

ANNA BIELAK-ŻMIJEWSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: a.bielak@nencki.gov.pl

MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA APOPTOZĘ

ZNACZENIE APOPTOZY KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Znanych jest ponad 100 typów i podtypów nowotworów umiejscowionych w różnych narządach organizmu człowieka. Mimo tej heterogenności spowodowanej różnym genotypem oraz specyficznością tkanki, z której pochodzi nowotwór, fenotyp prawie każdej komórki nowotworowej charakteryzują: uniezależnienie się od czynników wzrostu (stymulacja autokrynną), niewrażliwość na inhibitory wzrostu, nieograniczony potencjał replikacyjny (podniesiony poziom telomerazy), inwazyjność tkankowa, zdolność do metastazy i do podtrzymywania angiogenezy oraz oporność na apoptozę (HANAHAN i WEINBERG 2000).

W walce z nowotworami szczególnie duże nadzieje budzi poznanie mechanizmów związanych ze śmiercią komórkową. Uważa się bowiem, że miarą skuteczności terapii przeciwnowotworowej, oprócz zahamowania proliferacji, jest zdolność wyindukowania w komórkach rakowych procesu apoptozy (HICKMAN 1996, REED 1999). Leki przeciwnowotworowe można podzielić na związki uszkadzające DNA, antymetabolity (blokują specyficzne szlaki metaboliczne poprzez konkurowanie o miejsce wiązania z enzymami), inhibitory mitozy, analogi nukleotydów oraz inhibitory topoizomeraz. Większość z nich, jak również radioterapia, wywołują stres komórkowy, który w efekcie powinien doprowadzić do śmierci komórki (HERR i DEBATIN 2001, IGNEY i KRAMMER 2002). Jednakże transformacja nowotworowa prowadzi do nadekspresji czynników hamujących apoptozę lub/i zmniejszonej

lub wręcz braku ekspresji czynników aktywujących apoptozę.

SZLAKI PROWADZĄCE DO APOPTOZY

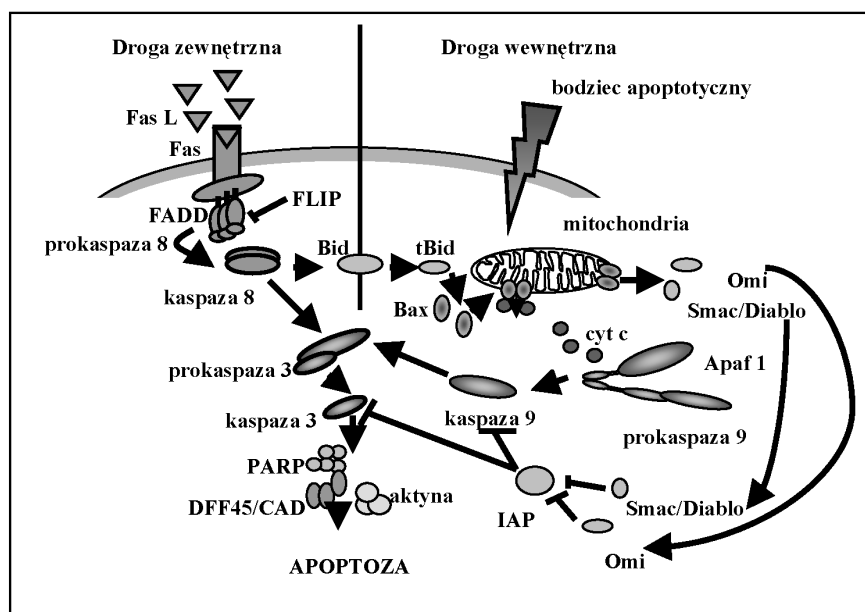
Apoptoza jest procesem uporządkowanym, zachodzącym według określonego programu prowadzącego do obkurczenia komórki, kondensacji chromatyny i fragmentacji DNA na odcinki będące wielokrotnością nukleosomów. Ostatnim etapem śmierci apoptotycznej jest rozpad komórki na otoczone błoną komórkową tzw. ciała apoptotyczne, zawierające organelle komórkowe. Ciała takie w organizmie są usuwane przez makrofagi lub sąsiadujące komórki (WYLLIE i współaut. 1980) i dzięki temu nie dochodzi do stanu zapalnego. Wyróżnia się dwa podstawowe szlaki wiodące do apoptozy. Pierwszy, indukowany sygnałem z zewnątrz, tzw. „extrinsic”, związany jest z błonowymi receptorami śmierci. Drugi, przebiega z udziałem mitochondriów i zwany jest wewnętrznym, „intrinsic”. W pewnych przypadkach drogi te mogą na siebie zachodzić i wtedy dochodzi do amplifikacji sygnału pro-apoptotycznego (Ryc. 1).

Szlak zewnętrzny – „extrinsic”

Aktywacja tego szlaku rozpoczyna się od pobudzenia receptorów śmierci, należących do nadrodziny receptorów TNF (ang. tumor-necrosis factor), np. CD95, TRAIL-R1 i R-2

(ang. TNF-related apoptosis-inducing ligand-R1, R2). Cechą receptorów śmierci jest obecność wewnątrzkomórkowej domeny zwa-

nętrzną błonę mitochondrialną. To z kolei prowadzi do uwolnienia cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej (DESAGHER i współaut.



Ryc. 1. Zewnętrzny i wewnętrzny szlak prowadzący do apoptozy, z uwzględnieniem inhibitorów apoptozy (wyjaśnienie skrótów w tekście).

nej domeną śmierci (ang. death domain, DD) (KRAMMER 1999, SCHMITZ i współaut. 2000). Na skutek związania liganda dochodzi do oligomeryzacji receptora, a następnie do tworzenia kompleksu DISC (ang. death-inducing signaling complex). Kompleks ten powstaje poprzez połączenie domen śmierci z białkami adaptorowymi FADD (ang. Fas associated death domain protein) oraz z prokaspazą 8 lub 10 (MEDEMA i współaut. 1997, KISCHKEL i współaut. 2001). Konsekwencją tego jest aktywacja przez autoproteolizę prokaspazy 8, która jest bezpośrednim aktywatorem kaspazy 3 (ENARI i współaut. 1996, SCAFFIDI i współaut. 1998, STENNICKE i współaut. 1998). Rola kaspazy 10 nie do końca jest jasna i postuluje się, że może być istotna w komórkach, w których nie występuje kaspaza 8 (KISCHKEL i współaut. 2001). W niektórych komórkach, tzw. „typ I”, apoptoza przebiega tylko tym szlakiem, ale w innych, tzw. „typ II”, dochodzi do wzmocnienia sygnału za pośrednictwem mitochondriów (SCAFFIDI i współaut. 1998, FULDA i współaut. 2001). Wzmocnienie to jest związane ze zdolnością kaspazy 8 do proteolizy proapoptotycznego białka z rodziny Bcl-2, a mianowicie białka Bid, które w postaci aktywnej, tzw. tBid (ang. truncated Bid), przemieszcza się do mitochondriów i tam umożliwia innym białkom z tej samej rodziny wbudowanie się w zew-

1999, KUWANA i współaut. 1998, LUO i współaut. 1998).

Szlak wewnętrzny – „intrinsic”

Drugim szlakiem prowadzącym do apoptozy jest droga bezpośrednio związana z udziałem mitochondriów. Sygnałem do apoptozy jest w tym przypadku oddziaływanie z błoną mitochondrialną np. reaktywnych form tlenu, aczkolwiek proces ten nie do końca jest poznany. Do indukcji tego szlaku dochodzi przede wszystkim za pośrednictwem onkogenów, w czasie niedotlenienia oraz na skutek uszkodzenia DNA lub pozbawienia komórek czynników wzrostu (JOHNSTONE i współaut. 2002). Istotnym etapem jest uwolnienie cytochromu c z przestrzeni międzybłonowej poprzez specjalne kanały. Kanały te tworzone są przez proapoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 samodzielnie lub w połączeniu z białkami megakanalu (ang. permeability transition pore complex, PTPC). Białka z rodziny Bcl-2 uważane są za regulatory apoptozy związanej z wpływem cytochromu c (cyt c) (KLUCK i współaut. 1997). Wpływ cytochromu c jest sygnałem do tworzenia kompleksu nazywanego apoptosomem, w skład którego wchodzi, oprócz cytochromu c, prokaspaza 9, ATP oraz cytozolowe białko Apaf 1 (ang. apoptotic protease activating factor-1).

Utworzenie tego kompleksu jest niezbędne do oligomeryzacji, a następnie autoproteolizy prokaspazy 9, która jest bezpośrednim, aktywatorem kaspazy 3 (GREEN i REED 1998). Aktywacja drogi wewnętrznej uwrażliwia komórki na pobudzenie ligandami śmierci, czyli uruchomienie drogi zewnętrznej (JOHNSTONE i współaut. 2002). Podczas apoptozy z mitochondriów uwalniane są również białka Smac/Diablo i Omi, które są antagonistami inhibitorów apoptozy, tzn. IAP (WANG 2001) oraz inne białka ściśle związane z procesem apoptozy, a mianowicie AIF i endonukleaza G.

ROLA BIAŁEK Z RODZINY Bcl-2 W PROCESIE APOPTOZY

Białka z rodziny Bcl-2 odgrywają ważną rolę regulacyjną w procesie apoptozy (ADAMS i CORY 2001). Wykazują one dużą homologię w tzw. regionach BH1 (ang. Bcl-2 homology), BH2, BH3 i BH4, ale niektórym z nich brak jest domeny BH4. Podzielono je na dwie podrodziny: białka antyapoptotyczne (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w i Mcl-1) oraz proapoptotycznym (Bax i Bak, wykazujące homologię domen BH1, BH2 i BH3 oraz Bik, Bad, Bid, Bim, NOXA i PUMA, posiadające homologię tylko domeny BH3, tzw. „BH3 only”). Domena BH3 wydaje się być niezbędna do indukcji apoptozy. Poprzez nią wiążą się ze sobą białka pro- i antyapoptotyczne, tworząc nieaktywne w indukcji apoptozy dimery (HUANG i STRASSER 2000).

Białka proapoptotyczne działają poprzez tworzenie kanałów w błonie mitochondrialnej, przez które uwalniane są z mitochondriów inne czynniki apoptotyczne. Pokazano to przy użyciu syntetycznych błon lipidowych, w których białka te tworzyły kanały jonowe (MINN i współaut. 1997, SCHENDEL i współaut. 1997). Kanały te mogą tworzyć się przy udziale białek Bax i Bak (DEGENHARDT i współaut. 2002). Niezbędnym warunkiem do tworzenia kanałów jest oligomeryzacja tych białek oraz translokacja z cytoplazmy do błony mitochondrialnej, za co w pewnej części odpowiedzialne jest białko Bid (ANTONSSON i współaut. 2000, DESAGHER i współaut. 1999). Białko Bid powoduje zmiany konformacyjne białka Bax (i Bak), czego wynikiem jest wbudowanie się tych białek do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Wykazano, że białko Bax może wbudowywać się w zewnętrzną błonę mitochondrialną niezależnie od białka Bid (RUFFOLO i współaut. 2000). Uważa się, że Bax i Bak mogą albo tworzyć kanały

złożone z homomultimerów albo współdziałać z megakanalem prawdopodobnie poprzez oddziaływanie z jednym z jego elementów, a mianowicie z kanałem anionowym zależnym od napięcia (ang. voltage-dependent anion channel, VDAC) znajdującym się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (SHIMIZU i współaut. 1999, WEI i współaut. 2001) lub ANT (ang. adenine nucleotide translocator) mieszczącym się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (MARZO i współaut. 1998). Postuluje się, iż megakanal pełni istotną funkcję w uwalnianiu cytochromu c podczas apoptozy, a białka z rodziny Bcl-2 pełnią w tym przypadku funkcję regulacyjną (TSUJIMOTO i SHIMIZU 2000). Proapoptotyczne białko Bid prawdopodobnie nie jest w stanie samodzielnie uwolnić cytochromu c, ponieważ nie tworzy kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, i działa pośrednio poprzez białko Bax lub jego homolog Bad. Aczkolwiek wykazano, że w mitochondriach komórek wątroby myszy pozbawionych genu *bax* (*bax*^{-/-}), białko Bid jest w stanie doprowadzić do uwolnienia cytochromu c niezależnie od białka Bax (KIM i współaut. 2000). Nie łączy się ono jednak z VDAC i nie moduluje jego aktywności (SHIMIZU i TSUJIMOTO 2000). Z kolei, białka Bcl-2 i Bcl-XL są inhibitorami uwalniania cytochromu c indukowanego przez białka proapoptotyczne (ADAMS i CORY 1998, REED 1998, ROSSE i współaut. 1998) (Ryc. 2). Na przykład w komórkach nabłonkowych nowotworu piersi białko Bcl-2 (MURPHY i współaut. 1999) łączy się poprzez domenę BH3 z VDAC i przez to hamuje apoptozę z udziałem mitochondriów (SHIMIZU i współaut. 2000).

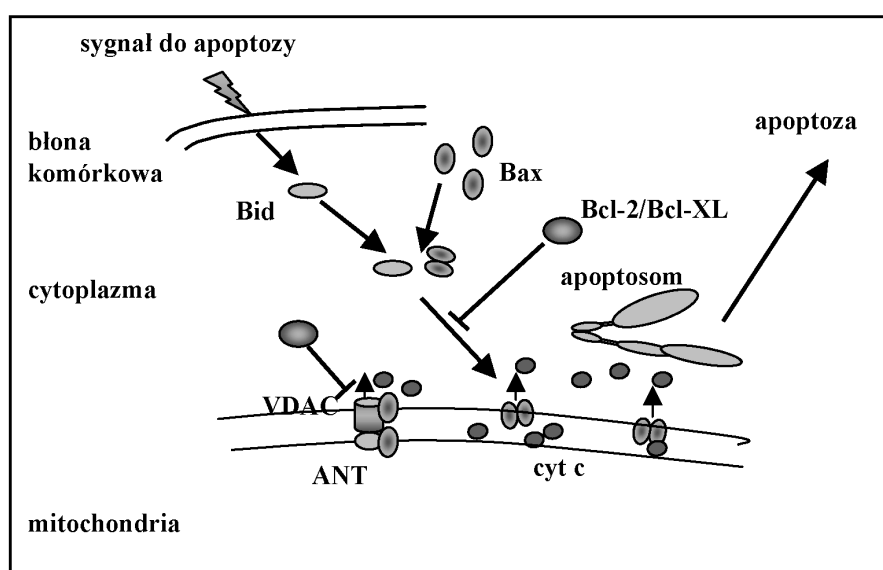
ROLA KASPAZY 3 W APOPTOZIE

Obydwa szlaki apoptozy, zarówno wewnętrzny, jak i zewnętrzny, prowadzą do aktywacji proteaz cysteinowych zwanych kaspazami, których znanych jest dzisiaj 14 (PATEL i współaut. 1996, COHEN 1997, NICHOLSON i THORNBERRY 1997, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1998). Wśród nich wyróżniamy kaspazy inicjatorowe i egzekutorowe. Wszystkie kaspazy syntetyzowane są w formie nieaktywnego zymogenu, który ulegając proteolizie oraz oligomeryzacji tworzy aktywną postać kaspazy. Kaspazy aktywowane są hierarchicznie (SLEE i współaut. 1999). Aktywacja kaspaz inicjatorowych ma miejsce w początkowej fazie apoptozy. Dochodzi do niej często przez autoproteoli-

zę. Następnie aktywowane są kolejne kaspazy aż do kaspaz efektorowych, których substratami są różne białka komórkowe (SUN i współaut. 1999). Skutkiem tego są charakterystyczne morfologiczne i biochemiczne zmiany w komórkach ulegających apoptozie. Centralną rolę w apoptozie odgrywa kaspaza 3 będąca kaspazą egzekutorową. Jej aktywację obserwuje się w przypadku apoptozy wywołanej brakiem surowicy, aktywacją receptora Fas, promieniowaniem gamma i UV oraz pod wpływem różnych substancji chemicznych (NICHOLSON i współaut. 1995, COHEN 1997). Efektem aktywacji kaspaz efek-

czasami nie obserwuje się w umierających komórkach (SCHULZE-OSTHOFF i współaut. 1994, SAKAHIRA i współaut. 1999). Ponieważ pośrednio za fragmentację DNA odpowiedzialna jest kaspaza 3, która doprowadza do aktywacji endonukleazy DFF40/CAD, zaangażowanej w hydrolizę DNA, to w przypadku braku fragmentacji DNA jedną z przyczyn może być brak aktywnej kaspazy 3.

Obecnie wyróżnia się apoptozę zależną i niezależną od kaspaz. Jest wiele przykładów apoptozy niezależnej od kaspaz. Obserwowano ją np. w limfocytach T przy użyciu inhibitorów kaspaz (BIDERE i SENIK 2001) lub indukto-



Ryc. 2. Rola antyapoptycznych i proapoptycznych białek z rodziny Bcl-2 w apoptozie (wyjaśnienie skrótów w tekście).

torowych jest proteoliza lamin jądrowych, co prowadzi do kondensacji chromatyny i obkurczenia jądra, proteoliza inhibitora DNA-zy DFF40/CAD (ang. DNA fragmentation factor 40kDa/caspase-activated deoxyribonuclease), mianowicie DFF45/ICAD, czego wynikiem jest aktywacja endonukleazy, przemieszczenie jej do jądra i fragmentacja DNA na odcinki będące wielokrotnością nukleosomów (SAKAHIRA i współaut. 1998, WIDŁAK 2000, NAGATA 2000). Również fragmentacja komórki i powstawanie ciałek apoptotycznych jest zależne od działania kaspaz i jest skutkiem proteolizy białek cytoszkieletu, takich jak aktyna, plektyna, gelsolina oraz ROCK1 (IGNEY i KRAMMER 2002).

Śmierć komórek nie zawsze przebiega z ujawnieniem wszystkich typowych cech procesu apoptozy. Do niedawna za jeden z typowych symptomów apoptozy uważano fragmentację DNA na odcinki oligonukleosomalne i ich wielokrotność, a właśnie tego zjawiska

rów omijających indukcję kaspaz (staurosporyna i przeciwciała monoklonalne anty-CD2) (DUMONT i współaut. 2000), w spontanicznej regresji komórek nerwiaka z nadekspresją H-Ras (KITANAKA i współaut. 2002) oraz w komórkach prawidłowych (proliferujących i spoczynkowych) i nowotworowych traktowanych kurkumina (BIELAK-ŻMIJEWSKA i współaut. 2000). Jednak rodzaj apoptozy nie zależy tylko od induktora apoptozy, ale również istotną rolę odgrywa rodzaj komórek. Pewne substancje, np. kurkumina lub staurosporyna, w różnych typach komórek indukują apoptozę zależną lub niezależną od kaspaz (BIELAK-ŻMIJEWSKA i współaut. 2000, BELMOKHTAR i współaut. 2001).

Czynnikiem, który może być odpowiedzialny za zmiany w jądrze komórkowym niezależnie od kaspaz, jest flawoproteina AIF (ang. apoptosis-inducing factor) (CANDE i współaut. 2002, JOZA i współaut. 2001). Białko to znajdu-

je się w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów, a po indukcji apoptozy wydostaje się z mitochondriów i przedostaje do jądra i tam może wywołać kondensację chromatyny i wielkocząsteczkową (50–300 kbp) fragmentację DNA. Wykazano, że inhibitory kaspaz nie były w stanie zahamować działania czynnika AIF, co przemawia za jego niezależną od kaspaz drogą działania. Można znaleźć też dane na temat innych białek, które mogą odgrywać istotną rolę w apoptozie niezależnej od kaspaz. Są to np. (i) kalpajny, będące proteazami cysteinowymi zależnymi od wapnia, których aktywację obserwowano np. w komórkach nowotworu piersi, MCF-7, na skutek działania

związków podwyższających poziom wapnia w komórce (WOLF i współaut. 1999), (ii) katepsyny (DEISS i współaut. 1996) oraz (iii) proteazy serynowe np. Omi. Białko Omi uwalniane jest z mitochondriów podczas apoptozy, której towarzyszy proteoliza białka Bid. Oddziałuje ono z inhibitorem kaspaz XIAP, w wyniku czego dochodzi do aktywacji kaspaz (VAN LOO i współaut. 2002). Również endonukleaza G, białko mitochondrialne uwalniane podczas apoptozy i ulegające translokacji do jądra, jest zaangażowana w niezależną od kaspaz degradację DNA (VAN LOO i współaut. 2001, LI i współaut. 2001).

MECHANIZMY OPORNOŚCI KOMÓREK

Komórki nowotworowe posiadają wiele mechanizmów, które zabezpieczają je przed apoptozą, czego skutkiem jest oporność na czynniki indukujące śmierć. Ma to przełożenie na niedostateczną skuteczność terapii przeciwnowotworowej (Tabela 1).

mysie komórki wątroby pozbawione ekspresji białka Bid (bid^{-/-}) są odporne na apoptozę indukowaną przez receptor Fas (YIN i współaut. 1999).

Inhibitory apoptozy

NADEKSPRESJA BIAŁEK ANTYAPOPTOTYCZNYCH I INAKTYWACJA PROAPOPTOTYCZNYCH

Częstą przyczyną braku wrażliwości na chemo- lub radioterapię jest nadekspresja białek o właściwościach antyapoptotycznych, takich jak białka z rodziny Bcl-2, czy też inhibitorów apoptozy lub/i obniżenie ekspresji białek proapoptotycznych należących do rodziny Bcl-2.

Białka z rodziny Bcl-2

W komórkach nowotworowych często dochodzi do zwiększenia poziomu antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, mianowicie Bcl-2 i Bcl-XL (LIU i współaut. 1999). Nadekspresja Bcl-2 hamuje apoptozę związaną z pobudzeniem receptora TRAIL w komórkach nerwiaków i glejaków (FULDA i współaut. 2002).

W wielu typach nowotworów obserwuje się również inaktywację białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2. Często jest to związane z mutacjami w genie białka BAX (MEIJERINK i współaut. 1998), w szczególności dotyczy to mutacji w obrębie domeny BH3. Ekspresję białka BAX reguluje produkt genu *p53*, którego mutacje występują w wielu nowotworach. Zaobserwowano również, że mutacja w genie kodującym białko Bak ma miejsce w nowotworach okrężnicy (KONDO i współaut. 2000), a

Kolejnym ważnym elementem obrony komórki nowotworowej przed śmiercią jest wzrost ekspresji inhibitorów apoptozy, tj. IAP (ang. inhibitor of apoptosis protein) i FLIP [ang. FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme-like protease (FLICE/caspase-8)-inhibitory protein] (patrz Ryc. 1).

Białka IAP (znanych jest 8 ludzkich), do których należą np. NAIP (ang. neuronal apoptosis inhibitor protein), XIAP (ang. X-linked IAP), surwiwina (w komórkach nowotworowych obserwuje się bardzo wysoki poziom tego białka w porównaniu z komórkami pierwotnymi) oraz c-IAP-1 i c-IAP-2, pełnią różne funkcje w komórce, zarówno w czasie podziału, jak również w apoptozie indukowanej wieloma związkami, również czynnikami przeciwnowotworowymi (DEVERAUX i REED 1999, DEVERAUX i współaut. 1999, GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1999). Większość z nich posiada zdolność bezpośredniego wiązania i hamowania aktywacji kaspazy 3 i 7, zapobiegając ich proteolizie. Zapobiegają również aktywacji inicjatorowej kaspazy 9 (ROY i współaut. 1997). Białka IAP mogą również działać jako ligazy ubikwitynowe przyczyniając się w ten sposób do degradacji kaspaz (SUZUKI i współaut. 2001).

Sugerowany jest jeszcze inny mechanizm hamowania apoptozy, niezależny bezpośred-

nio od kaspaz. Wykazano mianowicie, że c-IAP-1 i c-IAP-2 mogą wiązać się z TRAF1 i TRAF2 (ang. TNF receptor associated factor 1, 2) i w ten sposób hamować apoptozę na poziomie receptorów błonowych, czego wynikiem jest brak proteolizy prokaspazy 8 (WANG i współaut. 1998). Najlepiej poznanym białkiem inhibitorowym jest XIAP, który posiada zdolność do bezpośredniego blokowania kaspaz (DEVERAUX i współaut. 1997). Bardzo często

nowotworu (FONG i współaut. 2000). Ekspresję c-IAP2 i XIAP reguluje czynnik transkrypcyjny NF κ B, który w odpowiedzi na stres komórkowy indukuje ekspresję licznych genów antyapoptotycznych (CHU i współaut. 1997). Poznano również inhibitory, które podczas apoptozy są uwalniane z mitochondriów i mogą bezpośrednio oddziaływać z białkami IAP. Należą do nich Smac/Diablo (LIU i współaut. 2000, WU i współaut. 2000), zapobiegający hamowaniu

Tabela 1. Rola inicjatorów, regulatorów i egzekutorów apoptozy w oporności komórek na apoptozę (IGNEY i KRAMMER 2002, JOHNSTONE i współaut. 2002)

	Białko	Częstość występowania zmian lub rodzaj nowotworu	Funkcja
Supresory nowotworu (mutacje, brak lub zmniejszona ekspresja)	p53	•••	indukcja apoptozy na drodze wewnętrznej i zewnętrznej
	ARF	••	hamuje zależną od MDM2 degradację p53
	Bax, Bak	•	białka antyapoptotyczne
	PTEN	••	negatywny regulator kinazy IP3 a przez to i kinazy Akt
	Apaf-1	czerniaki, białaczki	niezbędny do aktywacji kaspazy 9
	CD95	białaczki, nowotwory w postaci litych guzów	inicjator drogi zewnętrznej
	TRAIL-R1/R2	przerzutujące nowotwory piersi	inicjator drogi zewnętrznej
	kaspaza 8	nerwiaki	pośrednik drogi zewnętrznej
Onkogeny (nadekspresja)	Bcl-2, Bcl-XL	•••	białka proapoptotyczne
	MDM2	•	negatywny regulator p53
	IAP	•••	inhibitor kaspaz
	NF κ B	••	aktywator ekspresji antyapoptotycznych białek Bcl-2 i IAP, induktor proliferacji, zaangażowany w drogę wewnętrzną i zewnętrzną
	Akt	nowotwory w postaci litych guzów •••	indukuje NF κ B i proliferację, hamuje aktywność czynników transkrypcyjnych z rodziny Forkhead, fosforyluje białko Bad, hamując jego proapoptotyczne działanie
	Kinaza IP3	•	aktywator kinazy Akt
	Ras	•••	aktywator kinazy IP3 i induktor proliferacji
	FLIP	•	hamuje aktywność kaspazy 8

- - bardzo często
- - często
- - czasem

obserwuje się jego wysoką ekspresję w ostrych białaczkach szpiczakowych (TAMM i współaut. 2000). W komórkach wielu typów ludzkich nowotworów obserwuje się obniżenie poziomu negatywnego regulatora XIAP, a mianowicie XAF1, uważnego za produkt genu supresora

aktywacji kaspazy 3 i 9, oraz Omi, proteaza oddziałująca z XIAP, związana z indukcją apoptozy (VAN LOO i współaut. 2002, VERHAGEN i współaut. 2002). Białka IAP, a w szczególności XIAP, mogą hamować wzrost nowotworu na drodze innej niż inaktywacja kaspaz, np. po-

przez zahamowanie cyklu komórkowego (SILKE i współaut. 2002).

Białka FLIP biorą udział w hamowaniu inicjacji apoptozy na poziomie receptorów śmierci (KRUEGER i współaut. 2001). Wykazują one dużą homologię do prokaspazy 8 i posiadają zdolność łączenia się z kompleksem DISC, a konkretnie z białkiem adaptorowym FADD, nie dopuszczając tym samym do proteolizy prokaspazy 8. Zwiększona ilość białek inhibitorowych powoduje zmniejszoną wrażliwość komórek na apoptozę (IRMLER i współaut. 1997).

ROLA BIAŁKA p53 W APOPTOZIE

Ważną rolę w niekontrolowanej proliferacji, jak i oporności na apoptozę w komórkach nowotworowych odgrywają mutacje genu *p53*, zaliczanego do genów supresorów nowotworu, prowadzące do zmian funkcjonalnych białka (ATTARDI i JACKS 1999). Produkt białkowy tego genu uważany jest za „strażnika” genomu. Decyduje on o tym, czy komórka zatrzyma podziały, aby naprawić uszkodzenia, czy też uruchamia program apoptozy. Białko *p53* działa jako nadrzędny regulator programu apoptotycznego i koordynuje ten proces na różnych poziomach. Podczas apoptozy dochodzi, poprzez oligomeryzację i fosforylację, do aktywacji *p53*, który jako czynnik transkrypcyjny jest odpowiedzialny za ekspresję białek proapoptotycznych (GOTLIEB i OREN 1998, VOUSDEN 2000, MOLL i ZAIKA 2001) związanych z drogą mitochondrialną, np. Bax, Bak, NOXA, PUMA (ODA i współaut. 2000, MIYASHITA i REED 1995, NAKANO i VOUSDEN 2001), oraz związanych z drogą od receptorów śmierci, tj. CD95, TRAIL-R1 i TRAIL-R2 (MULLER i współaut. 1998, HERR i DEBATIN 2001, RYAN i współaut. 2001). Skutkiem fosforylacji *p53* jest przyłączenie izomerazy Pin1, która zmieniając konformację białka odpowiada za odłączenie ligazy MDM2 i co za tym idzie brak ubikwitynacji i stabilizację *p53*. Pin1 jest niezbędny do zatrzymania cyklu komórkowego, czyli do funkcjonowania *p53* jako czynnika transkrypcyjnego (ZACCHI i współaut. 2002, ZHENG i współaut. 2002). Aktywacja *p53* ma miejsce w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, aktywację onkogenów, niedotlenienie, skracanie telomerów, brak czynników wzrostu i sygnałów do przeżycia. Mutacje w tym genie obserwuje się w 50% różnych nowotworów, a u osób zdrowych mogą one służyć jako marker zwiększonego ryzyka wystąpienia choroby no-

wotworowej. Brak funkcjonalnego *p53* powoduje utratę zdolności komórki do apoptozy z jego udziałem oraz rozwój nowotworu, jak to wykazano np. u myszy transgenicznych (ATTARDI i JACKS 1999). Białko *p53* hamuje ekspresję Bcl-2, Bcl-XL oraz IAP (surwiwina), cFLIP (BARTKE i współaut. 2001, RYAN i współaut. 2001, HOFFMAN i współaut. 2002) i aktywuje geny białek PTEN i Apaf 1 (STAMBOLIC i współaut. 2001, MORONI i współaut. 2001). *p53* może również działać niezależnie od aktywacji transkrypcji (RYAN i współaut. 2001). Białko to bierze udział w przemieszczaniu receptorów śmierci na powierzchnię komórki, bezpośrednio działa w mitochondriach oraz reguluje translację.

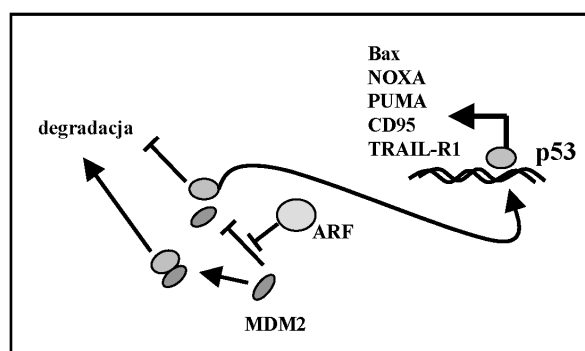
Nieprawidłowe funkcjonowanie *p53* nie musi być zawsze związane z mutacją w genie. Często wynika z amplifikacji ligazy ubikwitynowej MDM2 odpowiedzialnej za degradację *p53* w proteasomie. W przypadku braku inhibitora MDM2, jakim jest czynnik ARF, dochodzi do nadmiernej degradacji *p53* i w związku z tym nie może on pełnić swojej funkcji regulatorowej (SHERR i WEBER 2000, LOWE i LIN 2000). Zaobserwowano również, że w przypadku nadekspresji inhibitorów białka ARF, jakimi są Twist i Dermo1 (MAESTRO i współaut. 1999) lub TBX2 (JACOBS i współaut. 2000), dochodziło do transformacji nowotworowej i rozwoju nowotworu. Amplifikację inhibitora ARF obserwowano np. w ludzkich komórkach nowotworowych piersi (JACOBS i współaut. 2000). *p53* wpływa na wzrost ekspresji MDM2. Gdy wzrasta poziom *p53*, wzrasta MDM2, co przyczynia się do zwiększonej degradacji *p53* (sprężenie zwrotne ujemne) (Ryc. 3).

Istotną rolę w funkcji transaktywacyjnej *p53* odgrywa transport do i z jądra (VOUSDEN i WOUDE 2000), zależny od oddziaływań sieci mikrotubul i dyneiny (do jądra) oraz MDM2 (z jądra) (GEYER i współaut. 2000).

SZLAKI PROŻYCIOWE

W wielu komórkach nowotworowych dochodzi do nadekspresji białek związanych z tzw. szlakami prożyciowymi. W związku z tym, pod wpływem czynników apoptogennych, sygnał odpowiedzialny za przeżycie komórki jest silniejszy od sygnału do śmierci. Kaskada sygnałowa zdolna wzmocnić przeżycie komórek (wspierająca drogę prożyciową) może potencjalnie podnosić oporność na apoptozę indukowaną lekami.

Przykładem może tu być szlak prożyciowy związany z kinazą Akt/PKB. Jest to kinaza białkowa, której efektem działania jest zahamowanie apoptozy, zwiększenie proliferacji np. poprzez indukcję czynnika transkrypcyjnego NFκB (uznawanego za czynnik zwiększający przeżycie komórek), co prowadzi do ekspresji genów antyapoptotycznych. Kinaza ta do swojej aktywacji wymaga fosforylacji przez kinazę PI3. W komórkach nowotworowych często obserwuje się zwiększoną aktywność kinazy PI3 lub kinazy Akt (SHAYESTEH i współaut. 1999, ROYMANS i SLEGGERS 2001). Z kolei działanie kinazy PI3 może być antagonizowane przez fos-



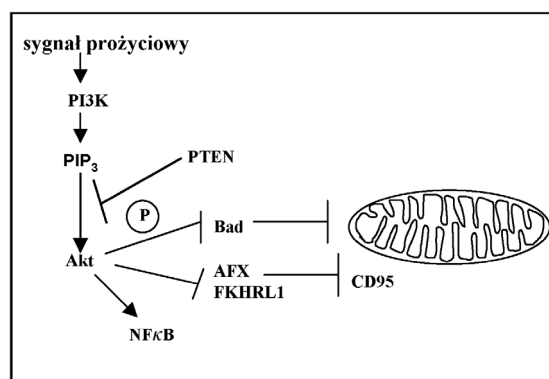
Ryc. 3. Regulacja aktywności transkrypcyjnej białka p53 (wyjaśnienie skrótów w tekście).

Degradacja p53 odbywa się w proteasomie 26S, a kluczową rolę odgrywa ubikwitynacja przez białko MDM2. Czynniki ARF zapobiega wiązaniu MDM2 do p53, a tym samym zapobiega jego degradacji. Zwiększona ekspresja MDM2 lub brak inhibitora, jakim jest ARF, prowadzi do nadmiernej degradacji p53, co uniemożliwia jego działanie jako czynnika transkrypcyjnego i „strażnika genomu”.

fatazę lipidową PTEN (będącą produktem genu supresora nowotworu), która defosforyluje fosfolipidy inozytoli (DI CRISTOFANO i PANDOLFI 2000). Mutacje w genie, którego produktem jest białko PTEN, mogą więc doprowadzić do tego, iż ten szlak prożyciowy jest cały czas aktywny. Wykazano także, że kinaza Akt hamuje, na drodze fosforylacji, białko Bad i aktywację kaspazy 9 (CARDONE i współaut. 1998) oraz jest negatywnym regulatorem czynników transkrypcyjnych z rodziny Forkhead (AFX i FKHL1), które mogą indukować ekspresję genów proapoptotycznych białek takich jak CD95L. Kinaza Akt hamuje również wpływ cytochromu c w sposób niezależny od fosforylacji Bad (KENNEDY i współaut. 1999) (Ryc. 4).

Inną drogą prożyciową jest szlak z udziałem białka Ras należącego do rodziny białek G. Jego

aktywacja może decydować o przeżyciu lub apoptozie. Mutacje w genie białka Ras są najczęstszymi zmianami w przypadku białaczek. W około 30% przypadków występuje zmutowana postać białka Ras. Ale nie tylko bezpośrednia mutacja genu *ras* prowadzi do zaburzenia przekazywania sygnału na tej drodze. Również elementy regulatorowe podlegają zmianom, w wyniku czego może dojść do nadekspresji receptorów czynników wzrostu, czy nadmiernej produkcji cytokin, np. interleukiny 1β. Wszystko to prowadzi do zmian w szlaku związanym z Ras. Białko Ras jest również regulatorem białek: Bcl-2 i Bcl-XL. Zwiększa ich poziom w komórkach, a nadekspresja Bcl-2 jest prawdopodobnie jednym z głównych mechanizmów wynikających z działania białka Ras (O’GORMAN i COOTTER 2001).



Ryc. 4. Szlak prożyciowy z udziałem kinazy Akt (wyjaśnienie skrótów w tekście).

Niezbędnym warunkiem aktywacji kinazy Akt jest fosforylacja przez kinazę PI3 fosfolipidów inozytoli (PIP₃). Z kolei kinaza PI3 może być antagonizowana przez białko PTEN, które defosforyluje fosfolipidy inozytoli. Gdy w komórce dochodzi do nadekspresji kinazy PI3 lub Akt albo ekspresja inhibitora PTEN jest obniżona komórka otrzymuje ciągły sygnał do przeżycia. Kinaza Akt jest nie tylko induktorem proliferacji, ale jest również inhibitorem białek o funkcji proapoptotycznej.

INNE MECHANIZMY WARUNKUJĄCE OPORNOŚĆ KOMÓREK NOWOTWOROWYCH NA APOPTOZĘ

Ważną rolę w przeciwdziałaniu apoptozie przypisuje się także białkom szoku cieplnego Hsp (ang. heat shock protein). Ich podwyższony poziom występuje często w komórkach lekoopornych. Są to białka wysoce konserwatywne. Najbardziej istotne w procesie hamowania apoptozy wydają się być Hsp70 i Hsp27. Są one uważane za negatywne regulatory apoptozy. Wykazano, że komórki poddane stresowi termicznemu, pod wpływem którego docho-

dziło do indukcji białek Hsp27 i Hsp70, lub komórki transfekowane genem Hsp70, były odporne na apoptozę indukowaną aktywnym, etopozydem, doksorubicyną, cisplatyną czy promieniowaniem UVC (SAMALI i COOTTER 1996, BEERE i GREEN 2001). Wykazano, że białko Hsp 70 w mitochondriach występuje w kompleksie z prokaspazą 3, uniemożliwiając tym samym jej aktywację. Białka te mogą działać w wielu różnych miejscach szlaków sygnałowych. Wykazano, że hamują kinazy JNK, zapobiegają tworzeniu się apoptosomu uniemożliwiając połączenie się cytochromu c z pozostałymi składnikami apoptosomu, nie dopuszczają również do proteolizy prokaspazy 9. Wykazano również, że Hsp 70 neutralizuje działanie czynnika AIF, który jest odpowiedzialny za apoptozę niezależną od kaspaz (RAVAGNAN i współaut. 2001).

Oporność wielolekowa jest kolejnym mechanizmem odpowiedzialnym za oporność komórek nowotworowych na apoptozę. Jest ona związana z obecnością transporterów błonowych należących do rodziny białek ABC (ang. ATP-binding cassette), będących pompami zależnymi od ATP. Transportery te są odpowiedzialne za usuwanie z komórki różnego rodzaju toksyn i co za tym idzie, za fenotyp oporności wielolekowej. Problem lekooporności pojawia się podczas radio- i chemioterapii stosowanej w leczeniu nowotworów. Komórki pod wpływem naświetlania lub leków mogą nabywać fenotyp oporności wielolekowej, tzn. może w nich dochodzić do wzrostu ekspresji białek transporterowych lub do selekcji komórek z nadekspresją spontaniczną. Komórki takie bardzo trudno jest wyeliminować z organizmu. Pompy zależne od ATP występują nie tylko w komórkach nowotworowych. Bardzo często obserwuje się je w komórkach prawidłowych. Funkcją ich jest obrona przed cytotoksycznym działaniem związków oraz dostosowanie komórek do zmian środowiska. Występują licznie w komórkach nerki, wątroby, nadnercza oraz w komórkach linii hematopoetycznej (JOHNSTONE i współaut. 1999). mRNA białek transporterów błonowych można znaleźć prawie we wszystkich tkankach. Wykazano, że podniesienie poziomu białka P-gp chroni komórki proksymalnych kanalików nerkowych przed apoptozą indukowaną przez kadm oraz reaktywne formy tlenu (THEVENOD i współaut. 2000).

Funkcje transporterów pełni białko: glikoproteina P (P-gp), produkt genu *MDR1*, oraz

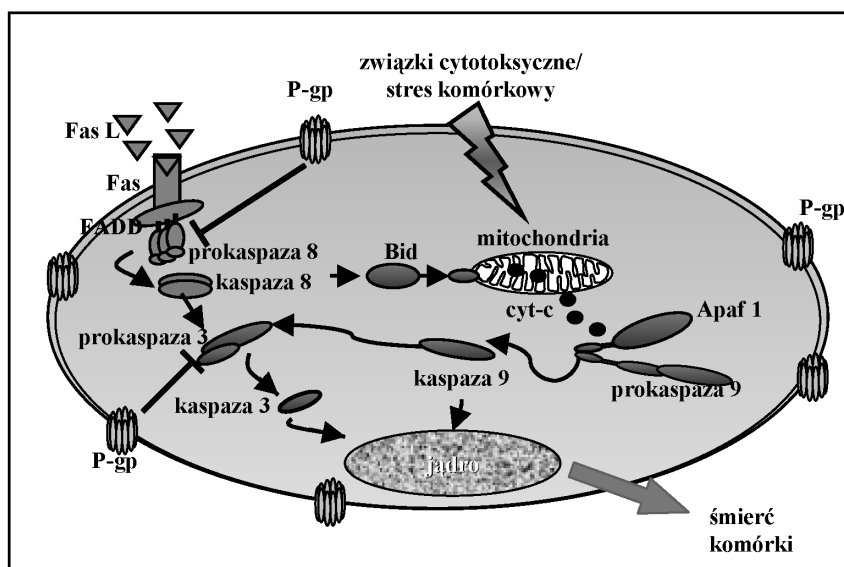
MRP, produkt genu *MRP*. Białka te różnią się sposobem usuwania leków z komórki oraz specyficznością substratów. Białko P-gp usuwa z komórki cytotoksyny w postaci niezwiązanej, natomiast MRP - w postaci koniugatów z glutationem. Wiele danych przemawia za tym, iż transportery błonowe są zaangażowane nie tylko w usuwanie leków z komórki, ale zabezpieczają ją również przed śmiercią z udziałem kaspazy 3 i 8 pod wpływem czynników niebędących substratami pompy (JOHNSTONE i współaut. 1999, 2000). Wykazano, że promieniowanie UV i gamma, brak w pożywce surowicy, jak również aktywacja receptora Fas przez FasL nie są w stanie wyindukować apoptozy z udziałem kaspaz (Ryc. 5). Komórki takie umierają, ale na drodze niezależnej od kaspaz. Wykazano, że obecność P-gp w błonie komórkowej zapobiega apoptozie w komórkach HeLa i NIH 3T3, indukowanej promieniowaniem jonizującym (RUTH i RONINSON 2000). Postuluje się jednak, że P-gp nie odgrywa głównej roli w ochronie przed apoptozą, gdyż inhibitor P-gp, jakim jest werapamil, tylko częściowo odwraca oporność na doksorubicynę w komórkach HL-60 (NOTARBARTOLO i współaut. 2002). W komórkach HL-60 opornych na doksorubicynę obserwowano wzrost poziomu mRNA białek IAP. Możliwe, że podniesiony poziom białek IAP, będących inhibitorami apoptozy, również wpływa na brak aktywnej kaspazy 3. Zaobserwowano, że w komórkach, w których wyindukowano lekooporność, dochodzi do spadku ekspresji receptora Fas (NOTARBARTOLO i współaut. 2002), czego skutkiem może być brak aktywacji kaspaz (Ryc. 5).

Nie wiadomo, jaki jest mechanizm obrony komórek posiadających transportery błonowe przed apoptozą wywoływaną związkami niebędącymi substratami pompy. Sugeruje się, iż może to być związane z wypompowywaniem jakiegoś ważnego pośrednika apoptozy lub wpływu P-gp na wewnątrzkomórkowe pH (SMYTH i współaut. 1998, JOHNSTONE i współaut. 1999).

Poznano również wiele innych mechanizmów oporności komórek na apoptozę, choć występujących z mniejszą częstotliwością niż wymienione powyżej, ale o których warto tutaj wspomnieć. W czerniakach obserwowano np. brak ekspresji składnika apoptosomu, a mianowicie Apaf1 (SOENGAS i współaut. 2001), a w komórkach nerwiaka, w wyniku amplifikacji onkogenu N-Myc, dochodziło do inaktywacji kaspazy 8 (TAKITA i współaut. 2000, TEITZ i

współaut. 2000). Oporność na chemoterapię związana z kaspazą 8 może wynikać z obniżonej ekspresji samej kaspazy lub podwyższonej ekspresji inhibitora FLIP (KIM i współaut. 2001). Często przyczyną oporności komórek na apoptozę jest inaktywacja lub spadek eks-

powiedniej terapii. W celu uzyskania najlepszego efektu należałoby dobrze scharakteryzować rodzaj zmian w poszczególnych przypadkach chorób nowotworowych i użyć związków, które uruchamiają apoptozę omijając szlaki z uszkodzonymi elementami maszy-



Ryc. 5. Blokada szlaku apoptozy zależnej od kaspazy w komórkach z nadekspresją P-gp (wyjaśnienie skrótów w tekście) (wg JOHNSTONE i współaut. 2000, zmodyfikowana).

presji receptorów śmierci, np. CD95 (STRAND i współaut. 1996) lub TRAIL-R1 i TRAIL-R2 (LEE i współaut. 1999, SHIN i współaut. 2001). Wymienione wyżej mechanizmy obrony komórek nowotworowych przed śmiercią mogą współwystępować. Efekt ich może się sumować lub uzupełniać. Wykazano, że w komórkach HL-60, w których wyindukowano lekooporność, wzrasta również poziom białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-XL przy niezmiennym poziomie białka BAX (HUANG i współaut. 1997), a w komórkach HL-60 opornych na dokсорubicynę dodatkowo obserwuje się podwyższony poziom białek z rodziny IAP (NOTARBARTOLO i współaut. 2002).

Poznanie mechanizmów oporności komórek na apoptozę stanowi klucz do doboru od-

nerii apoptotycznej. Wiedząc na przykład, że komórki nowotworowe posiadają zmutowany gen białka p53, należałoby wykluczyć leki wywołujące apoptozę poprzez uszkodzenia DNA. Wiele nadziei pokłada się w związkach pochodzenia naturalnego. Mogą one stanowić cenne uzupełnienie konwencjonalnej terapii lub same w sobie posiadać właściwości przeciwnowotworowe. Jednym z takich naturalnych związków cieszącym się dużym zainteresowaniem jest kurkumina, barwnik izolowany z kłączy ostryżu długiego (*Curcuma longa*), o właściwościach przeciwzapalnych, antyoksydacyjnych i przeciwnowotworowych. Więcej informacji na temat kurkuminy postaram się przedstawić Państwu w jednym z najbliższych numerów KOSMOSU.

THE MECHANISM OF RESISTANCE TO APOPTOSIS IN TUMOR CELLS

S u m m a r y

A most normal cell can die by apoptosis but tumor cells very often have some defects in the apoptotic pathway, leading not only to the increase of tumor mass but also to tumor resistance to chemotherapy. Since chemotherapy and irradiation act primarily by inducing apoptosis, defects in the apoptotic pathway make the therapy less efficient.

Generally, there are two pathways of apoptosis. One – mediated by the cell surface death receptors – the extrinsic pathway, the other mediated by the mitochondria – intrinsic pathway. The common element in those two ways is activation of caspase 3. However, in some cases we can observe cell death without activation of this enzyme. One of the often occurring

mechanism of resistance to apoptosis is overexpression of the Bcl-2 family antiapoptotic proteins like Bcl-2 and Bcl-XL, or lower expression of proapoptotic proteins like Bax, Bid, Bad. Another mechanism observed in tumor cells is overexpression of apoptosis inhibitors namely IAPs and FLIP. They play an important role in degradation or inactivation of executor caspases and protect cells from apoptosis. A key element in stress-induced apoptosis is p53 protein which can induce the expression of proteins involved in the mitochondrial apoptotic pathway. Mutations in p53 are common in many tumors and affect their ability to undergo cell death. In many tumor cells also the survival signal is stronger than usually and induction of apoptosis is more difficult. One of survival pathways is connected with the

PI3K/Akt signalling pathway. Also cells with high expression of Hsp70 protein are protected from apoptosis, especially that leading through mitochondria. Cells with MDR (multidrug resistance) phenotype, expressing proteins from the ABC superfamily on cell surface, are able to exclude many of the drugs (including anticancer drugs) from cytoplasm. There are some evidences that cell possessing membrane transporters are resistant to that form of apoptosis connected with activation of caspase 3. The knowledge of the molecular mechanisms of tumor resistance to apoptosis can improve cancer therapy through resensitization of tumor cells.

LITERATURA

- ADAMS J. M., CORY S., 1998. *The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival*. Science 281, 1322-1326.
- ADAMS J. M., CORY S., 2001. *Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family*. Trends Biochem. Sci. 26, 61-66.
- ANTONSSON B., MONTESSIUT S., LAUPER S., ESKEs R., MATRINOu J. C., 2000. *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria*. Biochem. J. 345, 271-278.
- ATTARDI L. D., JACKS T., 1999. *The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models*. Cell. Mol. Life Sci. 55, 48-63.
- BARTKE T., SIEGMUND D., PETERS N., REICHWEIN M., HEINKLER F., SCHEURICH P., WAJANT H., 2001. *p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells*. Oncogene 20, 571-580.
- BEERE H. M., GREEN D.R., 2001. *Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis*. Trends Cell. Biol. 11, 6-10.
- BELMOKHTAR C. A., HILLION J., SEGAL-BENDIRDJIAN E., 2001. *Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms*. Oncogene 20, 3354-3362.
- BIDERE N., SENIK A., 2001. *Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview*. Apoptosis 6, 371-375.
- BIELAK-ŻMIJEWSKA A., KORONKIEWICZ M., SKIERSKI J., PIWOCKA K., RADZISZEWSKA E., SIKORA E., 2000. *Effect of curcumin on the apoptosis of rodent and human nonproliferating and proliferating lymphoid cells*. Nutr. Cancer 38, 131-138.
- CANDE C., COHEN I., DAUGAS E., RAVAGNAN L., LAROCLETTE N., ZAMZAMI N., KROEMER G., 2002. *Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria*. Biochimie 84, 215-222.
- CARDONE M. H., ROY N., STENNICKE H. R., SALVESEN G. S., FRANKE T. F., STANBRIDGE E., FRISCH S. i współaut., 1998. *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science 282, 1318-1321.
- CHU Z. L., MCKINSEY T. A., LIU L., GENTRY J.J., MALIM M. H., BALLARD D. W., 1997. *Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 94, 10057-10062.
- COHEN G M., 1997. *Caspases: the executioners of apoptosis*. Biochem. J. 326, 1-16.
- DEGENHARDT K., SUNDARARAJAN R., LINDSTEN T., THOMPSON C., WHITE E., 2002. *Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria*. J. Biol. Chem. 277, 14127-14134.
- DEISS L. P., GALINKA H., BERISSI H., COHEN O., KIMCHI A., 1996. *Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha*. EMBO J. 15, 3861-3870.
- DESAGHER S., OSEN-SAND A., NICHOLS A., ESKEs R., MONTESSIUT S., LAUPER S., MAUNDREL K., i współaut., 1999. *Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis*. J. Cell. Biol. 144, 891-901.
- DEVERAUX Q. L., REED J. C., 1999. *IAP family protein-suppressors of apoptosis*. Genes Dev. 13, 239-252.
- DEVERAUX Q. L., STENNICKE H. R., SALVESEN G. S., REED J. C., 1999. *Endogenous inhibitors of caspases*. J. Clin. Immunol. 19, 388-398.
- DEVERAUX Q. L., TAKAHASHI R., SALVESEN G. S., REED J. C., 1997. *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature 388, 300-304.
- DI CRISTOFANO A., PANDOLFI P. P., 2000. *The multiple roles of PTEN in tumor suppression*. Cell 100, 387-390.
- DUMONT C., DURRBACH A., BIDERE N., ROULEAU M., KROEMER G., BERNARD G., HIRSCH F. i współaut., 2000. *Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult*. Blood 96, 1030-1038.
- ENARI M., TALANIAN R. V., WONG W. W., NAGATA S., 1996. *Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis*. Nature 380, 723-726.

- FONG W. G., LISTON P., RAJCAN-SEPAROVIC E., ST JEAN M., CRAIG C., KORNEŁUK R. G., 2000. *Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines*. Genomics 70, 113–122.
- FULDA S., MEYER E., DEBATIN K. M., 2002. *Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression*. Oncogene 21, 2283–2294.
- FULDA S., MEYER E., FRIESEN C., SUSIN S. A., KROEMER G., DEBATIN K. M., 2001. *Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis*. Oncogene 20, 1063–1075.
- GEYER R. K., YU Z. K., MAKI C. G., 2000. *The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export*. Nat. Cell. Biol. 2, 569–573.
- GOTTLIEB T. M., OREN M., 1998. *p53 and apoptosis*. Semin. Cancer Biol. 8, 359–368.
- GREEN D. R., REED J. C., 1998. *Mitochondria and apoptosis*. Science 281, 1309–1312.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1998. *Molecular mechanisms of apoptosis induced by activation of membrane receptors from the TNF-R superfamily*. Postepy Biochem. 44, 8–21.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1999. *Participation of viral and cellular IAP proteins in regulation of apoptosis and cell survival*. Postepy Biochem. 45, 167–176.
- HANAHAN D., WEINBERG R. A., 2000. *The hallmarks of cancer*. Cell 100, 57–70.
- HERR I., DEBATIN D. K. M., 2001. *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy*. Blood 98, 2603–2614.
- HICKMAN J. A., 1996. *Apoptosis and chemotherapy resistance*. Eur. J. Cancer 32A, 921–926.
- HOFFMAN W. H., BIADÉ S., ZILFOU J. T., CHEN J., MURPHY M., 2002. *Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53*. J. Biol. Chem. 277, 3247–3257.
- HUANG D. C., STRASSER A., 2000. *BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death*. Cell 103, 839–842.
- HUANG Y., IBRADO A. M., REED J. C., BULLOCK G., RAY S., TANG C., BHALLA K., 1997. *Co-expression of several molecular mechanisms of multidrug resistance and their significance for paclitaxel cytotoxicity in human AML HL-60 cells*. Leukemia 11, 253–257.
- IGNEY F. H., KRAMMER P. H., 2002. *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat. Rev. Cancer 2, 277–288.
- IRMLER M., THOME M., HAHNE M., SCHNEIDER P., HOFMANN K., STEINER V., BODMER J. L. i współaut., 1997. *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature 388, 190–195.
- JACOBS J. J., KEBLUSEK P., ROBANUS-MAANDAG E., KRISTEL P., LINGBEEK M., NEDERLOF P. M., VAN WELSEM T. i współaut., 2000. *Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers*. Nat. Genet. 26, 291–299.
- JOHNSTONE R. W., CRETNEY E., SMYTH M. J., 1999. *P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death*. Blood 93, 1075–1085.
- JOHNSTONE R. W., RUEFLI A. A., LOWE S. W., 2002. *Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy*. Cell 108, 153–164.
- JOHNSTONE R. W., RUEFLI A. A., TAINTON K. M., SMYTH M. J., 2000. *A role for P-glycoprotein in regulating cell death*. Leuk. Lymphoma 38, 1–11.
- JOZA N., SUSIN S. A., DAUGAS E., STANFORD W. L., CHO S. K., LI C. Y., SASAKI T. i współaut., 2001. *Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death*. Nature 410, 549–554.
- KENNEDY S. G., KANDEL E. S., CROSS T. K., HAY N., 1999. *Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria*. Mol. Cell. Biol. 19, 5800–5810.
- KIM M. S., KANG H. J., MOON A., 2001. *Inhibition of invasion and induction of apoptosis by curcumin in H-ras-transformed MCF10A human breast epithelial cells*. Arch. Pharm. Res. 24, 349–354.
- KIM T. H., ZHAO Y., BARBER M. J., KUHARSKY D. K., YIN X. M., 2000. *Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax*. J. Biol. Chem. 275, 39474–39481.
- KISCHKE F. C., LAWRENCE D. A., TINEL A., LEBLANC H., VIRMANI A., SCHOW P., GAZDAR A. i współaut., 2001. *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J. Biol. Chem. 276, 46639–46646.
- KITANAKA C., KATO K., IJIRI R., SAKURADA K., TOMIYAMA A., NOGUCHI K., NAGASHIMA Y. i współaut., 2002. *Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression*. J. Natl. Cancer Inst. 94, 358–368.
- KLUCK R. M., BOSSY-WETZEL E., GREEN D. R., NEWMYER D. D., 1997. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. Science 275, 1132–1136.
- KONDO S., SHINOMURA Y., MIYAZAKI Y., KIYOHARA T., TSUTSUI S., KITAMURA S., NAGASAWA Y. i współaut., 2000. *Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers*. Cancer Res. 60, 4328–4330.
- KRAMMER P. H., 1999. *CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die*. Adv. Immunol. 71, 163–210.
- KRUEGER A., BAUMANN S., KRAMMER P. H., KIRCHHOFF S., 2001. *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis*. Mol. Cell. Biol. 21, 8247–8354.
- KUWANA T., SMITH J. J., MUZIO M., DIXIT V., NEWMYER D. D., KORNBLUTH S., 1998. *Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c*. J. Biol. Chem. 273, 16589–16594.
- LEE S. H., SHIN M. S., KIM H. S., LEE H. K., PARK W. S., KIM S. Y., LEE J. H. i współaut., 1999. *Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers*. Cancer Res. 59, 5683–5686.
- LI L. Y., LUO X., WANG X., 2001. *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature 412, 95–99.
- LIU R., PAGE C., BEIDLER D. R., WICHA M. S., NUNEZ G., 1999. *Overexpression of Bcl-x(L) promotes che-*

- motherapy resistance of mammary tumors in a syngeneic mouse model. *Am. J. Pathol.* 155, 1861–1867.
- LIU Z., SUN C., OLEJNICZAK E. T., MEADOWS R. P., BETZ S. F., OOST T., HERRMANN J. i współa., 2000. *Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain.* *Nature* 408, 1004–1008.
- LOWE S. W., LIN A. W., 2000. *Apoptosis in cancer.* *Carcinogenesis* 21, 485–495.
- LUO X., BUDIHARDJO I., ZOU H., SLAUGHTER C., WANG X., 1998. *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.* *Cell* 94, 481–490.
- MAESTRO R., DEI TOS A. P., HAMAMORI Y., KRASNOKUTSKY S., SARTORELLI V., KEDES L., DOGLIONI C. i współa., 1999. *Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis.* *Genes. Dev.* 13, 2207–2217.
- MARZO I., BRENNER C., ZAMZAMI N., JURGENSMEIER J. M., SUSIN S. A., VIEIRA H., PREVOST M. C. i współa., 1998. *Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis.* *Science* 281, 2027–2031.
- MEDEMA J. P., SCAFFIDI C., KISCHKE F. C., SHEVCZENKO A., MANN M., KRAMMER P. H., PETER M. E., 1997. *FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC).* *EMBO J.* 16, 2794–2804.
- MEIJERINK J. P., MENSINK E. J., WANG K., SEDLAK T. W., SLOETJES A. W., DE WITTE T., WAKSMAN G., i współa., 1998. *Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX.* *Blood* 91, 2991–2997.
- MINN A. J., VELEZ P., SCHENDEL S. L., LIANG H., MUCHMORE S. W., FESIK S. W., FILL M., i współa., 1997. *Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes.* *Nature* 385, 353–357.
- MIYASHITA T., REED J. C., 1995. *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.* *Cell* 80, 293–299.
- MOLL U. M., ZAIKA A., 2001. *Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53.* *FEBS Lett.* 493, 65–69.
- MORONI M. C., HICKMAN E. S., DENCHI E. L., CAPRARA G., COLLI E., CECCONI F., MULLER H. i współa., 2001. *Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53.* *Nat. Cell. Biol.* 3, 552–558.
- MULLER M., WILDER S., BANNASCH D., ISRAELI D., LEHLBACH K., LI-WEBER M., FRIEDMAN S. L. i współa., 1998. *p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs.* *J. Exp. Med.* 188, 2033–2045.
- MURPHY K. L., KITTRELL F. S., GAY J. P., JAGER R., MEDINA D., ROSEN J. M., 1999. *Bcl-2 expression delays mammary tumor development in dimethylbenz(a)anthracene-treated transgenic mice.* *Oncogene* 18, 6597–6604.
- NAGATA S., 2000. *Apoptotic DNA fragmentation.* *Exp. Cell Res.* 256, 12–18.
- NAKANO K., VOUSDEN K. H., 2001. *PUMA, a novel pro-apoptotic gene, is induced by p53.* *Mol. Cell.* 7, 683–694.
- NICHOLSON D. W., ALI A., THORNBERRY N. A., VAILLANCOURT J. P., DING C. K., GALLANT M., GAREAU Y. i współa., 1995. *Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.* *Nature* 376, 37–43.
- NICHOLSON D. W., THORNBERRY N. A., 1997. *Caspases: killer proteases.* *Trends Biochem. Sci.* 22, 299–306.
- NOTARBARTOLO M., CERVELLO M., DUSONCHET L., CUSIMANO A., D'ALESSANDRO N., 2002. *Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins).* *Cancer Lett.* 180, 91–101.
- ODA E., OHKI R., MURASAWA H., NEMOTO J., SHIBUE T., YAMASHITA T., TOKINO T. i współa., 2000. *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis.* *Science* 288, 1053–1058.
- O'GORMAN D. M., COTTER T. G., 2001. *Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways.* *Leukemia* 1, 21–34.
- PATEL T., GORES G., KAUFMAN S. H., 1996. *The role of proteases during apoptosis.* *Faseb J.* 10, 587–597.
- RAVAGNAN L., GURBUXANI S., SUSIN S. A., MAISSE C., DAUGAS E., ZAMZAMI N., MAK T. i współa., 2001. *Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor.* *Nat. Cell Biol.* 3, 839–843.
- REED J. C., 1998. *Bcl-2 family proteins.* *Oncogene* 17, 3225–3236.
- REED J. C., 1999. *Dysregulation of apoptosis in cancer.* *J. Clin. Oncol.* 17, 2941–2953.
- ROSSE T., OLIVIER R., MONNEY L., RAGER M., CONUS S., FELLAY I., JANSEN B., i współa., 1998. *Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c.* *Nature* 391, 496–499.
- ROY N., DEVERAUX Q. L., TAKAHASHI R., SALVESEN G. S., REED J. C., 1997. *The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.* *Embo J.* 16, 6914–6925.
- ROYMANS D., SLEGGERS H., 2001. *Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression.* *Eur. J. Biochem.* 268, 487–498.
- RUFFOLO S. C., BRECKENRIDGE D. G., NGUYEN M., GOPING I. S., GROSS A., KORSMEYER S. J., LI H. i współa., 2000. *BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria.* *Cell Death Differ.* 7, 1101–1108.
- RUTH A. C., RONINSON I. B., 2000. *Effects of the multi-drug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation.* *Cancer Res.* 60, 2576–2578.
- RYAN K. M., PHILLIPS A. C., VOUSDEN K. H., 2001. *Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein.* *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13, 332–337.
- SAKAHIRA H., ENARI M., NAGATA S., 1998. *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.* *Nature* 391, 96–99.
- SAKAHIRA H., ENARI M., OHSAWA Y., UCHIYAMA Y., NAGATA S., 1999. *Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation.* *Curr. Biol.* 9, 543–546.
- SAMALI A., COTTER T. G., 1996. *Heat shock proteins increase resistance to apoptosis.* *Exp. Cell Res.* 223, 163–170.

- SCAFFIDI C., FULDA S., SRINIVASAN A., FRIESEN C., LI F., TOMASELLI K. J., DEBATIN K. M. i współa., 1998. *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. EMBO J. 17, 1675-1687.
- SCHENDEL S. L., XIE Z., MONTAL M. O., MATSUYAMA S., MONTAL M., REED J. C., 1997. *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5113-5118.
- SCHMITZ I., KIRCHHOFF S., KRAMMER P. H., 2000. *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 32, 1123-1136.
- SCHULZE-OSTHOFF K., WALCZAK H., DROGE W., KRAMMER P. H., 1994. *Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis*. J. Cell Biol. 127, 15-20.
- SHAYESTEH L., LU Y., KUO W. L., BALDOCCHI R., GODFREY T., COLLINS C., PINKEL D. i współa., 1999. *PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer*. Nat. Genet. 21, 99-102.
- SHERR C. J., WEBER J. D., 2000. *The ARF/p53 pathway*. Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 94-99.
- SHIMIZU S., KONISHI A., KODAMA T., TSUJIMOTO Y., 2000. *BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3100-3105.
- SHIMIZU S., NARITA M., TSUJIMOTO Y., 1999. *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC*. Nature 399, 483-487.
- SHIMIZU S., TSUJIMOTO Y., 2000. *Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 577-582.
- SHIN M. S., KIM H. S., LEE S. H., PARK W. S., KIM S. Y., PARK J. Y., LEE J. H. i współa., 2001. *Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers*. Cancer Res. 61, 4942-4946.
- SILKE J., HAWKINS C. J., EKERT P. G., CHEW J., DAY C. L., PAKUSCH M., VERHAGEN A. M. i współa., 2002. *The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites*. J. Cell Biol. 157, 115-124.
- SLEE E. A., HARTE M. T., KLUCK R. M., WOLF B. B., CASIANO C. A., NEWMAYER D. D., WANG H. G. i współa., 1999. *Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner*. J. Cell Biol. 144, 281-292.
- SMYTH M. J., KRASOVSKIS E., SUTTON V. R., JOHNSTONE R. W., 1998. *The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7024-7029.
- SOENGAS M. S., CAPODIECI P., POLSKY D., MORA J., ESTELLER M., OPITZ-ARAYA X., MCCOMBIE R. i współa., 2001. *Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma*. Nature 409, 207-211.
- STAMBOLIC V., MACPHERSON D., SAS D., LIN Y., SNOW B., JANG Y., BENCHIMOL S. i współa., 2001. *Regulation of PTEN transcription by p53*. Mol. Cell. 8, 317-325.
- STENNICKE H. R., JURGENSMEIER J. M., SHIN H., DEVERAUX Q., WOLF B. B., YANG X., ZHOU Q. i współa., 1998. *Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8*. J. Biol. Chem. 273, 27084-27090.
- STRAND S., HOFMANN W. J., HUG H., MULLER M., OTTO G., STRAND D., MARIANI S. M. i współa., 1996. *Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion?* Nat. Med. 2, 1361-1366.
- SUN X.M., MACFARLANE M., ZHUANG J., WOLF B. B., GREEN D. R., COHEN G. M. 1999. *Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis*. J. Biol. Chem. 274, 5053-5060.
- SUZUKI Y., NAKABAYASHI Y., TAKAHASHI R. 2001. *Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8662-8667.
- TAKITA J., YANG H. W., BESSHO F., HANADA R., YAMAMOTO K., KIDD V., TEITZ T. i współa., 2000. *Absent or reduced expression of the caspase 8 gene occurs frequently in neuroblastoma, but not commonly in Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma*. Med. Pediatr. Oncol. 35, 541-543.
- TAMM I., KORNBLOU S. M., SEGALL H., KRAJEWSKI S., WELSH K., KITADA S., SCUDIERO D. A. i współa., 2000. *Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias*. Clin. Cancer Res. 6, 1796-1803.
- TEITZ T., WEI T., VALENTINE M. B., VANIN E. F., GRENET J., VALENTINE V. A., BEHM F. G. i współa., 2000. *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. Nat. Med. 6, 529-535.
- THEVENOD F., FRIEDMANN J. M., KATSEN A. D., HAUSER I. A. 2000. *Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis*. J. Biol. Chem. 275, 1887-1896.
- TSUJIMOTO Y., SHIMIZU S., 2000. *VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins*. Cell Death Differ. 7, 1174-1181.
- VAN LOO G., SCHOTTE P., VAN GURP M., DEMOL H., HOORELBEKE B., GEVAERT K., RODRIGUEZ I. i współa., 2001. *Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation*. Cell Death Differ. 8, 1136-1142.
- VAN LOO G., VAN GURP M., DEPUYDT B., SRINIVASULA S. M., RODRIGUEZ I., ALNEMRI E. S., GEVAERT K. i współa., 2002. *The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity*. Cell Death Differ. 9, 20-26.
- VERHAGEN A. M., SILKE J., EKERT P. G., PAKUSCH M., KAUFMAN H., CONNOLLY L. M., DAY C. L. i współa., 2002. *HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize in-*

- hibitor of apoptosis proteins*. J. Biol. Chem. 277, 445-454.
- VOUSDEN K. H., 2000. *p53: death star*. Cell 103, 691-694.
- VOUSDEN K. H., WOUDE G. F., 2000. *The ins and outs of p53*. Nat. Cell. Biol. 2, 178-180.
- WANG C. Y., MAYO M. W., KORNEŁUK R. G., GOEDDEL D. V., BALDWIN A. S. JR. 1998. *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. Science 281, 1680-1683.
- WANG X., 2001. *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes. Dev. 15, 2922-2933.
- WEI M. C., ZONG W. X., CHENG E. H., LINDSTEN T., PANOUTSAKOPOULOU V., ROSS A. J., ROTH K. A. i współprac., 2001. *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. Science 292(5517): 727-30.
- WIDŁAK P., 2000. *The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis*. Acta Biochim. Polon. 47, 1037-1044.
- WOLF B. B., GOLDSTEIN J. C., STENNICKE H. R., BEERE H., AMARANTE-MENDES G. P., SALVESEN G. S., GREEN D. R., 1999. *Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation*. Blood 94, 1683-1692.
- WU G., CHAI J., SUBER T. L., WU J. W., DU C., WANG X., SHI Y., 2000. *Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO*. Nature 408, 1008-1012.
- WYLLIE A. H., KERR J. F., CURRIE A. R. 1980. *Cell death: the significance of apoptosis*. Int. Rev. Cytol. 68, 251-306.
- YIN X. M., WANG K., GROSS A., ZHAO Y., ZINKEL S., KLOCKE B., ROTH K. A. i współprac., 1999. *Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis*. Nature 400, 886-891.
- ZACCHI P., GOSTISSA M., UCHIDA T., SALVAGNO C., AVOLIO F., VOLINIA S., RONAI Z. i współprac., 2002. *The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults*. Nature 419, 853-857.
- ZHENG H., YOU H., ZHOU X. Z., MURRAY S. A., UCHIDA T., WULF G., GU L. i współprac., 2002. *The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response*. Nature 419, 849-853.