

EWA SIKORA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
Pasteura, 3, 02-093 WarszawaPraca dedykowana Pani Profesor Zofii Zielińskiej
w 80-tą rocznicę urodzin

APOPTOZA A ONKOGENEZA

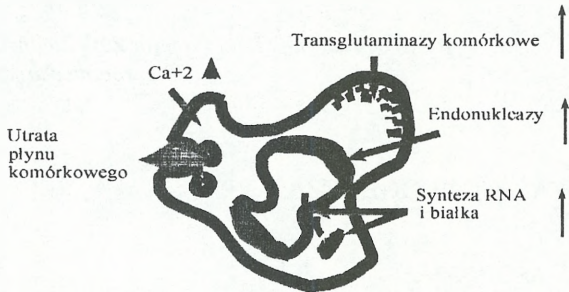
APOPTOZA

Komórki nowotworowe postrzegane są jako takie, które wymknęły się spod kontroli podziałów. Hodowane *in vitro* w warunkach zapewniających im przestrzeń i środowisko, dostarczające wszystkie niezbędne do życia składniki, mogą dzielić się nieustannie zapewniając sobie, jako pula komórek, nieśmiertelność. Wzrostu ich nie ogranicza proces starzenia zakończony śmiercią, tak charakterystyczny dla komórek prawidłowych (SIKORA 1993a). Nie oznacza to, że komórki nowotworowe nie umierają w ogóle. Spontaniczną, jak też i indukowaną wieloma lekami przeciwnowotworowymi, śmierć komórek nowotworowych obserwuje się zarówno *in vitro*, jak i w organizmie (WYLLIE 1992). Warto jednak zastanowić się, czy zdolność komórek nowotworowych do nieograniczonych podziałów wynika tylko z utraty kontroli tych podziałów, czy też może zawiodła w nich kontrola mechanizmów śmierci.

Zainteresowanie badaczy mechanizmami śmierci komórek ostatnio dramatycznie wzrosło. Lepsze poznanie ich budzi nadzieję na bardziej racjonalne wykorzystanie stosowanych dotychczas leków przeciwnowotworowych, a także być może na zupełnie nowe podejście do problemu nowotworu.

Śmierć komórek, podobnie jak ich podziały może być procesem aktywnym, podlegającym kontroli genetycznej. Nazywana wtedy bywa apoptozą (z greckiego opadanie płatków kwiatowych) lub śmiercią programowaną, w odróżnieniu od nekrozy (z łaciny martwica), która jest śmiercią przypadkową (WYLLIE i współaut. 1980). Śmierć komórek poprzez apoptozę jest poprzedzona zwykle wzrostem syntezy białka i RNA (MARTIN 1993). Charakterystyczny dla komórek apoptotycznych jest również wzrost stężenia jonów wapnia, a także aktywacja niektórych enzymów, w tym transglutaminaz komórkowych i endonukleaz (NICOTERA i współaut. 1992, MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 1993, PEITSCH i współaut. 1994). Również morfologia komórek umierających w sposób aktywny zmienia się bardzo charakterystycznie. Ulegają one obkurczeniu na skutek utraty wody i rozpadowi na tak zwane ciała apoptotyczne, w których znajdują się morfolo-

gicznie niezmienione organella, oraz fragmenty DNA. Za tworzenie usieciowań niezbędnych do powstania ciałek apoptotycznych są odpowiedzialne transglutaminazy komórkowe, a endonukleazy katalizują rozpad DNA na fragmenty wielkości 180–200 par zasad i ich wielokrotności. Komórki nekrotyczne, w odróżnieniu od apoptotycznych, pęcznieją i ulegają rozpadowi na skutek rozerwania błon komórkowych. Natomiast ciała apoptotyczne są trawione przez makrofagi lub komórki sąsiadujące nie wywołując stanu zapalnego, który towarzyszy nekrozie (COHEN 1993, WILLIAMS i współaut. 1992, WYLLIE i współaut. 1980). Schemat wydarzeń zachodzących w komórce apoptotycznej przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Schemat typowych procesów zachodzących w komórce apoptotycznej. Pionowe strzałki oznaczają nasilenie przedstawianych schematycznie aktywności enzymów i procesów.

Programowana śmierć komórek, na równi z ich podziałami, jest odpowiedzialna za kształtowanie organizmów przechodzących morfogenezę, prawidłowy przebieg embriogenezy, a także utrzymanie prawidłowej liczby komórek w organizmie dorosłym (WYLLIE 1992). Obydwa te procesy (podziały i śmierć komórek) „czuwają” nad prawidłowym przebiegiem różnicowania komórek nabłonkowych i krwiotwórczych, a także dojrzewania limfocytów T, które odbywa się w grasicy. Uważa się, że apoptoza jest jednym z mechanizmów obronnych, polegającym na usuwaniu komórek zbędnych, uszkodzonych i zmutowanych (RAFF 1992). Prawdopodobnie poprzez apoptozę umierają komórki stare, chociaż nie ma na to wyraźnych dowodów. Co więcej, FRANCESCHI i współautorzy (1992) uważają, że apoptoza właśnie, jako jeden z mechanizmów obronnych, zawodzi wraz z wiekiem. Śmierć programowana może być też zjawiskiem patologicznym. Tak jest w przypadku śmierci limfocytów CD^{+4} osób chorych na AIDS (AMEISEN 1992), jak również w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimer (BARR i TOMEI 1994). Nic nie wiemy, jak dotychczas, na temat sposobu umierania komórek organizmu podlegającego wyniszczeniu z powodu choroby nowotworowej. Można się jednakże spodziewać, że również w tym przypadku mamy do czynienia z apoptozą. We krwi wielu ludzi z różnymi nowotworami, a także u ludzi chorych na AIDS obserwuje się podwyższony poziom czynnika martwicy nowotworu, tak zwanej kachetyny lub inaczej TNF- α (tumor necrosis factor). Jak wykazano w doświadczeniach *in vitro* TNF- α może nie tylko zgodnie ze swoją nazwą powodować nekrozę, ale również w wielu komórkach wywoływać apoptozę (SIKORA 1994).

MECHANIZMY APOPTOZY

Przekazywanie sygnału komórkowego do apoptozy odbywa się bardzo różnymi drogami, które zależą od czynnika indukującego śmierć (EVANS 1993).

Czasami jednak te same czynniki mogą wywołać apoptozę lub podziały komórek, bądź też pozostać bez wpływu na obydwa procesy, w zależności od typu czy też stopnia dojrzałości komórek, na które działają. Tak jest, na przykład, w przypadku limfocytów. Aktywacja receptora komórek T (tak zwanego TCR) limfocytów dojrzałych prowadzi do ich proliferacji, natomiast w tymocytach, czyli limfocytach niedojrzałych, aktywacja tego receptora indukuje apoptozę. Glukokortykoidy natomiast zabijają tymocyty i komórki białaczkowe pozostając bez wpływu na dojrzałe limfocyty (SCHWARTZ i OSBORNE 1993).

Lista czynników indukujących apoptozę jest bardzo długa i rozszerza się niemal z każdym dniem. Apoptozę może wywołać niedobór czynników wzrostowych, niedobór hormonów, szok cieplny i zimny, stres oksydacyjny oraz inne czynniki uszkodzające DNA, takie jak promieniowanie jonizujące i leki przeciwnowotworowe. Do czynników indukujących apoptozę zaliczamy także antymetabolity, wspomniany wyżej czynnik nekrozy nowotworu, glukokortykoidy i jonofory wapniowe. Do apoptozy komórek prowadzić może również aktywacja takich receptorów, jak TCR oraz tak zwany Apo-1/Fas (SEN 1992). Apo-1/Fas jest transmembranowym białkiem i należy do rodziny receptorów, w skład której wchodzi między innymi receptory czynników nekrozy nowotworów. Wykazano, że pobudzenie Apo-1/Fas przeciwciałami monoklonalnymi wywołuje apoptozę w limfocytach (CORY 1994).

Proces apoptozy pozostaje pod ścisłą kontrolą genetyczną (OREN 1992). O tym, czy komórka uruchomi program śmierci, często decydują nie tylko czynniki zewnętrzne, ale również jej zdolność do ekspresji genów zarówno aktywujących, jak i hamujących apoptozę (WILLIAMS i SMITH 1993). Znamy już kilkanaście genów i ich produktów białkowych, które biorą udział w regulacji śmierci komórek (SIKORA 1994).

W komórkach ssaków występuje gen *bcl-2*, którego produkt białkowy hamuje apoptozę wywoływaną różnymi czynnikami. Gen ten wykazuje strukturalną i funkcjonalną homologię z genem *ced-9* występującym w komórkach nicienia *Caenorhabditis elegans* (REED 1994). Gen *bcl-2* jest protoonkogenem, którego wzrost ekspresji zaobserwowano po raz pierwszy w komórkach ziarnicy złośliwej, nowotworu limfocytów B. Rola *bcl-2* jest związana jednakże z utrzymaniem przeżywalności komórek a nie stymulowaniem ich do proliferacji, jak to ma miejsce w przypadku innych protoonkogenów. Wykazano, że wprowadzenie protoonkogenu *bcl-2* do takich komórek, jak fibroblasty, limfocyty T, czy też komórki nerwowe, zapobiegało ich śmierci indukowanej różnymi czynnikami (REED 1994). Białko Bcl-2 współdziała w regulacji apoptozy z innym białkiem, tak zwanym Bax. Obydwa białka wykazują duże podobieństwo w sekwencji aminokwasów i tworzą ze sobą kompleksy. Mogą to być zarówno homo- jak i heterodimery. Przewaga w komórce homodimerów Bax-Bax przechyla szalę w stronę śmierci, natomiast nadmiar dimerów Bcl-2-Bcl-2 decyduje o jej przeżyciu (BARINAGA 1994). Wydaje się, że za podobny mechanizm regulacji apoptozy odpowiada białko zwane Bcl-x, które występuje w dwóch różnych formach charakteryzujących się przeciwstawnym działaniem (BOISE i współaut. 1993). W komórkach *C. elegans*, umierających w czasie morfogenezy, wykazano wysoką aktywność genów *ced-3* i *ced-4*. Gen *ced-3* ma swój strukturalny i funkcjonalny odpowiednik występujący w genomie ssaków. Jest to gen, którego białkowy

produkt wykazuje aktywność tak zwanej interleukiny 1- β converting enzyme (ICE), czyli proteazy katalizującej reakcję konwersji prekursora interleukiny do jej aktywnej formy. Wykazano, że nadekspresja ICE indukuje apoptozę w szczurzych fibroblastach, którą można zahamować zarówno wprowadzeniem do komórek genu *bcl-2*, jak również genu wirusa ospy bydłowej, którego produkt białkowy jest inhibitorem ICE (GAGLIARDINI i współaut. 1994). Niestety, nie wiemy jeszcze na czym miałyby polegać mechanizm regulacji apoptozy przez te właśnie geny i ich produkty białkowe. Interleukina 1- β , jako taka, nie indukuje bowiem apoptozy, lecz bierze udział w procesach związanych ze stanem zapalnym (SCHWARTZ i OSBORNE 1994).

ONKOGENEZA A APOPTOZA

Podział komórki na dwie potomne, czyli tak zwany cykl komórkowy dzieli się zwyczajowo na cztery fazy (spoczynkową G1, syntezy DNA S, spoczynkową G2, mitozy M). Fazę bezpodziałową komórek określa się mianem G0. Komórki prawidłowe w odróżnieniu od nowotworowych mogą być zatrzymane w fazie G1, bądź G0. Komórki nowotworowe dzielą się nieustannie. Prawidłowy podział komórek zależy od aktywności protoonkogenów, genów supresorów nowotworu, a także aktywatorów i inhibitorów kinaz białkowych (serynowo-treoninowych) tak zwanych kinaz typu Cdk (cyclin dependent kinase). Aktywatorami kinaz typu Cdk są tak zwane cykliny, białka, które w różnych fazach podziału komórek włączają, bądź wyłączają odpowiednie kinazy regulujące procesy charakterystyczne dla tych faz (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992). Bardzo niedawno wykryto i opisano kilka białkowych inhibitorów tych enzymów (PINES 1994, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1995).

Transformacja nowotworowa jest procesem wieloetapowym. Aby doszło do przekształcenia komórki prawidłowej w nowotworową niezbędna jest stopniowa aktywacja wielu onkogenów (których prekursorami są protoonkogeny), a także zahamowanie aktywności genów supresorów nowotworu (FEARON i VOGELSTEIN 1990). Do niedawna badania regulacji cyklu komórkowego poprzez cykliny szły zupełnie niezależnym torem od badań związanych z udziałem w tym procesie białkowych produktów protoonkogenów i genów supresorów nowotworu. Obecnie coraz wyraźniej w regulacji cyklu komórkowego zarysowuje się związek pomiędzy tymi trzema kategoriami białek (MARX 1994a). Co więcej, coraz bardziej oczywista staje się nie tylko korelacja pomiędzy tymi białkami a transformacją nowotworową ale również, paradoksalnie, śmiercią komórki.

Otóż, bardzo niedawno okazało się, że jedna z cyklin, tak zwana D1, jest typowym protoonkogenem. Przypuszcza się, że być może wszystkie osiem cyklin, jakie dzisiaj znamy, są również protoonkogenami, to znaczy że ich mutacje, bądź wzmożona ekspresja, przyczyniają się do transformacji nowotworowej (MARX 1994a). Ponadto, jeden z niedawno odkrytych inhibitorów kinaz typu Cdk, tak zwane białko p16, okazało się być produktem typowego genu supresora nowotworu (MARX 1994b).

UDZIAŁ PROTOONKOGENÓW I ONKOGENÓW W APOPTOZIE

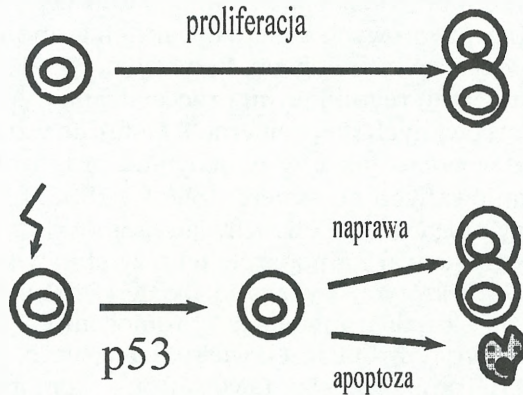
Z każdym niemal dniem coraz wyraźniej zarysowuje się intrygujący związek pomiędzy onkogenezą a apoptozą komórek. Protoonkogeny są to geny, które w prawidłowej komórce biorą udział w przekazywaniu sygnału z zewnątrz do jądra. W komórkach nowotworowych obserwuje się ich wzmoczoną ekspresję lub też mutacje przekształcające je w onkogeny. Geny *c-jun*, *c-fos* i *c-myc* są typowymi protoonkogenami jądrowymi, regulującymi procesy transkrypcji i indukowanymi w komórkach stymulowanych do proliferacji. Ostatnio wzrost ekspresji tych protoonkogenów obserwowano także w tymocytach oraz różnych komórkach nowotworowych stymulowanych do śmierci (SIKORA 1993b). Co więcej, uważa się nawet, że onkogeny mogą wręcz „uwrażliwiać” komórki na apoptozę (SIKORA 1994). Bardzo efektowny dowód na poparcie tej tezy stanowią ostatnio opublikowane wyniki badań, w których wykazano, że gen chimeryczny, tak zwany *E2A-PBX1*, powstały na skutek translokacji chromosomu 1 i 19 limfocytów B charakteryzującej niektóre typy białaczek wieku dziecięcego, powodował w myszach transgenicznych transformację nowotworową komórek limfoidalnych. Transformacja ta była jednakże poprzedzona masowym wymieraniem macierzystych komórek, zarówno limfocytów B, jak i T (DEDERA i współaut. 1993). Podobnie, transformacja nowotworowa wirusami onkogennymi, zawierającymi DNA przebiega „poprzez apoptozę”. Do transformacji nowotworowej komórek adenowirusem niezbędne jest współdziałanie dwóch onkogenów: *E1A* i *E1B*. Przy czym, sam onkogen *E1A* wywołuje apoptozę w komórkach nerki szczura, podczas gdy jedno z dwóch białek onkogenu *E1B* (19-kDa) hamuje śmierć tych komórek, podobnie jak ludzki protoonkogen *bcl-2* (WHITE i współaut. 1992).

UDZIAŁ GENÓW SUPRESORÓW NOWOTWORU W APOPTOZIE

Geny supresory nowotworu biorą udział w regulacji podziałów komórkowych, hamując je w fazie G1 cyklu komórkowego. W komórkach nowotworowych, na skutek zahamowania aktywności genów supresorów poprzez ich mutacje lub delecje, dochodzi do utraty kontroli podziałów. Funkcje tych genów bardzo szczegółowo opisano w artykule B. GRZELAKOWSKIEJ-SZTABERT (w tym tomie *Kosmosu* 323–352). Szczególną rolę w apoptozie odgrywiają przede wszystkim dwa z nich, tak zwane *p53* i *Rb*.

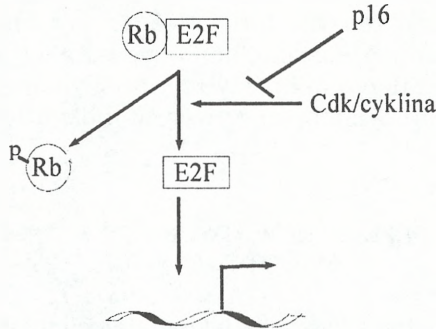
Gen *p53* w normalnych, proliferujących komórkach wykazuje niewielką aktywność. Podwyższona jego ekspresja występuje natomiast w komórkach z uszkodzonym DNA. Gen *p53* zatrzymuje komórki w fazie G1 dając im czas na naprawę DNA. Jeśli uszkodzenia nie są zbyt rozległe, to po dokonaniu napraw komórka podejmuje normalną proliferację. Jeśli jednak przekraczają one możliwości naprawcze komórki to „popelnia ona samobójstwo” w „ucieczce” przed transformacją nowotworową, do której prowadziłyby powstałe mutacje (rys. 2). Sam gen *p53* bardzo często ulega mutacjom, które z genu supresorowego nowotworu zmieniają go w protoonkogen przyczyniający się do transformacji nowotworowej (LANE 1992, 1993). Mechanizm regulacji apoptozy z udziałem *p53* nie jest jednak uniwersalny, występuje bowiem przede wszystkim w komórkach, w których indukowano apoptozę czynnikami uszkodzającymi DNA. Na przykład,

w tymocytach myszy pozbawionych genu *p53* (tak zwany „knock out”) promieniowanie jonizujące, powodujące uszkodzenia DNA, nie indukowało apoptozy. Natomiast deksametazon, który jest syntetycznym glukokortykoidem wywoływał w tych komórkach śmierć poprzez apoptozę (LANE 1993).



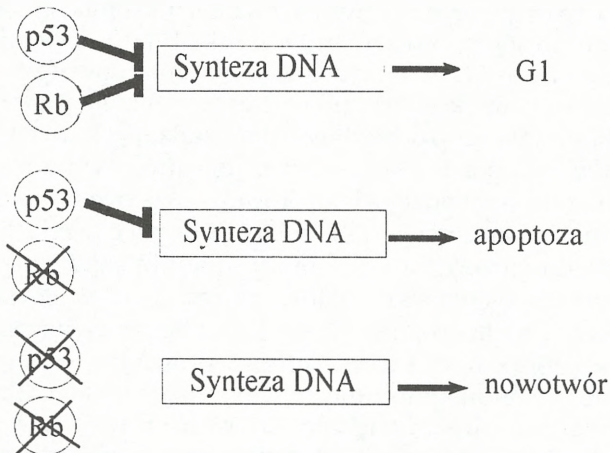
Rys. 2. Schemat obrazujący udział genu supresoru nowotworu *p53* w proliferacji i apoptozie komórek. W prawidłowych proliferujących komórkach (górną część rysunku) występuje niewielka ekspresja genu *p53*. Podwyższoną jego aktywność obserwuje się w komórkach z uszkodzonym DNA (na przykład po zadziałaniu promieniowania jonizującego — dolną część rysunku). Jeżeli uszkodzenia są niewielkie komórka po ich naprawie podejmuje proliferację. W wyniku poważniejszych uszkodzeń natomiast uruchamia program samobójstwa.

Delecje genu *Rb* wykryto po raz pierwszy u dzieci chorych na siatkówczaka. W komórkach prawidłowych aktywna nieufosforylowana forma białka *Rb* występuje w fazie G1 podziału komórkowego. Białko to tworzy kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi, należącymi do rodziny białek E2F uniemożliwiając im związanie z promotorami genów docelowych (LEES i współaut. 1993). Nie związany z białkiem *Rb* czynnik transkrypcyjny E2F aktywuje geny, których produkty białkowe są niezbędne do podziałów komórki (na przykład reduktaza dihydrofolianowa, kinaza tymidylanowa, polimeraza α , białka *Myc* i *Myb*). Związanie białka E2F przez białko *Rb* powoduje zahamowanie aktywności tego czynnika transkrypcyjnego i zatrzymanie komórki w fazie G1. Za fosforylację białka *Rb*, a tym samym uwolnienie z kompleksu czynnika transkrypcyjnego E2F jest odpowiedzialna kinaza *Cdk4*. Specyficznym inhibitorem tej kinazy jest białko *p16*, którego inaktywacja może doprowadzić do niekontrolowanych podziałów komórkowych (rys. 3). Ten skomplikowany mechanizm regulacji podziałów komórek odgrywa istotną rolę w transformacji nowotworowej, jak też w starzeniu się komórek *in vitro*, charakteryzującym się utratą ich zdolności do podziałów. A jaką rolę odgrywa *Rb* w apoptozie komórek? Otóż okazało się, że myszy pozbawione obydwu alleli genu *Rb* charakteryzują się przedwczesną umieralnością spowodowaną prawdopodobnie apoptozą komórek nerwowych i krwiotwórczych (HARLOW 1992). Ponadto ten sam czynnik transkrypcyjny E2F, który aktywuje ekspresje genów, niezbędnych do przejścia komórek z fazy G1 do S, może indukować apoptozę. Uważa się, że apoptoza wywołana inaktywacją *Rb*



Rys. 3. Schemat przedstawiający mechanizm działania genu supresora nowotworu, *Rb*. W fazie G1 cyklu komórkowego białko *Rb* występuje w kompleksie z białkiem E2F, które w tej postaci nie jest aktywne jako czynnik transkrypcyjny, działający w miejscu regulatorowym genów niezbędnych w podziałach komórkowych. Po fosforylacji białka *Rb*, katalizowanej przez kinazę typu Cdk, następuje uwolnienie z kompleksu czynnika transkrypcyjnego E2F. Inhibitor kinazy, białko p16, hamuje fosforylację białka *Rb* i zatrzymuje komórki w fazie G1. Inaktywacja tego inhibitora może doprowadzić do uwolnienia E2F i niekontrolowanych podziałów komórkowych.

zachodzi prawdopodobnie z udziałem p53 (WHITE 1994). Mianowicie, jeśli w komórce nie ma aktywnego białka *Rb*, a jest aktywne białko p53, to wtedy to ostatnie indukuje apoptozę. Natomiast aktywne białko *Rb* hamuje apoptozę. Bardzo wiele nowotworów charakteryzuje się brakiem obydwu aktywnych genów, a tym samym ich produktów białkowych, co może objawiać się zahamowaniem apoptozy i niekontrolowaną proliferacją komórek. W zrozumieniu tego skomplikowanego mechanizmu pomoże czytelnikowi rysunek 4. Należy jednak



Rys. 4. Schemat przedstawiający mechanizm współdziałania genów *p53* i *Rb* w indukcji apoptozy i transformacji nowotworowej. W prawidłowej komórce geny supresory nowotworu, *p53* i *Rb*, hamują syntezę DNA zatrzymując komórkę w fazie G1 (górna część rysunku). Inaktywacja genu *Rb* może w niektórych typach komórek prowadzić do ujawnienia „apoptotycznej roli” genu *p53* (środkowa część rysunku). Inaktywacja obydwu genów prowadzi do zahamowania apoptozy i niekontrolowanych podziałów komórki (dolna część rysunku).

pamiętać, że mechanizm ten nie musi być uniwersalny, gdyż nie wszystkie nowotwory charakteryzują się mutacjami obydwu alleli zarówno genu *p53*, jak i genu *Rb*. Ponadto, regulacja apoptozy nie musi zachodzić poprzez białko *p53*. Na szczęście też w wielu typach nowotworów można indukować apoptozę, co omówiono poniżej.

CHEMIOTERAPIA PRZECIWNOWOTWOROWA A APOPTOZA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Apoptozę wywołuje bardzo wiele leków przeciwnowotworowych o bardzo różnorodnej chemicznej strukturze i różnych mechanizmach działania (HICKMAN 1992, SEN i DINCALCI 1992). Na długą listę chemioterapeutyków indukujących apoptozę możemy wpisać: a) czynniki indukujące uszkodzenia DNA powodujące powstawanie wiązań zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzniowych, a także krzyżowych wiązań białko-DNA; b) inhibitory topoizomerazy I i II; c) inhibitory syntezy DNA; d) czynniki uszkadzające aparat mitotyczny; e) antymetabolity; f) hormony lub ich niedobór. Ponadto, apoptozę w komórkach nowotworowych może indukować szok cieplny oraz promieniowanie jonizujące.

W tej chwili bardzo trudno jest odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób sygnał wywołany tak różnorodnymi czynnikami prowadzi do tego samego efektu, a mianowicie podobnej pod względem morfologicznym i biochemicznym śmierci komórki. Z pewnością jednak w którymś momencie musi nastąpić interakcja dróg przekazywania tych tak różnych początkowo sygnałów. Ponieważ do tej pory poznano już niejedyn mechanizm genetycznej kontroli zarówno indukcji, jak i hamowania śmierci komórki, można spodziewać się, że również w komórkach nowotworowych, rozwijających się w organizmie, indukcja śmierci zależeć będzie od bardzo wielu czynników, między innymi takich jak pochodzenie nowotworu, stopień jego zróżnicowania i inwazyjności. W leczeniu nowotworów bardzo ważny jest taki dobór terapii, aby komórki nowotworowe były na nią podatne, to znaczy zdolne do uruchomienia kaskady zdarzeń prowadzących do ich aktywnej śmierci. Niewykluczone, że oporność niektórych nowotworów na leki, poza indukcją znanego mechanizmu oporności wielolekowej, może być związana z występowaniem mechanizmów hamujących ich śmierć. Tak więc ocena podatności komórek nowotworowych zarówno na apoptozę spontaniczną, jak też indukowaną czynnikami dotychczas stosowanymi (lub testowanymi) w leczeniu nowotworów, może mieć duże znaczenie prognostyczne. Dotychczas większość badań dotyczących apoptozy komórek nowotworowych przeprowadzono *in vitro*. Stosunkowo niewiele wiadomo na temat spontanicznej apoptozy ludzkich nowotworów *in vivo* i jej związku z prognozowaniem w leczeniu nowotworów. Ciągle też mało wiadomo na temat kinetyki śmierci komórek nowotworowych podczas terapii przeciwnowotworowej i związku fazy podziałowej komórek z podatnością ich na apoptozę. Ostatnio opracowano kilka metod z zastosowaniem cytofluorymetrii przepływowej, które pozwalają na wykrycie pojedynczych komórek apoptotycznych (DARZYŃKIEWICZ i współaut. 1992). Dzięki tym metodom możliwe jest wykrywanie umierających komórek w materiale klinicznym. Stosując niektóre z nich, przetestowano komórki białaczkowe u ponad 100 pacjentów przed i w trakcie

chemioterapii przeciwnowotworowej. Wyniki tych badań wskazują na występowanie populacji komórek spontanicznie umierających (od 0,1% do 16% całej populacji) oraz indukcji apoptozy (średnio w ponad 80% przebadanych komórek) przez inhibitory topoizomeraz, antymetabolity, jak też czynniki uszkodzające mikrotubule (Li i współaut. 1994).

Cytofluorymetria przepływowa pozwala na ilościowe oznaczenie komórek nie tylko apoptotycznych, ale również komórek będących w poszczególnych fazach podziału komórkowego. Powszechnie uważa się, że terapia przeciwnowotworowa jest skuteczna, kiedy komórki nowotworowe są w fazie syntezy DNA i mitozy. GORCZYCA i współpracownicy (1993) zbadali indukcję apoptozy w komórkach białaczkowych HL-60 *in vitro* wieloma różnymi czynnikami stosowanymi w chemioterapii przeciwnowotworowej. Wyniki ich badań wskazują na występowanie różnic w indukcji apoptozy przez różne czynniki w zależności od fazy cyklu komórkowego. I tak, takie leki jak CAM (inhibitor topoizomerazy I), TN i AMSA (inhibitory topoizomerazy II) najbardziej efektywnie indukują apoptozę w komórkach będących w fazie syntezy DNA (S). Inne czynniki, takie jak FTS (inhibitor topoizomerazy II), AZT (azacytydyna — analog purynowy), gaz musztardowy i hipertermia preferencyjnie zabijają komórki nie dzielące się. Różnice w podatności na apoptozę komórek w zależności od fazy cyklu komórkowego stanowią prawdopodobnie odbicie stopnia uszkodzenia z jednej strony oraz zdolności naprawczych komórek z drugiej. Wiedza na temat skuteczności indukcji śmierci komórkowej przez różne czynniki w zależności od fazy podziałowej komórek powinna przyczynić się do znacznie bardziej racjonalnego stosowania terapii kombinowanej w leczeniu nowotworów.

APOPTOSIS AND ONCOGENESIS

Summary

It is believed that neoplastic cells are immortal because they have acquired an unlimited capability to proliferate. In the light of recent studies concerning apoptosis we should ask whether this is caused only by their increased proliferation rate, or also by a decrease in the rate of cell death. Apoptosis is a defense mechanism against mutations as well as a means for controlled deletion of cells from dense tissue structures during development and subsequent homeostasis. Morphological and physiological features of apoptosis have been well documented, and the early signals capable of inducing apoptosis have also been well defined. Several genes involved in controlling the process (activation and inhibition) have been identified, although we are still far from understanding the molecular mechanisms whereby apoptotic signals are transduced, or integrated to set in motion the cell death machinery.

Over the past several years it has gradually emerged that the control of apoptosis is intimately connected with the control of cell proliferation. The mechanisms controlling proliferation are becoming increasingly well understood and appear to involve cyclins, oncogenes and tumor suppressor genes. It seems that the link between tumor suppressors such as *p53* and *Rb* and activators (cyclins) as well as inhibitors of cycline-dependent kinases is now firmly established.

It is evident that apoptosis can be induced by a variety of antineoplastic drugs with diverse chemical structure and different mechanism of action. Nevertheless, the data concerning the kinetics of the process *in vivo*, which probably depends on the cancer type and the drug used, is scant. In future, better characterization of this process should lead to improvement of the rationale of cancer treatment.

LITERATURA

- AMEISEN J. C., 1992. *Programmed cell death and AIDS: from hypothesis to experiment*. Immunol. Today 13, 388-391.
- BARINAGA M., 1994. *Cell suicide: by ICE, not fire*. Science, 263, 754-756.
- BARR P. J., TOMEI L. D., 1994. *Apoptosis and its role in human disease*. Bio/Technology, 12, 487-493.
- BOISE L. H., GONZALEZ-GARCIA M, POSTEMA CH. E., DING E, LINDSTEN T, TURKA L. A., MAO X, NUNEZ G, THOMPSON C. B. 1993. *bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death*. Cell 74, 597-608.
- COHEN J.J. 1993. *Apoptosis*. Immunol.Today, 14, 126-130.
- CORY S. 1994. *Fascinating death factor*. Nature, 367, 317-318.
- DARZYNKIEWICZ Z., BRUNO S., DEL BINO G., GORCZYCA W., HOTZ M. A., LASSOTA P., TRAGANOS S., 1992. *Features of apoptotic cells measured by flow cytometry*. Cytometry, 13, 795-808.
- DEDERA D. A., WALTER E. K., LEBRUN D. P., SEN-MAJUMDAR A, STEVENS M. E., BARSH G. S., CLEARY M. L., 1993. *Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice*. Cell 74, 833-843.
- EVANS V. G., 1993. *Multiple pathways to apoptosis*. Cell Biol. Int. 17, 461-476.
- FEARON E. R., VOGELSTEIN B., 1990. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell 61, 759-767.
- FRANCESCHI C., MONTI D., ROSARIO M., ZENI P., TEMPERANI P., EMILIA G., SANSONI P., LIOLI M. B., TROIANO L., AGNESI C., SALVIOLI S., COSSARIZZA A., 1992. *Genomic instability and aging: studies on centenarians (successful aging) and in patients with Down's syndrome (accelerated aging)*. Ann. New York Acad. Sci. 663, 4-16.
- GAGLIARDINI V., FERNANDEZ P. A., LEE R. K. K., DREXLER C. C. A., ROTELLO R. J., FISHMAN M. C., YUAN J., 1994. *Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene*. Science 263, 826-828.
- GORCZYCA W., GONG J., ARDELT B., TRAGANOS F., DARZYNKIEWICZ Z., 1993. *The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents*. Cancer Res. 53, 3186-3192.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1992. *Regulacja cyklu komórkowego-historii i komplikacji ciąg dalszy*. Post. Biochem. 38, 3, 98-107.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1995. *Regulacja cyklu komórkowego udział białkowych inhibitorów kinaz cyklino-zależnych*. Post. Biochem. 41, 80-93.
- HARLOW E., 1992. *For our eyes only*. Nature 359, 270-271.
- HICKMAN J. A., 1992. *Apoptosis induced by anticancer drugs*. Cancer Metast. Rev. 11, 121-139.
- KONDO E., YOSHINO T., NOMURA S., NAKAMURA S., TAKAHASHI K., TERAMOTO N., HAYASHI K., AKAGI T., 1994. *bcl-2 Regulation in normal resting lymphocytes and lymphoblasts*. Jpn. J. Cancer Res. 85, 260-265.
- LANE D. P., 1992. *p53, guardian of the genom*. Nature 358, 15-16.
- LANE D. P., 1993. *A death in the life of p53*. Nature 362, 786-787.
- LEES J. A., SAITO M., VIDAL M., VALENTINE M., LOOK T., HARLOW E., DYSON N., HELIN K., 1993. *The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors*. Mol. Cell. Biol. 13, 7813-7825.
- LI X., GONG J., FELDMAN E., SEITER K., TRAGANOS F., DARZYNKIEWICZ Z., 1994. *Apoptotic cell death during treatment of leukemias*. Leukemia and Lymphoma 13,65-70.
- MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., 1993. *Nowy aspekt metabolizmu poliamin-posttranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy*. Post. Biochem. 39, 118-126.
- MARTIN S. J., 1993. *Apoptosis: suicide, execution or murder?* Trends Cell Biol. 3, 141-144.
- MARX J., 1994a. *How cells cycle toward cancer*. Science, 263, 319-321.
- MARX J., 1994b. *New tumor suppressor may rival p53*. Science, 264, 344-345.
- NICOTERA P., BELLOMO G., ORRENIUS S. 1992. *Calcium-mediated mechanism in chemically induced cell death*. Annu. Rev Pharmacol. Toxicol. 32, 449-470.
- OREN M., 1992. *The involvement of oncogenes and tumour suppressor genes in the control of apoptosis*. Cancer Metast. Rev. 11, 141-148.
- PEITSCH M. C., MANNHERZ H. G, TSCHOPP J., 1994. *The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?* Trends Cell Biol. 4, 37-41.
- PINES J., 1994. *p21 inhibits cyclin shock*. Nature, 369, 520-521.
- RAFF M. C., 1992. *Social controls on cell survival and cell death*. Nature 356, 397-399.

- RAFF M. C., BARRES B. A., BURNE J. F., COLES H. C., ISHIZAKI Y., JACOBSON M. D., 1993. *Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system*. Science 262, 695-700.
- REED J. C., 1994. *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. J. Cell Biol. 124, 1-6.
- SCHWARTZ L. M., OSBORNE B. A., 1993. *Programmed cell death, apoptosis and killer genes*. Immunol. Today 14, 582-590.
- SCHWARTZ L. M., OSBORNE B. A., 1994. *Ced-3/ICE: Evolutionarily conserved regulation of cell death*. BioEssays 16, 387-389.
- SEN S., 1992. *Programmed cell death: concept, mechanism and control*. Biol. Rev. 67, 287-319.
- SEN S., D'INCALCI M., 1992. *Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy*. FEBS Lett. 307, 122-127.
- SIKORA E., 1993a. *Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek*. Post. Biochem. 39, 212-220.
- SIKORA E., 1993b. *Transcription factors in cellular senescence and death*. Acta Biochim. Polon. 40, 389-394.
- SIKORA E., 1994. *Mechanizmy śmierci programowanej komórek (apoptozy)*. Post. Biochem. 40, 150-160.
- WHITE E., SABBATINI P., DEBBAS M., WOLD W. S. M., KUSHER D. I., GOODING L., 1992. *The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor*. Mol. Cell. Biol. 12, 2570-2580.
- WHITE E., 1994. *p53, guardian of Rb*. Nature, 371, 21-22.
- WILLIAMS G. T., SMITH C. A., 1993. *Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death*. Cell 74, 777-779.
- WILLIAMS G. T., SMITH C. A., MCCARTHY N. J., GRIMES E. A., 1992. *Apoptosis: final control point in cell biology*. Trends Cell Biol. 2, 263-267.
- WYLLIE A. H., 1992. *Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview*. Cancer Metast. Rev. 11, 95-103.
- WYLLIE A. H., KERR J. F. R., CURRIE A. R., 1980. *Cell death: the significance of apoptosis*. Int. Rev. Cytol. 68, 251-307.