

INDUKCJA APOPTOZY JAKO CEL TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

INDUCTION OF APOPTOSIS AS A TARGET OF CANCER GENE THERAPY

Maciej MAŁECKI¹, Sylwia RZOŃCA²

¹Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie oraz Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Klinicznej, Akademia Medyczna,

²Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Streszczenie. Śmierć komórek, ich proliferacja są procesami fizjologicznymi, które zachodzą w każdym organizmie. Komórki prawidłowe umierają zarówno w okresie embriogenezy, jak i w dorosłym organizmie. Dla komórek nowotworowych charakterystyczną jest swoista oporność na apoptozę i wynikająca z tego ograniczona wrażliwość na cytostatyki. Proapoptotyczna terapia genowa jest strategią terapii genowej chorób nowotworowych. Zakłada się, iż transfer genów, kodujących czynniki proapoptotyczne bezpośrednio np. do guzów nowotworowych, może doprowadzić do indukcji apoptozy komórek nowotworowych i ograniczy tym samym wzrost nowotworów. Jak dotychczas większość badań eksperymentalnych dotyczy wykorzystania genów – znanych, dobrze scharakteryzowanych – białek sygnalizacji apoptozy np. BAX, P53, TNF, kaspaz. Bardzo często rozpatruje się możliwość wykorzystania strategii transferu genów proapoptotycznych jako metody wspomagającej klasyczne leczenie nowotworów np. za pomocą chemioterapii czy radioterapii.

Słowa kluczowe: terapia genowa, apoptoza, nowotwory.

Summary: Cell death, commonly recognized as necrosis or apoptosis, is thought to be a one of biological processes describing cell life. The phenomena of cell recycling during human life is known for a various types of cells and the resistance of cancer cells to apoptosis is also well described. Proapoptotic gene therapy is one of the method of cancer therapy. The main rationales are focused on induction of apoptosis of cancer cells and therefore inhibition its growth. Mostly, gene therapy trials are concerned on genes encoding well known proteins of apoptotic signaling as BAX, P53, TNF, caspases. Proapoptotic gene therapy is also discussed as a supplementary method of the cancer treatment. The classical therapies like chemotherapy or radiotherapy may be assisted by gene transfer strategy.

Key words: gene therapy, apoptosis, cancer.

TERAPIA GENOWA NOWOTWORÓW

Terapia genowa jest nową strategią terapeutyczną. Początkowo była metodą przewidzianą do leczenia wrodzonych defektów metabolicznych (np. SCID/ADA), jednak bardzo szybko zaczęto wykorzystywać metody terapii genowej w próbach leczenia chorób nowotworowych, infekcyjnych czy naczyniowo-sercowych [82]. Ponad 60% prób klinicznych przeprowadzanych na świecie dotyczy chorób nowotworowych. Główne strategie terapeutyczne terapii genowej nowotworów zebrano w tabeli 1. Obejmują one:

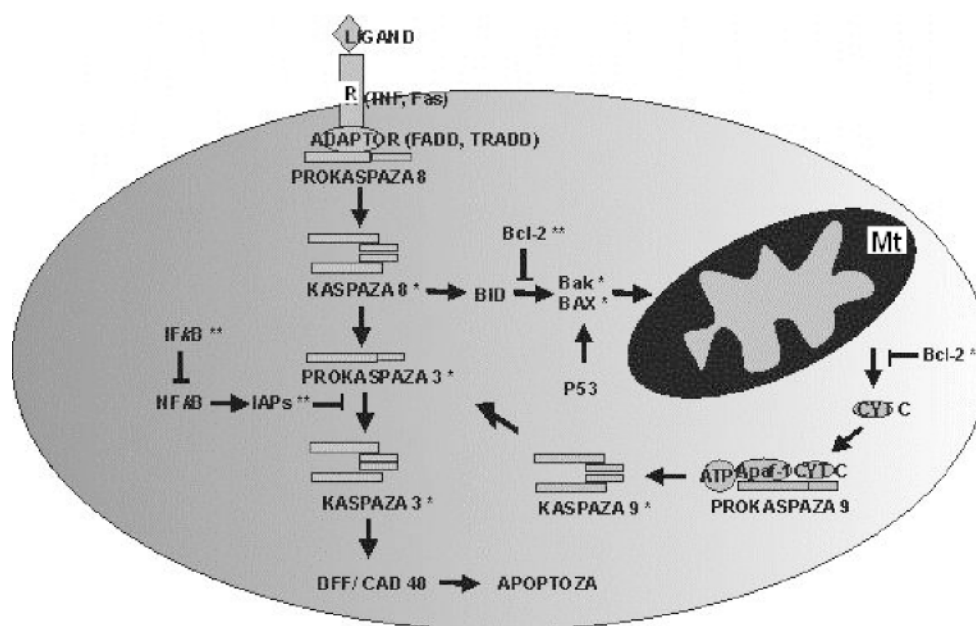
- 1) próby modulowania funkcją onkogenów i genów supresorowych;
- 2) stosowanie genów samobójczych;
- 3) próby immunomodulacji;
- 4) strategię antyangiogenezy oraz
- 5) stosowanie genów proapoptotycznych.

Wykorzystanie strategii onkogeny / supresory sprowadza się do badań mających na celu albo wyciszenie, blokowanie funkcji onkogenów np. przez zastosowanie sekwencji antysensownych (np. hamowanie aktywności onkogenu ras [10]) albo też doprowadzenie do nadekspresji supresorów onkogenezy poprzez np. wykorzystanie wektorów ekspresyjnych, kodujących geny supresorowe np. *P53* [81]. Terapia genami samobójczymi z kolei, opiera się na założeniu, iż chorą tkankę można wyposażać w gen kodujący białko enzymatyczne, które przekształci podany systemowo nietoksyczny substrat w toksyczny produkt. Przykłady zastosowania genów samobójczych to np. podanie do guza wektora z wklonowanym genem dezaminazy cytozynowej, którego białko przekształca w guzie, podaną systemowo nietoksyczną 5-fluorocytozynę w toksyczny 5-fluorouracyl [41]. Immunoterapia nowotworów natomiast bardzo często wiąże się z zabiegami wykonanymi *ex vivo*. Pobrane od pacjenta komórki nowotworowe transfekuje się genami, których produkty wpływają na odpowiedź układu immunologicznego. Najczęściej są to geny cytokin, np. IL-1,2,4,6; INF, TNF [27,49]. Obiecującą strategią terapii genowej nowotworów jest również antyangiogeneza. Opiera się ona na założeniu, iż powstawanie sieci naczyń krwionośnych w masie nowotworu jest czynnikiem bezpośrednio determinującym jego rozwój i warunkującym jednocześnie

tworzenie przerzutów nowotworowych [13,70]. Kilka strategii antyangiogennych jest w trakcie badań eksperymentalnych. Zaliczyć tu można np. próby wykorzystania proteolitycznych fragmentów białek budulcowych (arestyna, angiostatyna, endostatyna), przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw angiogennym czynnikom wzrostowym, czy rozpuszczalnych fragmentów receptorów dla tychże czynników, np. dla VEGF [13,20]. Do tej pory znanych jest ponad 40 endogennych inhibitorów

TABELA 1. Terapia genowa chorób nowotworowych – główne metody

Terapia genowa chorób nowotworowych	Strategie terapeutyczne
	onkogeny / supresory
	geny samobójcze
	immunoterapia
	antyangiogeneza
	APOPTOZA



RYCINA 1. Szlaki apoptozy – droga receptorowa (R) i mitochondrialna (Mt), schemat wskazuje na wykorzystywane w próbach terapii genowej geny kodujące czynniki proapoptotyczne (*) lub czynniki antyapoptotyczne (**)

angiogenezy, których mechanizm powstawania i działania jest różny [13]. Generalnie hamują one proliferację, migrację komórek śródbłonkowych, dzięki czemu ograniczają wzrost nowotworów i powstawanie przerzutów [13,71]. W wielu badaniach wykorzystuje się czynniki, które bezpośrednio oddziałują z cytokinami proangiogennymi – VEGF, FGF, angiopoetyna-1, Del-1; najczęściej prace dotyczą prób ograniczenia funkcji VEGF [13,20,52]. Podejmowane strategie obejmują wykorzystanie przeciwciał antyVEGF, blokowanie receptorów dla VEGF, hamowanie syntezy VEGF przez sekwencje antysensowne oraz wykorzystanie rozpuszczalnych form receptorów dla VEGF [13]. Terapię genową nowotworów wiąże się również nierzadko z apoptozą. Prace eksperymentalne wskazują, iż w komórkach nowotworowych dochodzi do zaburzenia przebiegu procesu apoptozy [70], a główną przyczyną nieskuteczności np. chemioterapii jest oporność komórek nowotworowych na stosowane cytostatyki [45,70]. Zakłada się, iż transfer genów proapoptotycznych do komórek nowotworowych (proapoptotyczna terapia genowa) może wymusić śmierć komórek w drodze apoptozy.

ŚMIERĆ KOMÓREK

Na podstawie wielu obserwacji rozróżnić można dwa rodzaje śmierci komórek: śmierć w drodze nekrozy i apoptozy. Nekroza najczęściej spowodowana jest uszkodzeniami mechanicznymi komórek. Następuje ona głównie w wyniku utraty

równowagi osmotycznej komórki. W związku z tym dochodzi do biernego transportu jonów (głównie wapnia) do wnętrza komórki, zwiększonego napływu wody, zahamowania syntezy ATP. Zniszczona otoczka jądrowa i błona komórkowa ułatwiają wypływ zawartości komórki na zewnątrz, któremu towarzyszy reakcja zapalna. W odróżnieniu od nekrozy, apoptoza jest procesem kontrolowanym genetycznie. W drodze apoptozy usuwane są np. komórki, których materiał genetyczny został uszkodzony i które mogą być potencjalnym źródłem np. transformacji nowotworowej [54]. Morfologicznie apoptozie towarzyszą takie zmiany jak obkurczenie komórki na skutek utraty wody, kondensacja chromatyny, fragmentacja DNA, reorganizacja cytoszkieletu, kondensacja cytoplazmy i powstanie ciałek apoptotycznych (trawionych przez otaczające makrofagi lub sąsiadujące komórki). Zmiany zachodzące w komórce w czasie apoptozy indukują szybką odpowiedź ze strony układu immunologicznego. Pozwala to komórkom fagocytyzującym na natychmiastowe rozpoznanie komórki apoptotycznej, ciałek apoptotycznych, co zapobiega powstaniu reakcji zapalnej.

Znane są różne czynniki, które mogą być przyczyną zarówno nekrozy, jak i apoptozy. O tym czy komórka ulegnie szybkiej destrukcji na zasadzie nekrozy, czy uruchomi program apoptozy, zależy od czasu ekspozycji na czynnik uszkodzający, jego dawki, rodzaju komórki i środowiska, w którego otoczeniu ona przebywa [45,54].

APOPTOZA

Terapia genowa wykorzystuje wprowadzane, metodami wirusowymi lub niewirusowymi, geny kodujące terapeutyczne białka [35]. W przypadku terapii proapoptotycznej klonowane wektory ekspresyjne niosą sekwencje kodujące czynniki o charakterze apoptotycznym. Spośród olbrzymiej grupy białek biorących udział w sygnalizacji apoptozy [54,58], niektóre z nich zdają się zdobywać znaczenie aplikacyjne i stawać się przedmiotem badań terapii genowej.

Rodzina białek BCL-2

W procesie regulacji apoptozy kluczową rolę odgrywa rodzina białek BCL-2. Do grupy tej zalicza się zarówno białka proapoptotyczne, jak i białka hamujące proces apoptozy. Wspólną cechą wszystkich białek tej grupy jest obecność czterech konserwatywnych domen określanych skrótem BH (ang. *BCL-2 homology*) [83]. Antyapoptotyczne białka BCL-2, BCL-XL BCL-W i MCL-1 wykazują w swej budowie obecność wszystkich czterech domen. Wydaje się, że obecność domeny BH1 oraz BH2 decyduje o antyapoptotycznym charakterze tych białek [85]. Białka należące do tej grupy mogą spełniać funkcje regulacyjne poprzez łączenie się z białkiem Apaf-1 uniemożliwiając w ten sposób przyłączenie się prokaspazy 9 do apoptosomu, mogą również pełnić rolę inhibitora uwalniania cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy. Białka proapoptotyczne, takie jak BAX, BAK, BOK, nie mają domeny BH4, natomiast białka BID, BAD, BIM, BLK, BIK/NBK mają tylko i wyłącznie BH3 (ang. *BH3 only*). Proapoptotyczne działanie białek rodziny BCL-2 polega głównie na tworzeniu kanałów

w błonie mitochondrialnej, przez które uwalniane są do cytoplazmy inne czynniki apoptotyczne, bądź też na współdziałaniu z megakanałem, a konkretnie z jego anionową częścią zależną od napięcia (ang. *voltage-dependent anion channel*, VDAC) [63].

Białka IAP

W mechanizmy regulacji procesu apoptozy zaangażowana jest grupa białek IAP (ang. *inhibitor of apoptosis protein*). Białka NAIP (ang. *neuronal apoptosis inhibitory protein*), XIAP (ang. *X-linked IAP*), c-IAP 1, c-IAP 2, czy surwiwina działają hamująco na proces apoptozy. Ekspresja tych białek jest regulowana między innymi przez jądrowy czynnik transkrypcyjny NFκB. Relacje pomiędzy białkami IAP a czynnikiem NFκB są bardziej złożone. Uważa się, że IAP są odpowiedzialne za inaktywację inhibitora dla NFκB (IkB), przez co wpływają na aktywność samego czynnika. Białka IAP mogą hamować proces apoptozy na etapie pobudzenia receptorów błonowych poprzez wiązanie białek regulatorowych TRAF (ang. *TNF receptor associated factor*) [78]. Ponadto mogą zapobiegać bądź hamować aktywację niektórych kaspaz (3, 7, 9) poprzez ich bezpośrednie wiązanie. Białka tej grupy mogą również działać jak ligaza ubikwitynowa [68], prowadząc do degradacji kaspaz.

Białka szoku cieplnego

Do niedawna uważano, że białka szoku cieplnego (HSP, ang. *heat shock protein*) są głównie odpowiedzialne za przeżywanie komórek w warunkach stresu wywołanego wysoką temperaturą [32,65]. Aktualnie wiadomo, że odgrywają one istotną rolę w oporności komórek na wiele sygnałów apoptotycznych. HSP mogą hamować proces apoptozy, nawet w momencie, kiedy doszło już do aktywacji kaspaz efektorowych [65].

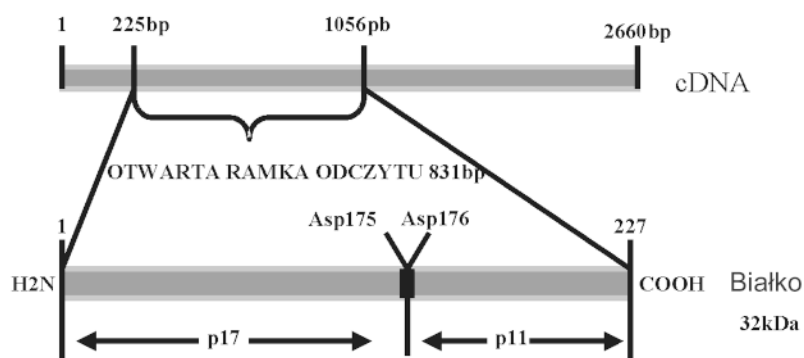
Strażnik genomu – białko p53

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym mającym decydujący wpływ na losy komórki, w której doszło do uszkodzenia DNA. W zależności od stopnia uszkodzenia materiału genetycznego białko p53 poprzez aktywację odpowiednich genów prowadzi do reperacji uszkodzeń DNA (aktywacja genów GADD45, p21^{WAF1}), zahamowania cyklu komórkowego w fazie G-1 (genu 14-3-3σ, GADD45, p21^{WAF1}) bądź aktywacji procesu apoptozy (aktywacja genów BAX, PIG, Fas, DR5) [17].

Kaspazy

Kluczowym etapem indukcji apoptozy jest aktywacja enzymów o aktywności proteaz cysteinowych zwanych kaspazami. Historia tych białek rozpoczęła się w momencie identyfikacji genu kodującego ICM (ang. *interleukin-1 β converting enzyme*), nazwanego później kaspazą 1 [59]. Gen ten jest w dużym stopniu homologiczny do genu *ced-3 Caenorhabditis elegans* i podobnie jak on bierze udział w procesach związanych ze śmiercią komórki. Kaspazy należą do grupy proteaz cysteinowych, rozszczepiających substrat po reszcie kwasu asparaginowego. W organizmie syntetyzowane są w formie nieaktywnej jako proenzymy, aby mogły pełnić swoje funkcje,

musi dojść do ich aktywacji. Do zmian konformacyjnych prowadzących w stronę aktywnego enzymu dochodzi w drodze oligomeryzacji (np.: kaspaza 8) bądź poprzez regulację allosteryczną (np.: kaspaza 9, allosterycznym regulatorem dla kaspazy 9 jest białko Apaf-1) [6]. Funkcjonalnie kaspazy można podzielić na dwie grupy. Kaspazy inicjatorowe, które biorą udział w przekazywaniu sygnałów apoptotycznych (np. kaspaza 2, 6, 8) oraz kaspazy efektorowe, które ten sygnał realizują (kaspaza 3, 7). Wszystkie kaspazy zbudowane są z dwóch podjednostek, małej i dużej (ryc. 2). Przed dużą podjednostką znajduje się tzw. prodomena. Ze względu na jej długość kaspazy dzieli się na dwie grupy: z długą prodomeną (kaspaza 1, 2, 4, 5, 9, 11, 12) oraz z prodomeną krótką (kaspaza 3, 6, 7, 14). Podczas aktywacji dochodzi do rozszczepienia podjednostek, usunięcia prodomeny. Aktywna kaspaza występuje jako homodimer. Specyficzność substratowa kaspaz determinowana jest obecnością w substracie reszty czteroaminokwasowej pasującej do odpowiedniego czteroaminokwasowego motywu w samej kaspazie. Strukturę przestrzenną kaspaz tworzą cztery zmienne pętle (L1-L4) [62]. Pętla L1 i L2 tworzą dużą podjednostkę, L3 oraz L4 wchodzi w skład podjednostki małej. Wśród kaspaz efektorowych kluczową rolę w procesie apoptozy odgrywa kaspaza 3 (ryc. 2). Zidentyfikowana jednocześnie przez trzy grupy badaczy, znana jest jako CPP32 [14], Yama [76] oraz apopain [44]. Aktywowana przez kaspazę 8 oraz kaspazę 9, jest elementem łączącym dwa szlaki apoptotyczne, mitochondrialny oraz od mitochondriów niezależny. Kaspaza 3 dezaktywuje inhibitor DFF/CAD (ang. *DNA fragmentation factor 40kDa / caspase-activated, deoxyribonuclease*), czego wynikiem jest aktywacja endonukleazy DFF40 /CAD, przemieszczanie się jej do jądra komórkowego i fragmentacja DNA [62]. Fragmenty DNA wielkości nukleosomów są jednym z bardziej charakterystycznych markerów apoptozy. Otwarta ramka odczytu kaspazy 3 (ryc. 2) liczy 831 pz, białko o masie 32 kDa jest zbudowane z 277 aminokwasów [14]. W wyniku hydrolizy wiązań peptydowych prokaspazy w miejscu Asp-28-Ser-29 oraz Asp-175-Ser-176 [47] powstają dwie podjednostki wielkości 11 kDa oraz 17 kDa. Aktywny enzym, podobnie jak w przypadku innych kaspaz funkcjonuje jako homodimer zbudowany z dwóch małych i dwóch dużych podjednostek [9]. Grupa substratów dla kaspazy 3 jest dość duża. Do bardziej znanych zalicza się PARP, DNA-PK_{cs}, Rb,



RYCINA 2. Kaspaza 3 – schemat organizacji sekwencji kodującej i białka

Huntingtyna. Białka, które do niej należą, charakteryzuje obecność czteroamino-kwasowej sekwencji DXXD. Substratem dla kaspazy 3 mogą być również inne kaspazy (kaspaza 2, 6, 9). Wyróżnia się dwa podstawowe szlaki sygnalizacji apoptozy związane z kaskadą kaspaz (ryc.1). Jednym z nich jest szlak niezależny od mitochondriów. Sygnałem do uruchomienia tego szlaku jest przyłączenie się ligandu do jednego z receptorów błonowych z rodziny TNF [19]. Przedstawicielami tej grupy receptorów są m.in. TNFR1, Fas, DR3, DR4, DR5, DcR1, DcR2. Receptory te eksprymowane są na powierzchni wielu komórek, głównie układu immunologicznego, biorąc udział w negatywnej selekcji limfocytów. Przyłączenie ligandu do receptora aktywuje go, jednak do tego, aby spełniał on swoją funkcję, konieczne jest jeszcze białko adaptatorowe. Do lepiej poznanych białek adaptorowych należą białka: FADD, TRADD, RIP, TRAF2. W budowie mają one tzw. domenę śmierci (ang. DD – *death domain*) [1], taką samą domenę mają receptory z grupy TNF. Oddziaływania pomiędzy receptorami i białkiem adaptatorowym mają charakter oddziaływań homofilowych. W budowie białka pośredniczącego wyróżnia się jeszcze dodatkową domenę zwaną DED (ang. *death effector domain*). Za pośrednictwem tej domeny przyłącza się do kompleksu inicjatorowa prokaspaza 8, która następnie ulega autoaktywacji [1,51,62]. Kaspaza 8 jest bezpośrednim aktywatorem prokaspazy 3, głównego efektora zmian zachodzących w komórce podczas apoptozy zależnej od kaspaz.

Drugi z komórkowych szlaków aktywacji kaspaz jest procesem zależnym od mitochondriów. Do jego indukcji może dojść w wyniku niedotlenienia, uszkodzenia DNA oraz za pośrednictwem onkogenów. Proces ten jest związany z aktywacją białek z rodziny Bcl-2/BAX. Aktywna forma jednego z białek tej grupy, białka BID (tBID – *truncated BID*) przemieszcza się z cytoplazmy do mitochondriów. W wyniku oddziaływania białka BID z innymi białkami proapoptotycznymi z grupy BCL-2 (BAX, BAK), w błonie mitochondrialnej tworzą się kanały, dochodzi do zmiany potencjału błonowego i wyrzutu cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy. Cytochrom c wraz z cytozolowym białkiem APAF-1 (ang. *apoptosis protease activating factor*), ATP oraz nieaktywną formą kaspazy 9 tworzy kompleks zwany apoptosomem. Celem powstania takiego kompleksu jest utworzenie odpowiednich warunków do aktywacji prokaspazy 9, będącej aktywatorem wspomnianej powyżej prokaspazy 3 [18]. Zarówno szlak aktywacji kaspaz związany z mitochondriami, jak i od mitochondriów niezależny prowadzi do uaktywnienia kaspazy 3. Substratami dla kaspazy 3 jest szereg białek, których wynikiem działania są charakterystyczne dla apoptozy zmiany biochemiczne i morfologiczne komórek.

PROAPOPTOTYCZNA TERAPIA GENOWA

Oporność komórek nowotworowych na apoptozę

Zmiany w komórkach nowotworowych w profilu ekspresji genów kodujących czynniki o charakterze pro- i antyapoptotycznym ujawniają się w postaci oporności komórek na apoptozę. Bardzo często zmieniona wrażliwość na apoptozę jest podstawowym

czynnikiem ograniczającym skuteczność terapii nowotworów opartych na wykorzystaniu leków cytostatycznych [45,70]. Mutacje np. genu *P53* obserwuje się w 50% różnych nowotworów, a występowanie niefunkcjonalnej formy białka P53 bądź jego brak w komórkach może być jedną z przyczyn wystąpienia fenotypu opornego na apoptozę [17,43]. Podwyższona ekspresja białka Bcl-2 często skorelowana jest z mutacjami genu *p53* w komórkach. We wczesnych etapach nowotworzenia nadekspresja białka Bcl-2 chroniąc komórki z mutacjami letalnymi sprzyja procesom destabilizacji genetycznej charakterystycznej dla nowotworów [15]. Ograniczona efektywność apoptozy w komórkach nowotworowych związana jest często również z mutacjami genu *BAX*, jednego z głównych efektorów apoptozy indukowanej przez białko supresorowe P53 [40]. Wykazano, iż nadekspresja białka BAX w komórkach raka piersi zwiększa ich wrażliwość na leki [16]. Bardzo często obserwuje się współzależność pomiędzy występowaniem mutacji *P53* w nowotworach a zaburzoną równowagą ekspresji białek BCL-2-BAX [17,43]. Oporność komórek nowotworowych na apoptozę bardzo często wiąże się również ze zmienionym profilem ekspresji inhibitorów apoptozy IAP i surwiwiny. Tamm i współpracownicy wykazali, iż np. ostre białaczki oraz szpiczaki cechuje wysoka ekspresja czynnika XIAP [74]. Znacznie podwyższony poziom surwiwiny stwierdzono w przypadku raka piersi [75] oraz trzustki [59]. W niektórych nowotworach można stwierdzić obniżony poziom ekspresji negatywnego regulatora dla XIAP-XAF1 [74]. Nadekspresja inhibitorów apoptozy IAP może również zmieniać aktywność kaspazy 3. Zmiany mogą również dotyczyć regulacyjnego białka FLIP. Białko to wykazuje dużą homologię z prokaspazą 8, poprzez przyłączenie się do kompleksu DISC, uniemożliwia aktywację kaspazy [28,39]. Przyczyną oporności komórek nowotworowych na apoptozę może być także zmieniony poziom ekspresji receptorów błonowych z grupy TNF [21,46]. Z podwyższonym poziomem np. Fas w komórkach nowotworowych związana jest wyższa ekspresja genu kodującego fosfatazę FAP-1 (ang. *Fas associated phosphatase-1*). Enzym ten zakłóca prawidłowe działanie Fas, przez co nie dochodzi do przekazywania sygnału apoptotycznego do wnętrza komórki [22,30]. Przyczyną nieprawidłowego funkcjonowania receptorów błonowych w komórkach nowotworowych mogą być również ich mutacje, co zmniejsza efektywność wiązania ligandu, hamując w ten sposób apoptozę na etapie jej inicjacji. Występowanie fenotypu opornego może mieć również związek ze zmienionym poziomem ekspresji kaspaz w komórkach nowotworowych. Głównie dotyczy to kaspazy 3, która jako kaspaza efektorowa, odgrywa kluczową rolę w procesie apoptozy, a jej brak bądź obniżona ekspresja może w dużym stopniu upośledzić mechanizm apoptozy bądź go całkowicie zahamować. Tak jest w niektórych przypadkach raka nerki, którego oporność na apoptozę może być związana z brakiem kaspazy 3 oraz obniżoną ekspresją kaspaz 7, 8 i 10 [26]. Brak kaspazy 3 stwierdzono również w komórkach MCF-7 (komórki raka piersi) [23] oraz OVP-10 (komórki z wysięku raka jajnika) [34]. W przypadku komórek MCF-7 została zidentyfikowana delecja w obszarze egzonu trzeciego, co wyjaśnia brak produktu białkowego [23]. Warto również wspomnieć, iż paradoksalnie w niektórych nowotworach obserwuje się podwyższony poziom kaspaz; przykładem jest ostra białaczka szpikowa (AML), w której obserwuje się wyższy poziom prokaspaz oraz aktywowanych form kaspazy 2 i 3 [11].

PROAPOPTOTYCZNA TERAPIA GENOWA – PRÓBY EKSPERYMENTALNE

W badaniach stosuje się geny proapoptotyczne, wprowadzane do komórek za pomocą wektorów wirusowych bądź niewirusowych lub nierzadko wykorzystuje się sekwencje antysensowne do genów antyapoptotycznych. Przeprowadzane są np. próby transferu dzikiego typu (wt, ang. *wild type*) genu p53 między innymi do komórek raka płuca, piersi, jajnika [16,81]. Jedną z proponowanych strategii terapii polega na połączeniu chemio- oraz genoterapii. Wprowadzenie sekwencji antysensownej dla komórek z wt p53 znacznie uwrażliwia komórki na cisplatynę [8], choć niektóre doniesienia wskazują na brak indukcji apoptozy w komórkach transfekowanych p53 [25]. Nierzadko obserwuje się również regresję guzów na skutek koinfekcji komórek nowotworowych genami np. p53 i Bcl-2 [53].

W terapii genowej proapoptotycznej wykorzystuje się również geny kodujące białka z rodziny Bcl-2/BAX. Dotyczy to zarówno pro-, jak i antyapoptotycznych reprezentantów tej grupy. Nadekspresja antyapoptotycznego białka Bcl-2 w komórkach nowotworowych we wczesnych stadiach choroby jest jednym z mechanizmów decydujących o oporności komórek nowotworowych na apoptozę. Terapia z udziałem Bcl-2 polega na blokowaniu aktywności genu poprzez wprowadzenie np. siRNA. Przeprowadzone doświadczenia, polegające na transferze sekwencji antysensownej dla genu *Bcl-2* do komórek raka piersi MCF-7, znacznie zwiększyły wrażliwość tych komórek na cytostatyki: etopozyd oraz dokсорubicynę [31]. Miejsce w terapii genowej znajduje również antagonist Bcl-2, białko BAX, odpowiedzialne za permabilizację – przepuszczalność błony mitochondrialnej i aktywność białek BID oraz Bak, a w konsekwencji wyrzut cytochromu c do cytoplazmy. W zdrowej komórce istnieje równowaga pomiędzy poziomem ekspresji BAX i Bcl-2. Przeprowadzane są próby adenowirusowego transferu BAX do komórek nowotworowych bądź genów o charakterze induktorów dla BAX, [72] np. genu *mda-7* [66]. Odnotowano również addytywny wpływ jednoczesnego wprowadzenia do komórek glejaka genu BAX oraz genu kodującego inicjatorową kaspazę 8 [64]. Wprowadzenie proapoptotycznego genu *Bak* do komórek raka płuca powoduje śmierć komórek w warunkach *in vitro* oraz znaczną regresję guza w warunkach *in vivo* [48]. Oprócz powyżej wymienionych białek regulujących apoptozę z grupy Bcl-2/BAX prowadzone są również badania dotyczące genów np. *BID* oraz *Bcl-X_s* [67]. Znane są również próby wykorzystania w terapii nowotworów genów kodujących egzogenne białka proapoptotyczne pochodzenia wirusowego. Petersen i wsp. [50] wykazali, iż poprzez wprowadzenie do komórek nowotworowych genu kodującego apoptynę dochodzi do indukcji apoptozy i ograniczenia wzrostu guzów. Indukcję apoptozy nowotworów zaobserwowano również w badaniach dotyczących genu wirusowego E4orf4 [70], choć mechanizm działania nie jest jeszcze poznany. Komórki nowotworowe często charakteryzuje zmienna ekspresja receptorów błonowych z grupy TNF. Obniżona ekspresja i zmiany w budowie są przyczynami oporności komórek na proces apoptozy. Niekiedy wprowadza się do komórek nowotworowych np. gen FasL dla receptora Fas [55], w efekcie czego obserwuje się

regresję guza oraz białka TRAIL dla receptora TRAIL-R3 i TRAIL-R4 [42]. Znaną grupą białek, wpływającą hamująco na proces programowanej śmierci są białka grupy IAP, np. surwiwina. Białko to ekspresowane jest tylko w komórkach nowotworowych. Nie stwierdzono obecności surwiwiny w komórkach zdrowej tkanki. Zablokowanie aktywności antyapoptotycznej surwiwiny, poprzez wprowadzenie antysensu do komórek raka wątroby, indukuje apoptozę oraz uwrażliwia komórki na stosowaną chemioterapię. [86,37].

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, jako aktywator IAP, może przyczynić się do zahamowania apoptozy, wywołanej obecnością odpowiednich cytokin, promieniowaniem jonizującym czy chemioterapeutykami. W celu zniesienia antyapoptotycznego działania NF- κ B w komórkach nowotworowych wprowadza się gen kodujący jego inhibitor – I κ B [47]. BRCA1, uważany jest za jeden z kluczowych genów odpowiedzialnych za stabilność genomu [61]. Jego zmutowane formy odgrywają istotną rolę w ontogenezie raka jajnika oraz piersi. Znane są próby transferu dzikiej wersji tego genu do komórek nowotworowych (rak jajnika), w efekcie uzyskano znaczne zahamowanie aktywności proliferacyjnej. Po wprowadzeniu prawidłowej formy genu BRCA1 również obserwowano regresję guzów u myszy [56]. W wielu badaniach wykorzystuje się również konstrukty genowe kodujące białka efektorowe apoptozy – kaspazy. Komórki np. raka wątroby charakteryzuje niższa ekspresja kaspazy 3 niż w prawidłowych hepatocytach [5]. Przeprowadzono próby wprowadzenia *in vitro* do komórek HuH7 adenowirusowego konstrukt z aktywną formą kaspazy efektorowej. Po 7 dniach od dnia infekcji poziom aktywności kaspazy 3 w komórkach transfekowanych był 5 lub 4 razy większy w stosunku do kontroli [5]. Podobne doświadczenia przeprowadzono na komórkach PC II (rak trzustki). Do PC II wprowadzono plazmid pcDNA 3.1 (+)/r-Caspase-3 (plazmid z rearanżowanymi podjednostkami kaspazy 3). Za pomocą analizy RT-PCR uzyskano produkt o wielkości 849 pz, odpowiadający aktywnej formie kaspazy 3 [79]. Wprowadzenie konstrukt z rearanżowaną kaspazą 3 do komórek MCF-7 [84] prowadzi do charakterystycznej dla apoptozy fragmentacji jądra. Istotny jest tu fakt, że w komórkach MCF-7 w obrębie egzonu 3 genu kaspazy 3 występuje mutacja. Brak transkryptu i białka kaspazy 3 jest przyczyną niewrażliwości tych komórek na cytostatyki. Transfer prawidłowej kopii genu zwiększa wrażliwość komórek MCF-7 m.in. na etopozyd i doksorubicynę [84]. Efekt działania aktywnej formy kaspazy 3 na komórki raka piersi został również określony na modelu mysim. Do guzów (rak piersi; SKBr-3) wprowadzono konstrukt adenowirusowy z rearanżowaną kaspazą 3. W efekcie zaobserwowano znaczną regresję guza. Analiza komórek z chorej tkanki wskazała na znaczny odsetek komórek apoptotycznych [2]. MacNeish i wsp. [38] wykazali natomiast skuteczność łączenia transfekcji genów samobójczych i apoptotycznych (kaspaz). Autorzy prowadzili badania na komórkach raka jajnika i stwierdzono, że proapoptotyczny sygnał systemu kinaza tymidynowa / gancyklovir (TK/GCV) można wzmocnić poprzez kotransfekcję komórek prokaspazą 3. Uzyskane wyniki wykazały, że substrat dla kaspazy 3, PARP jest znacznie szybciej rozcinany w przypadku układu TK/GCV-prokaspaza 3 niż w przypadku zastosowania tylko TK/GCV co wskazywałoby na wzmoczoną aktywność tej proteazy cysteinowej [38]. Nierzadko wskazuje się również, iż w układzie gen samobójczy/cytostatyk (np. TK/GCV) bardzo często regresja guzów nowotworowych determinowana jest w dużym stopniu przez tzw. efekt bystander [4,7].

Do grupy kaspaz efektorowych obok kaspazy 3 zalicza się również kaspazę 7. Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* na komórkach LNCaP (rak prostaty), polegające na adenowirusowym transferze kaspazy 7 do komórek wykazały, że kaspaza 7 jest obok kaspazy 3 głównym induktorem zmian apoptotycznych w komórkach raka prostaty [36]. Kaliberov i wsp. [24] natomiast wykazali ostatnio, iż w „terapii” raka prostaty zasadne jest łączenie terapii genowej z radioterapią. Autorzy wskazują, iż adenowirusowy transfer genu TRAIL pod kontrolą promotora FLT-1 do komórek nowotworowych i śródbłonkowych skutecznie ogranicza wzrost nowotworów poddanych promieniowaniu jonizującemu [24].

PODSUMOWANIE

Terapia genowa odzwierciedla postęp w naukach biomedycznych. Leczenie chorób za pomocą genów kodujących terapeutyczne białka budzi ogromny entuzjazm wśród naukowców, klinicystów, a przede wszystkim chyba wśród pacjentów. Proapoptotyczna terapia genowa wykorzystuje geny czynników indukujących apoptozę. Opiera się ona na założeniu, iż transfer proapoptotycznych wektorów ekspresyjnych kodujących geny apoptozy do komórek nowotworowych może wymusić ich apoptozę, tym samym może ograniczyć wzrost nowotworów. Badania dotyczące proapoptotycznej terapii genowej przekroczyły już próg kliniki. Szereg prowadzonych prac klinicznych dotyczy wykorzystania np. genu p53. W pracy Buller i wsp. [3] wykazano, iż dootrzewnowe podanie rekominowanych adenowirusów –Adp53- jest bezpieczne i dobrze tolerowane przez pacjentki chore na raka jajnika. Obserwowano również spadek poziomu markera CA125 w surowicy krwi pacjentek [3]. Bezpieczeństwo stosowania adenowirusów kodujących p53 wykazali również np. Kuball i wsp. [29] w badaniu klinicznym zastosowania Adp53 u chorych na raka pęcherza moczowego, a Schuler i wsp. [60] u chorych na niedronokomórkowego raka płuca. Jak pokazano w pracy Wen i wsp. [80] analiza materiału pochodzącego z biopsji od pacjentek z rakiem jajnika, którym podano konstrukt z p53, wykazała wzmożoną aktywność genów *p21/WAF1*, *bax* oraz *mdm-2* oraz obniżoną aktywność surwiwiny [80]. W pracy zaś Swisher i wsp. [69] przedstawiono regresję guzów u chorych na raka płuca. Pacjenci poddawani byli radioterapii, zaś doguzowo wprowadzany był konstrukt adenowirusowy kodujący p53 [69]. W badaniach klinicznych są wykorzystywane również inne niż p53 geny apoptozy, np. prowadzone są próby kliniczne oparte na genach BRCA1 [73] czy E1A [33] i E1B [77]. Prace eksperymentalne i pierwsze próby kliniczne wskazują, iż terapia genowa wykorzystująca geny apoptozy może być rozpatrywana jako metoda wspomagająca klasyczne procedury leczenia nowotworów np. chemioterapię czy radioterapię.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305–1308.
- [2] BAO W, ZHANG LH, JIA LT, QU P, WANG CJ, YANG AG. [Tumor suppression of a constitutively active caspase-3 in the SKBr-3 breast carcinoma xenograft mice model] *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2004; **20**: 23–26.
- [3] BULLER RE, RUNNEBAUM IB, KARLAN BY, HOROWITZ JA, SHAHIN M, BUEKERS T, PETRAUSKAS S, KREIENBERG R, SLAMON D, PEGRAM M. A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 553–566.
- [4] BURROWS FJ, GORE M, SMILEY WR, KANEMITSU MY, JOLLY DJ, READ SB, NICHOLAS T, KRUSE CA. Purified herpes simplex virus thymidine kinase retroviral particles: III. Characterization of bystander killing mechanisms in transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 87–95.
- [5] CAM L, BOUCQUEY A, COULOMB-L'HERMINE A, WEBER A, HORELLOU P. Gene transfer of constitutively active caspase-3 induces apoptosis in a human hepatoma cell line. *J Gene Med* 2004; **7**: 30–38.
- [6] CHANG DW, DITSWORTH D, LIU H, SRINIVASULA SM, ALNEMRI ES, YANG X. Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J Biol Chem* 2003; **278**: 16466–16469.
- [7] CHO HS, LEE HR, KIM MK. Bystander-mediated regression of murine neuroblastoma via retroviral transfer of the HSV-TK gene. *J Korean Med Sci* 2004 **19**: 107–112.
- [8] DATTA K, SHAH P, SRIVASTAVA T, MATHUR SG, CHATTOPADHYAY P, SINHA S. Sensitizing glioma cells to cisplatin by abrogating the p53 response with antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther* 2004; **11**: 525–531.
- [9] DEGTEREV A, BOYCE M, YUAN J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; **22**: 8543–8567.
- [10] DUURSMA AM, AGAMI R. Ras interference as cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**: 267–273.
- [11] ESTROV Z, THALL PF, TALPAZ M, ESTEY EH, KANTARJIAN HM, ANDREEFF M, HARRIS D, VAN Q, WALTERSCHEID M, KORNBLAU SM. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998; **92**: 3090–3097.
- [12] FAVROT M, COLL JL, LOUIS N, NEGOESCU A. Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy. *Gene Ther* 1998; **5**: 728–739.
- [13] FELDMAN A L, LIBUTTI SK. Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer* 2000; **89**: 1181–94.
- [14] FERNANDES-ALNEMRI T, LITWACK G, ALNEMRI ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30761–30764.
- [15] FULDA S, MEYER E, DEBATIN KM. Inhibition of TRAIL- induced apoptosis by *Bcl-2* overexpression. *Oncogene* 2002; **21**: 2283–2294.
- [16] GOMEZ-NAVARRO J, ARAFAT W, XIANG J. Gene therapy for carcinoma of the breast. Pro-apoptotic gene therapy. *Breast Cancer Res* 2000; **2**: 32–44.
- [17] GOTTLIEB TM, OREN M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1998; **8**: 359–368.
- [18] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312.
- [19] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molecular mechanisms of apoptosis induced by activation of membrane receptors from the TNF-R superfamily. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–21.
- [20] HORNIG C, WEICH HA. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999; **3**: 33–39.
- [21] IVANOV VN, BHOUMIK A, RONAI Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis *Oncogene*. 2003; **19**: 3152–3161.
- [22] IVANOV VN, LOPEZ BERGAMI P, MAULIT G, SATO TA, SASSOON D, RONAI Z. FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface *Mol Cell Biol*. 2003; **23**: 3623–3635.
- [23] JANICKE RU, SPRENGART ML, WATI MR, PORTER AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998; **273**: 9357–9360.
- [24] KALIBEROV SA, KALIBEROVA LN, STOCKARD CR, GRIZZLE WE, BUCHSBAUM DJ. Adenovirus-mediated FLT-1-targeted proapoptotic gene therapy of human prostate cancer. *Mol Ther* 2004; **10**: 1059–1070.
- [25] KIMURA M, TAGAWA M, TAKENAGA K, YAMAGUCHI T, SAISHO H, NAKAGAWARA A, SAKIYAMA S. Inability to induce the alteration of tumorigenicity and chemosensitivity of p53-null human pancreatic carcinoma cells after the transduction of wild-type p53 gene. *Anticancer Res* 1997; **17**: 879–883.

- [26] KOLENKO V, UZZO RG, BUKOWSKI R, BANDER NH, NOVICK AC, HSI ED, FINKE JH. Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1999; **59**: 2838–2842.
- [27] KOWALCZYK DW, WYSOCKI PJ, MACKIEWICZ A. Cancer immunotherapy using cells modified with cytokine genes. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 613–624.
- [28] KRUEGER A, BAUMANN S, KRAMMER PH, KIRCHHOFF S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 8247–8254.
- [29] KUBALL J, WEN SF, LEISSNER J, ATKINS D, MEINHARDT P, QUIJANO E, ENGLER H, HUTCHINS B, MANEVAL DC, GRACE MJ, FRITZ MA, STORKEL S, THUROFF JW, HUBER C, SCHULER M. Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation. *J Clin Oncol* 2002; **15**: 957–965.
- [30] LI Y, KANKI H, HACHIYA T, OHYAMA T, IRIE S, TANG G, MUKAI J, SATO T. Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int J Cancer* 2000; **15**: 473–479.
- [31] LIMA RT, MARTINS LM, GUIMARAES JE, SAMBADE C, VASCONCELOS MH. Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2004; **11**: 309–316.
- [32] LISOWSKA K, KRAWCZYK Z. Family of hsp70 stress genes in mammals. *Postępy Biochem* 1998; **44**: 179–192.
- [33] MADHUSUDAN S, TAMIR A, BATES N, FLANAGAN E, GORE ME, BARTON DP, HARPER P, SECKL M, THOMAS H, LEMOINE NR, CHARNOCK M, HABIB NA, LECHLER R, NICHOLLS J, PIGNATELLI M, GANESAN TS. A multicenter Phase I gene therapy clinical trial involving intraperitoneal administration of E1A-lipid complex in patients with recurrent epithelial ovarian cancer overexpressing HER-2/neu oncogene. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2986–2996.
- [34] MAŁECKI M. Przeżywanie komórek w warunkach braku adhezji. *Współczesna Onkologia* 2003; **7**: 90–94.
- [35] MAŁECKI M. Wirusowe strategie w terapii genowej ze szczególnym uwzględnieniem wektorów konstruowanych z wirusów związanych z adenowirusami (AAV). *Post Biol Kom* 2004; **31**: 47–57.
- [36] MARCELLI M, CUNNINGHAM GR, WALKUP M, HE Z, STURGIS L, KAGAN C, MANNUCCI R, NICOLETTI, TENG B, DENNER L. Signaling pathway activated during apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP: overexpression of caspase-7 as a new gene therapy strategy for prostate cancer. *Cancer Res* 1999; **59**: 382–390.
- [37] MCKAY TR, BELL S, TENEV T, STOLL V, LOPES R, LEMOINE NR, McNEISH IA. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene* 2003; **22**: 3539–3547.
- [38] McNEISH IA, TENEV T, BELL S, MARANI M, VASSAUX G, LEMOINE N. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced cell death is enhanced by co-expression of caspase-3 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2001; **8**: 308–319.
- [39] MEDEMA JP, SCAFFIDI C, KISCHKE FC, SHEVCHENKO A, MANN M, KRAMMER PH, PETER ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; **16**: 2794–2804.
- [40] MEIJERINK JP, MENSINK EJ, WANG K, SEDLAK TW, SLOETJES AW, DE WITTE T, WAKSMAN G, KORSMEYER SJ. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 1998; **91**: 2991–2997.
- [41] MISSOL E, SOCHANIK A, SZALA S. The use of E. coli cytosine deaminase gene as an example of suicide gene therapy of cancer. *Biotechnologia* 1996; **4**: 80–90.
- [42] MOHR A, HENDERSON G, DUDUS L, HERR I, KUERSCHNER T, DEBATIN KM, WEIHER H, FISHER KJ, ZWACKA RM. AAV-encoded expression of TRAIL in experimental human colorectal cancer leads to tumor regression. *Gene Ther* 2004; **11**: 534–543.
- [43] MULLAUER L, GRUBER P, SEBINGER D, BUCH J, WOHLFART S, CHOTT A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001; **488**: 211–231.
- [44] NICHOLSON DW, ALI A, THORNBERRY NA, VAILLANCOURT JP, DING CK, GALLANT M, GAREAU Y, GRIFFIN PR, LABELLE M, LAZEBNIK YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; **376**: 37–43.
- [45] NOWAK R, TARASIUK J. Hamowanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych opornych na działanie leków przeciwnowotworowych. *Post Biochem* 2004; **50**: 330–343.
- [46] OZOREN N, EL-DEIRY WS. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**: 135–147.

- [47] PAILLARD F. Induction of apoptosis with I-kappaB, the inhibitor of NF-kappaB. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 1–3.
- [48] PATAER A, FANG B, YU R, KAGAWA S, HUNT KK, MCDONNELL TJ, ROTH JA, SWISHER S. Adenoviral Bak overexpression mediates caspase-dependent tumor killing. *Cancer Res* 2000; **60**: 788–792.
- [49] PAUL S, CALMELS B, ACRES RB. Improvement of adoptive cellular immunotherapy of human cancer using *ex-vivo* gene transfer. *Curr Gene Ther* 2002; **2**: 91–100.
- [50] PIETERSEN AM, VAN DER EB MM, RADEMAKER HJ, VAN DEN WOLLENBERG DJ, RABELINK MJ, KUPPEN PJ, VAN DIERENDONCK JH, VAN ORMONDT H, MASMAN D, VAN DE VELDE CJ, VAN DER EB AJ, HOEBEN RC, NOTEBORN MH. Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Ther* 1999; **6**: 882–892.
- [51] PHILCHENKOV A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004; **8**: 432–444.
- [52] PROCZKA R, POLAŃSKI J, MAŁECKI M. The significance of vascular endothelial growth factor in the neoangiogenesis process. The role of hypoxia in the endothelial cells proliferation process and in the formation of collateral circulation. *Acta Angiologica* 2003; **9**: 143–150.
- [53] PUTZER BM, BRAMSON JL, ADDISON CL, HITT M, SIEGEL PM, MULLER WJ, GRAHAM FL. Combination therapy with interleukin-2 and wild-type p53 expressed by adenoviral vectors potentiates tumor regression in a murine model of breast cancer. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 707–718.
- [54] RADZISZEWSKA E. Fizjologiczna rola apoptozy. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 247–263.
- [55] RAKKAR AN, KATAYOSE Y, KIM M, CRAIG C, OHRI E, LI Z, COWAN KH, SETH P. A novel adenoviral vector expressing human Fas/CD95/APO-1 enhances p53-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 326–333.
- [56] RANDRIANARISON V, MAROT D, FORAY N, CABANNES J, MERET V, CONNAULT E, VITRAT N, OPOLON P, PERRICAUDET M, FEUNTEUN J. BRCA1 carries tumor suppressor activity distinct from that of p53 and p21. *Cancer Gene Ther* 2001; **8**: 759–770.
- [57] ROŻYŃKOWA D, FILIP A. Endogenne białka przeciwdziałające apoptozie. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 561–578.
- [58] SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; **391**: 96–99.
- [59] SATOH K, KANEKO K, HIROTA M, MASAMUNE A., SATOH A., SHIMOSEGAWA T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001; **92**: 271–278.
- degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 8662–8667.
- [69] SWISHER SG, ROTH JA, KOMAKI R, GU J, LEE JJ, HICKS M, RO JY, HONG WK, MERRITT JA, AHRAR K, ATKINSON NE, CORREA AM, DOLORMENTE M, DREILING L, EL-NAGGAR AK, FOSSELLA F, FRANCISCO R, GLISSON B, GRAMMER S, HERBST R, HUARINGA A, KEMP B, KHURI FR, KURIE JM, LIAO Z, MCDONNELL TJ, MORICE R, MORELLO F, MUNDEN R, PAPADIMITRAKOPOULOU V, PISTERS KM, PUTNAM JB JR, SARABIA AJ, SHELTON T, STEVENS C, SHIN DM, SMYTHE WR, VAPORCIYAN AA, WALSH GL, YIN M. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 93–101.
- [70] SZALA S. Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych. *Nowotwory* 2000; **50**: 111–121.
- [71] SZALA S, SZARY J, CICHON T, SOCHANIK A. Antiangiogenic gene therapy in inhibition of metastasis. *Acta Biochim Pol* 2000; **49**: 313–21.
- [72] TAI YT, STROBEL T, KUFE D, CANNISTRA SA. *In vivo* cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res* 1999; **59**: 2121–2126.
- [73] TAIT DL, OBERMILLER PS, REDLIN-FRAZIER S, JENSEN RA, WELCSH P, DANN J, KING MC, JOHNSON DH, HOLT JT. A phase I trial of retroviral BRCA1sv gene therapy in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 1959–1968.
- [74] TAMMI I, KORNBLAU SM, SEGALL H, KRAJEWSKI S. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 1796–1803.
- [75] TANAKA K, IWAMOTO S, GON G, NOHARA T, IWAMOTO M, TANIGAWA N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 127–134.

- [76] TEWARI M, QUAN LT, O'ROURKE K, DESNOYERS S, ZENG Z, BEIDLER DR, POIRIER GG, SALVESEN GS, DIXIT VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 1995; **81**: 801–809.
- [77] VASEY PA, SHULMAN LN, CAMPOS S, DAVIS J, GORE M, JOHNSTON S, KIRN DH, O'NEILL V, SIDDIQUI N, SEIDEN MV, KAYE SB. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 1562–1569.
- [78] WANG CY MAYO MW, KORNEŁUK RG, GOEDEL DV, BALDWIN AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680–1683.
- [79] WANG W, LIU L, LIU Z, YAN L. [Construction of recombinant caspases-3 gene and the test of its apoptotic activity in pancreatic carcinoma cell strain] *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2003; **20**: 671–674.
- [80] WEN SF, MAHAVNI V, QUIJANO E, SHINODA J, GRACE M, MUSCO-HOBKINSON ML, YANG TY, CHEN Y, RUNNENBAUM I, HOROWITZ J, MANEVAL D, HUTCHINS B, BULLER R. Assessment of p53 gene transfer and biological activities in a clinical study of adenovirus-p53 gene therapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 2003; **10**: 224–238.
- [81] WILLIS AC, CHEN X. The promise and obstacle of p53 as a cancer therapeutic agent *Curr Mol Med* 2002; **2**: 329–345
- [82] www.wiley.co.uk
- [83] YANG E, KORSMEYER SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; **88**: 386–401.
- [84] YANG XH, SLADEK TL, LIU X, BUTLER BR, FROELICH CJ, THOR AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; **61**: 348–354.
- [85] YIN XM, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; **369**: 321–323.
- [86] ZHANG W, CHEN X, QIU F. An antisense plasmid targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes hepatocarcinoma cells to chemotherapy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; **23**: 387–391.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 12.12.2004 r.

Przyjęto: 05.04.2005 r.

ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

e-mail: mahan@poczta.wp.pl