

W artykule przedstawiono możliwości wykorzystania w terapii genowej nowotworów strategii tzw. genów proapoptotycznych. Mechanizm działania białek proapoptotycznych (kodowanych przez proapoptotyczne transgeny) polega na niszczeniu komórek nowotworowych poprzez indukowanie w nich śmierci mającej wszelkie morfologiczne cechy apoptozy. Szereg danych wskazuje, że niektóre białka proapoptotyczne pochodzenia wirusowego (np. Apoptyna i E4orf4) indukują śmierć tylko w komórkach nowotworowych. Ponadto indukowana przez te wirusowe białka śmierć komórek jest niezależna od kaspaz, statusu genu p53 oraz hamującego wpływu białek z rodziny Bcl-2. Zastosowanie w terapii genowej genów kodujących wirusowe białka proapoptotyczne przypuszczalnie pozwoli ominąć problem uszkodzenia prawidłowych tkanek. W przypadku genów proapoptotycznych kodujących endogenne białka eukariotyczne (np. białko Bax), swoistość ekspresji genów może zostać zapewniona przez zastosowanie promotorów swoistych dla nowotworów (np. promotora indukowanego hipoksją lub promotora dla genu telomerazy). Strategia genów proapoptotycznych umożliwi nie tylko selektywne i bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych w wyniku programowania ich śmierci, ale też w przypadku stosowania terapii skojarzonej z radioterapią lub chemioterapią, może polepszyć efekty terapeutyczne tych metod.

Słowa kluczowe: terapia genowa nowotworów, geny proapoptotyczne, apoptoza, nekroza.

Geny proapoptotyczne w terapii genowej nowotworów

Proapoptotic genes in cancer gene therapy

Iwona Mitrus, Ewa Missol-Kolka, Stanisław Szala

Zakład Biologii Molekularnej Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

WPROWADZENIE

Celem niniejszej pracy jest przedyskutowanie możliwości zastosowania genów proapoptotycznych w terapii genowej nowotworów.

U organizmów wielokomórkowych apoptoza jest podstawowym procesem, w którym eliminowane są uszkodzone komórki, niezdolne do naprawienia różnego rodzaju defektów (mutacji DNA, wadliwej proliferacji, itp.) [1, 2]. W chorobach nowotworowych mechanizm ten jest zaburzony. W komórkach nowotworowych powstaje tzw. *fenotyp oporny na apoptozę*. Innymi słowy, stają się one odporne na większość sygnałów indukujących apoptozę [3, 4]. Pojawia się w nich coraz więcej nieskorygowanych błędów związanych z replikacją, cyklem komórkowym, adhezją itd. Komórki nowotworowe stają się niewrażliwe na większość leków przeciwnowotworowych. Zmniejszeniu zdolności do indukcji apoptozy towarzyszy coraz większa autonomiczna komórek nowotworowych [5].

W leczeniu nowotworów do zniszczenia nieprawidłowych komórek, które uniknęły śmierci apoptotycznej, stosuje się różnorodne podejścia terapeutyczne. Podstawowy problem stanowi zniszczenie wszystkich komórek nowotworowych w organizmie chorego, zarówno komórek guzów pierwotnych, jak i krążących w krwiobiegu komórek przerzutujących. Chirurgia i radioterapia wykorzystywane są do eliminowania komórek guzów rosnących miejscowo. Przerzuty mają być niszczone za pomocą chemioterapii. Chemioterapeutyki niszczą jednak nie tylko komórki nowotworowe, ale także komórki prawidłowych tkanek. Celowe jest więc opracowanie nowej strategii terapeutycznej, umożliwiającej zniszczenie wszystkich komórek nowotworowych w sposób selektywny, bez uszkodzenia prawidłowych tkanek.

Mechanizm działania większości leków przeciwnowotworowych i promieni jonizujących polega przede wszystkim na indukowaniu w komórkach nowotworowych apoptozy. Jedną z takich strategii *kierowania* komórek na drogę apoptozy jest terapia genowa, wykorzystująca tzw. geny proapoptotyczne. Jest

to przykład bezpośredniego niszczenia komórek nowotworowych w terapii genowej.

MECHANIZM APOPTOZY

Apoptoza – programowana śmierć komórki – jest procesem, w którym eliminowane są zarówno komórki uszkodzone, niezdolne do naprawienia różnego rodzaju defektów, jak i powstające podczas rozwoju lub morfogenezy zbędne komórki prawidłowe.

Apoptoza może być wyindukowana w komórkach za pośrednictwem wielu różnych sygnałów, w tym m.in. za pomocą tzw. sygnałów śmierci pochodzących z innych komórek, w wyniku zahamowania dopływu czynników wzrostu (tzw. sygnałów przeżycia), bądź poprzez różnego rodzaju stres środowiskowy, np. promieniowanie jonizujące, stres termiczny, stres oksydacyjny wywołany przez reaktywne formy tlenu itp. [1, 2, 5, 6].

Apoptoza przebiega najczęściej w tzw. *szlaku p53* lub *szlaku receptorów sygnałów śmierci* (ryc. 1.). W apoptozie przebiegającej w *szlaku p53* kluczową rolę odgrywają mitochondria [7]. Na terenie mitochondriów m.in. dochodzi do uwalniania aktywatorów kaspaz (np. cytochromu c), zachodzą zmiany w transporcie elektronów, dochodzi do spadku potencjału transbłonowego [8]. W przypadku apoptozy indukowanej aktywacją receptorów sygnałów śmierci mitochondria mogą wzmacniać (amplifikować) zbyt słaby sygnał, choć ich udział w tym procesie nie jest konieczny [9].

Szlak zależny od P53 przebiega z udziałem białka P53 i wielu białek modulujących jego aktywność. Białko P53 ulega fosforylacji i acetylacji, co powoduje jego zmiany konformacyjne. Białko zmienia wtedy swoje powinowactwo do różnych promotorów i aktywuje ekspresję różnych genów kodujących białka, biorące udział w odpowiedzi komórek na stres. Jednym z białek biorących udział w apoptozie zależnej od P53 jest proapoptotyczne białko Bax, które ma zdolność otwierania kanałów w błonie mitochondriów i uwalniania w ten sposób cytochromu c. Uwolniony cytochrom c wraz z białkiem Apaf-1, ATP i inicjatorową prokaspazą 9 tworzy tzw. apoptosom, w którym prokaspaza 9 ule-

The article describes prospects of using the so-called pro-apoptotic genes in gene therapy of neoplastic diseases.

Apoptosis is a process that eliminates damaged cells unable to repair their incurred defects (for example mutations in their DNA, faulty proliferation patterns, etc.). In neoplastic diseases apoptosis becomes corrupted. Neoplastic cells become insensitive to the majority of signals that normally trigger apoptosis. In sum, their phenotype becomes apoptosis-resistant.

One possible therapeutic strategy in cancer treatment is to destroy defective cells by endowing them with genes that encode the pro-apoptotic proteins. Their task is to restore apoptosis responsiveness of these cells. During gene therapy trials, both in vitro and in vivo, various pro-apoptotic genes have been tried (for example bax, bak, bim). Usually, growth inhibition has been obtained in primary tumors induced in experimental animals that have been administered such pro-apoptotic genes. However, this strategy has a serious drawback, namely its low specificity. These genes induce apoptosis in both normal and neoplastic cells, thus leading to damage of normal tissues also.

Nonetheless, there are pro-apoptotic proteins that act specifically on abnormal cells and cause their death without affecting normal cells. Examples of such proteins involve viral Apoptin and E4orf4. Death induced by these proteins is caspase-independent. It neither depends on functional status of p53 gene nor on inhibitory effects of Bcl-2 family proteins. Although it shows morphological features of apoptosis, its time-course is considerably longer than that of typical apoptosis (it lasts up to several days). Therapeutic application of genes encoding these proteins is likely to circumvent problems associated with damage to normal tissues.

In case of pro-apoptotic genes encoding endogenous eukaryotic proteins (for example Bax protein) specificity of expression may be assured by putting them under the control of promoters that are tumor-specific. Examples include hypoxia-induced promoter and telomerase gene promoter.

Pro-apoptotic genes may be transferred into neoplastic cells in various manners, including electroporation and use of cationic liposomes or cationic polymers. However, viral carriers prove to be so far the most efficient type of vectors for such purposes, albeit they are nor devoid of inherent problems. In the

ga autokatalitycznej aktywacji. Zaktywowana kaspaza 9 inicjuje aktywację kaspaz efektorowych, co powoduje proteolizę szeregu białek jądrowych i cytoplazmatycznych. Efektem są zmiany strukturalne i funkcjonalne komórki, i w rezultacie śmierć komórki [1, 2, 5].

Szlak receptorów sygnałów śmierci jest uruchamiany po przyłączeniu się swoistych ligandów do receptorów błonowych z rodziny tzw. receptorów śmierci (np. receptora Fas). Ligandy te są białkowymi sygnałami śmierci wysyłanymi przez inne komórki organizmu. Receptor związany z ligandem wiąże tzw. białka adaptorowe, np. dla receptora Fas jest to białko FADD, mające zdolność wiązania się z nieaktywną prokaspazą 8, po czym następuje jej autokatalityczna aktywacja. Aktywna kaspaza 8 inicjuje kaskadę kaspaz przez proteolityczną aktywację efektorowej kaspazy 3, a następnie uaktywniane są dalsze kaspazy efektorowe [1, 2, 5].

Oprócz typowej apoptozy zależnej od kaspaz znane są także inne typy śmierci komórek, wykazujące cechy morfologiczne i biochemiczne podobne do cech śmierci apoptotycznej, np. apoptozę niezależną od kaspaz i P53. Określeniem *apoptoza kaspazoniezależna* posługują się różni autorzy do opisu śmierci komórek, w której nie odgrywają roli kaspazy, natomiast śmierć komórek inicjowana jest poprzez destrukcję mitochondriów [8, 10, 11]. Destrukcja mitochondriów pociąga za sobą m.in. zaburzenia transportu elektronów, oksydacyjnej fosforylacji, syntezy ATP i zmian w potencjale oksydoredukcyjnym komórki. Śmierć taka ma zupełnie inny przebieg niż śmierć apoptotyczna z udziałem kaspaz. Choć wykazuje pewne podobieństwa do typowej apoptozy, trwa jednak o wiele dłużej (czas *nietypowej* apoptozy liczy się w dniach, podczas gdy czas apoptozy zależnej od kaspaz i p53 w minutach lub godzinach). Niektórzy twierdzą, że śmierć taka jest raczej pewną postacią nekrozy [10, 11, 12]. Innym przykładem może być tzw. *paraptoza* (ang. *paraptosis*). Jest to proces w większym stopniu zbliżony do nekrozy, lecz jednocześnie zależny od kaspazy 9 [13].

Decyzja czy komórki ulegną śmierci apoptotycznej, czy nekrotycznej, zależy m.in. od poziomu wewnątrzkomórkowego ATP w momencie, gdy dochodzi do tzw. załamania potencjału transbłonowego mitochondrium ($\Delta\Psi_m$) [9, 14, 15, 16, 17]. Towarzyszące otwarciu megakanalów zahamowanie oksydacyjnej fosforylacji i aktywacja mitochondrialnej ATPazy przyspieszają zmniejszanie puli ATP w komórce. Gwałtowny ubytek ATP prowadzi do zahamowania funkcji życiowych komórki i niekontrolowanej lizy komórek – innymi słowy – nekrozy. Przy dostatecznym natomiast poziomie ATP aktywne są kaspazy i następuje indukcja typowej apoptozy [17]. Manipulowanie metabolizmem energetycznym komórki, np. hamowanie reakcji w łańcuchu oddechowym lub zablokowanie dostarczania substratów dla glikolizy, ukierunkowuje śmierć komórek na nekrozę [18].

GENY PROAPOPTOTYCZNE W TERAPII GENOWEJ NOWOTWORÓW

Jak już wcześniej wspomniano, komórki nowotworowe nie wchodzą w stan apoptozy pomimo uszkodzeń DNA i sygnałów otrzymywanych od innych komórek. Stan taki określa się niekiedy jako *ucieczkę od apoptozy*. Przyczyną mogą być mutacje i delecje genów supresorowych kodujących białka biorące udział w regulacji apoptozy (np. genów: p53, mda-7, BRCA1, Rb, PTEN, itp.), genów kodujących kaspazy, genów kodujących proapoptotyczne białka należące do rodziny Bcl-2 (np. Bax, Bak) [5] oraz genu kodującego białko Apaf-1 [19]. Szereg danych wskazuje, że w komórkach nowotworowych występuje zachwianie równowagi między czynnikami pro- i antyapoptotycznymi [3, 4, 5]. Zmniejszeniu aktywności genów proapoptotycznych towarzyszy najczęściej nadekspresja genów kodujących inhibitory apoptozy, np. białka Bcl-2 lub endogenne białkowe inhibitory apoptozy (IAP), np. tzw. surwiwiny [5].

Wprowadzanie do komórek nowotworowych genów proapoptotycznych ma na celu *wymuszenie* w komórkach śmierci apoptotycznej. Przykładami takich genów są geny z rodziny bcl-2 (bax, bim, bak), geny kaspaz oraz gen kodujący receptor błonowy Fas wiążący ligand FasL. Osobną grupę stanowią wirusowe geny proapoptotyczne: apoptyny wirusa anemii u kurcząt, Vpr wirusa HIV i E4orf4 adenowirusów. Przykłady genów proapoptotycznych, zarówno wirusowych i pochodzących z genomu ssaków, które stosowano w terapii genowej w badaniach *in vitro* i *in vivo* zostały przedstawione w tab.

Większość białek kodowanych przez geny proapoptotyczne wywołuje apoptozę w mechanizmie zależnym od p53 oraz kaspaz w tzw. szlaku p53 lub szlaku receptorów sygnałów śmierci. Niektóre, jak np. apoptyna czy E4orf4, wywołują *nietypową* apoptozę w mechanizmie niezależnym od genu p53 oraz kaspaz, w którym śmierć komórek inicjowana jest poprzez destrukcję mitochondriów. Zaletą białek kodowanych przez wirusowe geny jest to, że niektóre z nich indukują apoptozę swoiście w komórkach nowotworowych i stransformowanych, nie indukują natomiast śmierci komórek prawidłowych [20, 21, 22, 23, 24]. Białka te jednak stanowią wyjątek, ponieważ większość znanych białek proapoptotycznych indukują apoptozę we wszystkich komórkach, do których zostaną wprowadzone. Aby więc uniknąć niszczenia komórek zdrowych tkanek, niezbędne jest zapewnienie swoistości transdukcyjnej i transkrypcyjnej.

GENY PROAPOPTOTYCZNE POCHODZĄCE Z GENOMU SSAKÓW

Geny proapoptotyczne pochodzące z genomu ssaków to m.in. geny z rodziny wielogenowej bcl-2. Rodzina ta obejmuje geny kodujące białka proapoptotyczne indukujące apoptozę (Bax, Bcl-x_s, Bak, Bad, Bim i in.)

case of pro-apoptotic genes, it is the production of adenoviral vectors that poses a problem as they contain a gene which is toxic to packaging cells. Possible solutions include use of binary systems comprising two adenoviral vectors. The first of them contains a pro-apoptotic gene remaining under the control of a promoter binding a specific, second vector-encoded protein, whose gene was placed under the control of a telomerase promoter. Expression of the pro-apoptotic gene takes place only upon co-transfection of target cells with both carriers. The strategy of using pro-apoptotic genes in the treatment of neoplastic diseases, apart from enabling selective and direct destruction of cancer cells via restoring their programmed death, may also ameliorate the therapeutic effect obtained if it is combined with radiotherapy and/or chemotherapy.

Key words: cancer gene therapy, pro-apoptotic genes, apoptosis, necrosis.

oraz antyapoptyczne białka hamujące apoptozę (np. Bcl-2, Bcl-w, Bcl-x_L). Wzajemne relacje pomiędzy białkami proapoptycznymi i antyapoptycznymi decydują o tym, czy komórka ulegnie apoptozie. Najlepiej poznanym proapoptycznym białkiem z tej rodziny jest Bax. Białko to ma zdolność otwierania kanałów znajdujących się w błonach mitochondrialnych, a być może także perforacji błon mitochondrium i uwalniania cytochromu c. Jego działanie zbadano na różnych nowotworowych liniach komórkowych, np. komórkach raka jajnika (PA-1, OV-4, OVCAR3) [25], raka płuc (A549, H1299) [26]. We wszystkich komórkach wprowadzany gen bax skutecznie indukował apoptozę. Stwierdzono także, iż bax zwiększa wrażliwość niektórych opornych na chemioterapię linii komórek nowotworowych. Zaobserwowano np. zwiększoną liczbę komórek w stanie apoptozy po traktowaniu taksolem ludzkich linii raka jajnika (SW626, SKOV3.ip1) z transgenem bax w stosunku do tych samych komórek nietraktowanych taksolem [25]. Podjęto także próby terapii wielogenowej genem bax i innymi genami, np. kaspazy 8. Zaobserwowano synergistyczny efekt działania kodowanych przez te geny białek, znaczny wzrost liczby komórek w apoptozie w porównaniu z poziomem apoptozy w komórkach, wywołowanym tylko przez pojedyncze geny.

Kolejne białko z rodziny Bcl-2, białko Bcl-x_s hamuje działanie białka antyapoptycznego białka Bcl-2, które wykazuje nadekspresję w ponad 70 proc. przypadków raka piersi. Indukowanie apoptozy przez białko Bcl-x_s sprawdzano na komórkach raka piersi, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Podawanie genu Bcl-x_s za pomocą nośników adenowirusowych *in vivo* spowodowało zahamowanie wzrostu guzów w porównaniu do guzów u zwierząt nieleczonych [27].

Innym przykładem genów proapoptycznych są geny kodujące białka Fas i FADD. Receptor Fas (APO-1; CD95) należy do rodziny receptorów TNF (TNF – czynnik nekrozy nowotworów). Receptor Fas łączy się z ligandem FasL. Cytoplazmatyczne fragmenty receptorów z rodziny TNF nie mają domen katalitycznych. Dlatego zaktywowany receptor (receptor ze związanym ligandem) wiąże tzw. białka pośredniczące, białka adaptorowe, do których z kolei przyłącza się prokaspaza inicjatorowa. Do lepiej poznanych białek adaptorowych należy m.in. białko FADD. Interakcja białek adaptorowych z cytoplazmatycznym fragmentem receptorów z rodziny TNF zachodzi z udziałem tzw. domen śmierci (DD, ang. *death domain*), swoistych aminokwasowych sekwencji znajdujących się zarówno w białkach adaptorowych, jak i receptorach. Białko FADD oprócz domeny DD posiada również tzw. domenę efektorową (DED, ang. *death effector domain*), do której przyłącza się swoją domeną DED prokaspaza 8. W tak uformowanym kompleksie prokaspaza 8 ulega autokatalitycznej aktywacji.

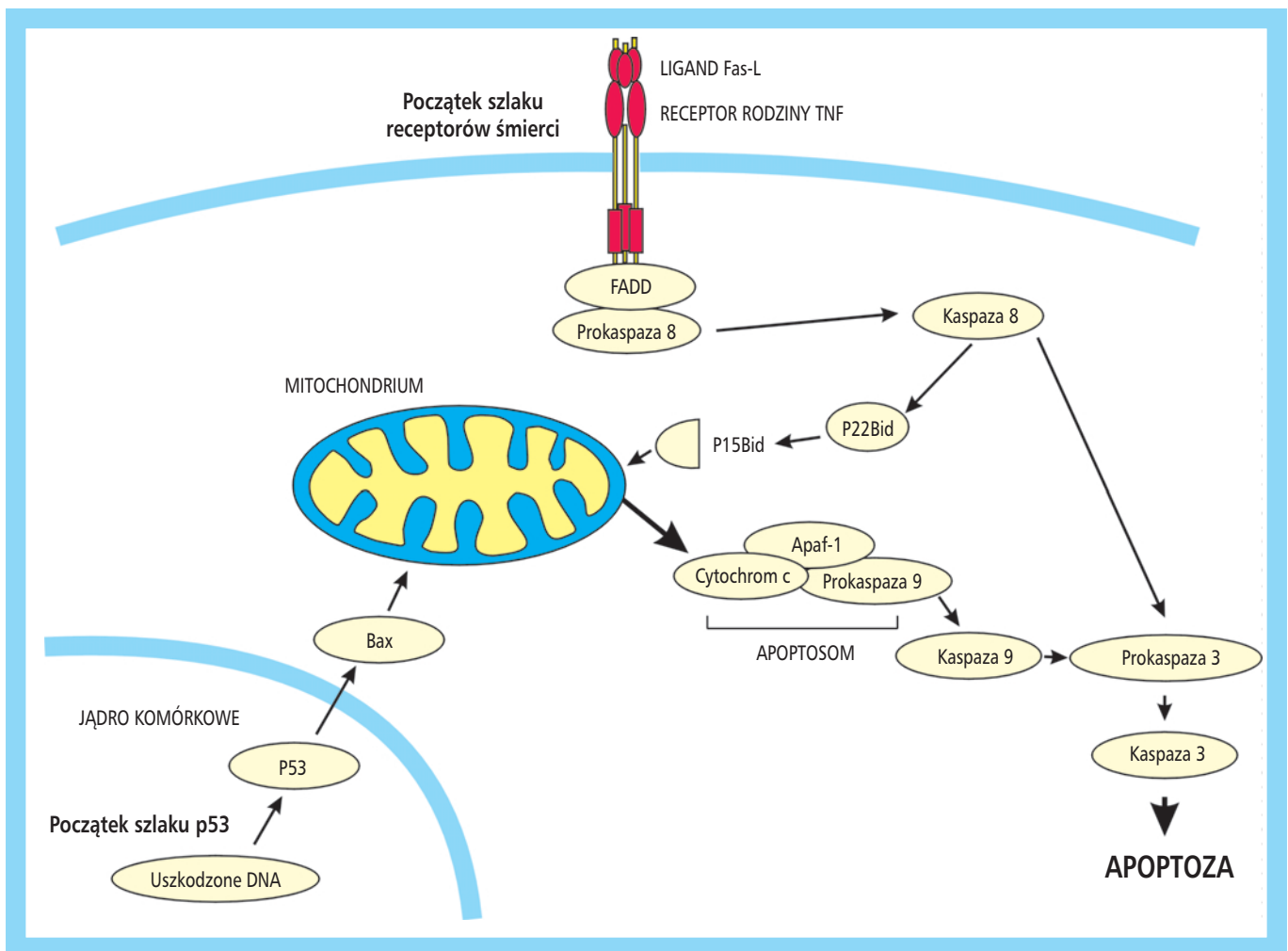
Fas jest glikozylowanym białkiem błonowym o masie 48 kDa. Ulega ekspresji w różnych typach prawidłowych i nowotworowych ludzkich linii komórkowych [28]. FasL znalazł się głównie na aktywowanych limfocytach T i NK. Oddziaływanie między receptorem i ligandem (Fas-FasL) odgrywa rolę w indukowaniu apoptozy linii limfoidalnej i w wywoływaniu systemowej odpowiedzi immunologicznej [29].

Działanie genu FasL badano zarówno na komórkach posiadających receptor Fas (Fas⁺, mysi rak nerki Renca) oraz na komórkach nie posiadających tego receptora (FasL⁻, komórki ludzkiego raka okrężnicy CT26). Do obu linii komórkowych wprowadzono plazmid z genem FasL. Zaobserwowano różnice w indukcji apoptozy wywołanej przez ten gen w komórkach obu linii: w linii komórkowej Fas⁺ poziom apoptozy był bardzo wysoki (nawet ponad 90 proc.), zaś komórki Fas⁻ były niewrażliwe na działanie białka FasL. Gen FasL stosowany był także w badaniach *in vivo*, na kilku różnych modelach zwierzęcych, m.in. na mysim raku nerki Renca. Guzy, do komórek których wprowadzano gen FasL w wektorach adenowirusowych, już po pierwszym podaniu ulegały zmniejszeniu. Po drugim podaniu myszom genu (2 dni po pierwszej iniekcji) guzy zanikały całkowicie [28].

W badaniach *in vitro* i *in vivo* wprowadzano także gen kodujący białko FADD za pomocą nośników wirusowych do komórek mysich glejaków GL26 oraz GL261. Białko wywoływało wysoki poziom apoptozy *in vitro* (ok. 70 proc. komórek) oraz powodowało zahamowanie wzrostu guzów pochodzących z tych linii. Efekt terapeutyczny utrzymywał się nawet do 4 tyg. po zaprzestaniu podawania genu terapeutycznego [30].

Genami proapoptycznymi są także geny kodujące tzw. kaspazy. Kaspazy są enzymami proteolitycznymi z grupy proteaz cysteinowych, rozszczepiającymi białka po reszcie kwasu asparaginowego [31]. W terapii genowej nowotworów próbowano stosować kilka różnych kaspaz, m.in. kaspazę 3 i 8. Działanie kaspazy 8 badano na przykładzie glejaków. W komórkach glejaków (U251) wprowadzenie *in vitro* lub *in vivo* genu kodującego kaspazę 8 wywoływało w nich apoptozę [32]. Innym genem, który próbowano stosować w terapii genowej nowotworów był gen kaspazy 3. Wywołany przez nią poziom apoptozy był stosunkowo niski, lecz wprowadzenie do komórek genu kodującego tę kaspazę uczało je na chemioterapeutyki. Na przykład zastosowanie etopozydu wywoływało apoptozę nie tylko *in vitro*, ale też powodowało zmniejszenie wielkości guzów u szczurów zaszczypanych komórkami raka wątroby (AH130) [33].

Kolejnym przykładem genu proapoptycznego stosowanego w terapii genowej jest E2F-1. E2F-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym,



Ryc. 1. Uproszczony schemat przebiegu apoptozy. Schemat przedstawia przebieg typowej apoptozy zależnej od obecności kaspaz, przebiegającej zarówno w mechanizmie zależnym od obecności białka P53 jak i w mechanizmie aktywującym tzw. receptory sygnałów śmierci. Czynniki uszkodzające DNA (np. promieniowanie jonizujące) poprzez P53 aktywują głównie transkrypcję genu *bax*, kodującego białko uwalniające z mitochondrium cytochrom c. Cytochrom c wraz z białkiem Apaf 1 bierze udział w aktywacji kaspazy 9 aktywującej następnie kaspazy efektorowe. W szlaku receptorów sygnałów śmierci po związaniu liganda (białkowego czynnika śmierci) z receptorem z rodziny TNF pobudzony receptor aktywuje inicjatorową prokaspazę 8. Kaspaza 8 uaktywnia kolejno kaspazy efektorowe. Oba szlaki łączą się poprzez białko Bid.

pełniącym ważną rolę w podziałach komórkowych, w czasie przechodzenia z fazy G1 do fazy S. Nadekspresja E2F-1 wywołuje apoptozę, przypuszczalnie z powodu niezgodności sygnałów proliferacji z sygnałami zatrzymania cyklu komórkowego [34]. Działanie E2F-1 badano *in vitro*, m.in. na dwóch liniach komórkowych: czerniaka SK-MEL-28 oraz SK-MEL-2. W obu przypadkach uzyskano zbliżony poziom apoptozy, pomimo że pierwsza z tych linii posiada prawidłowy, a druga zmutowany gen p53. Sugeruje to, że E2F-1 indukuje apoptozę niezależną od statusu tego genu [34]. E2F-1 był używany również w badaniach *in vivo*. Mysiom zaszczepionym komórkami raka płaskonabłonkowego głowy i szyi Tu-138 lub Tu-167 podawano gen kodujący E2F-1 w nośnikach wirusowych. Zaobserwowano zahamowanie wzrostu guzów u leczonych w ten sposób myszy [35].

WIRUSOWE GENY PROAPOPTOTYCZNE

Wirusowe geny proapoptotyczne to np. geny apoptyny, *e4orf4* oraz *vpr*. Apoptyna jest białkiem kodowanym przez gen VP3 wirusa

anemii u kurcząt (CAV – *chicken anemia virus*). Jest to białko o masie 14 kDa, składające się ze 121 aminokwasów [21]. Apoptyna wywołuje apoptozę w transformowanych i nowotworowych liniach komórkowych, nie wywołuje natomiast apoptozy w komórkach prawidłowych. Apoptoza indukowana jest przez apoptynę niezależnie od statusu genu p53, od obecności kaspaz i od hamującego wpływu antyapoptycznych białek z rodziny Bcl-2 [36]. W prawidłowych komórkach apoptyna lokalizuje się głównie w cytoplazmie komórek, w komórkach transformowanych i nowotworowych głównie w jądrze komórkowym. Sugeruje to, iż funkcja i aktywność apoptyny zależą od jej lokalizacji. Jądrowa lokalizacja białka jest niezbędna do wywołania apoptozy. Apoptyna, jako białko bogate w prolinę, może ze względu na zasadowy charakter oddziaływać z DNA powodując kondensację i fragmentację chromatyny. Apoptyna może też działać jako regulator transkrypcji genów wywołujących apoptozę. Być może w normalnych komórkach apoptyna jest modyfikowana przez białka odpowiedzialne za cytoplazmatyczną lokalizację apoptyny. Utrata takich funkcjonalnych czynników w transformowanych i nowotworowych komór-

kach może ułatwiać transport apoptyny do jądra. Niewykluczone, że w komórkach nowotworowych następuje także modyfikacja struktury apoptyny (np. fosforylacja, acetylacja), która właśnie umożliwia transport białka do jądra [37]. Apoptyna zawiera sygnał lokalizacji jądrowej i przypuszczalnie sygnał eksportu jądrowego. Prawdopodobnie komórki prawidłowe rozpoznają sekwencję eksportu i apoptyna jest usuwana z jądra komórkowego. Dzięki temu w komórkach tych nie dochodzi do indukcji apoptozy [20]. W badaniach *in vitro* wykazano iż apoptyna indukuje apoptozę jedynie w komórkach stransformowanych i nowotworowych. Po wprowadzeniu genu apoptyny apoptoza indukowana była w ludzkich komórkach mięsaka kościopochodnego (U2OS – z prawidłowym genem p53, Saos-2/ala143 – ze zmutowanym p53, Saos-2 – bez genu p53) oraz innych liniach nowotworowych, np. wątrobiakach, białaczkach, czerniakach, nowotworach sutka i okrężnicy [36]. Apoptyna nie wywoływała natomiast apoptozy komórek prawidłowych: ludzkich fibroblastów (VH10), keratynocytów (FSK-1), ludzkich komórek śródbłonkowych HUVEC, ludzkich komórek mięśni gładkich (HSMC) [20, 21, 38]. Apoptyna jest,

jak dotąd, jedynym proapoptotycznym białkiem pochodzenia wirusowego badanym *in vivo* w komórkach nowotworowych. Myszy zaszczeniowano komórkami raka wątroby HepG2. Następnie za pomocą adenowirusów dożylnie lub doguzowo wprowadzano gen kodujący apoptynę. W grupie myszy leczonych zaobserwowano wyraźne zahamowanie wzrostu guzów w porównaniu z myszami grup kontrolnych (myszom podawano sól fizjologiczną lub dożylnie wprowadzano wektor adenowirusowy z genem apoptyny w odwróconej orientacji). Badania na zwierzętach wykazały niską toksyczność apoptyny po podskórnym, dootrzewnowym i dożylnym podaniu adenowirusów zawierających gen apoptyny [21].

Innym przykładem genu proapoptotycznego jest gen *e4orf4* z ludzkiego adenowirusa typu 5 (Ad5). Białko E4orf4 kodowane przez gen *e4orf4*, ma masę 14 kDa i składa się ze 113 aminokwasów [22, 23, 39]. E4orf4 reguluje ekspresję genów na poziomie transkrypcji i translacji. Jego działanie ma wiele cech podobnych do działania apoptyny. Indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych i transformowanych niezależnie od statusu genu p53, jak i niezależnie od obecności kaspazy [40]. Białko E4orf4 nie indukuje apoptozy w komórkach prawidłowych [22, 23, 39]. Białko E4orf4 wiąże się z fosfatazą PP2A [41]. Kompleks E4orf4-PP2A odgrywa rolę w regulacji procesów komórkowych: w podziałach komórkowych, sygnałach transdukcyjnych, ekspresji genów, i kontroli apoptozy [39, 41]. Mechanizm indukcji apoptozy przez białko E4orf4 wyłącznie w komórkach nowotworowych nie został do tej pory wyjaśniony [39]. W przeciwieństwie do apoptyny nie obserwuje się jądrowej lokalizacji E4orf4 w transformowanych i nowotworowych liniach. Nie moż-

na więc powiązać funkcji białka E4orf4 z jego lokalizacją. Swoistość indukowania apoptozy wyłącznie w komórkach nowotworowych próbowano więc tłumaczyć w inny sposób. Przypuszczalnie E4orf4 indukuje apoptozę tylko w obecności onkogenów. Niewykluczone, że w komórkach nowotworowych E4orf4 ulega modyfikacjom innym niż w komórkach prawidłowych [23].

METODY WPROWADZANIA GENÓW PROAPOPTOTYCZNYCH DO KOMÓREK

O powodzeniu terapii genowej nowotworów w dużym stopniu decyduje wprowadzenie genów terapeutycznych do jak największej ilości komórek. Geny wprowadzane są *in vivo* różnymi metodami [42]. DNA można wprowadzać do komórek np. za pomocą lipidów kationowych i kationowych polimerów. Nośniki te nie indukują odpowiedzi immunologicznej. Są jednak mało wydajne, a niską wydajność transfekcji jedynie w niewielkim stopniu można zwiększać wielokrotnymi podaniami. Skuteczniejszą metodą wprowadzania genów do komórek *in vivo* wydaje się elektroporacja komórek – metoda polegająca na przejściowym uszkodzeniu błony komórkowej pod wpływem przyłożonego napięcia i wytworzeniu w ten sposób porów, przez które DNA łatwo wnika do komórek. Metoda ta ma jednak ograniczone zastosowanie *in vivo*, ponieważ nadaje się jedynie do podskórnego lub domięśniowego wprowadzania genów. W ostatnich latach do transfekcji *in vivo* najczęściej stosowane są modyfikowane wektory adenowirusowe. O powszechności ich stosowania decyduje wysoka wydajność wprowadzania genów do komórek. Jednak i te wektory nie są pozbawione wad. Największą z nich jest immunogenność, ograniczająca ilość podań *in vivo*. Ponadto nośniki te mają ograniczoną pojemność dla te-

rapeutycznego DNA. W przypadku omawianych przez nas genów proapoptotycznych dodatkowym problemem staje się konstruowanie wektorów ekspresyjnych z transgenem, którego białkowy produkt jest toksyczny dla komórek pakujących. Aby ominąć problem indukowania apoptozy w komórkach pakujących stosuje się tzw. binarne systemy adenowirusowe (ang. *binary adenoviral vector system*). Przykładem takiego układu może być system z promotorem indukowanym przez białko GAL4 (ryc. 2.) [43]. System taki składa się z dwóch typów nośników adenowirusowych. Jeden z nich zawiera gen terapeutyczny pod kontrolą promotora wiążącego białko GAL4. Warunkuje on minimalną transkrypcję danego genu, dzięki czemu nie dochodzi do indukcji apoptozy w komórkach pakujących. Drugi nośnik adenowirusowy zawiera gen kodujący białko GAL4. Ekspresja genu terapeutycznego zachodzi dopiero po kotransfekcji komórek tymi dwoma nośnikami wirusowymi.

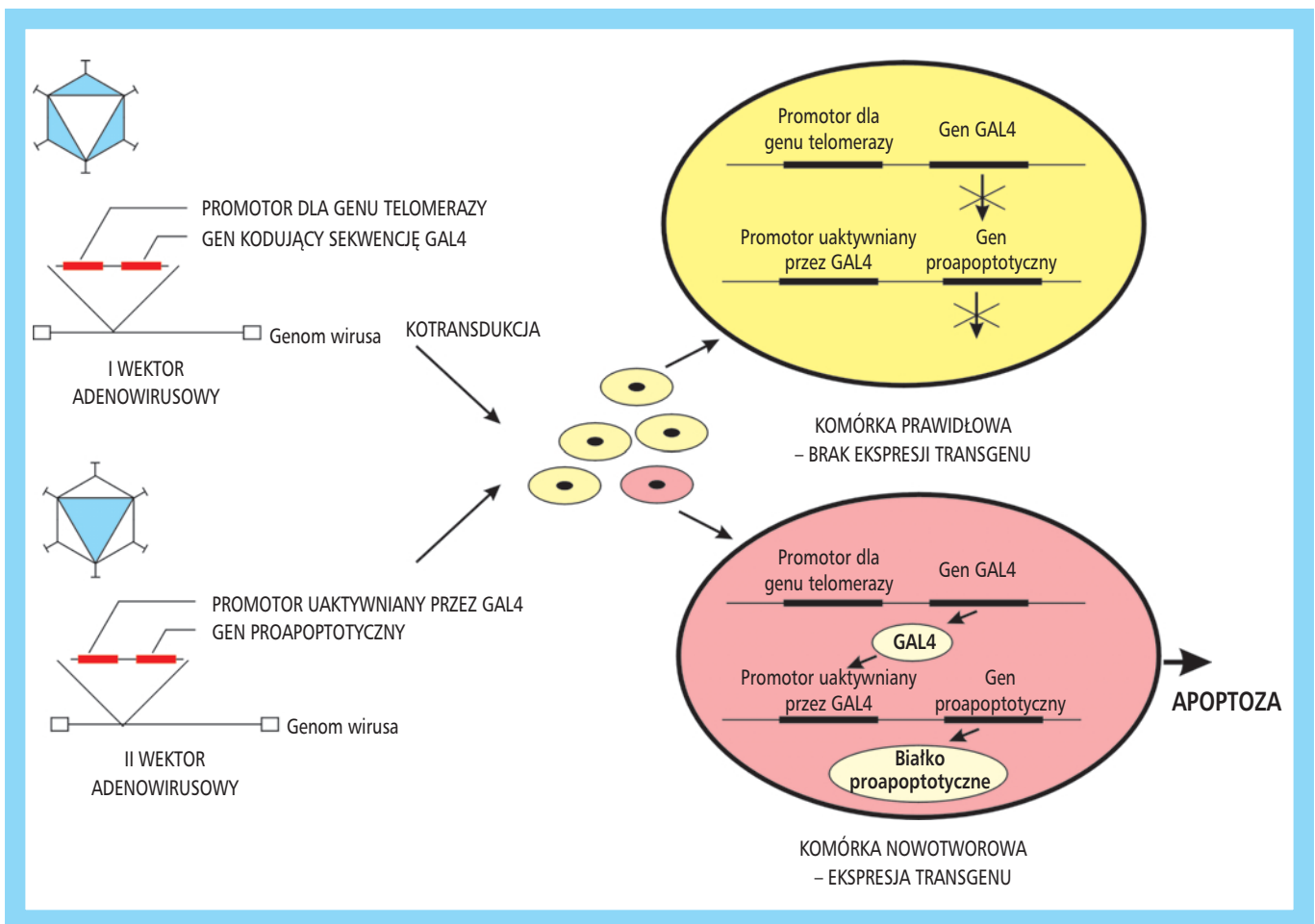
Jak już wspomniano, w terapii genowej z zastosowaniem genów proapoptotycznych ważne jest zapewnienie swoistości niszczenia komórek nieprawidłowych. Aby nie doszło do uszkodzenia prawidłowych tkanek, geny terapeutyczne muszą ulegać ekspresji wyłącznie w komórkach nowotworowych. Jedną z metod zapewnienia selektywnego niszczenia komórek nowotworowych jest umieszczenie genów proapoptotycznych pod kontrolą promotorów swoistych nowotworowo. Przykładami takich promotorów obok niektórych promotorów tkankowo swoistych (np. tyrozynazy, CEA), może być promotor regulowany hipoksją i promotor dla genu telomerazy.

Stan hipoksji (niedotlenowania) pewnych regionów komórek jest unikalną cechą guzów

Tab. Przykłady genów proapoptotycznych, stosowanych w terapii genowej nowotworów w badaniach *in vitro* i *in vivo*

Gen	Działanie białka kodowanego przez gen proapoptotyczny	Autorzy
Bax	uwalnia z mitochondrium cytochrom c; terapeutyczne działanie tego genu wzrasta w przypadku stosowania terapii skojarzonej z chemio- i radioterapią	Xiang i wsp. [25]
Bcl-x _s	hamuje działanie antyapoptotycznych białek Bc ₂ -2 i Bc ₁ -xL	Ealovega i wsp. [53]
Bak	hamuje działanie antyapoptotycznych białek Bc ₂ -2 i Bc ₁ -xL	Pataer i wsp. [54]
Bim	hamuje działanie antyapoptotycznych białek Bc ₂ -2 i Bcl-w	O'Connor i wsp. [55]
Fas	receptor wiążący białka pośredniczące, uruchamia prokaspazy inicjatorowe	Arai i wsp. [28]
FADD	białko wiążące się z receptorem Fas, w przypadku nadekspresji może indukować apoptozę niezależnie od tego receptora	Kondo i wsp. [30]
E2F-1	czynnik transkrypcyjny kompleksujący z białkiem Rb; działa w cyklu komórkowym w fazie G1/S	Liu i wsp. [35]
Apoptyna ^{*)}	indukuje apoptozę specyficznie w komórkach nowotworowych i stransformowanych	Noteborn [36], Zhuang i wsp. [38], Noteborn i wsp. [56]
E4orf4 ^{*)}	indukuje apoptozę specyficznie w komórkach nowotworowych i stransformowanych	Shtrichman i Kleinberger [22], Shtrichman i wsp. [23]
Vpr ^{*)}	indukuje apoptozę specyficznie w komórkach nowotworowych i stransformowanych; wprowadzono nie gen, a białko liczące 96 aminokwasów w pustym, nie zawierającym materiału genetycznego, wirionie HIV-1	Stewart i wsp. [24]

^{*)} Gen pochodzenia wirusowego



Ryc. 2. Binarny system adenowirusowy. Schemat przedstawia przykład tzw. binarnego systemu adenowirusowego (ang. *binary adenoviral vector system*), który pozwala ominąć problem indukcji apoptozy w komórkach pakujących. System składa się z dwóch nośników adenowirusowych. Jeden z nich zawiera gen proapoptotyczny pod kontrolą promotora wiążącego białko GAL4. Drugi nośnik adenowirusowy zawiera gen kodujący białko GAL4, pod kontrolą promotora dla genu telomerazy. Promotor ten warunkuje ekspresję GAL4 wyłącznie w komórkach nowotworowych. Ekspresja proapoptotycznego genu terapeutycznego zachodzi dopiero po kotransfekcji komórek docelowych tymi dwoma nośnikami wirusowymi.

nowotworowych [44–47]. Większość guzów o wymiarach powyżej 1 mm³ zawiera regiony, do których dociera zbyt mała ilość tlenu w stosunku do potrzeb komórek [48]. W regionach takich dochodzi do aktywacji wielu różnych genów, w tym także genu kodującego naczyniowo-śródłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) odpowiedzialnego m.in. za powstawanie sieci naczyń krwionośnych w obrębie guzów [46]. Gen kodujący VEGF znajduje się pod kontrolą promotora indukowanego hipoksją, zawierającego w swojej strukturze m.in. element odpowiedzi na hipoksję (HRE, ang. *hypoxia response element*). Promotor ten zostaje zaktywowany po przyłączeniu się do elementu HRE czynnika HIF-1 (ang. *hypoxia-inducible factor-1*). Regulowany hipoksją promotor VEGF był wykorzystany do uzyskania swoistej ekspresji tzw. genów samobójczych w obrębie niedotlenionych komórek nowotworowych [49].

Innym przykładem promotora swoistego dla nowotworów jest promotor dla genu telomerazy [50]. Telomery są końcowymi odcinkami ludzkich chromosomów, złożonymi z powtarzających się sekwencji: TTAGGG. Ich funkcją jest ochrona chromosomów przed degradacją, fuzją końców, rearanżacjami i utratą chromosomów. Ludzkie telomery są skracane w kolej-

nych podziałach komórek somatycznych. Synteza telomerów zachodzi przy udziale kompleksów rybonukleoproteinowych zwanych telomerezami. Enzym ten odgrywa rolę w uniesmiertelnianiu komórek. Jego aktywność stwierdza się w większości komórek nowotworowych (w ok. 70 proc. typów nowotworów), nieaktywny jest natomiast w komórkach prawidłowych. Promotor genu telomerazy był już wykorzystany m.in. w terapii genowej nowotworów z użyciem proapoptotycznego genu *bax* [51].

Podstawowym problemem ograniczającym skuteczność metody jest niska wydajność wprowadzania genów. Ponieważ apoptozę wywołują nie same geny, a kodowane przez nie białka wydaje się, iż alternatywną metodą byłaby terapia wykorzystująca białka proapoptotyczne. Białka te nie posiadają jednak receptorów umożliwiających ich transport przez błonę do komórek. Próbowano więc różnych metod wprowadzania białek proapoptotycznych do komórek. Białko wirusa HIV-1 (Vpr) wprowadzano np. w pustym wirionie nie zawierającym materiału genetycznego wirusa [24]. Stwierdzono, iż białko Vpr indukuje apoptozę w różnych nowotworowych liniach komórkowych (np. HeLa), preferencyjnie jednak w komórkach intensywnie dzielących się [24].

Nowatorskim podejściem terapeutycznym mogą być próby zastosowania do wprowadzania do komórek białek proapoptotycznych połączonych z białkiem VP22. Białko to ma zdolność przemieszczania się między komórkami, a ponadto nie traci tej właściwości po fuzji z innym białkiem. Białko VP22 pochodzi z wirusa opryszczki [52]. Mechanizm jego transportu do komórek nie jest jeszcze poznany. Wiadomo jednak, że VP22 jest usuwane z komórek niezależnie od aparatu Golgiego i wchodzi do jądra sąsiadujących komórek. VP22 nie wnika do komórek na drodze endocytozy, ale wykorzystuje transport z udziałem aktywnego szkieletu. Jest w stanie wnikać zarówno do komórek w pełni zróżnicowanych, jak i dzielących się, co może mieć duże znaczenie w przypadku szybko dzielących się komórek nowotworowych. Jego unikalne właściwości być może pozwolą na wykorzystanie białek proapoptotycznych bezpośrednio w terapii nowotworów.

ZAKOŃCZENIE

W artykule przedstawiono możliwości wykorzystania w terapii genowej nowotworów genów proapoptotycznych. Mechanizm działania genów proapoptotycznych (tak jak większości leków przeciwnowotworowych i promieni joni-

zujących) polega na *kierowaniu* komórek nowotworowych na drogę apoptozy. Zastosowanie genów proapoptycznych, szczególnie pochodzenia wirusowego, przypuszczalnie pozwoli ominąć problem uszkodzenia prawidłowych tkanek. Wirusowe białka proapoptyczne indukują bowiem apoptozę selektywnie w komórkach nowotworowych.

Strategia genów i białek proapoptycznych umożliwi nie tylko bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych w wyniku programowania ich śmierci, ale też w przypadku stosowania terapii skojarzonej z radiolub chemioterapią, może polepszyć efekty terapeutyczne tych tradycyjnych metod. Generalnie, strategia genów proapoptycznych jest uważana za obiecujące podejście w leczeniu chorób nowotworowych. Badania dotyczące genów proapoptycznych – zwłaszcza pochodzenia wirusowego – są dopiero we wstępnej fazie, i trudno zatem przesądzać, czy spełnią pokładane w nich nadzieje.

PIŚMIENNICTWO

- Hengartner MO. *The biochemistry of apoptosis*. Nature 2000; 407: 770-6.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH. *Defying death after DNA damage*. Nature 2000; 407: 777-83.
- Kaufmann SH, Gores GJ. *Apoptosis in cancer: cause and cure*. BioEssays 2000; 22: 1007-17.
- Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. Cell 2000; 100: 57-70.
- Szala S. *Swoista indukcja apoptozy w komórkach nowotworowych*. Nowotwory 2000; 50: 111-21.
- Krammer PH. *CD95's deadly mission in the immune system*. Nature 2000; 407: 789-95.
- Gottlieb RA. *Mitochondria: execution central*. FEBS Lett 2000; 482: 6-12.
- Green DR, Reed JC. *Mitochondria and apoptosis*. Science 1998; 281: 1309-12.
- Grądzka I. *Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium*. Postępy Biochem 2000; 46: 2-16.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzani N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. *The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death*. Oncogene 1997; 15: 1573-81.
- Kolenko V, Uzzo RG, Bukowski R, Bander NH, Novick AC, Hsi ED, Finke JH. *Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma*. Cancer Res 1999; 59: 2838-42.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenaabeele P. *More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage*. Oncogene 1999; 18: 7719-30.
- Sperandio S, De Belle I, Bredesen DE. *An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death*. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 14376-81.
- Cai J, Jones DP. *Mitochondrial redox signaling during apoptosis*. J Bioener Biomem 1999; 31: 327-34.
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. *Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues*. Eur J Biochem 1999; 264: 687-701.
- Pedersen PL. *Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview*. J Bioener Biomem 1999; 31: 291-304.
- Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, et al. *Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death*. J Bioener Biomem 1999; 31: 305-19.
- Martin DS, Bertino JR, Koutcher JA. *ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach*. Cancer Res 2000; 60: 6776-83.
- Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, et al. *Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma*. Nature 2001; 409: 207-11.
- Danen-Van Oorschot AAM, Fischer DF, Grimbergen JM, et al. *Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 5843-7.
- Pietersen AM, Van der Eb MM, Rademaker HJ, et al. *Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene*. Gene Ther 1999; 6: 882-92.
- Shtrichman R, Kleinberger T. *Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells*. J Virol 1998; 72: 2975-82.
- Shtrichman R, Sharf R, Barr H, Dobner T, Kleinberger T. *Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 10080-5.
- Stewart SA, Poon B, Jowett JBM, Xie Y, Chen ISY. *Lentiviral delivery of HIV-1 Vpr protein induces apoptosis in transformed cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 12039-43.
- Xiang J, Gómez-Navarro J, Arafa W, Liu B, Barker SD, Alvarez RD, Siegal GP, Curiel DT. *Pro-apoptotic treatment with an adenovirus encoding Bax enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer*. J Gene Med 2000; 2: 97-106.
- Kagawa S, Gu J, Swisher SG, Ji L, Roth JA, Lai D, Stephens LC, Fang B. *Antitumor effect of adenovirus-mediated bax gene transfer on p53-sensitive and p53-resistant cancer lines*. Cancer Res 2000; 60: 1157-61.
- Dole MG, Clarke MF, Holman P i wsp. *Bcl-xS enhances adenoviral vector-induced apoptosis in neuroblastoma cells*. Cancer Res 1996; 56: 5734-40.
- Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ. *Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 13862-7.
- Watzlik A, Dufter Ch, Jung M, Opelz G, Terness P. *Fas ligand gene-carrying adeno-5 AdE-asy viruses can be efficiently propagated in apoptosis-sensitive human embryonic retinoblast 911 cells*. Gene Ther 2000; 7: 70-4.
- Kondo S, Ishizaka Y, Okada T, et al. *FADD gene therapy for malignant gliomas in vitro and in vivo*. Hum Gene Ther 1998; 9: 1599-1608.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. *Caspases: enemies within*. Science 1998; 281: 1312-6.
- Shinoura N, Koike H, Furuta T, Hashimoto M, Asai A, Kirino T, Hamada H. *Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: implication for gene therapy*. Hum Gene Ther 2000; 11: 1123-37.
- Yamabe K, Shimizu S, Ito T, Yoshioka Y, Nomura M, Narita M, Saito I, Kanegae Y, Matsuda H. *Cancer gene therapy using a pro-apoptotic gene, caspase-3*. Gene Ther 1999; 6: 1952-9.
- Dong Y-B, Yang H-L, Elliott MJ, Liu T-J, Stilwell A, Atienza C Jr, McMasters KM. *Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer efficiently induces apoptosis in melanoma cells*. Cancer 1999; 86: 2021-33.
- Liu T-J, Wang M, Breau RL, Henderson Y, El-Naggar AK, Steck KD, Sicard MW, Clayman GL. *Apoptosis induction by E2F-1 via adenoviral-mediated gene transfer results in growth suppression of head and neck squamous cell carcinoma cell lines*. Cancer Gene Ther 1999; 6: 163-71.
- Noteborn MHM. *Apoptin – induced apoptosis: a review*. Apoptosis 1999; 4: 317-9.
- Murphy AL. *Apoptin: nuclear switch triggers cancer cell death*. Gene Ther 1999; 6: 713-4.
- Zhuang SM, Shvarts A, Van Ormondt H, Jochemsen AG, Van der Eb AJ, Noteborn MHM. *Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells*. Cancer Res 1995; 55: 486-9.
- Kleinberger T. *Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein*. Apoptosis, 2000; 5: 211-5.
- Lavoie JN, Nguyen M, Marcellus RC, Branton PE, Shore GC. *E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk*. J Cell Biol 1998; 140: 637-45.
- Kleinberger T, Shenk T. *Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription*. J Virol 1993; 67: 7556-60.
- Mountain A. *Gene therapy: the first decade*. Trends Biotechnol 2000; 18: 119-28.
- Kagawa S, Pearson SA, Ji L, Xu K, McDonnell TJ, Swisher SG, Roth JA, Fang B. *A binary adenoviral vector system for expressing high levels of the proapoptotic gene bax*. Gene Ther 2000; 7: 75-9.
- Sutherland RM. *Tumor hypoxia and gene expression. Implication for malignant progression and therapy*. Acta Oncol 1998; 37: 567-74.
- Brown JM. *The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy – eighteenth Bruce F. Cain memorial award lecture*. Cancer Res 1999; 59: 5863-70.
- Dachs GU, Tozer GM. *Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation*. Eur J Cancer 2000; 36: 1649-60.
- Höckel M, Vaupel P. *Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects*. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 266-76.
- Brown JM, Giaccia AJ. *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy*. Cancer Res 1998; 58: 1408-16.
- Koshikawa N, Takenaga K, Tagawa M, Sakiyama S. *Therapeutic efficacy of the suicide gene driven by the promoter of vascular endothelial growth factor gene against hypoxic tumor cells*. Cancer Res 2000; 60: 2936-41.
- Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeida J, Yutsudo M, Inoue M. *Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells*. Cancer Res 1999; 59: 551-7.
- Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA, Fang B. *Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the bax gene to cancers*. Cancer Res 2000; 60: 5359-64.
- Brewis N, Phelan A, Webb J, Drew J, Elliott G, O'Hare P. *Evaluation of VP22 spread in tissue culture*. J Virol 2000; 74: 1051-6.
- Ealovega MW, McGinnis PK, Sumantran VN, Clarke MF, Wicha MS. *bcl-xS gene therapy induces apoptosis of human mammary tumors in nude mice*. Cancer Res 1996; 56: 1965-9.
- Pataer A, Fang B, Yu R, Kagawa S, Hunt KK, McDonnell TJ, Roth JA, Swisher SG. *Adenoviral bax overexpression mediates caspase-dependent tumor killing*. Cancer Res 2000; 60: 788-92.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DCS. *Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis*. EMBO J 1998; 17: 384-95.
- Noteborn MHM, De Boer GF, Van Roozelaar DJ i wsp. *Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle*. J Virol 1991; 65: 3131-9.

Praca została sfinansowana z grantu KBN nr 4P05A 046 15.

ADRES DO KORESPONDENCJI

mgr inż. Iwona Mitrus
Zakład Biologii Molekularnej
Centrum Onkologii – Instytut
im. M. Skłodowskiej-Curie
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15
44-101 Gliwice
e-mail: mitrus@io.gliwice.pl