

PRZEMYSŁAW KONOPELSKI, AGNIESZKA DYNOWSKA

*Pozawydziałowy Zamiejscowy Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk
Podstawowych Uniwersytet Rzeszowski w Weryni
Werynia 502 36-100 Kolbuszowa
E-mail: imek5k@o2.pl*

PROGRAMOWANA ŚMIERĆ KOMÓRKI A BIAŁKA Z RODZINY INHIBITORÓW APOPTOZY (IAP) I ICH ROLA W NOWOTWORZENIU

WSTĘP

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest aktywnym procesem fizjologicznym. Z języka greckiego termin apoptoza, w dosłownym tłumaczeniu oznacza opadanie liści. Jest to proces zaprogramowany genetycznie i wymagający nakładu energii do jego realizacji. W odróżnieniu od nekrozy, apoptoza obejmuje wyłącznie jedną, konkretną komórkę lub grupę komórek, bez szkody i wpływu na komórki z nią sąsiadujące. Homeostaza na drodze apoptozy jest utrzymywana poprzez kontrolę liczby i jakości poszczególnych komórek, usuwając z organizmu te nieprawidłowe, zainfekowane lub zbędne. Po raz pierwszy określenie apoptoza zostało zaproponowane przez Kerr'ego i jego współpracowników w 1972 r. (patrz STĘPIEŃ i współpracownicy, 2007).

Zahamowanie mechanizmów apoptozy jest jednym z głównych procesów wzmacniających kancerogenezę. Aby komórka prawidłowa mogła ulec przekształceniu w komórkę nowotworową, niezbędne jest jej „wyłamanie się” spod mechanizmów kontrolujących proliferację i śmierć. Jednym ze sposobów jest uniknięcie wejścia na ścieżkę programowanej śmierci przez nadekspresję białek hamujących apoptozę. Do takich białek należy między innymi rodzina białek IAP

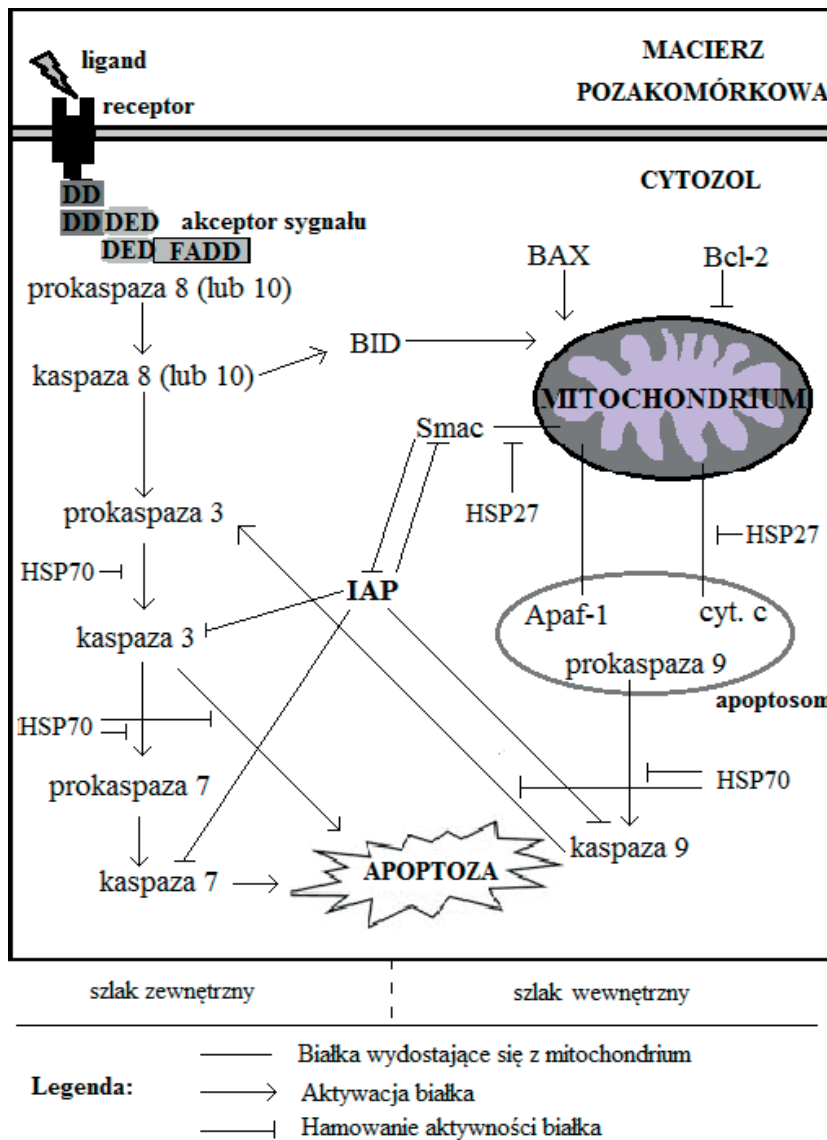
(ang. inhibitors of apoptosis proteins). Po raz pierwszy geny kodujące białka z rodziny inhibitorów apoptozy zostały zidentyfikowane w bakulowirusach, jako ich mechanizm w odpowiedzi na próbę inicjacji apoptozy przez gospodarza po infekcji wirusem (NACHMIAS i współpracownicy, 2004). Część leków obecnie stosowanych w terapiach nowotworowych opiera się na próbie indukcji apoptozy, a IAP wydają się być również dogodnym celem dla tych starań. Mechanizm działania białek IAP polega na niedopuszczeniu do aktywacji kaspaz przez asocjację z nimi. Głównym celem IAP są kaspazy wykonawcze 3 i 7, odpowiedzialne za niespecyficzną proteolizę białek strukturalnych i enzymatycznych. IAP mają również zdolność kierowania białek inicjujących śmierć komórkową do degradacji przez wyznaczenie ich ubiquityną. Enzymatyczne przyłączenie reszt ubiquityny do białek akceptorowych prowadzi następnie do ich skierowania na drogę degradacji proteasomalnej. W warunkach fizjologicznych białka IAP są odpowiedzią na czynniki stresowe, natomiast w komórkach nowotworowych pomagają przezwycięzać próby indukcji apoptozy przez mechanizmy obronne samej komórki, czy leczenie terapeutyczne.

ŚCIEŻKI PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI I SPOSOBY JEJ HAMOWANIA

Proces programowanej śmierci obejmuje następujące po sobie, trzy umowne fazy. Są to: (i) faza decyzji, w której komórka pod wpływem bodźców decyduje czy włączyć program autodestrukcji, (ii) faza wykonawcza, gdzie aktywowane są geny i białka odpowiedzialne za degradację składników komórkowych oraz (iii) faza degradacji, czyli fragmentacja komórki, tworzenie ciałek apoptycznych i fagocytoza (KOPACZEWSKA i KOPACZEWSKI 2004).

W procesie apoptozy można wyróżnić dwa główne szlaki, zależne od miejsca inicjacji i przebiegu, mianowicie szlak zewnętrzny i wewnętrzny (Ryc. 1). Szlak zewnętrzny związany jest z receptorami ulokowanymi w błonie komórkowej, a jego indukcję zapoczątkowują czynniki pozakomórkowe. Receptorami błonowymi, najczęściej odpowiadającymi na „sygnały śmierci” są: białka nadrodziny receptorów TNF (m. in. TNFR-I, TNFR-II, antygen CD40), CD95/Apo1, czy TRAIL/Apo2 (HORDYJEWSKA i PASTERNAK 2005, STĘPIEŃ i współaut. 2007). Po przyłączeniu cząsteczki liganda, sygnał za pośrednictwem receptora przekazywany jest na białko adaptorowe, zawierające w swej strukturze na końcu karboksylowym domenę śmierci (ang. death domain, DD). Taką samą domenę zawiera również receptor. Do receptorowej domeny śmierci przyłącza się domena DD białka adaptorowego. Fragment N-końcowy adaptora zawiera natomiast domenę efektorową DED (ang. death efektor domain), z którą w obecności kilku kolejnych cząsteczek cytozolowych, łączy się prokaspaza 8. Powstały w ten sposób kompleks DISC (ang. death inducing signalling complex) jest odpowiedzialny za aktywację kaspazy 8, uruchomienie kaskady kolejnych kaspaz i fazy wykonawczej procesu (KOPACZEWSKA i KOPACZEWSKI 2004, HORDYJEWSKA i PASTERNAK 2005). Aktywacja szlaku wewnętrznego przebiega z udziałem mitochondriów. Śmierć apoptyczna zostaje zapoczątkowana przez zmianę przepuszczalności błony mitochondrialnej. W zmianach tych udział biorą m.in. białka z rodziny Bcl-2 (ang. B-cell leukemia), w skład których wchodzi zarówno białka pro-, jak i antyapoptyczne (STĘPIEŃ i współaut. 2007). Indukcja sygnału przeżycia lub śmierci zależy od tego, których białek w danej chwili jest więcej. Obydwie grupy przedstawicieli rodziny Bcl-2 są w stanie tworzyć między sobą tak homo-, jak i heterodimery. Rolą, jaką przypie-

kuje się rodzinie Bcl-2 w procesie apoptozy, jest m. in. możliwość hamowania bądź inicjacji przepływu jonów między przestrzenią międzybłonową mitochondrium a cytozolem. Inicjacja jest możliwa dzięki oligomeryzacji białek proapoptycznych, wbudowujących się następnie w zewnętrzną błonę. Tworzą w ten sposób pory umożliwiające uwolnienie jonów. Powoduje to zmianę mitochondrialnego potencjału błonowego. Konsekwencją tego może być przerwanie integralności błony oraz uwolnienie cząsteczek odpowiedzialnych również za stymulację apoptozy. Zwiększona ilość białek antyapoptycznych w komórce hamuje z kolei tworzenie porów przez łączenie się z białkami proapoptycznymi w heterodimety na powierzchni błony mitochondrialnej. Rodzina białek Bcl-2 jest w stanie ponadto regulować aktywność kanałów białkowych, znajdujących się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W zależności od typu białka, stymulują ich otwieranie lub zamykanie, co również nie pozostaje bez wpływu na wahania potencjału błony (HORDYJEWSKA i PASTERNAK 2005). Przepuszczalność błon jest regulowana ponadto przez megakanaly. Tworzy je kompleks kilku białek, a ich regulacja także podlega częściowo wpływowi białek rodziny Bcl-2. Podczas aktywacji szlaku wewnętrznego apoptozy przedstawiciele Bcl-2 są w stanie wpływać na ich otwarcie. Umiejscowione są na styku zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrium. Są mało selektywne i umożliwiają wydostawanie się z macierzy mitochondrialnej dużych cząsteczek (RUPNIEWSKA i BOJARSKA-JUNAK 2004, ŁABĘDZKA i współaut. 2006, BRUNELLE i LETAI 2009). Zapoczątkowanie apoptozy związane jest z wydostaniem się z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów do cytoplazmy czynnika AIF (czynnik indukujący apoptozę) i cytochromu c. Cytochrom w cytozolu łączy się z białkiem Apaf-1 (ang. apoptotic protease activating factor-1) i prokaspazą 9, tworząc apoptosom odpowiedzialny za przekształcenie nieaktywnej prokaspazy 9 w aktywną kaspazę 9 i uruchomienie kaskady kaspaz, prowadząc ostatecznie do aktywacji wykonawczej kaspazy 3 (IGNEY i KRAMMER 2002, KOPACZEWSKA i KOPACZEWSKI 2004). Po utracie integralności błony mitochondrialnej z przestrzeni międzybłonowej wydostaje się m.in. mitochondrialne białko Smac/DIABLO (HORDYJEWSKA i PASTERNAK 2005). Białko to reguluje funkcjonowanie



Ryc. 1. Szlaki regulujące apoptozę oraz główne białka regulatorowe i wykonawcze procesu. Szczegółowy opis i wyjaśnienie skrótów w tekście.

Schemat przedstawia zarówno białka szlaku zewnętrznego jak i wewnętrznego oraz białka łączące oba szlaki jak BID czy IAP. Szlak zewnętrzny rozpoczyna się przyłączeniem liganda do błonowego receptora śmierci, zawierającego domenę śmierci (DD). Sygnał następnie przekazywany jest z receptora na cząsteczkę adaptora (np. FADD), co z kolei po jego połączeniu z prokaspazą 8 (lub 10) prowadzi do jej aktywacji. Aktywna kaspaza inicjuje proteolityczną aktywację innych kaspaz, w tym efektorową kaspazę 3. Kaspaza 8 może również brać udział w aktywacji szlaku wewnętrznego przez proteolityczne cięcie białka BID do jego aktywnej formy. Aktywowane białko BID może tworzyć heterodimery z białkiem BAX i w tej postaci wiązać się z błoną mitochondrialną tworząc w niej pory. W przypadku większej ekspresji białek antyapoptotycznych (jak Bcl-2) proces tworzenia porów przez proapoptotyczne białka BID i BAX jest hamowany. Po wytworzeniu porów, utracie potencjału błonowego i przerwaniu integralności błony mitochondrialnej z przestrzeni międzymbłonowej do cytozolu wydostają się białka regulujące apoptozę (m. in. Smac/DIABLO, Apaf-1 czy cytochrom c). Apaf-1 i cytochrom c łączą się z prokaspazą 9 tworząc apoptosom i umożliwiając aktywację prokaspazy 9. Aktywna kaspaza 9 powoduje proteolityczną aktywację kaspazy 3 a ta z kolei aktywację kaspazy 7, prowadząc tym samym do rozpoczęcia fazy wykonawczej apoptozy. Hamowanie kaspaz, aktywowanych zarówno na drodze zewnętrznej jak i wewnętrznej, odbywa się głównie z udziałem białek IAP. Podobną rolę pełnią białka HSP. Jednak zamiast wchodzić w interakcję z aktywnymi kaspazami blokują inicjację apoptozy wiążąc się z prokaspazami i nie dopuszczając do ich aktywacji. Ponadto białka HSP mogą wiązać się z cytochromem c, hamując tworzenie apoptosomu oraz z białkiem Smac/DIABLO, które jest inhibitorem białek IAP.

białek z rodziny inhibitorów apoptozy. Po przedostaniu się do cytozolu białka te wiążą się z IAP, prowadząc do zniesienia efektu hamowania apoptozy przez IAP. Smac/DIABLO wiąże każdy typ białek IAP, które do tej pory były przebadane pod tym kątem, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Wykorzystując przy tym domenę BIR, obecną u każdego z przedstawicieli rodziny inhibitorów apoptozy (QIN i współaut. 2012). Białko Smac/DIABLO jest negatywnym regulatorem apoptozy. Nie jest ono jedynym mogącym oddziaływać z przedstawicielami inhibitorów apoptozy. Jednak wszystkie pozostałe [m.in. uwalniania z mitochondriów peptydaza serynowa HtrA2/Omi, czy jądrowy czynnik łączący się z XIAP (XAF1)] wywołują także identyczny skutek – ich asocjacja z białkiem docelowym powoduje zniesienie efektów aktywności IAP (YANG i współaut. 2003).

Poszczególne rodzaje nowotworów mogą znacznie różnić się pod względem zdolności hamowania programowanej śmierci komórki. Jedno z podstawowych rozwiązań tego problemu jest związane ze zwiększoną ekspresją IAP. Do ważniejszych należy także zmieniona ekspresja białek pro- i antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2, częściowo powiązana z nimi aktywność czynników transkrypcyjnych takich jak p53 czy NF- κ B (ang. nuclear factor kappa B) oraz zwiększona ekspresja białek szoku cieplnego (ang. heat shock protein, HSP) (BIELAK-ŻMIJEWSKA 2003). Rodzina białek Bcl-2 towarzyszy wewnętrznemu szlakowi aktywacji apoptozy. Cechą uwzględnianą podczas klasyfikacji rodziny regulatorów apoptozy Bcl-2 jest obecność domeny BH (domeny homologii z Bcl-2). W obrębie rodziny Bcl-2 zarysowują się trzy podgrupy (Tabela 1). Do pierwszej należą białka antyapoptotyczne (zawierające 4 domeny BH, od BH1 do BH4). Druga grupa to białka proapoptotyczne, zawierające poza jednym wyjątkiem domenę BH1-BH3. Trzecia grupa zawiera wyłącznie domenę BH3. Ich ekspresja następuje w efekcie działania czynników uszkodzających i aktywatorów transkrypcji jak np. białko p53 (RUPNIEWSKA i BOJARSKA-JUNAK 2004, ŁABĘDZKA i współaut. 2006, BRUNELLE i LETAI 2009, KANG i REYNOLDS 2009). W wielu typach nowotworów dochodzi do zmiany ekspresji genów *Bcl-2* i pierwotnego stosunku białek proapoptotycznych do antyapoptotycznych. Konsekwencją nadekspresji białek antyapoptotycznych jest utrudnienie, czy wręcz uniemożliwienie inicjacji apoptozy w komórkach nowotworowych. Przy-

kładem nowotworów charakteryzujących się zwiększoną ekspresją białek antyapoptotycznych jest m. in. rak płuc, nerki, jajnika, piersi, czerniak (PLACZEK i współaut. 2010). Badania nad terapiami nowotworowymi koncentrują się między innymi na próbach indukcji apoptozy przez inaktywację członków rodziny Bcl-2 z zastosowaniem inhibitorów i interferencji RNA (LIMA i współaut. 2004, ARISAN i współaut. 2010). Ekspresja miRNA występująca w niektórych przypadkach nowotworów może doprowadzić do drugiego rodzaju zmian ekspresji białek rodziny Bcl-2, mianowicie zmniejszenia ekspresji białek proapoptotycznych (ZHOU i współaut. 2010). Czynniki transkrypcyjne i regulatorowe, jak p53, NF- κ B czy ligaza Mdm-2 (ang. mouse double minute-2), jako produkty protoonkogenów i genów supresorowych, kontrolujące przebieg cyklu komórkowego oraz onkogenezę, mogą także regulować procesy związane z zahamowaniem apoptozy w nowotworach w wyniku mutacji kodujących je genów. Mutacje w genie *TP53*, kodującym białko p53, są jednymi z najczęściej występujących w nowotworach (BIELAK-ŻMIJEWSKA 2003, DWORAKOWSKA 2005). Przy zachowaniu niezmienionej aktywności, odpowiadają za transkrypcję genów proapoptotycznych, natomiast w wyniku mutacji funkcja ta często zostaje utracona. Mdm-2 odpowiada za degradację p53. Przy jego nadekspresji zbyt duża degradacja regulatora transkrypcji powoduje zmniejszenie ekspresji białek proapoptotycznych. Nadekspresja genu supresorowego, którego produktem jest czynnik transkrypcyjny NF- κ B powoduje, odwrotnie niż w przypadku p53, zwiększoną transkrypcję białek antyapoptotycznych (BIELAK-ŻMIJEWSKA 2003, DWORAKOWSKA 2005).

Ekspresja białek szoku cieplnego (HSP) indukowana jest w odpowiedzi na stres komórkowy. Białka te dzieli się na 4 grupy, zależnie od wielkości (HSP90, HSP70, HSP60 i małe HSP). Głównym ich zadaniem jest prawidłowe fałdowanie białek, działanie antyapoptotyczne i kontrola stabilności lub proteasomalnej degradacji białek w warunkach stresowych (JEGO i współaut. 2010). W przypadku wielu nowotworów obserwuje się nadekspresję HSP. Pociąga to za sobą możliwość wzrostu guza, zwiększenie potencjalnej zdolności do przerzutów oraz odporność na chemio- i radioterapię (RASHMI i współaut. 2004). Białka szoku cieplnego mogą działać w podobny sposób jak onkogeny. Ich zwiększona ilość w komórce nowotworowej może

Tabela 1. Podział głównych białek rodziny Bcl-2 z uwzględnieniem liczby obecnych domen homologii z Bcl-2 oraz roli w indukcji apoptozy (wg OPIELA i KAŃSKA-KSIAŻKIEWICZ 2006).

BIAŁKA PROAPOPTOTYCZNE		BIAŁKA ANTYAPOPTOTYCZNE
zawierające 1 domenę homologiczną (BH3 - only)	zawierające 3 domeny homologiczne (BH1-BH3)	zawierające 4 domeny homologiczne (BH1-BH4)
<ul style="list-style-type: none"> - Bid - Bim - Blk - Bnip3 - Nix - NOXA - PUMA - Bcl-Gs 	<ul style="list-style-type: none"> - Bad - Bik - Hrk - Bax - Bak - Bok - Bcl-rambo 	<ul style="list-style-type: none"> - Bcl-2 - Bcl-xl - Bcl-w - Mcl-1 - A1/Bfl - Bcl-B

prowadzić do wiązania i unieczynnienia efektorów apoptozy, pośredniczyć w ich proteolizie, czy wreszcie chronić przed degradacją białka odpowiadając za blokadę ścieżek proapoptotycznych, tym samym przyczyniając się do niepowodzenia prowadzonych terapii

(JEGO i współaut. 2010), Po poznaniu mechanizmów działania HSP, stały się one także celem w badaniach nad nowymi terapiami, głównie prowadzącymi do zahamowania ich ekspresji. (RASHMI i współaut. 2004, KHONG i SPENCER 2011).

BUDOWA BIAŁEK Z RODZINY INHIBITORÓW APOPTOZY

U człowieka rodzinę IAP reprezentuje 8 białek. Zalicza się do nich: XIAP, ILP-2, cIAP-1, cIAP-2, liwinę, NAIP, surwiwinę, BRUCE (GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2009). Białka te wykazują homologiczną budowę strukturalną pewnych regionów zarówno w obrębie komórek ssaczych, w tym ludzkich, jak i zupełnie odrębnych grup zwierząt oraz wirusów. Przy czym zaznaczyć należy, że nie we wszystkich organizmach występują identyczne białka IAP. Białka te u różnych gatunków mogą posiadać zupełnie inne nazwy czy budowę. Sytuacja taka ma miejsce m. in. u drożdży. W komórkach *Saccharomyces cerevisiae* wykryto białka o podobnej strukturze i właściwościach jak ludzkie IAP. Niemniej trudno spekulować o ich roli w inhibicji apoptozy ze względu na fakt, że aktualnie nie udowodniono istnienia owego zjawiska w komórkach drożdżowych i postuluje się, że w ogóle taki proces nie ma miejsca (DEVERAUX i REED 1999). Nasuwa to jednoznacznie hipotezę o nabyciu w drodze ewolucji przez

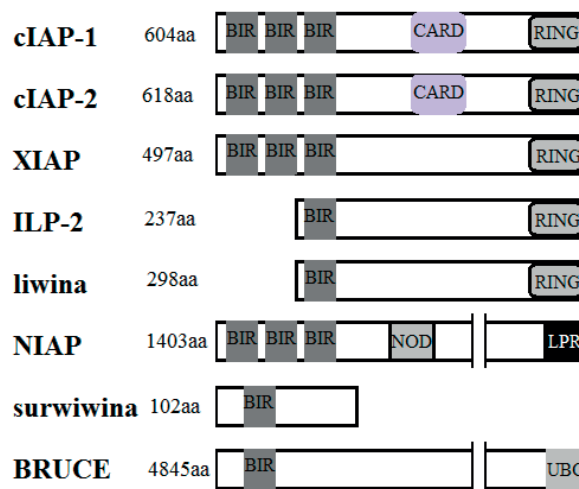
te, pierwotnie pełniące całkowicie odmienną funkcję białka, zdolności do hamowania apoptozy. Jednocześnie przy nabyciu nowej funkcji w niektórych przypadkach dochodziło do zachowania pierwotnej funkcji danych białek, niezwiązanej z hamowaniem apoptozy. To wydaje się mieć miejsce w przypadku np. białka BRUCE, zawierającego domenę UBC (ang. Ub-conjugating domain), która ma aktywność ligazy i odpowiada za dołączanie reszt ubikwityny do białek adaptorowych oraz zależną od ubikwitynacji, proteasomalną degradację białek, w tym niezwiązanych z apoptozą. Ponadto udowodniono, że surwiwina, oprócz interakcji z białkami szlaków apoptotycznych, bierze udział m. in. w mitozie (DEVERAUX i REED 1999).

Białka zaliczane do rodziny IAP charakteryzują się dwiema unikalnymi cechami, dotyczącymi ich funkcjonowania: są to jedyne czynniki komórkowe, których celem są zarówno kaspazy inicjatorowe oraz wykonawcze; efekt ich działania może ulegać konwer-

sji od antyapoptotycznego do proapoptotycznego (NACHMIAS i współaut. 2004).

Białka IAP w swej budowie charakteryzują się obecnością kilku domen powtarzających się u większości przedstawicieli oraz konserwowanymi ewolucyjnie motywami w sekwencji aminokwasów (Ryc. 2). W swej strukturze posiadają domeny BIR. Ich nazwa wywodzi od wirusów, w których je wykryto (ang. baculoviral IAP repeat). Buduje je sekwencja aminokwasowa złożona z około 70 aa. Odstępstwem są BIR zawarte w surwiwinie i BRUCE, które tworzą łańcuchy złożone z około 100 aa. W białkach domeny BIR mogą występować pojedynczo lub w seriach powtórzeń, których liczba nie przekracza trzech. Położone są na końcu aminowym białka, a w szeregu tworzących je aminokwasów można dostrzec stały motyw CX2CX6WX3DX5HX6C (DEVERAUX i REED 1999), zbudowany z wielu reszt cysteiny i histydyny. Domeny BIR są odpowiedzialne za tworzenie palców cynkowych – domen białkowych zawierających atomy cynku i odpowiedzialnych za wiązanie się z innymi białkami (DEVERAUX i REED 1999, VERHAGEN i współaut. 2001, GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2009). W wielu przypadkach wśród przedstawicieli tej rodziny odnotowano również obecność domen RING (ang. really interesting new gene). Te z kolei znajdują się w C-końcowej części białek. Ludzkimi białkami, w których wykazano ich obecność są c-IAP1, c-IAP2, XIAP, ILP-2 i liwina. Zawierają konserwatywny motyw CX2CXN-CXHX2-3CX2CXMCX2C (LACASSE i współaut. 1998). Są one kolejną grupą domen typu palca cynkowego, wykazującą aktywność ligazy E3 ubikwityny, biorącej udział w znakowaniu białek i kierowaniu ich do proteasomów. Znakowaniu ubikwityną podlegają zarówno same białka IAP, na drodze auto-ubikwitynacji, jak również białka docelowe – kaspazy (GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2008).

Rodzinę IAP podzielono na 3 klasy. Do pierwszej zaliczono wszystkie białka posiadające domenę RING (XIAP, cIAP-1, cIAP-2, ILP-2 i liwina). Białka XIAP, cIAP-1 oraz cIAP-2 oprócz domeny RING zawierają w swej strukturze 3 domeny BIR (BIR1, BIR2 i BIR3). Pozostałe dwa białka mają jedną domenę BIR, lecz z powodu jej znacznej homologii do BIR3 zostały sklasyfikowane w tej samej grupie. U cIAP-1 i cIAP-2 między BIR



Ryc. 2. Schemat budowy białek rodziny inhibitorów apoptozy z uwzględnieniem liczby i rozmieszczenia domen. Szczegółowy opis w tekście.

a RING zidentyfikowano charakterystyczną tylko dla nich domenę rekrutacji kaspaz (ang. caspase recruitment domain, CARD). Domeny CARD pośredniczą w powstawaniu większych kompleksów z innymi białkami, które także je posiadają. Domena CARD obecna jest także w kaspazach. Ułatwia to białkom cIAP interakcję z nimi. Drugą klasę reprezentuje NIAP. W jego strukturę wchodzi również trzy domeny BIR, ale brak mu domeny RING. Zamiast niej posiada domenę oligomeryzacji NOD (ang. nucleotide-binding oligomerization domain). Tuż za nią znajduje się 14 powtórzeń leucynowych. Prawdopodobnie wraz z powtórzeniami leucynowymi domena NOD bierze udział w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne wiążąc bakteryjne lipopolisacharydy. NIAP jest w stanie hamować też prozapalną kaspazę 1 po wcześniejszym związaniu lipopolisacharydu oraz oligomeryzacji domeny NOD z domenami NOD innych białek NIAP w komórce i zmianie konformacyjnej powodującej odsłonięcie domeny BIR, która z kolei umożliwia interakcję z kaspazą 1. Trzecią klasę tworzy surwiwina i BRUCE. Mają one wyłącznie jedną, podobną do siebie domenę BIR. Prawdopodobnie w mniejszym stopniu regulują apoptozę, jednocześnie pośrednicząc w procesach podziału komórek (SCHIMMER 2004, HUNTER i współaut. 2007, GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2009).

MECHANIZMY DZIAŁANIA INHIBITORÓW APOPTOZY

Ekspresję białek z rodziny inhibitorów apoptozy wykazano już podczas rozwoju płodowego. W wielu normalnie rozwijających się komórkach znajdowano mRNA poszczególnych jej członków w różnej ilości, choć zawsze na zależnym od tkanki, stałym poziomie dla każdego z nich (DEVERAUX i REED 1999).

Początkowe sugestie dotyczące działania inhibitorów apoptozy mówiły o zdolności hamowania kaspaz przez wszystkich przedstawicieli rodziny IAP (DEVERAUX i REED 1999, NACHMIAS i współaut. 2004). Najnowsze badania wykazały jednak, że zdolnością bezpośredniego obniżenia aktywności kaspaz *in vivo* charakteryzuje się jedynie XIAP. Część pozostałych IAP (jak cIAP-1 i cIAP-2) wykazuje hamowanie kaspaz *in vitro*, choć i tak znacznie słabsze w porównaniu z XIAP. Surwiwina może współdziałać z XIAP przy interakcji i hamowaniu aktywności kaspaz. Działając w pojedynkę, nie przejawia jednak zdolności ich dezaktywacji (ALTIERI 2010). Spośród białek IAP, XIAP jest najlepiej przebadanym i scharakteryzowanym białkiem. Jego głównym celem są kaspazy efektorowe 3 i 7 oraz inicjatorowa kaspaza 9. Połączenie IAP z substratem jest możliwe dzięki obecnym domeną BIR oraz konserwatywnej sekwencji łącznika pomiędzy BIR1 i BIR2. Inhibicja kaspazy 9 odbywa się przy udziale BIR3. Domena ta wiąże się z sekwencją, która jest odsłaniana po enzymatycznym cięciu prokaspazy 9 na dwie podjednostki. Sekwencja wiążąca się z domeną BIR znajduje się na mniejszej podjednostce (P12) prokaspazy 9. Związanie XIAP nie dopuszcza do utworzenia homodimerów z dwóch mniejszych podjednostek, co blokuje pełną aktywność kaspazy i uniemożliwia dalszą proteolityczną obróbkę z utworzeniem podjednostki P10, niezawierającej już miejsca wiązania XIAP (NACHMIAS i współaut. 2004, HUNTER i współaut. 2007). Podejrzuje się, że do wywołania inhibicji białku XIAP nie jest niezbędny motyw obecny w sekwencji cząsteczki P12, wiążący domenę BIR3, aby z powodzeniem oddziaływać na podjednostkę P10 (HUNTER i współaut. 2007). Natomiast zupełnie inny mechanizm jest wykorzystywany w interakcjach z kaspazą 3 i 7. Udział w ich hamowaniu bierze domena BIR2 oraz region pomiędzy domenami BIR. Największą rolę przypisuje się obecności linkera. To on blokuje możliwość przestrzennego przyłączenia substratu do miejsca

aktywnego enzymu. Rolą BIR2 jest najprawdopodobniej stabilizacja kompleksu, ale tylko w przypadku hamowania kaspazy 7. Przy współdziałaniu z kaspazą 3 nie odgrywa żadnej funkcji. Domena BIR1 w obu przypadkach nie odgrywa znaczącej roli. Być może uczestniczy w procesach regulacji bądź interakcji z innymi szlakami, np. ubikwitynacji (NACHMIAS i współaut. 2004, SCHIMMER 2004, HUNTER i współaut. 2007).

Łączenie się IAP z docelowymi substratami, tak *in vivo*, jak i *in vitro* wymaga obecności w sekwencji tych białek specyficznego motywu IBM (ang. IAP-binding motif) (ALTIERI 2010). Ma on swój udział w wiązaniu IAP z kaspazami. Odgrywa też rolę w oddziaływaniach z innymi białkami regulacyjnymi. Wśród nich ważną grupę stanowią negatywne regulatory IAP. Z ich pomocą możliwa jest modulacja ścieżek sygnałowych, powodująca zniesienie efektów hamujących apoptozę i aktywację szlaku programowanej śmierci komórki. Łącząc się z IAP przez region IBM, zajmują to samo miejsce wiązania, które niezbędne jest do asocjacji białek IAP z kaspazami. Znosi to aktywność inhibitorów apoptozy, pozwalając wejść komórce w fazę wykonawczą apoptozy. Do najważniejszych negatywnych regulatorów apoptozy zalicza się bez wątpienia Smac/DIABLO, HtrA2/Omi i XAF1 (HUNTER i współaut. 2007, GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2009). Uwalnianie w odpowiedzi na bodźce proapoptotyczne, po przedostaniu się do cytozolu łączy się z IAP w heterodimery, umożliwiając aktywację kaskady kaspaz (VAUX i SILKE 2003, SCHIMMER 2004, HUNTER i współaut. 2007, MARTINEZ-RUIZ i współaut. 2008). Ich substratem nie jest wyłącznie XIAP, w głównej mierze odpowiedzialny za hamowanie kaspaz. W badaniach *in vitro* wykazują także zdolność łączenia się z cIAP-1 cIAP-2 oraz surwiwiną (GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2009). Blokada IAP przez Smac/DIABLO nie ogranicza się jedynie do pozbawienia ich funkcji wiązania kaspaz. Oddziałując z domeną RING, antagoniści wpływają również na obniżenie zdolności IAP do ubikwitynacji białek (CREAGH i współaut. 2004). Co więcej, badania wykazały, że możliwy jest proces odwrotny. To IAP „znakują” Smac/DIABLO przez przyłączenie ubikwityny, wzmagając ich degradację (MACFARLANE i współaut. 2002, HU i YANG 2003, BARTKE i współaut. 2004).

Jak już zaznaczono, ubikwitynacja jest kolejnym przykładem wszechstronnego działania inhibitorów apoptozy. Zdolność tą zapewnia im obecność C-końcowej domeny RING (SILKE i współaut. 2005, GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2008) oraz domeny UBC (w przypadku BRUCE) (BARTKE i współaut. 2004). Białka z rodziny inhibitorów apoptozy, mające zdolność ubikwitynacji, wykazują aktywność enzymów szlaku proteasomalnej degradacji białek: E2 (enzymu przenoszącego ubikwitynę) oraz E3 (ligazy ubikwityny) (BARTKE i współaut. 2004, SILKE i współaut. 2005). Ubikwitynacja może przebiegać dwukierunkowo, tzn. cząsteczki ubikwityny mogą być zligowane zarówno z białkami innymi niż inhibitory apoptozy, jak i same białka IAP mogą ulegać autoubikwitynacji. Niesie to za sobą zdolność do odpowiedzi pro- lub antyapoptotycznej, w zależności od wyznaczonego substratu. Ubikwitynacja białek IAP jest ponadto związana z regulacją cyklu komórkowego. Dużą rolę odgrywa przy tym poziom ekspresji oraz proteasomalnej degradacji ubikwitynowanej surwiwiny. Ma to na celu zachowanie odpowiedniego poziomu surwiwiny w zależności od aktualnej fazy cyklu, a w razie konieczności szybkiego obniże-

nia jej zawartości w komórce (ZHAO i współaut. 2000).

Znane są oddziaływania przedstawicieli IAP ze szlakami przekazywania sygnału niezależnymi od kaspaz. Do hamowania apoptozy może dochodzić dzięki interakcją z NF- κ B oraz kinazą JNK1 (ang. c-Jun N-terminal kinases 1), należąca do kinaz aktywowanych mitogenami, pośrednicząca w działaniu czynników stresowych, proliferacji i apoptozie komórek. Przeżycie komórek może zwiększać nadekspresja IAP wywołana przez NF- κ B. Z kolei IAP prowadzą do degradacji inhibitorów NF- κ B, I κ B (ang. inhibitor of kappa B). Tworzy się w ten sposób swego rodzaju pętla działająca na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Dodatkowo oddziaływanie białek cIAP z receptorem czynnika martwicy nowotworów TNFR1 (ang. tumor necrosis factor 1) również może zwiększać aktywność NF- κ B (ALTIERI 2010). W aktywacji JNK1 pośredniczy XIAP wiążąc receptor dla białka morfogenetycznego kości (BMP) oraz białko wiążące kinazę TAK (TAB1) i kinazy aktywowane mitogenami (MAP), a także NAIP i liwina (wiążąc się z białkiem TAB1 i kinazą TAK1) (NACHMIAS i współaut. 2004).

IAP A KANCEROGENEZA

Komórki rakowe cechuje m. in. oporność apoptotyczna. Największy problem w pokonaniu oporności nowotworów na czynniki proapoptotyczne stanowi duża liczba możliwych aktywowanych szlaków, niedopuszczających do inicjacji programu śmierci. Spora rolę odgrywają tu IAP, również z powodu ich różnorodnego działania.

Bardzo często IAP działają jak onkogeny. Wiele nieprawidłowych wzorów ekspresji rodziny inhibitorów apoptozy wykazano w chorobach nowotworowych związanych z komórkami krwiotwórczymi i układem chłonnym (GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2008, 2009), a także w przypadku wielu guzów litych (HUNTER i współaut. 2007, GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK i SMOLEWSKI 2009). W wielu nowotworach obserwuje się amplifikację fragmentów chromosomów kodujących inhibitory a także ich translokacje. Amplifikowany region 11q21-q23 kodujący białka cIAP, odnajdywano często w glejakach, raku nerki czy żołądka. Natomiast dobrze udokumentowanym i często wstępującym w chłoniakach przykładem jest translokacja części

genu kodującego cIAP-2 zawierającego domeny BIR oraz jego fuzja z fragmentem genu MALT1 (ang. mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1). Chimeryczne białko jest wówczas zdolne do aktywacji NF- κ B i jest spotykane w około 50% chłoniaków typu MALT (HUNTER i współaut. 2007, SRINIVASULA i ASHWELL 2008). Białka cIAP są w stanie łączyć się z receptorami TNFR1, co może je uniewrażliwić na czynnik martwicy nowotworu (TNF). Stosując mimetyki antagonistów IAP spowodowano, przez ubikwitynację, degradację cIAP i zwiększenie wrażliwości na stymulację zewnętrznego szlaku apoptozy przez TNF. Degradacji ulegał też XIAP, choć z mniejszym skutkiem (VAUX 2009). cIAP-2 w podwyższonym stężeniu jest obecny w hormono zależnym raku piersi. Stymulacja komórek przez 17 β -estradiol (E2) za pośrednictwem receptorów ER, znajdujących się w zwiększonej liczbie, prowadzi do akumulacji cIAP-2 i wywołania oporności na apoptozę w komórkach nowotworowych. Również w tym przypadku zastosowanie mimetyków stymulowało apoptozę (STANCULESCU i współaut.

2010). Nadekspresja IAP może odgrywać rolę jako czynnik prognostyczny. Przykładem jest zwiększony poziom XIAP w raku jelita grubego (GUOAN i współaut. 2009). Podobnie w raku wątrobowokomórkowym (HCC), gdzie komórki rakowe charakteryzuje znaczny wzrost poziomu surwiwiny i liwiny w zestawieniu z komórkami prawidłowymi (AUGELLO i współaut. 2009). Jako metodę leczenia płaskonabłonkowego raka głowy i szyi często stosuje się cisplatynę, w przypadku której komórkowa oporność jest również związana z obecnością białka XIAP, przez co jego poziom może być markerem skuteczności stosowanej terapii i czynnikiem prognostycznym (YANG i współaut. 2012). Wartość prognostyczną może stanowić również stosunek IAP do ich antagonistów. Wysoki współczynnik XIAP/XAF1 koreluje ze złym rokowaniem w HCC (AUGELLO i współaut. 2009). Podwyższony poziom surwiwiny występuje w wielu komórkach nowotworowych, podczas gdy w komórkach prawidłowo funkcjonujących jej poziom jest znikomy. W pewnym stopniu surwiwina może więc być swego rodzaju markerem przebiegającej kancerogenezy. Bliższe obserwacje wykazują jednak heterogeniczność ekspresji surwiwiny, nawet w obrębie tego samego nowotworu. Natomiast niektóre nowotwory w ogóle nie wykazują zwiększonego poziomu surwiwiny podczas całego rozwoju (np. chłoniaki nieziarnicze o niskim stopniu złośliwości) (DEVERAUX i REED 1999). Możliwe jest też synergiczne działanie surwiwiny wraz z XIAP. Blokując oba białka jednocześnie, uzyskano lepszy wynik w indukcji apoptozy niż przy inhibicji każdego pojedynczo. Nie jest to jednak regułą (NACHMIAS i współaut. 2004). Surwiwina uczestnicząc w cyklu komórkowym i oddziałując z mikrotubulami może dodatkowo chronić komórki nowotworowe przed działaniem inhibitorów mitozy (np. winkrystyny), dając

w efekcie działanie antyapoptotyczne (DEVERAUX i REED 1999). Asocjacja typu surwiwina-XIAP może także prowadzić do zwiększonej stabilizacji XIAP, jego wzmożonej aktywności i zmniejszonej degradacji na drodze ubiquitynacji, co również może nie pozostawać bez znaczenia w nowotworzeniu (ALTIERI 2010). Synergiczne działanie wykazują także liwina, XIAP i surwiwina w raku pęcherza moczowego. Wyciszenie ekspresji współdziałających białek IAP za pomocą interferencyjnego RNA uwrażliwia komórki nowotworowe na czynniki proapoptotyczne, powodując wzrost aktywności kaspaz (YANG i współaut. 2010). Liwina w komórkach może być obecna w dwóch formach: liwina-alfa i liwina-beta. Liwina-alfa może brać udział w inicjacji nowotworu. Interesujące jest, że liwina-beta może wykazywać działanie proapoptotyczne. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że przy udziale komórek NK następowało cięcie liwiny-beta do krótszej formy (t-liwina) i hamowania progresji nowotworu. Gdy wyeliminowano działanie komórek NK lub wprowadzono mutacje w beta-liwinie, hamowanie progresji ustępowało (ABD-ELRAHMAN i współaut. 2009).

Oprócz wymienionych wyżej przykładów także BRUCE ulega silnej ekspresji w komórkach nowotworowych, m. in. w czerniakach i chłoniakach, liwina zaś w glejakach, indukując odporność na chemioterapię (LOPES i współaut. 2007). Większość przypadków charakteryzuje zatem zwiększona aktywność IAP związana ze wzrostem ekspresji. Dlatego też główne cele badań prowadzonych nad terapiami nowotworowymi związanymi z IAP koncentrują się na dwóch kierunkach. Są to: zastosowanie RNAi oraz antagonistów lub mimetyków białek IAP. Wszystkie te próby sprowadzają się do jednego celu – obniżenia ekspresji i biologicznej aktywności IAP w komórkach nowotworowych.

PROGRAMOWANA ŚMIERĆ KOMÓRKI A BIAŁKA Z RODZINY INHIBITORÓW APOPTOZY (IAP) I ICH ROLA W NOWOTWORZENIU

Streszczenie

Apoptoza to naturalny proces fizjologiczny, którego celem jest uśmiercenie komórki. Na drogę programowanej śmierci kierowane są komórki nieprawidłowe, uszkodzone lub zbędne. Inicjacja apoptozy przebiega z udziałem czynników zewnątrzkomórkowych i aktywacją receptorów błonowych, lub z udziałem mitochondriów i zakłóceniem wewnątrzkomórkowej homeostazy. Ważną rolę w regulacji

apoptozy odgrywają białka rodziny Bcl-2, do których należą białka pro- i antyapoptotyczne. Ich wzajemny stosunek decyduje o wejściu na ścieżkę programowanej śmierci komórki. Apoptoza w komórce może być hamowana na wiele sposobów. Taką rolę pełnią białka szoku cieplnego (HSP) jak również białka z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP). Białka IAP hamują inicjację procesu poprzez wiązanie się z biał-

kami efektorowymi fazy wykonawczej apoptozy oraz ich kierowanie na drogę proteasomalnej degradacji.

Geny białek rodziny inhibitorów apoptozy po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w bakulowirusach. U człowieka wyodrębniono osiem białek IAP, zgrupowanych w trzy klasy. Cechą wspólną wszystkich przedstawicieli rodziny jest obecność co najmniej jednej domeny BIR. Domeny BIR oraz regiony do nich przylegające są odpowiedzialne za wiązanie IAP do kaspaz, prowadząc do zahamowania ich aktywności. Pozostałe domeny, charakterystyczne dla poszczególnych przedstawicieli rodziny IAP są odpowiedzialne m. in. za degradację białek przez ubiquitynację (domeny RING, UBC), czy też asocjacje z innymi białkami (domena CARD). Oprócz kontroli szlaków apoptotycznych, IAP biorą udział w degradacji białek niezwiązanych z programowaną śmiercią komórki, kontroli cyklu komórkowego, a także regu-

lacji aktywności czynników transkrypcyjnych.

Wyłamanie się komórki spod kontroli mechanizmów odpowiedzialnych za proliferację i śmierć może prowadzić do transformacji nowotworowej. Często obserwowanym zjawiskiem w komórkach nowotworowych jest wzmożona ekspresja białek IAP, przez co ich działanie można porównać do działania onkogenów. Wiele typów nowotworów wykazuje obecność translokacji lub amplifikacji genów kodujących inhibitory apoptozy. Prowadzi to do zmniejszenia wrażliwości nowotworu na bodźce proapoptotyczne. Poziom białek IAP w komórce może być markerem rozwijającej się choroby nowotworowej oraz czynnikiem prognostycznym. Białka IAP są atrakcyjnym celem badań prowadzonych nad terapiami nowotworowymi, głównie z zastosowaniem inhibitorów IAP oraz interferencyjnego RNA.

PROGRAMMED CELL DEATH AND INHIBITORS OF APOPTOSIS PROTEIN FAMILY (IAP) AND THEIR ROLE IN CANCER GENESIS

Summary

Apoptosis is a natural physiological process, intended to eliminate some cells. Incorrect, damaged or redundant cells, undergo programmed cell death. Initiation of the apoptosis proceeds under the influence of extracellular factors and activation of membrane receptors or involves mitochondrion activity and a disruption of intracellular homeostasis. A crucial role in regulation of the apoptosis is played by the Bcl-2 family proteins, which include pro- and anti-apoptotic proteins. The relation between these proteins determines which pathway leading to the cell death will be entered. Apoptosis may be inhibited in several ways, for example by heat shock proteins (HSP) or by inhibitors of apoptosis (IAP). IAP inhibit initiation of the process by binding to effector proteins of the execution phase of apoptosis or by leading them to the proteasomal degradation. Genes of IAP were identified for the first time in baculoviruses. In a human, eight IAP proteins, grouped into three classes, were isolated. Common feature of all members of the family is the presence of at least one BIR domain. BIR domains and contiguous regions are responsible for binding IAPs to cas-

pases, leading to inhibition of their activity. Other domains, common for specific members of IAP family, are responsible, among others, for: degradation of proteins through ubiquitination (RING, UBC domains) or association with other proteins (CARD domain). Besides controlling apoptotic pathways, IAPs take part in degradation of proteins not involved in the programmed cell death, in control of the cell cycle and regulation of transcription factors.

Avoidance by a cell of the control mechanisms of cell proliferation and death may lead to its cancer transformation. A frequently observed phenomenon in cancer cells is an increased expression of IAP proteins, hence their function can be compared to that of the oncogenes. In many types of cancers cells exhibit the presence of translocation or amplification of genes encoding apoptotic inhibitors. This decreases cancer's sensitivity to pro-apoptotic stimuli. The level of IAP proteins in a cell may serve as a marker of developing cancer and a prognostic factor. IAP proteins are thus attractive goal of research underlying cancer therapies, mainly those involving the use of IAP inhibitors and interfering RNA.

LITERATURA

- ABD-ELRAHMAN I., HERSHKO K., NEUMAN T., NACHMIAS B., PERLMAN R., BEN-YEHUDA D., 2009. *The inhibitor of apoptosis protein livin (ML-IAP) plays a dual role in tumorigenicity*. Cancer Res. 69, 5475-5480.
- ALTIERI D. C., 2010. *Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms*. Biochem. J. 430, 199-205.
- ARISAN E., KUTUK O., TEZIL T., BODUR C., TELCI D., BASAGA H., 2010. *Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells*. Breast Cancer Res. Treat. 119, 271-281.
- AUGELLO C., CARUSO L., MAGGIONI M., DONADON M., MONTORSI M., SANTAMBROGIO R., TORZILLI G., VAI-
RA V., PELLEGRINI C., RONCALLI M., COGGI G., BOSARI S., 2009. *Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma*. BMC Cancer 9, 125.
- BARTKE T., POHL C., PYROWOLAKIS G., JENTSCHS., 2004. *Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase*. Mol. Cell 14, 801-811.
- BIELAK-ŻMIJEWSKA A., 2003. *Mechanizmy oporności komórek nowotworowych na apoptozę*. Kosmos 52, 157-171.
- BRUNELLE J. K., LETAI A., 2009. *Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family*. J. Cell Sci. 122, 437-441.

- CREAGH E. M., MURPHY B. M., DURIEZ P. J., DUCKETT C. S., MARTINS J., 2004. *Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins*. J. Biol. Chem. 279, 26906-26914.
- DEVERAUX Q. L., REED J. C., 1999. *IAP family proteins—suppressors of apoptosis*. Genes Dev. 13, 239-252.
- DWORAKOWSKA D., 2005. *Rola białka p53, pRb, p21^{WAF1/CIP1}, PCNA, mdm2 oraz cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy*. Onkol. Pol. 8, 223-228.
- GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK O., SMOLEWSKI P., 2008. *Rola białek z rodziny inhibitora apoptozy (IAP) w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego*. Postepy Hig. Med. Dosw. 62, 55-63.
- GRZYBOWSKA-IZYDORCZYK O., SMOLEWSKI P., 2009. *Białka inhibitorowe apoptozy z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP) i ich antagoniści: rola biologiczna oraz potencjalne znaczenie w karcinogenezie i celowanej terapii przeciwnowotworowej*. Acta Haematol. Pol. 40, 593-612.
- GUOAN X., XIAOMIN W., HANNING W., KAIYUN C., HAOL., 2009. *Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human colorectal cancer and its correlation with prognosis*. J. Surg. Oncol. 100, 708-712.
- HORDYJEWSKA A., PASTERNAK K., 2005. *Apoptyczna śmierć komórki*. Adv. Clin. Exp. Med. 14, 545-554.
- HU S., YANG X., 2003. *Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO*. J. Biol. Chem. 278, 10055-10060.
- HUNTER A., LACASSE E., KORNELUK R., 2007. *The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets*. Apoptosis 12, 1543-1568.
- IGNEY F. H., KRAMMER P. H., 2002. *Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis*. Nat. Rev. 2, 277-288.
- JEGO G., HAZOUMÉ A., SEIGNEURIC R., GARRIDO C., 2010. *Targeting heat shock proteins in cancer*. Cancer Lett. 332, 275-285.
- KANG M. H., REYNOLDS C. P., 2009. *Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy*. Clin. Cancer Res. 15, 1126-1132.
- KHONG T., SPENCER A., 2011. *Targeting HSP 90 Induces Apoptosis and Inhibits Critical Survival and Proliferation Pathways in Multiple Myeloma*. Mol. Cancer Ther. 10, 1909-1917.
- KOPACZEWSKA M., KOPACZEWSKI B., 2004. *Apoptoza – genetycznie zaprogramowana śmierć komórki*. Nowiny Lekarskie 73, 389-392.
- LACASSE E. C., BAIRD S., KORNELUK R. G., MACKENZIEA. E., 1998. *The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer*. Oncogene 17, 3247-3259.
- LIMA R. T., MARTINS L. M., GUIMARAES J. E., SAMBADE C., VASCONCELOS M. H., 2004. *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. 11, 309-316.
- LOPES R. B., GANGESWARAN R., MCNEISH I. A., WANG Y., LEMOINE N. R., 2007. *Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy*. Int. J. Cancer 120, 2344-2352.
- ŁABĘDZKA K., GRZANKA A., IZDEBSKA M., 2006. *Mitochondrium a śmierć komórki*. Postepy Hig. Med. Dosw. 60, 439-446.
- MAC FARLANE M., MERRISON W., BRATTON S. B., COHEN G. M., 2002. *Proteasome-mediated Degradation of Smac during Apoptosis: XIAP Promotes Smac Ubiquitination in Vitro*. J. Biol. Chem. 277, 36611-36616.
- MARTINEZ-RUIZ G., MALDONADO V., CEBALLOS-CANCINO G., GRAJEDA J. P., MELENDEZ-ZAJGLA J., 2008. *Role of Smac/DIABLO in cancer progression*. J. Exp. Clin. Cancer Res. 27, 48.
- NACHMIAS B., ASHHAB Y., BEN-YEHUDA D., 2004. *The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer*. Semin. Cancer Biol. 14, 231-243.
- OPIELA J., KATSKA-KSIAZKIEWICZ L., 2006. *Rola białek rodziny BCL-2 w kontroli apoptozy w pecherzykach fajnikowych*. Biotechnologia 1, 90-96.
- PLACZEK W. J., WEI J., KITADA S., ZHAI D., REED J. C., PELLECCIA M., 2010. *A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy*. Cell Death Dis. 1, e40.
- QIN S., YANG C., LI S., XU C., ZHAO Y., REN H., 2012. *Smac: Its role in apoptosis induction and use in lung cancer diagnosis and treatment*. Cancer Lett. 318, 9-13.
- RASHMI R., KUMAR S., KARUNAGARAN D., 2004. *Ectopic expression of Hsp70 confers resistance and silencing its expression sensitizes human colon cancer cells to curcumin-induced apoptosis*. Carcinogenesis 25, 179-187.
- RUPNIEWSKA Z., BOJARSKA-JUNAK A., 2004. *Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2*. Postepy Hig. Med. Dosw. 58, 538-547.
- SCHIMMER A. D., 2004. *Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice*. Cancer Res. 64, 7183-7190.
- SILKE J., KRATINA T., CHU D., EKERT P. G., DAY C. L., PAKUSCH M., HUANG D. C. S., VAUX D. L., 2005. *Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 16182-16187.
- SRINIVASULA S. M., ASHWELL J. D., 2008. *IAPs: What's in a Name?* Mol. Cell 30, 123-135.
- STANCULESCU A., BEMBINSTER L. A., BORGAN K., BERGAMASCHI A., WILEY E., FRASOR J., 2010. *Estrogen promotes breast cancer cell survival in an inhibitor of apoptosis (IAP)-dependent manner*. Horm. Cancer 1, 127-135.
- STĘPIEŃ A., IZDEBSKA M., GRZANKA A., 2007. *Rodzaje śmierci komórki*. Postepy Hig. Med. Dosw. 61, 420-428.
- VAUX D. L., 2009. *Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins as drug targets for the treatment of cancer*. Biol. Rep. 1, 79.
- VAUX D. L., SILKE J., 2003. *Mammalian mitochondrial IAP binding proteins*. Biochem. Biophys. Res. Com. 304, 499-504.
- VERHAGEN A. M., COULSON E. J., VAUX D. L., 2001. *Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs*. Genome Biol. 2, 1-10.
- YANG D., SONG X., ZHANG J., YE L., WANG S., CHE X., WANG J., ZHANG Z., WANG L., SHI W., 2010. *Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells*. Acta Biochem. Biophys. Sin. 42, 137-144.
- YANG Q.-H., CHURCH-HAJDUK R., REN J., NEWTON M. L., DU C., 2003. *Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis*. Genes Dev. 17, 1487-1496.
- YANG X.-H., FENG Z.-E., YAN M., HANADA S., ZUO H., YANG C.-Z., HAN Z.-G., GUO W., CHEN W.-T., ZHANG P., 2012. *XIAP Is a predictor of cisplatin-based chemotherapy response and prognosis for patients with advanced head and neck cancer*. PLoS ONE 7, e31601.

- ZHAO J., TENEV T., MARTINS L. M., DOWNWARD J., LEMOINE N. R., 2000. *The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner*. J. Cell Sci. 113, 436-4371.
- ZHOU M., LIU Z., ZHAO Y., DING Y., LIU H., XI Y., XIONG W., LI G., LU J., FODSTAD O., RIKER A. I., TAN M., 2010. *MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression*. J. Biol. Chem. 285, 21496-21507.