

PROTEIN BCL-2 A JEHO ÚLOHA V MALIGNÍ TRANSFORMACI BUŇKY

BCL-2 PROTEIN AND ITS ROLE IN THE MALIGNANT TRANSFORMATION OF CELL

JAKUB NOVOSAD, KAROLÍNA JANKOVIČOVÁ, JAN KREJSEK

ÚSTAV KLINICKÉ IMUNOLOGIE A ALERGOLOGIE LF UK HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn: Příčinou nádorových onemocnění jsou akumulace genetických poruch v buňce. Charakteristickým rysem nádorových buněk je jejich neschopnost uskutečnit proces apoptózy. Protein Bcl-2, lokalizovaný na nitrobuňčných membránových systémech, blokuje tvorbu heterodimerů s dalšími členy rodiny proteinů Bcl-2 a vazbou na adaptorové proteiny apoptózy Apaf-1, FADD, TRADD, proces apoptózy. Fyziologicky se vyskytuje v dlouhožijících buňkách různého původu. V rozličné míře je vyjádřen v maligních buňkách hematopoetického původu, jeho exprese je patognomická pro folikulární B-NHL. Nádorové buňky s vyjádřeným proteinem Bcl-2 vykazují obvykle agresivnější vlastnosti a jsou odolné vůči terapeutickým zásahům. Bcl-2 lze proto považovat za faktor mnohočetné rezistence nádorů.

Clíčová slova: Bcl-2; apoptóza; malignity; mechanismus

Summary: The malignant transformation of cell is caused by the accumulation of genetic defects. The characteristic feature of malignant transformed cells is their inability today by apoptosis. Bcl-2 protein which is localized on intracellular membranes of cell is able to block the process of apoptosis via either heterodimers formation with another members of Bcl-2 protein family or its ability to bind to the principle adaptor proteins of apoptosis such as Apaf-1, FADD and TRADD. Bcl-2 protein is physiologically expressed in long-living cells. It is overexpressed with various intensity in malignant cells of hematopoietic origin and its presence is pathognomic for follicular B-NHL lymphomas. Malignant clones with the overexpression of Bcl-2 are more aggressive and treatment resistant. Bcl-2 is thought to be involved in multiple drug resistance of cancer cells.

Key words: Bcl-2; apoptosis; malignancy; mechanisms

Úvod

Úvahy o vztahu mezi genetickými poruchami a maligní transformací buňky jsou staré více než 100 let. Teprve kolem roku 1970 byla navržena dodnes uznávaná teorie somatické mutagenese a mnohastupňové karcinogeneze. V souladu s ní je možné považovat nádorové bujení v podstatě za genetickou chorobu. K utvoření konkrétních představ o jejím vzniku významně přispěly dva základní modely: Knudsonův model patogeneze retinoblastomu (teorie dvojího zásahu) a Vogelsteinův model vzniku kolorektálního karcinomu. K dalšímu obohacení našich vědomostí o procesu maligní transformace přispělo i studium B-nonHodgkinských lymfomů (B-NHL).

Genetické poruchy u B-NHL

B-NHL jsou velmi heterogenní skupinou maligních onemocnění, jak s ohledem na klinické ukazatele, tak patogenezi. Jsou nejčastější malignitou ve věkové skupině mezi 20.–40. rokem a jejich incidence vzrůstá, zejména s nárůstem incidence AIDS (26).

V souladu s teorií mnohastupňové karcinogeneze přicházejí v úvahu tři různé patogenetické mechanismy jejich vzniku a rozvoje: I) aktivace protoonkogenů, II) inaktivace tumor suprimujících genů, III) infekce onkogenními viry. Společná pro ně je porucha regulace buněčného růstu, tedy nepoměr mezi schopností buněk dělit se a přežívat i za nepřítomnosti růstové stimulace a jejich smrti (zejména apoptózou). Jedná se tedy o vážné narušení tkáňové homeostázy.

Většina onkogenů, patogeneticky spjatých s rozvojem těchto malignit, kóduje nukleární proteiny náležející do velké rodiny

transkripčních faktorů, s výjimkou onkoproteinu Alk, tyrozinové kinázy zapojené do transdukce signálů a onkoproteinu Bcl-2, negativního regulátoru apoptózy.

Typické asociace mezi některými skupinami B-NHL dle klasifikace REAL (Revised European-American Lymphoma) a charakteristickými změnami v expresi onkoproteinů, resp. tumor suprimujících proteinů a onkovirovými infekcemi shrnuje tabulka 1 (15).

Folikulární lymfom

Folikulární lymfom je nádorové onemocnění řadící se mezi NHL, vycházející z B-lymfocytů lymfatických folikulů, dělí se histopatologicky do několika podskupin s různým stupněm malignity, v jehož buňkách byla poprvé v roce 1985 popsána charakteristicky zvýšená exprese onkoproteinu Bcl-2 (B-cell lymphoma).

Pro 80–90% folikulárních lymfomů je charakteristická cytogenetická porucha reprezentovaná zlomem dlouhého raménka 18. chromozómu v oblasti 18q21 a jeho translokace z přísně střežené části genomu do transkripčně velmi aktivní oblasti kódující těžké řetězce imunoglobulinů (14q32), vedoucí zejména ke změně aktivity genu bcl-2.

Tato translokace t(14;18)(q32;q21) je nejčastější, existují však i dva vzácné biologické ekvivalenty, a to: t(2;18)(p11;q21) a t(18;22)(q21;q21). Asi 70% zlomů 18. chromozómu je lokalizováno v tzv. hlavní zlomové oblasti MBR (major breakpoint region), ve zbylých případech probíhá lomná linie chromozómu distálněji. Translokací genu bcl-2 z 18. na 14. chromozóm, do bezprostřední blízkosti J-segmentu IgH, vzniká

Tab.1: B lymfoproliferativní onemocnění a genové poruchy

Typ B NHL	Onkogeny					tsg		onkogenní viry	
	Bcl-1	Bcl-2	Bcl-6	c-MYC	PAX-5	REL	p53	EBV	HHV-6
SLL/B-CLL	–	–	–	–	–	–	10%	–	–
LPL	–	–	–	–	50%	–	–	–	–
MCL	70%	–	–	–	–	–	–	–	–
FL	–	90%	vzácně	–	–	–	–	–	–
DLCL	–	–	–	–	–	–	–	–	–
de novo	–	20%	30–40%	–	–	20%	–	–	–
transformovaný	–	100%	–	vzácně	–	–	90%	–	–
BL	–	–	–	–	–	–	–	–	–
sporadický	–	–	–	100%	–	–	30%	30%	–
endemický	–	–	–	100%	–	–	–	100%	–
závislý na AIDS	–	–	–	100%	–	–	60%	–	–
BCBL	–	–	–	–	–	–	–	90%	100%

Vysvětlivky:
tsg : tumor suprimující gen
SLL/B-CLL malobuněčný
lymfom / B-CLL
LPL plazmocelulární
lymfom
MCL lymfom pláštěvé zóny
FL folikulární lymfom
DLCL difúzní velkobuněčný
lymfom
BL Burkittův lymfom
BCBL lymfom tělesných
dutin

ká hybridní gen bcl-2/IgH. Fúzní protein nevzniká, dochází pouze k záměně promotorů.

Příčina a vlastní mechanismus této chromozomální translokace je nejasný. Uvažuje se o chybách enzymatického aparátu, který za fyziologických okolností provádí přeskupování genových segmentů při tvorbě receptoru pro antigen, BcR (15). Translokace t(14;18)(q32;q21) však není patognomická jen pro folikulární lymfom. Vyskytnout se dále může u chronické lymfoproliferativní choroby, u mnohočetného myelomu a u difúzního velkobuněčného lymfomu jež vznikl transformací folikulárního lymfomu následnou mutací antionkogenu p53 (15, 16). Frekvence translokace roste s věkem (31), a vyskytuje-li se v nemaligních tkáních, nemusí sama o sobě vést k jejich malignizaci (30).

Struktura a základní funkce, rodina Bcl-2

Bcl-2 je integrální membránový protein o molekulární hmotnosti 26 000 vyskytující se přirozeně na vnitřní (23) a vnější membráně mitochondrií, endoplazmatickém retikulu a na jaderné membráně (9). Typické pro jeho konformaci jsou dvě fylogeneticky vysoce konzervované oblasti – domény BH 1 a BH 2 (Bcl-2 homology), jež byly popsány i na několika dalších molekulách, sdružených tímto charakteristickým strukturálním znakem do rodiny proteinů Bcl-2 (tab. 2).

Tab. 2: Rodina proteinů Bcl-2

Funkce	Zástupci	Domény
Inhibice apoptózy	Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W	BH 4, BH 3, BH 1, BH 2
Akcelerace apoptózy	Bax, Bak, Bok	BH 3, BH 1, BH 2
Akcelerace apoptózy	Bik, Hrk, Bad	BH 3

Tyto domény jsou nejen morfologickou charakteristikou, ale jsou odpovědné zejména za dominující funkční rys této rodiny proteinů, regulaci apoptózy vzájemnou dimerizací a vytvářením funkčních (Bax / Bax) nebo nefunkčních (Bax / Bcl-2, Bcl-2 / Bcl-2) dimerů se schopností apoptózu akcelarovat, či naopak blokovat. Kromě těchto dvou domén existuje ještě doména třetí (BH 3), působící jako akcelerator apoptózy a vyskytující se N-terminálně na proteinech: Bax, Bak a Bok. Na Bcl-2 a Bcl-XL, které apoptózu významně inhibují, je vytvořena rovněž, ale je nefunkční, pravděpodobně pro svou lokalizaci nepřiléhající k N-konci molekuly.

Z této rodiny se poněkud vymykají proteiny Hrk, Bad a Bik, které nemají domény BH 1 ani BH 2, vytvářejí však funkční doménu BH 3 (25). Kromě schopnosti vytvářet homo či heterodimery (a to nejen s členy rodiny Bcl-2), vykazují proteiny rodiny Bcl-2 i další vlastnosti, z nichž některé jsou nepochybně závislé na existenci domény BH 4, popsané jako poslední

u proteinů Bcl-2, Bcl-W a Bcl-XL (43): fungují pravděpodobně jako iontové kanály, negativně ovlivňují uvolnění faktoru AIF (apoptózu indukující faktor), cytochromu c a dalších aktivních proapoptotických působků z mitochondrie. Bcl-2 navíc vykazuje významnou antioxidační aktivitu.

Mechanismus apoptózy

Apoptózu je možno definovat jako jednu z konkrétních forem geneticky řízené buněčné smrti. Jedná se o fylogeneticky vysoce konzervovaný děj, jehož principem je kaskádovitá aktivace určitých genů a jejich transkriptů. Cílem je na energii závislé hydrolytické štěpení cytoplazmatických molekul s následnou smrtí buňky. Významným momentem je zachování integrity povrchové membrány buňky po celou dobu procesu a vznik apoptotických tělísek, jež jsou fagocytována okolními buňkami bez zánětlivé odpovědi organismu.

V mnohobuněčném organismu je apoptóza za fyziologických okolností zcela nepostradatelný mechanismus regulace velikosti buněčných populací. Funkčně vytváří protíváhu mitotického dělení. Poruchy její regulace se vyskytují jak ve smyslu pozitivním, tak negativním a je možné je prokázat u mnoha onemocnění, např.: nádorových (většina), imunopatologických (např.: SLE) a neurodegenerativních onemocnění (např.: amyotrofická laterální skleróza), dále u kongenitálních malformací a zřejmě i u chorob asociovaných s věkem (jako je např.: artróza, arterioskleróza nebo Alzheimerova choroba). Je rovněž zodpovědná za odumírání buněk napadených virem (např.: AIDS) a za regulaci poškození tkáně zánětem. Z tohoto hlediska hraje protein Bcl-2 velmi významnou roli. Svým komplexním působením je schopen zabránit apoptóze i při zvýšené expresi hlavního vnitřního buněčného aktivátoru apoptózy, proteinu p53.

Pro ozřejmění účinků Bcl-2 je důležité načrtnout alespoň v hrubých rysech základní kroky apoptózy. Z časového hlediska prochází apoptotický mechanismus dvěma na sebe navazujícími fázemi. V první, signalizační, buňka zpracovává řadu proapoptotických (např.: mutace genomu, TNF α) a protiapoptotických (např.: růstové faktory) stimulů, a to buď prostřednictvím povrchových molekul (rodina receptorů pro TNF α , t.j., vnější cesta apoptózy), či cytoplazmatickým proteinem p53, hlavním receptorem genetických poruch v buňce (tj. vnitřní cesta apoptózy). Převažují-li signály proapoptotické, přechází apoptóza do své druhé, efektorové fáze, charakteristické aktivací latentních cysteinových proteináz schopných štěpit bílkovinný řetězec za aspartátem (c-asparzová aktivita) – kaspáz.

V průběhu apoptózy se vyskytuje několik klíčových bodů: 1. tvorba či aktivace tzv. adaptorových proteinů na závěr signalizační fáze, které jsou branou do fáze efektorové. Jsou jimi proteiny FADD (Fas associated death domain), TRADD (TNFR associated death domain) a Apaf-1 (apoptotic protea-

ses activating factor-1). FADD a TRADD vznikají oligomerizací C-konců aktivovaných povrchových receptorů Fas a TNF α R z rodiny receptorů pro TNF α . Apaf-1 je cytoplasmatický protein aktivovaný cytochromem c a dATP (deoxyribonukleotidtrifosfát) v průběhu vnitřní cesty apoptózy. Adaptorové proteiny následně aktivují kaspázy I. třídy, mající přítomnu aminoterminální prodoménu, sloužící k jejich vazbě na adaptorové proteiny, dimerizaci a samoštěpení. Kaspázy II. třídy, bez prodomény, jsou následně aktivovány kaspázami třídy I.

2. rozvoj oxidativního stresu z důvodu zvýšené tvorby volných kyslíkových radikálů zejména některými proteiny exprimovanými v průběhu vnitřní cesty apoptózy, tzv. PIGs (p53 induced genes) a následná oxidativní degradace některých cytoplasmatických molekul, zejména fosfolipidů membrán organel.

3. pokles mitochondriálního membránového potenciálu Ψ_m z původních asi 20 mV až k nulovým hodnotám v souvislosti s otevřením napěťově řízeného megakanálu PTP (permeability transition pore), pravděpodobně působením kalciových iontů, jejichž koncentrace se v buňce v průběhu apoptózy zvyšuje.

4. následné otevření dalších napěťově řízených kanálů, porinů VDAC (voltage dependent anion channel) situovaných rovněž na vnější mitochondriální membráně, zvyšující permeabilitu mitochondriální membrány.

5. uvolnění aktivních proapoptotických molekul z intermembránového prostoru mitochondrií, cytochromu c, AIF (apoptosis inducing factor), volných kyslíkových radikálů, kalcia a prokaspáz 9 a 3.

Na závěr je třeba zmínit, že zvýšení permeability vnější mitochondriální membrány je uzlovým bodem, ve kterém se protínají obě cesty apoptózy. Mitochondrie tak sehrává vskutku dominantní úlohu v celém procesu.

Úloha Bcl-2 v apoptóze

Onkoprotein Bcl-2 je velmi silným antagonistou apoptotických mechanismů a blokuje je hned na několika úrovních.

1. je schopen aktivně vázat adaptorové proteiny (zejména Apaf-1, ale v solubilní formě i FADD a TRADD) a tím je inaktivovat (47, 24). K reaktivaci Apaf-1 dojde opětovným uvolněním z vazby některým z proapoptotických proteinů rodiny Bcl-2, zejména Bik (Bcl-2 interacting killer), který pak zaujme vazebné místo pro Apaf-1.

2. působí jako antioxidant, a snižuje tak účinek volných kyslíkových radikálů. Jeho antioxidační účinek je tak výrazný, že u experimentálních myši s deficitem Bcl-2 došlo k hypopigmentaci pro zvýšenou aktivitu volných kyslíkových radikálů rozkládajících melanin (41).

3. působí jako iontový kanál pro kalcium, a reguluje tak jeho hladinu v cytoplazmě a tím mimo jiné ovlivňuje i aktivitu PTP a nepřímou i výši mitochondriálního membránového potenciálu (9).

4. zdá se, že N – terminálně se vyskytující doména BH 4 významně omezuje, až znemožňuje otevření porinů (VDAC) (43).

5. inhibuje uvolnění AIF (9) a tím, že vyvazuje protein Bax, nepřímou negativně ovlivňuje i uvolnění cytochromu c (46), mediované pravděpodobně homodimerem Bax / Bax.

Stěžejním bodem působení onkoproteinu Bcl-2 je jeho schopnost vytvářet neaktivní heterodimery s proapoptotickými molekulami. Znemožněna tím je nejen činnost apoptotických akceleratorů, ale i samotného proteinu Bcl-2. Z toho důvodu, důležitější než samotná hladina Bcl-2, je vzájemný poměr mezi pro a protiapoptotickými proteiny (např.: Bax : Bcl-2). Zvláštěností je jeho vlastnost tvořit vlastní nefunkční homodimery, která je však u přirozeně se vyskytujícího Bcl-2 zpochybněna (5).

Výskyt Bcl-2 za fyziologických a patologických okolností. Protein Bcl-2 se za fyziologických okolností vyskytuje například v neuronech, bazálních keratinocytech, buňkách žlázo-

vého epitelu, střevních krypt, vývodů exokrinních žláz, T-lymfocytech dřeně thymu, prekurzorech hematopoetických buněk. Obecně je možno říci, že se nachází ve všech dlouhožijících buňkách, které tímto chrání před předčasnou smrtí.

Velmi komplexně jsou změny hladiny Bcl-2 studovány u B-lymfocytů. U nezralých imunokompetentních buněk se jeho hladina snižuje. Únikem do periferní krve z primárního lymfatického orgánu B-lymfocytů (kostní dřeně) se z nezralých buněk stávají zralé, dlouho žijící B-lymfocyty, s opět zvýšenou hladinou Bcl-2. Jsou vychytávány sekundárními lymfatickými orgány, kde tvoří primární folikuly v klidové fázi. Proliferující B-lymfocyty, po kontaktu s antigenem, se od klidových liší znovu sníženou hladinou proteinu. Jsou tedy závislé na růstové stimulaci zprostředkované povrchovými receptory CD40 a působením IL-4, která jim umožňuje přežívání. Vyselektované lymfocyty se po odeznění primární odpovědi stávají pamětovými buňkami s opět vysokou hladinou Bcl-2 (36). Jiným příkladem buněk se známou kinetikou proteinu Bcl-2 jsou např. keratinocyty, které v průběhu vyžívání snižují jeho expresi až na minimum (41).

Za patologických okolností, u nádorů, je otázka výskytu Bcl-2 komplikovanější. Jedná se o projev deregulace a hladiny onkoproteinu jsou neúměrně zvýšené. Účinky Bcl-2 jsou spojené s vyšší životností nádorových buněk, vyšší odolností k léčbě a často i horší prognózou pro pacienty (8). Jeho patologicky zvýšenou expresi můžeme nalézt nejen u onemocnění spojených s translokací t(14;18), pro něž je patrně hlavním patogenetickým faktorem, ale i u celé řady dalších. Následující přehled shrnuje nejzákladnější poznatky o vlivu zvýšených hladin Bcl-2 u některých hematologických malignit na jejich průběh a prognózu.

1. **Folikulární lymfom** – vysoká nitrobuňková koncentrace Bcl-2 je pravděpodobně spouštěcím faktorem onemocnění (34, 8).

2. **Difúzní velkobuňčný lymfom** – Bcl-2 je často zvýšeně exprimován, ale nemá vliv na prognózu (44).

3. **AML** – významné zvýšení množství buněk se zvýšenou hladinou Bcl-2 při relapsech. Tento typ leukémie klinicky nejlépe koreluje se změnami v expresi Bcl-2 (4, 8).

4. **CML** – hladina Bcl-2 je signifikantně vyšší v blastické fázi onemocnění, je však spíše obrazem zmnožení populace blastů (18).

5. **ALL** – u B a T ALL je exprese Bcl-2 významně vyšší než u normálních lymfoidních progenitorů, nereflektuje však agresivitu onemocnění ani rezistenci na léčbu (6). Relativně častým nálezem je mutace genu bax (35).

6. **CLL** – vyšší hladina Bcl-2 může z části vysvětlit horší průběh CD5- B CLL (37).

Regulace Bcl-2, MDR

Současné představy o regulaci hladiny a funkce onkoproteinu Bcl-2 v buňce se opírají o tři základní momenty v jeho buněčné kinetice a dynamice. Jsou jimi: i) genová exprese, ii) dimerizace proteinu a iii) fosforylace, resp. defosforylace.

i) Exprese Bcl-2 proteinu je za fyziologických okolností přísně regulována. Zvýšení jeho hladiny je pro danou buňku selekční výhoda - je nadána vyšší schopností čelit nebezpečí smrti a je předurčena k delšímu životu. Vlastní mechanismy regulace jsou však zatím nejasné. Snižování pravděpodobně souvisí s buněčným stárnutím a diferenciací (viz. dále). Zvyšování u melanocytů, které stejně jako neurony produkují intenzivně Bcl-2, má úzkou souvislost s parakrinní produkcí cytokinu NGF (nerve growth factor) keratinocyty, indukovanou UV zářením (41).

U folikulárního lymfomu je zvýšená hladina Bcl-2 způsobená deregulací genu bcl-2 jeho translokací do aktivní oblasti genu. Zcela jistě bude existovat i řada jiných mechanismů, které způsobí genetické změny protoonkogenu bcl-2, za vzniku onkogenu bcl-2.

II) Vzájemný poměr mezi pro a protiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 je klíčový z hlediska osudu buňky, zejména nachází-li se v iniciační fázi apoptózy. Funkce onkoproteinu Bcl-2 je tak nepřímo regulována i všemi transkripčními faktory pozitivně regulujícími protein Bax (např. p53). Na buněčných kulturách byl studován účinek dvou forem neurotropního alfaviru - SV (Sindbis virus). Forma SVNI, charakteristická lytickým průběhem infekce, prokazatelně zvyšovala u napadených buněk expresi proteinu Bax, a ty pak podléhaly smrti apoptózou. Persistentní typ infekce virovou formou SVA je analogicky vysvětlována zvýšením exprese proteinu Bcl-2 (2).

III) Pro normální antiapoptotickou funkci Bcl-2 je nezbytná fosforylace serinového zbytku na pozici 70. Jedná se o dynamický proces, v němž účinkují dva antagonické enzymy, proteinová kináza Cα a proteinová fosfatáza 2A (PP2A). Ukazuje se, že aktivace mitochondriální PP2A, defosforylující Bcl-2, je jednou z možných cest vedoucích k smrti buňky apoptózou. Uvedeným mechanismem působí v buňce např. ceramid (42).

Z hlediska klinické onkologie je důležité, že schopnost nádorových buněk vyhnout se apoptóze, je spojena nejen s agresivnějším chováním nádoru, ale zpravidla znamená i selhání farmako i radioterapie (8, 9). Podle současného pohledu na mechanismus působení cytostatik či ionizujícího záření spočívá jejich hlavní účinek v nespecifickém umělém vyvolání genetických změn s následnou aktivací apoptózy, zejména vnitřní cestou (19). Onkoprotein Bcl-2 a jeho zvýšená exprese se tak stává jedním z mechanismů mnohočetné rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům (MDR- multidrug resistance) díky svému protiapoptotickému působení (9, 22, 27, 40) a jeho určení pak důležitým parametrem pro biologickou klasifikaci nádoru ve smyslu nastavení účinné léčby (8). V této souvislosti vystupuje do popředí jeho antioxidantní funkce, neboť právě oxidativní stres je považován za hlavního akcelérátora apoptózy u buněk poškozených působením cytostatik. Mechanismem je zde patrně zásahem do buněčného genomu

nastartovaná vnitřní cesta apoptózy, a tedy zvýšená exprese proteinů schopných generovat volné kyslíkové radikály. Podobně jako Bcl-2 u těchto buněk působí i některé stresové proteiny (heat shock proteins, hsp70) (7).

Je pochopitelné, že existují snahy nalézt metody k ovlivnění multirezistentního fenotypu ve smyslu snížení odolnosti proti apoptóze a senzibilizace buněk k léčbě. Využívá se faktu, že většina buněk ztrácí schopnost produkovat Bcl-2 při své diferenciaci. Úspěšně byl využit IL-6 a G-CSF v předléčbě pacientů s myeloidní leukémií, vedoucí k snížení hladin Bcl-2 a senzibilizaci buněk k cytostatikům (33). Jiné perspektivní přístupy, usilující o znovunastolení rovnováhy mezi pro a protiapoptotickými molekulami, se rýsují spolu s možností selektivní inhibice proteazómové degradace Bax proteinu (28), nebo využití chemicky upraveného analogu proteinu Bad s cílem inaktivovat Bcl-2 (48).

Závěr

Stanovení hladiny onkoproteinu Bcl-2 se zdá být parametrem významně rozšiřujícím paletu standardních diagnostických vyšetření, jež směřuje k preciznější typizaci onemocnění s možností odlišení biologicky relevantních subtypů, vyžadujících agresivnější léčbu (8).

U lymfomů s translokací t(14;18) navíc může genetická analýza sloužit ke stanovení diagnózy u morfologicky nejasných případů a ke sledování minimální reziduální choroby (15).

Onkoprotein Bcl-2, stejně jako všechny ostatní molekuly účastnící se regulace apoptózy, zastává již teď v zorném poli biomedicínského výzkumu významné postavení. Metody využívající regulaci apoptózy budou v budoucnu jistě efektivním rozšířením dosavadní palety terapeutických přístupů k dnes neřešitelným klinickým stavům.

Poděkování: Práce byla sestavena s podporou IGA MZ ČR, projekt č. XM 20-3/98.

Jakub Novosad, Ústav klinické imunologie a alergologie LF UK FN, Hradec Králové, e-mail: krejssek@fnhk.cz

Literatura:

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: Molecular biology of the cell – third edition. Garland Publishing, Inc., NY, LONDON, 1994.
2. Appel, E., et al.: Differential regulation of bcl-2 and bax expression in cells infected with virulent and nonvirulent strains of sindbis virus. *Virology*, 2000; 276(2): 238-42.
3. Barclay, A.N., et al.: The leucocyte antigen- facts book. Academic Press Ltd., London, 1993.
4. Bensi, L., et al.: Bcl-2 oncoprotein expression in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 1995; 80: 98-102.
5. Conus, S., et al.: Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints. *EMBO J.*, 2000; 19(7): 1534-1544.
6. Coustan – Smith, E., et al.: Clinical relevance of bcl-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1996; 87(3): 1140-1146.
7. Creagh, E.M., et al.: Heat shock proteins – modulators of apoptosis in tumour cells. *Leukemia*, 2000; 14: 1161-1173.
8. Di Giuseppe, J., Kastan, M.B.: Apoptosis in haematological malignancies. *J. Clin. Pathol.*, 1997; 50: 361-364.
9. Dive, C.: Avoidance of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *J. Int. Med.*, 1997; 242: 139-145.
10. Driver, A.S., et al.: Age – related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol*, 2000; 22(2): 175-181.
11. Eckschlanger, T. a kol.: Průtoková cytometrie v klinické praxi. Grada, Praha, 1. vydání, 1999.
12. Favier, A.: Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker. *Ann. Biol. Clin.*, 1997; 55(1): 9-16.
13. Fraser, A., Evan, G.: A licence to kill. *Cell*, 1996; 85(6): 781-784.
14. Friedlander, R.R., et al.: Caspase inhibitor protects against ALS in transgenic mouse model. *Science*, 2000; 288: 283-284, 335-339.
15. Gaidano, G.: Molecular genetics of malignant lymphoma. *Rev. Clin. Exp. Hematol.*, 1997; 2: 27-44.
16. Gordon, W., et al.: 154 chromosome anomalies in hematologic malignancies. *Leukemia Research*, 2000; 24: 487-489.
17. Hamblin, T.J., Oscier, D.G.: Chronic lymphocytic leukaemia: the nature of leukaemic cell. *Blood Rev.*, 1997; 11: 119-128.
18. Handa, H., et al.: Bcl-2 and c-myc expression, cell cycle kinetics and apoptosis during the progression of chronic myelogenous leukemia from diagnosis to blastic phase. *Leuk. Res.*, 1997; 21(6): 479-489.
19. Hannun, Y.A.: Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*, 1997; 89(6): 1845-1853.
20. Harris, C.C.: Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1996; 88(20): 1442-1455.
21. Hatina, J., Sykes, B.: Lékařská genetika- problémy a přístupy. Academia, Praha, 1. vydání, 1999.
22. Hickman, J.A.: Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur. J. Canc.*, 1996; 32A(6): 921-926.
23. Hockenberger, D., et al.: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990; 348(6299): 334-336.
24. Hu, Y., et al.: Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1 dependent caspase – 9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998; 95: 4386-4391.
25. Inohara, N., et al.: Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival – promoting proteins Bcl-2 and Bcl-XL. *EMBO J.*, 1997; 16(7): 1686-1694.
26. Klener, P., et al.: Vnitřní lékařství. Galén, Karolinum Praha, 1. vydání, 1999.
27. Lehnert, M.: Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur. J. Canc.*, 1996; 32A(6): 912-920.
28. Li, B., Dou, Q.P.: Bax degradation by the ubiquitin/proteasome – dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97(8): 3850-3855.
29. Li, P., et al.: Cytochrome c and dATP – dependent formation of Apaf/caspase – 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997; 91: 479-489.
30. Limpens, J., et al.: Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene*, 1991; 6(12): 2271-6.
31. Liu, Y., et al.: BCL-2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91(19): 8910-4.
32. Lorenzo, H.K., et al.: Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase – independent effector of cell death. *Cell Death Differ.*, 1996; 6: 516-524.
33. Lotem, I., Sachs, L.: Control of apoptosis in hematopoiesis and leukemia by cytokines, tumor suppressor and oncogenes. *Leukemia*, 1996; 10: 925-931.

34. Lust, J.A.: Molecular genetics and lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Lab. Anal.*, 1996; 10: 359-368.
35. Meijerink, J.P., et al.: Hematopoietic malignancies demonstrate cross-of-function mutations of BAX. *Blood*, 1998; 91(8): 2991-7.
36. Mokry, J.: Vývoj B-lymfocytů v primárních a sekundárních lymfatických orgánech. *Lék. Zpr. LF UK HK*, 1997; 42(5-6): 111-120.
37. Molica, S., et al.: Comparative flow cytometric evaluation of bcl-2 oncoprotein in CD 5+ and CD 5- B-cell lymphoid chronic leukemias. *Haematologica*, 1997; 82: 555-559.
38. O'Brien, S., Del Giglio, A., Keating, M.: Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1995; 85(2): 307-318.
39. Polyak, K., et al.: A model for p53 - induced apoptosis. *Nature*, 1997; 389(9): 300-305.
40. Preisler, H.D.: Multidrug resistance is more than MDR 1 activity. *Leuk. Res.*, 1995; 19(7): 429-431.
41. Raskin, C.A.: Apoptosis and cutaneous biology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1997; 36(6): 885-896.
42. Ruvolo, P.P., et al.: Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274(29): 20296-300.
43. Shimizu, S., et al.: BH 4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage - dependent anion channel and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97(7): 3100-3105.
44. Tang, S.C., et al.: Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *J. Clin. Oncol.*, 1994; 12(1): 149-54.
45. Troll, H., et al.: Purification, functional characterization, and cDNA sequencing of mitochondrial porin from Dictyostelium discoideum. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267(29): 21072-9.
46. Tsujimoto, Y.: Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosis or mitochondria? *Genes Cells*, 1998; 3(11): 697-707.
47. Vaux, D.L.: Immunopathology of apoptosis - introduction and overview. *Springer Sem. Immunol.*, 1998; 19: 271-278.
48. Wang, J.L., et al.: Cell permeable bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res.*, 2000; 60(6): 1498-1502.
49. Warren, H.S., Smith, M.J.: NK cells and apoptosis. *Immun. Cell Biol.*, 1999; 77: 64-75.
50. Wyllie, A.: Clues in the p53 murder mystery. *Nature*, 1997; 389(9): 237-238.
51. Yanker, B.A., et al.: Amyloid beta - precursor interaction mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.*, 2000; 3: 460-464.
52. Zou, H., et al.: Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c - dependent activation of caspase - 3. *Cell*, 1997; 90(3): 405-13.

