądra komórkowego i rozpoczęcia transkrypcji genów zależnych od NF- $\kappa$ B [1, 53]. Ważną rolę w ochronie komórek przed procesem apoptozy odgrywa również szlak sygnałowy zewnątrzkomórkowej kinazy ERK 1/2, związanej głównie z mitogenezą. Aktywacja tej kinazy odbywa się w drodze fosforylacji reszty treoninowej i tyrozynowej, przy udziale kinaz MEK1 i MEK2 [9,16].

Modulacja szlaków kinaz serynowo-treoninowych poprzez zastosowanie selektywnych inhibitorów farmakologicznych może indukować apoptozę i/lub zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na czynniki chemioterapeutyczne. Z tego względu mogą one stanowić obiecujący cel terapii przeciwnowotworowych. Potwierdzają to badania Tabellini i wsp., którzy wykazali że zastosowanie związku LY294002 i wortmanniny, inhibitorów szlaku PI3K/Akt w komórkach nowotworowych HL60AR i K562 z konstytutywnie aktywnym szlakiem PI3K/Akt, powodowało odtworzenie wrażliwości tych komórek na apoptozę po zastosowaniu tritlenku arsenu [58, 68]. Do I i II fazy badań klinicznych zostały włączone niskocząsteczkowe inhibitory szlaku sygnałowego Akt, które hamują aktywność Akt na poziomie fosforylacji. Związkiem wykazującym takie działanie jest inhibitor API-2 (ang. *Akt/Protein kinase B signaling Inhibitor-2*), który w badaniach *in vitro* powodował zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych i indukcję apoptozy. Ponadto w badaniach *in vivo* wykazano, że API-2 wpływał na wyraźne zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych z nadekspresją Akt [69].

## 6. KASPAZY JAKO CEL TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Obok białek Bcl-2 ważnym celem terapii przeciwnowotworowych są kaspazy (ang. *Caspases – Cysteine Aspartate Specific ProteASEs*). Enzymy te należą do grupy cysteinowych enzymów proteolitycznych produkowanych przez komórki w formie



nieaktywnych prokaspaz, zbudowanych z prodromy N-terminalnej oraz dwóch podjednostek: dużej podjednostki o masie cząsteczkowej 20 kDa (p20) i małej podjednostki o masie 10 kDa (p10). Do aktywacji kaspaz dochodzi w wyniku proteolitycznego, kaskadowego rozpadu prokaspaz. W zależności od struktury prodromy N-terminalnej i pełnionych przez nią funkcji, kaspazy dzielą się na trzy grupy: kaspazy zapalne, inicjujące i efektorowe. Najważniejszą rolę w procesie apoptozy odgrywają kaspazy inicjujące (kaspaza 2, 8, 9 i 10) oraz kaspazy efektorowe (kaspaza 3, 6 i 7) [29].

Niektóre związki selektywnie aktywujące kaspazy w komórkach nowotworowych, szczególnie kluczową dla procesu apoptozy kaspazę 3, zostały włączone do I fazy badań klinicznych. Do substancji wykazujących takie działanie należy PETCM ( $\alpha$ -(trichloromethyl)-4-pyridineethanol), który w badaniach *in vitro* powodował aktywację kaspazy 3 w ekstraktach nowotworowych linii komórkowych (ryc. 1). Działanie PETCM polega na zahamowaniu aktywności onkoproteiny prothymosin- $\alpha$ , która negatywnie reguluje aktywność kaspazy 9 [24].

Bardzo obiecujące, ze względu na możliwość wykorzystania w leczeniu niektórych typów nowotworów, są zidentyfikowane ostatnio związki niskocząsteczkowe zaliczane do karbaminianów, powodujące oligomeryzację Apaf-1 i powstawanie apoptosomu, co prowadzi do aktywacji kaspazy 9 i 3 w szlaku zależnym od cytochromu C. Badania przeprowadzone w prawidłowych i nowotworowych liniach komórkowych wykazały selektywne działanie tych związków w stosunku do komórek nowotworowych [39]. Do substancji powodujących aktywację kaspaz należy również apoptyna, białko kodowane przez gen VP3 wirusa anemii u kurcząt. Białko to indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych i transformowanych, nie wywołuje natomiast apoptozy w komórkach prawidłowych. Mechanizm selektywnego działania apoptyny jest związany z jądrową lokalizacją tego białka. W komórkach transformowanych i nowotworowych apoptyna jest fosforylowana przez kinazę występującą w cytoplazmie tych komórek, co powoduje translokację białka do jądra komórkowego i jego aktywację. Natomiast w komórkach prawidłowych apoptyna pozostaje w cytoplazmie, gdzie ulega agregacji lub degradacji [45, 76].

Oprócz bezpośredniego wykorzystania kaspaz, celem terapii przeciwnowotworowych mogą być również wewnątrzkomórkowe inhibitory kaspaz, takie jak: IAPs (ang. *Inhibitor-of-Apoptosis Proteins*) i c-FLIPs [49]. Wykazano, że oporność niektórych typów komórek nowotworowych na apoptozę jest związana z nadekspresją inhibitorów z rodziny IAPs. Wszystkie homologi IAPs występujące u człowieka, m.in. XIAP, c-IAP1 i c-IAP2, hamują aktywność kaspazy 3 i 7. Ponadto XIAP hamuje również aktywność inicjującej kaspazy 9, która bierze udział w procesie apoptozy zależnej od mitochondriów [60].

Oligonukleotydy antysensowne XIAP, stosowane obecnie w I fazie badań klinicznych, zawierają sekwencję komplementarną do docelowego mRNA, która po hybrydyzacji z mRNA powoduje zahamowanie jego translacji (ryc. 1). Dodatkowo kompleks oligonukleotydy antysensowne/mRNA ma zdolność do aktywacji RNazy H, która powoduje degradację mRNA. Wykazano, że zastosowanie oligonukleotydów antysensownych może nie tylko bezpośrednio indukować proces apoptozy, ale również zwiększać wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapię i promieniowanie [49].

Coraz więcej uwagi poświęca się również zastosowaniu peptydów, które strukturalnie naśladują proapoptotyczne białka Smac i poprzez bezpośrednie przyłączenie się do IAP prowadzą do zahamowania aktywności tego inhibitora [18].

## 7. REGULACJA APOPTOZY W SZLAKU ZALEŻNYM OD RECEPTORÓW ŚMIERCI

W szlaku zewnętrznym dochodzi do pobudzenia powierzchniowych receptorów komórki tzw. receptorów śmierci przez specyficzne ligandy śmierci [2]. Następnie kompleks zaktywowanych receptorów powoduje aktywację kaskady kaspaz, co prowadzi do powstawania zmian morfologicznych typowych dla procesu apoptozy.

Receptory śmierci, do których należą m.in. TNFR-1, TNFR-2, CD95, Fas/CD95, CD40, TRAIL-R1, TRAIL-R2, wchodzą w skład rodziny receptorów TNF (ang. *Tumor Necrosis Factor*). Wszystkie receptory śmierci zawierają domenę zewnątrzkomórkową, dzięki której rozpoznają odpowiednie ligandy śmierci oraz wewnątrzplazmatyczną domenę śmierci – DD (ang. *Death Domain*), poprzez którą następuje przyłączenie białek adaptorowych FADD (ang. *Fas-Associated Death Domain protein*) lub TRADD (ang. *TNFR1-Associated Death Domain*). W wyniku tego procesu powstaje kompleks sygnałowy zapoczątkowujący śmierć – DISC (ang. *Death Initiated Signaling Complex*), do którego poprzez wykonawczą domenę śmierci – DED (ang. *Death Execution Domain*) wchodząca w skład białka adaptorowego, zostaje przyłączona prokaspaza 8. Proces ten zapoczątkowuje autokatalityczną aktywację prokaspazy 8 i 10 [63, 70]. Aktywne kaspazy 8 i 10 aktywują kolejno efektorowe kaspazy 3, 6 i 7. W ten sposób uruchamiany jest proces apoptozy w komórkach określanych jako komórki typu I [56]. W odróżnieniu od nich, w komórkach typu II ilość powstałego kompleksu DISC nie wystarcza do silnej aktywacji kaspazy 8. W tej sytuacji receptory śmierci przekazują sygnał do mitochondriów i indukują uwolnienie cytochromu C w procesie zależnym od białka Bid. Występujące w cytozolu białko Bid pod wpływem kaspazy 8 ulega proteolitycznej modyfikacji, a następnie w skróconej formie jako tBid (ang. *truncated Bid*) przemieszcza się do zewnętrznej błony mitochondrialnej, gdzie razem z białkami Bax i Bad wpływa na utworzenie kanałów mitochondrialnych i uwolnienie cytochromu C [11].

### Zastosowanie ligandów TRAIL w terapiach przeciwnowotworowych

Wszystkie ligandy śmierci, z wyjątkiem TNF $\alpha$ , są cząsteczkami międzybłonowymi. Dzięki biologicznej aktywności niektóre rekombinowane, rozpuszczalne formy ligandów znalazły zastosowanie w badaniach klinicznych (ryc. 1). Najbardziej obiecujące, ze względu na brak toksycznego działania na zdrowe komórki, są ligandy TRAIL. W przeciwieństwie do nich TNF $\alpha$  i ligandy CD95 wykazują toksyczne działanie w stosunku do komórek prawidłowych. Ligandy TRAIL indukują apoptozę w różnych typach komórek poprzez oddziaływanie z powierzchniowymi receptorami komórki DR4 (TRAIL-R1) i DR5 (TRAIL-R2) [63]. Wykazano, że TRAIL niszczy większość transformowanych nowotworowo linii komórkowych w badaniach *in vitro*, nie powoduje natomiast uszkodzenia

komórek zdrowych. Brak toksycznego działania w stosunku do zdrowych tkanek zaobserwowano również po zastosowaniu TRAIL w badaniach przedklinicznych na modelach zwierzęcych. Bardzo obiecujące są również wyniki badań *in vitro*, w których zastosowano kombinację TRAIL i inhibitorów NF- $\kappa$ B. Oporność wielu nowotworowych linii komórkowych, m.in. komórek raka piersi na apoptozę indukowaną przez TRAIL, związana jest z aktywacją NF- $\kappa$ B przez TRAIL, co prowadzi do ekspresji białek antyapoptotycznych. Wykazano, że zastosowanie kombinowanej terapii TRAIL i inhibitorów NF- $\kappa$ B prowadzi do wyeliminowania oporności komórek na apoptozę i znacznie zwiększa wydajność terapii z zastosowaniem TRAIL [27]. Wykorzystanie receptorów śmierci w terapiach przeciwnowotworowych prawdopodobnie pozwoli na wyeliminowanie oporności na apoptozę, zjawiska występującego często w komórkach nowotworowych oraz hamującego ten proces działania protoonkogenów Bcl-2. Ponadto receptory śmierci stosowane łącznie z radio- i chemioterapią mogą stać się w przyszłości ważnym składnikiem kombinowanej terapii skierowanej przeciwko nowotworom z dzikim genem p53 [66].

## 8. ROLA GLUTATIONU W REGULACJI APOPTOZY

Glutation (L- $\gamma$ -glutamylcysteinyloglicyna) jest jednym z najważniejszych antyoksydantów chroniących komórki ssaków przed reaktywnymi formami tlenu (RFT) [31, 74]. Związek ten odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji genów, w procesie apoptozy i w transporcie błonowym [35]. Najważniejszym funkcjonalnym składnikiem cząsteczki GSH jest część cysteinowa, która dostarcza reaktywnych grup tiolowych wchodzących w bezpośrednie reakcje z wolnymi rodnikami, np. nadtleniem wodoru,  $\cdot\text{O}_2^-$ , rodnikiem hydroksylowym lub tworzących odwracalne wiązania z grupami tiolowymi białek [10, 31]. Obniżenie stężenia wewnątrzkomórkowego GSH prowadzi do zwiększonej produkcji RFT, a tym samym do zwiększenia wrażliwości komórek na proces apoptozy. Zwiększone stężenie GSH występujące w wielu typach komórek nowotworowych jest odpowiedzialne za rozwój oporności na chemio- i radioterapię. Modułacja stężenia GSH w komórkach może więc prowadzić do uzyskania różnej odpowiedzi zdrowych i nowotworowych linii komórkowych na leki stosowane podczas chemioterapii [3, 32]. Potwierdzają to wyniki badań Duechlera i wsp., którzy zaobserwowali, że zastosowanie L-buthioniny-(S,R)-sulfoksyminy (BSO), specyficznego inhibitora syntetazy  $\gamma$ -glutamylcysteiny łącznie z tritlenkiem arsenu i partenolidem powodowało wyraźny wzrost nasilenia apoptozy w komórkach białaczkowych linii Jurkat, EL-4 i K562, w stosunku do komórek narażanych na tritlenek arsenu i partenolid [12]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach Meurette i wsp., w których zmniejszenie puli wewnątrzkomórkowego GSH poprzez zastosowanie BSO wpływało na zwiększenie apoptozy indukowanej przez kombinację TRAIL/cisplatyna lub TRAIL/5-fluorouracyl w ludzkich komórkach raka okrężnicy HT29 i w komórkach nowotworowych wątroby HepG2 [35].

GSH jest ważnym czynnikiem wpływającym na regulację procesu apoptozy. Komórki przechodzące apoptozę gwałtownie uwalniają GSH do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Mechanizm tego zjawiska, jak i jego praktyczne znaczenie nie zostały

dotychczas dokładnie wyjaśnione. Proces ten jest prawdopodobnie stymulowany przez kaspazy i pozwala na wyeliminowanie ochronnego działania GSH. Z drugiej strony niskie stężenie wewnątrzkomórkowego GSH może być czynnikiem hamującym proces apoptozy, ponieważ kluczowe dla tego procesu enzymy – kaspazy, zawierają w swoim centrum aktywnym reszty cysteinowe, które do swojej aktywacji wymagają odpowiedniego stężenia GSH. Antyoksydant ten zapobiega utlenieniu reszt cysteinyowych i pozwala na utrzymanie katalitycznej aktywności kaspaz. Zmniejszenie stężenia GSH poniżej pewnego poziomu może więc hamować aktywność kaspaz, a tym samym wpływać na zahamowanie procesu apoptozy [21].

## 9. UKIERUNKOWANE UŚMIERCANIE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Nowym podejściem w terapiach przeciwnowotworowych jest ukierunkowane uśmiercanie komórek. Zastosowanie związków, które niszczą komórki nowotworowe poprzez atakowanie specyficznych szlaków i procesów istotnych dla przeżycia i wzrostu komórek nowotworowych, pozwala zarówno na ograniczenie efektów ubocznych, jak i zwiększenie efektywności terapii. Jednym z celów ukierunkowanego uśmiercania komórek jest terapia genami samobójczymi. Ten rodzaj terapii polega na konwersji substancji nietoksycznych do fizjologicznie aktywnych związków przy udziale enzymów, które nie występują w komórkach ssaków. W tym celu komórki nowotworowe są transfekowane genami kodującymi tzw. enzymy śmierci. Najczęściej stosowanym genem śmierci jest gen kodujący kinazę tymidynową wirusa opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-tk), który powoduje konwersję gancyklowiru (GCV) do formy ufosforylowanej. Tak przekształcony GCV hamuje syntezę DNA i powoduje śmierć komórki w szlaku zależnym od apoptozy lub niezależnie od tego procesu [7]. Ważną cechą tego systemu jest tzw. *bystander effect* polegający na przedostawaniu się toksycznego metabolitu z komórki zmodyfikowanej genetycznie do komórek sąsiadujących przez połączenia komórkowe typu *gap-junction*, co powoduje wyraźne zwiększenie wydajności systemu HSV-tk/GCV do niszczenia komórek nowotworowych. Ponadto wykazano, że zastosowanie kombinowanej terapii systemu HSV-tk/GCV z radioterapią wpływa na dalsze zwiększenie wydajności takiej terapii [7, 37]. W chwili obecnej oprócz genu kinazy tymidynowej wykorzystywanych jest kilka innych genów samobójczych, takich jak: deaminaza cytozyny, która wykazuje działanie na podobnej zasadzie jak kinaza tymidynowa lub enterotoksyna gronkowcowa [37].

## 10. APOPTOZA A ZAPOBIEGANIE NOWOTWOROM

Apoptoza jest prawdopodobnie jednym z najważniejszych mechanizmów obrony przeciwko nowotworom, ponieważ wszystkie *Metazoa* wykorzystują proces apoptozy do eliminacji komórek zmienionych nowotworowo. Ponadto wybiórcza indukcja apoptozy w komórkach we wczesnej fazie rozwoju nowotworu może być ważnym elementem chemoprewencji nakierowanej na choroby nowotworowe (20, 57).

Chemoprewencja polega na stosowaniu związków, które opóźniają, odwracają lub hamują proces kancerogenezy i w ten sposób zmniejszają ryzyko rozwoju chorób nowotworowych. Dlatego związki wykazujące działanie chemoprewencyjne powinny być stosowane w możliwie najwcześniejszych etapach procesu powstawania nowotworu tak, aby doszło do eliminacji komórek przednowotworowych, zanim staną się one komórkami nowotworowymi (20, 57).

Związki chemoprewencyjne są na ogół produktami naturalnymi lub ich syntetycznymi analogami. Dzieli się je na kilka klas: związki hamujące etap inicjacji transformacji nowotworowej, związki hamujące proliferację komórek przednowotworowych i nowotworowych na etapie promocji i progresji nowotworu oraz związki działające zarówno na etapie inicjacji transformacji nowotworowej, jak i promocji i progresji nowotworu (13).

Działanie czynników chemoprewencyjnych polega na modulowaniu procesów komórkowych związanych z biotransformacją ksenobiotyków i ochroną przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Wiele czynników chemoprewencyjnych, włączając retinoidy, niesteroidowe leki przeciwzapalne (aspirynę, celecoxib, exisulind), polifenole (resveratrol, gallusan epigalokatechiny), związki antyestrogenne i antyandrogenne, wanioloide (kapsaicyna, kurkumina, resiniferatoksyna), flawonole (kwercetyna, rutyna) i selen, wykazują działanie proapoptotyczne w różnych typach komórek transformowanych, przednowotworowych i nowotworowych, co potwierdzają wyniki badań *in vitro* (26). Nasilenie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych po zastosowaniu czynników chemoprewencyjnych wykazano również w badaniach na zwierzętach (57).

Niektóre czynniki chemoprewencyjne aktywują kaspazy w szlaku wewnętrznym, regulowanym przez rodzinę białek Bcl-2 lub mitochondrialny potencjał transbłonowy. Inne, np. kwas all-trans retinowy, sulindak czy galusan epigalokatechiny, indukują apoptozę w szlaku zewnętrznym, związanym z receptorami błonowymi z rodziny TNF. Kilka klas czynników chemoprewencyjnych zawiera związki, które zwiększają produkcję RFT, co również może być sygnałem zapoczątkowującym proces apoptozy. Do związków wykazujących takie działanie należą m.in. niesteroidowe leki przeciwzapalne np. indometacyna, izotiocyaniany, polifenole, retinoidy, triterpenoidy i wanioloide. Wiele związków chemoprewencyjnych może modulować aktywność czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B, który włączony jest w mechanizmy regulatorowe związane ze stresem oksydacyjnym [20].

Związek pomiędzy indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych przez czynniki chemoprewencyjne a odpowiedzią kliniczną zaobserwowano również w badaniach u ludzi. Zastosowanie exiulindu, substancji zaliczanej do niesteroidowych leków przeciwzapalnych, w I fazie badań klinicznych u pacjentów z rodzinnym polipem gruczołakowatym, prowadziło do nasilenia apoptozy w komórkach polipów okrężnicy. Podobnie w badaniach przeprowadzonych u pacjentów z rakiem okrężnicy zaobserwowano wyraźne nasilenie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych po zastosowaniu mesalazyny, innego związku z tej samej grupy leków przeciwzapalnych (57).

Spośród kilku tysięcy substancji wykazujących działanie chemoprewencyjne, ponad 40 to związki stosowane obecnie w badaniach klinicznych. Pomimo wielu przeszkód, które należy przezwyciężyć, zanim związki chemoprewencyjne staną się integralną częścią klasycznej praktyki medycznej, substancje te stanowią ogromny potencjał w zapobieganiu i odwracaniu procesu kancerogenezy.

## 11. PODSUMOWANIE

Głównym zadaniem terapii przeciwnowotworowych jest wywołanie selektywnej śmierci komórek nowotworowych poprzez uruchomienie procesu apoptozy. Pomimo różnej struktury i specyficzności większość leków przeciwnowotworowych prowadzi do powstawania w komórkach zmian morfologicznych charakterystycznych dla programowanej śmierci komórkowej, takich jak: kurczenie cytoplazmy, kondensacja i fragmentacja chromatyny, fragmentacja jądrowego DNA i tworzenie ciałek apoptotycznych [17, 25, 61].

W przypadku niektórych typów nowotworów, np. pewnych rodzajów białaczek, zastosowanie chemioterapii wyraźnie poprawiło skuteczność leczenia. Nadal jednak brak jest spektakularnych wyników w leczeniu powszechnie występujących nowotworów nabłonkowych piersi, okrężnicy i płuc. Ważnym problemem w chemioterapii jest specyficzność leków przeciwnowotworowych, których działanie powinno ograniczać się do cytotoksycznego i/lub cytostatycznego działania wyłącznie w stosunku do komórek nowotworowych. W rzeczywistości duży wpływ na obniżenie efektywności terapii przeciwnowotworowych ma zarówno brak specyficznego działania toksycznego leków i ich gwałtowny metabolizm, jak również wrodzona i nabyta odporność komórek.

Regulacja procesu apoptozy może odbywać się na różnych poziomach począwszy od fazy inicjacji aż do fazy wykonawczej. Ważnym celem terapii przeciwnowotworowych są białka pro- i antyapoptotyczne, które regulują apoptozę na poziomie mitochondrialnym. Leki przeciwnowotworowe mogą powodować modulację ekspresji, aktywności i wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek z rodziny Bcl-2 [55]. Mutacje lub zmiana ekspresji białek Bcl-2 mogą drastycznie zmieniać wrażliwość komórek na leki przeciwnowotworowe i prowadzą do wielolekowej oporności komórek nowotworowych. Obok białek Bcl-2 ważnym celem terapii przeciwnowotworowych są kaspazy. W ciągu ostatnich kilku lat do I i II fazy badań klinicznych zakwalifikowano wiele związków niskocząsteczkowych, które bezpośrednio aktywują kaspazy lub hamują aktywność wewnątrzkomórkowych inhibitorów apoptozy. Nadal jednak ze względu na duże różnice w ich efektywności w badaniach *in vitro* i *in vivo* występują ograniczenia w stosowaniu tych związków w terapiach przeciwnowotworowych.

Innym obiecującym celem terapii przeciwnowotworowych są szlaki sygnałowe indukowane przez kinazę PI3-K/Akt i czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B, który w wielu typach komórek nowotworowych występuje w formie konstytutywnie aktywnej i powoduje ekspresję białek antyapoptotycznych. Coraz więcej uwagi poświęca się również wykorzystaniu oligonukleotydów antysensownych, które wpływają na ekspresję wielu genów antyapoptotycznych.

Bardzo obiecującym podejściem w zapobieganiu nowotworom, ze względu na znikomą toksyczność i niewielkie działanie uboczne w stosunku do tradycyjnie stosowanej chemioterapii, jest chemoprewencja. Liczne badania z zastosowaniem związków chemoprewencyjnych sugerują, że większość z nich to substancje wywołujące apoptozę w komórkach nowotworowych, co przynajmniej częściowo

związane jest z produkcją RFT i/lub zakłóceniem komórkowej/mitochondrialnej homeostazy redoks. Indukcja apoptozy w komórkach przednowotworowych, w których proces ten jest jeszcze stosunkowo nienaruszony, może więc być skuteczną metodą obrony przeciwnowotworowej. Nadal jednak konieczne jest prowadzenie badań przedklinicznych i klinicznych, aby w pełni ocenić skuteczność związków chemoprewencyjnych.

## LITERATURA

- [1] ARMSTRONG L. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF {kappa} {beta} signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum Mol Genet* 2006; **1**: 1894–1913.
- [2] ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Apoptosis* 1998; **281**: 1305–1308.
- [3] BALENDRIAN G, DABUR R, FRESER D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct* 2004; **22**: 343–352.
- [4] BERTHO AL, SANTIAGO MA, COUTINHO SG. *Flow Cytometry in the Study of Cell Health*. 2000; **95**: 429–433.
- [5] BUREAU F, VANDERPLASSCHEN A, JASPAR F, MINNER F, PASTORET P-P, MERVILLE M-P, BOURS V, LEKEUX P. Constitutive nuclear factor- $\kappa$ B activity preserves homeostasis of quiescent mature lymphocytes and granulocytes by controlling the expression of distinct Bcl-2 family proteins. *Blood* 2002; **99**: 3683–3691.
- [6] CHEN Q, CHAI Y-C, MAZUMDER S, JIANG C, MACKLINS RM, CHISOLM GM, ALMASAN A. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome C release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 323–334.
- [7] CHO HS, KIM HM. Bystander-Mediated Regression of Murine Neuroblastoma via Retroviral Transfer of the HSV-TK Gene. *J Korean Med Sci* 2004; **19**: 107–112.
- [8] COULTAS L, STRASSER A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**: 115–123.
- [9] CUI CH, ADACH T, OYAMADA H, KAMADA Y, KUWASAKI T, YAMADA Y, SAITOAITO N, KAYABA H, CHIHARA J. The role of mitogen-activated protein kinases in eotaxin-induced cytokine production from bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; **27**: 329–335.
- [10] DEAN RT, STOCKER S, FU R, DAVIES MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; **324**: 1–18.
- [11] DEGLI EM, FERRY G, MASDEHORS P, BOUTIN JA, HICKMAN JA, DIVE C. Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3. *J Biol Chem* 2003; **278**: 15749–15757.
- [12] DUECHLER M, STANCZYK M, CZYZ M, STEPNIK M. Potentiation of arsenic trioxide cytotoxicity by Parthenolide and buthionine sulfoximine in murine and human leukemic cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; **61**: 727–737.
- [13] DUVOIX A, BLASIUS R, DELHALLE S, SCHNEKENBURGER M, MORCEAU F, HENRY E, DICATO M, DIEDERICH M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 2005; **223**: 181–190.
- [14] FISCHER U, SCHULZE-OSTHOFF K. New Approaches and Therapeutics Targeting Apoptosis in Disease. *Pharmacol Rev* 2005; **57**: 187–215.
- [15] FRISEN C. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. *Cell Death and Differ* 2004; **11**: S73–S85.
- [16] GALINDO CL, FADLAA, SHAJ, GUTIERREZ C Jr, POPOV VL, BOLDOGHI I, AGGARWAL BB, CHOPRA AK. *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin activates mitogen-activated protein kinases and induces apoptosis in murine macrophages and human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; **3**: 37597–37612.
- [17] GARCIA-HEREIDA JM, HERYAS M, DE la ROSA MA, NAYARRO JA. Acetylsalicylic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures. *Planta* 2008; **228**: 89–97.
- [18] GLOVER CJ, HITE K, DELOSH R, SCUDIERO DA, FIVASH MJ, SMITH LR, FISHER RJ, WU JW, SHI Y, KIPP RA, MCLENDON GL, SAUSVILLE EA, SHOMAKER RH. A high-throughput screen for identification of molecular mimics of Smac/DIABLO utilizing a fluorescence polarization assay. *Anal Biochem* 2003; **320**: 157–169.

- [19] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Apoptosis* 1998; **281**: 1309–1312.
- [20] HAIL N Jr. Mitochondria: A novel target for the chemoprevention of cancer. *Apoptosis* 2005; **10**: 687–705.
- [21] HAMMOND CHL, LEE TK, BALLATORI N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *J Hepatol* 2001; **34**: 946–954.
- [22] HAYAKAWA M, MIYASHITA H, SAKAMOTO I, KITAGAWA M, TANAKA H, YASUDA H, KARIN M, KIKUGAWA K. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF-kappaB activation. *EMBO J* 2003; **22**: 3356–3366.
- [23] HUANG X, MASSELLIA, FRISCH SM, HUNTON IC, JIANG Y, WANG JY. Blockade of tumor necrosis factor-induced Bid cleavage by caspase-resistant Rb. *J Biol Chem* 2007; **282**: 29401–29413.
- [24] JIANG X, KIM HE, SHU H, ZHAO Y, ZHANG H, KOFRON J, DONNELLY J, BURNS D, NG SC, ROSENBERG S, WANG X. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 2003; **10**: 223–226.
- [25] JOHNSTONE RW, RUEFLI AA, LOWE SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; **108**: 153–164.
- [26] KANG K, LEE HJ, KIM CY, LEE SB, TUNSAG J, BATSUREN D, NHO CW. The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme. *Biol Pharm Bull* 2007; **30**: 2352–2359.
- [27] KEANE MM, RUBINSTEIN Y, CUELLO M, ETTEBERG SA, BANERJEE P, NAU MM, LIPKOWIC S. Inhibition of NF-kappaB activity enhances TRAIL mediated apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2000; **64**: 211–219.
- [28] KITAZAWA M, WAGNER JR, KIRBY ML, ANANTHARAM V, KANTHASAMY AG. Oxidative stress and mitochondrial-mediated apoptosis in dopaminergic cells exposed to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 2002; **302**: 26–35.
- [29] LAVRIK IN, GOLKS A, KRAMMER PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2665–2672.
- [30] LIU S, PEREIRA NA, TEO JJ, MILLER P, SHAH P, SONG Z. Mitochondrially Targeted Bcl-2 and Bcl-XL Chimeras Elicit Different Apoptotic Responses. *Mol Cells* 2007; **24**: 378–387.
- [31] LU SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB* 1999; **13**: 1169–1183.
- [32] MARENCO B, DE CIUCIS C, VERZOLAD, PISTOIA V, RAFFAGHELLO L, PATRIARCA S, BALBIS E, TRAVERSON, COTTASSO D, PRONZATO MA, MARINARI UM, DOMENICOTTI C. Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**: 474–482.
- [33] MARTINSSON P, EKELUND S, NYGREN P, LARSSON R. The combination of the antitumoural pyridyl cyanoguanidine CHS 828 and etoposide *in vitro* – from cytotoxic synergy to complete inhibition of apoptosis. *Br J Pharmacol* 2002; **137**: 568–573.
- [34] MENORET E, GOMEZ-BOUGIE P, GEFFROY-LUSEAU A, DANIELS S, MOREAU P, LE GOUILL S, HAROUSSEAU JL, BATAILLE R, AMIOT M, PELLAT-DECEUNYCK C. Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells. *Blood* 2006; **108**: 1346–1352.
- [35] MEURETTE O, LEFEUYRE-ORFILA L, REBILLARD A, LAGADIC-GOSSMANN D, DIMANCHE-BOITREL MT. Role of intracellular glutathione in cell sensitivity to the apoptosis induced by tumor necrosis factor {alpha}-related apoptosis-inducing ligand/anticancer drug combinations. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 3075–3083.
- [36] NAKANISHI CH, TOI M. Nuclear Factor- $\kappa$ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Cancer* 2005; **5**: 297–301.
- [37] NAWROCKI S, MACKIEWICZ A. Terapia genowa nowotworów wyzwaniem XXI wieku. *Współczesna Onkologia* 2000; **4**: 190–194.
- [38] NEGROTTO S, MALAVER E, ALVAREZ ME, PACIENZA N, D'ATRI LP, POZNER RG, GOMEZ RM, SCHATTNER M. Aspirin and salicylate suppress polymorphonuclear apoptosis delay mediated by pro-inflammatory stimuli. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **319**: 972–979.
- [39] NGUYEN JT, WELLS JA. Direct activation of the apoptosis machinery as a mechanism to target cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 7533–7538.
- [40] O'BRIEN S, MOORE JO, BOYD TE, LARRATT LM, SKOTNICKI A, KOZINER B, CHANAN-KHAM AA, SEYMOUR JF, BOCIEK RG, PAYLETIC S, RAI KR. Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 1114–1120.



- [41] OLSEN LS, HJARNAA PJ, LATINI S, HOLM PK, LARSSON R, BRAMME E, BINDERUP L, MADSEN MW. Anticancer agent CHS 828 suppresses nuclear factor-kappa B activity in cancer cells through downregulation of IKK activity. *Int J Cancer* 2004; **111**: 198–205.
- [42] PENG J, TAN C, ROBERTS GJ, NIKOLAEVA O, ZHANG Z, LAPOLLA SM, PRIMORAC S, ANDREWS DW, LIN J. tBid elicits a conformational alteration in membrane-bound Bcl-2 such that it inhibits Bax pore formation. *J Biol Chem* 2006; **281**: 35802–35811.
- [43] PETIT PX, SUSIN S, ZAMZAMI N, MIGNOTTE B, KROEMER G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Letters* 1996; **396**: 7–13.
- [44] RAMOS AM, FERNANDEZ C, AMRAN D, SANCHO P, DE BLAS E, ALLER P. Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells. *Neoplasia* 2005; **10**: 4013–4020.
- [45] ROHN JL, NOTEBORN MH. The viral death effector Apoptin reveals tumor-specific processes. *Apoptosis* 2004; **9**: 315–322.
- [46] RUDIN CM, KOZLOFF M, HOFFMAN PC, EDELMAN MJ, KARNAUSKAS R, TOMEK R, SZETO L, VOKES EE. Phase I study of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, combined with carboplatin and etoposide in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 1110–1117.
- [47] SAADANE A, MASTERS S, DIDONATO J, LI J, BERGER M. Parthenolide inhibits IkkappaB kinase, NF-kappaB activation, and inflammatory response in cystic fibrosis cells and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; **36**: 728–736.
- [48] SARBASSOV DD, GUERTIN DA, ALI SM, SABATINI DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **18**: 1098–1101.
- [49] PINILLA C, WANG Z, KRAJEWSKA M, BONNEAU MJ, PEDERSEN IM, KITADA S, SCOTT FL, BAILLY-MAITRE B, GLINSKY G, SCUDIERO D, SAUSVILLE E, SALVESEN G, NEFZIA, OSTRESH JM, HOUGHTEN RA, REED JC. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell* 2004; **5**: 25–35.
- [50] SCHMIDT C, PENG B, LI Z, SCLABS GM, FUJIOKA S, SCHIMMER AD, WELSH K, NIU J, SCHMIDT-SUPPRIAN M, EVANS DB, ABBRUZZESE JL, CHIAO PJ. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2003; **12**: 1287–1300.
- [51] SCHUBERT A, GRIMM S. Cyclophilin D, a component of the permeability transition-pore, is an apoptosis repressor. *Cancer Res* 2004; **64**: 85–93.
- [52] SHIMIZU S, MATSUOKA Y, SHINOHARA Y, YONEDA Y, TSUJIMOTO Y. Essential Role of Voltage-dependent of Apoptosis in Mammalian Cells. *J Cell Biol* 2001; **152**: 237–250.
- [53] SHUKLA S, GUPTA S. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3169–3178.
- [54] SIKORAE, BIELAK-ZMIJEWSKAA, MAGALSKAA, PIWOCKAK, MOSIENIAK G, KALINOWSKA M, WIDLAK P, CYMERMAN IA, BUJNICKI JM. Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40/caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 927–934.
- [55] SOLARY E, DROIN N, BETTAIEB A, CCRCOS L, DIMANCHE-BOITREL MT, GARRIDO C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* 2000; **14**: 1833–1849.
- [56] SORDET O, GOLDMAN A, REDON C, SOLIER S, RAO AV, POMMIER Y. Topoisomerase I requirement for death receptor-induced apoptotic nuclear fission. *J Biol Chem* 2008; **283**: 23200–23208.
- [57] SUN SY, HAIL N Jr, LOTAN R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 662–672.
- [58] TABELLINI G, CAPPELLINI A, TAZZARI P, FALA F, BILLIA, MANZOLI L, COCCO L, MARTELLI A. Phosphoinositide 3-kinase/Akt inhibition increases arsenic trioxide-induced apoptosis of acute promyelocytic and T-cell leukaemias. *Br J Haematol* 2005; **130**: 716–725.
- [59] TAKADA Y, SINGH S, AGRAWAL BB. Identification of a p65 peptide that selectively inhibits NF- $\kappa$ B activation induced by various inflammatory stimuli and its role in downregulation of NF- $\kappa$ B-mediated gene expression and upregulation of apoptosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 15096–15104.
- [60] TAMM I, TREPEL M, CARDO-VILA M, SUN Y, WELSH K, CABEZAS E, SWATTERTHWAIT A, ARAP W, REED JC, PASQUALINI R. Peptides Targeting Caspase Inhibitors. *J Biol Chem* 2003; **278**: 14401–14405.

- [61] TROYANO A, FERNANDEZ C, SANCHO P, DE BLAS E, ALLER P. Effect of Glutathione Depletion on Antitumor Drug Toxicity (Apoptosis and Necrosis) in U-937 Human Promonocytic Cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 47107–47115.
- [62] UMEZAWA K. Inhibition of tumor growth by NF-kappaB inhibitors. *Cancer Sci* 2006; **97**: 990–995.
- [63] UNO K, INUKAI T, KAYAGAKI N, GOI K, SATO H, NEMOTO A, TAKAHASHI K, KAGAMI K, YAMAGUCHI N, YAGITA H, OKUMARAK, KOYAMA-OKAZAKI T, SUZUKI T, SUGITAK, NAKAZAWA S. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) frequently induces apoptosis in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. *Blood* 2003; **101**: 3658–3667.
- [64] WANG G. A Role for Mitochondrial Bak in Apoptotic Response to Anticancer Drugs. *J Biol Chem* 2001; **276**: 34307–34317.
- [65] WATABE M, HISHIKAWA K, TAKAYANAGIA, SHIMIZU N, NAKAKI T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkappaB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 6017–6026.
- [66] WERNER A, DE VRIES E, TAIT S, BONTIER I, BORST J. TRAIL Receptor and CD95 Signal to Mitochondria via FADD, Caspase-8/10, Bid, and Bax but Differentially Regulate Events Downstream from Truncated Bid. *J Biol Chem* 2002; **277**: 40760–40767.
- [67] WEST JD, JI C, MARNETT LJ. Modulation of DNA fragmentation factor 40 nuclease activity by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* 2005; **280**: 1514–1517.
- [68] WEST KA, CASTILLO SS, DENNIS PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 2002; **5**: 234–248.
- [69] YANG L, DAN HC, SUN M, LIU Q, SUN XM, FELDMAN RI, HAMILTON AD, POLOKOFF M, NICOSIA SV, HERLYN M, SEBTI SM, CHENG JQ. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* 2004; **64**: 4394–4399.
- [70] YAO Z, DUAN S, HOU D, HEESE K, WU M. Death effector domain DEDa, a self-cleaved product of caspase-8/Mch5, translocates to the nucleus by binding to ERK1/2 and upregulates procaspase-8 expression via a p53-dependent mechanism. *EMBO J* 2007; **26**: 1068–1080.
- [71] YASUI H, ADACHI M, IMAI K. Combination of tumor necrosis factor-alpha with sulindac in human carcinoma cells *in vivo*. *Ann NY Acad Sci* 2003; **1010**: 273–277.
- [72] YETHON JA, EPAND RF, LEBER B, EPAND RM, ANDREWS DW. Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 48935–48941.
- [73] YIP-SCHNEIDER MT, NAKSHATRI H, SWEENEY CJ, MARSHALL MS, WIEBKE EA, SCHMIDT CM. Parthenolide and sulindac cooperate to mediate growth suppression and inhibit the nuclear factor-kappa B pathway in pancreatic carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; **4**: 587–594.
- [74] YOSHIDA A, TAKEMURA H, INOUE H, MIYASHITA T, UEDA T. Inhibition of glutathione synthesis overcomes Bcl-2-mediated topoisomerase inhibitor resistance and induces nonapoptotic cell death via mitochondrial-independent pathway. *Cancer Res* 2006; **66**: 5772–5780.
- [75] YOULE RJ, STRASSER A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 47–59.
- [76] ZHANG YH, KOOISTRA K, PIETERSEN A, ROHN JL, NOTEBORN MH. Activation of the tumor-specific death effector apoptin and its kinase by an N-terminal determinant of simian virus 40 large T antigen. *J Virol* 2004; **78**: 9965–9976.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 17.07. 2008 r.

Przyjęto: 05.10. 2008 r.

Ireneusz Majsterek

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki

ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

e-mail: imajst@biol.uni.lodz. pl