

Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách

Programmed Cell Death in Cancer Cells

Ondroušková E., Vojtěšek B.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Rezistence k indukci smrti je jedním z charakteristických znaků nádorové buňky, jež ovlivňuje od počátku jak samotný proces neoplastické transformace, tak i pozdější odpověď na onkologickou léčbu. Cílem tohoto přehledového článku je shrnout recentní informace o programované buněčné smrti zdravých i nádorových buněk a o nových možnostech protinádorové terapie zacílené na tyto signální dráhy. Podrobněji jsou popsány tři hlavní typy: apoptóza, programovaná nekróza a buněčná smrt spojená s autofagií. Především apoptóza hraje významnou roli nejen při neoplastické transformaci buňky, ale i jako jeden z faktorů určujících úspěšnost protinádorové terapie. V textu je podán přehled hlavních signálních drah a molekul podílejících se na regulaci apoptózy ve zdravých buňkách. Většina nádorových buněk nese mutace v proteinech přímo či nepřímo se účastnících indukce a exekuce buněčné smrti, jako jsou proteiny p53, členové rodiny Bcl-2, proteiny inhibující apoptózu (IAPs), receptory/ligandy smrti a další. U těchto významných regulátorů jsou popsány jejich nejčastější mutace či změny exprese vyskytující se v buňkách konkrétních typů nádorů. Na závěr je podán přehled některých nových léčiv zaměřených na modulaci programované buněčné smrti, jež právě procházejí klinickými zkouškami. Díky intenzivnímu výzkumu je možné stále detailnější porozumění procesům, které v umírající buňce probíhají, a na jejich základě pak lze navrhovat léčiva nové generace, jež v kombinaci s tradiční terapií umožní významné zlepšení odpovědi na protinádorovou terapii.

Klíčová slova

programovaná buněčná smrt – apoptóza – nekroptóza – autofagie – kaspázy – Bcl-2

Summary

Resistance to programmed cell death is one of the hallmarks of cancer cells that affects the process of malignant transformation as well as response to cancer therapy. The goal of this review is to summarize recent information about programmed cell death (PCD) in healthy and cancer cells, as well as new perspectives for anticancer treatments targeting these signaling pathways. Three main types of PCD are described in detail: apoptosis, necrosis/necroptosis and cell death associated with autophagy. Among them, apoptosis plays the key role in both malignant transformation and response to therapy. In this review, we describe main signaling pathways and molecules participating in apoptosis regulation in healthy cells. In most cancer cells, mutations or aberrant expression of proteins directly or indirectly involved in induction and execution of cell death can be detected – p53, Bcl-2 family proteins, inhibitors of apoptosis, death receptors/ligands and other proteins. Mutations or changes in expression of these proteins and their relation to certain types of tumors are described. Finally, we provide a review of recently developed treatments that target and reactivate the machinery of programmed cell death and are currently tested in clinical trials.

Key words

programmed cell death – apoptosis – necroptosis – autophagy – caspases – Bcl-2

Práce byla podpořena grantem Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky (OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) a MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic (RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101) and by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



Mgr. Eva Ondroušková, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: eva.ondrouskova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 14. 1. 2014

Přijato/Accepted: 6. 3. 2014

Úvod

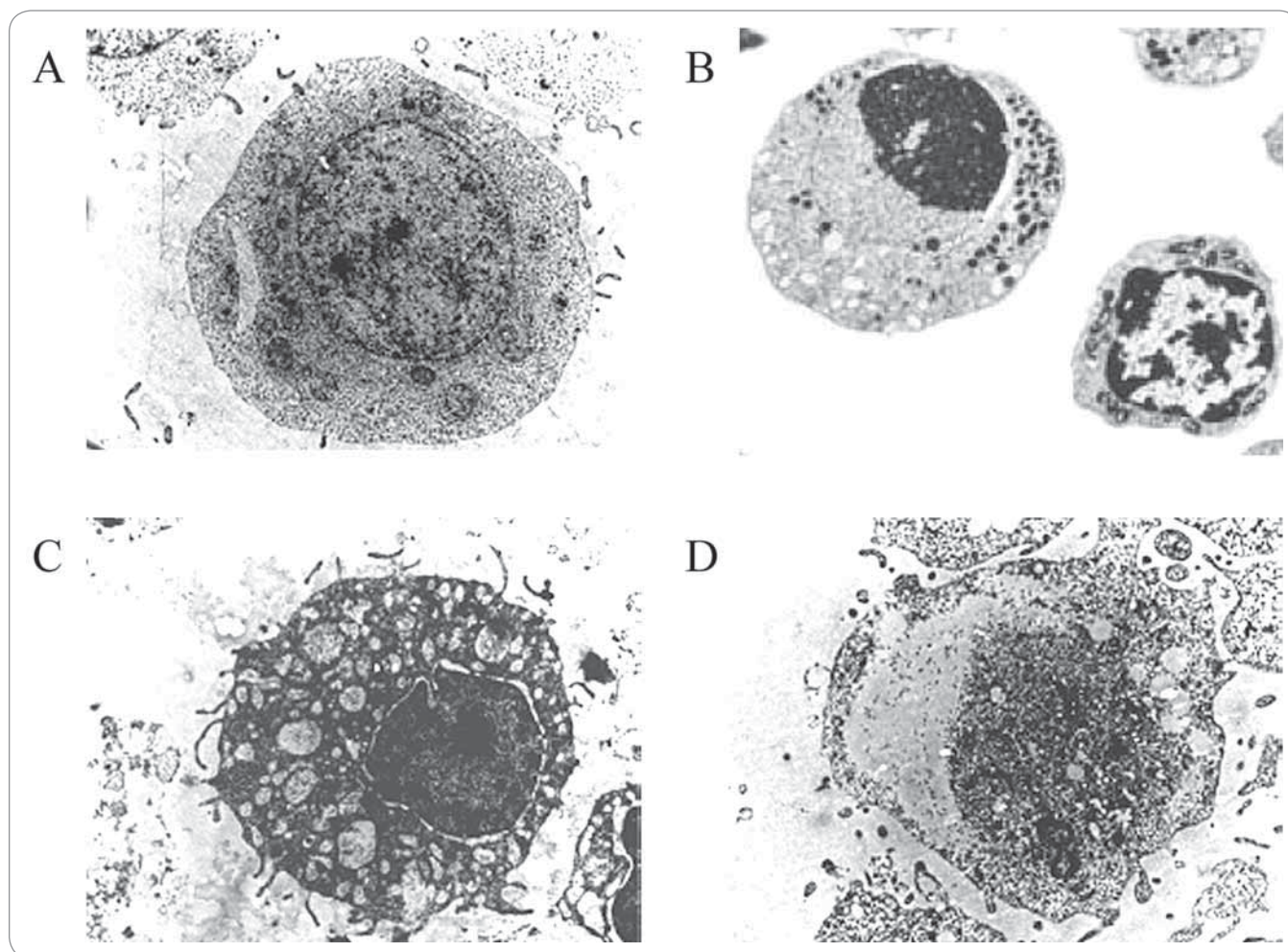
Proces postupné přeměny normální buňky v nádorovou ústí ve fatální změnu jejích vlastností souvisejících především s regulací růstu, schopností přežít a šířit se v organismu. Tyto základní vlastnosti maligních buněk jsou popsány v respektovaném článku Hanahana a Weinberga [1]. Mezi nejdůležitější charakteristické znaky nádorové buňky tito autoři zařadili i její schopnost uniknout indukci programované buněčné smrti. Nádorové buňky produkují řadu signálů, které za normálních okolností aktivují signální dráhy vedoucí k eliminaci těchto buněk – obsahují poškozenou DNA, aktivované onkogeny, jsou vystaveny oxidačnímu stresu atd. Ty z nich, které získají mutace umožňující zablokovat proces

jejich odstranění programovanou buněčnou smrtí, vytváří rezistentní klony a v organismu dále přežívají a neregulovaně se množí.

Převládající paradigma nádorové terapie předpokládá, že buňky, které jsou citlivé k indukci apoptózy, budou na léčbu odpovídat lépe než ty, jež jsou k indukci apoptózy a tím i k léčbě rezistentní. Základní výzkum, jenž odhaluje signální dráhy a mechanismy klasické apoptózy i alternativních typů buněčné smrti, poskytuje znalosti, na základě kterých lze vyvíjet nová léčiva a kombinovat je s tradiční protinádorovou terapií. Tato nová léčiva jsou většinou zaměřena na reaktivaci apoptotické dráhy a zvyšují tak úspěšnost eliminace nádorových buněk, jež by jinak byly k indukci smrti více rezistentní.

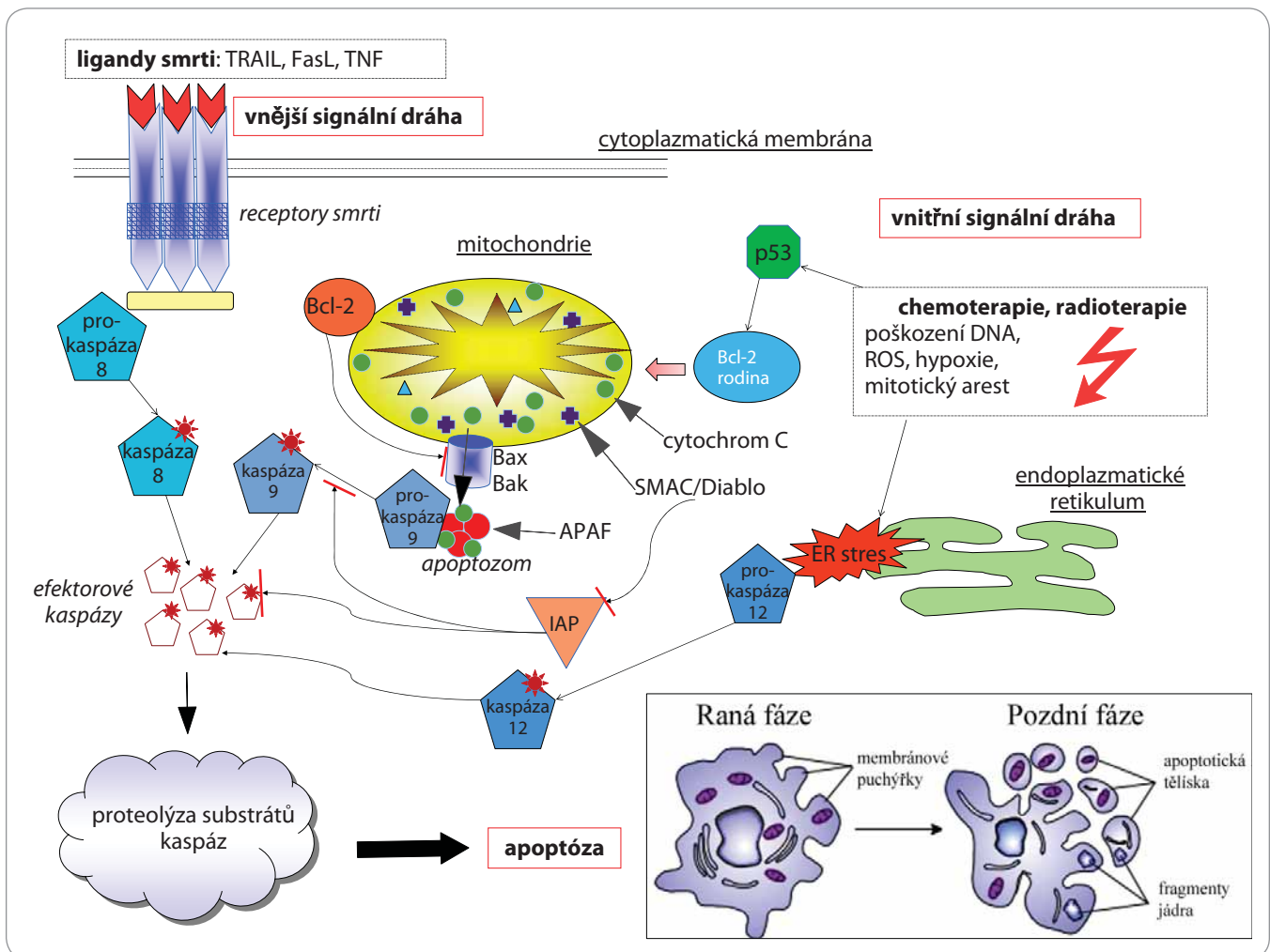
Typy programované buněčné smrti

Podle toho, jaké morfologické a jiné znaky umírající buňka vykazuje, lze programovanou buněčnou smrt (programmed cell death – PCD) klasifikovat do některého ze základních typů [2]. Morfologie buňky může být apoptotická, nekrotická, autofagická či spojená s mitózou. Historicky nejstarší typ identifikované PCD je apoptóza, popsaná již před více než 40 lety [3]. Nekroptóza a buněčná smrt asociovaná s autofagií jsou další dva typy PCD popsané u nejrůznějších typů buněk. Typická morfologie normální, apoptotické, autofagické a nekrotické buňky, nasnímaná na elektronovém mikroskopu, je na obr. 1. Pro úplnost: čtvrtý oficiálně uznávaný, ač vy-



Obr. 1. Buňka s normální, apoptotickou, autofagickou a nekrotickou morfologií.

Nasnímáno elektronovým mikroskopem, zvětšení 4 400 \times , upraveno dle [91]. U zdravé buňky pozorujeme obvyklý tvar jádra i celé buňky (A), u apoptotické chromatin kondenzovaný v jádře a zmenšení objemu buňky (B), u autofagické výrazně vakuolizovanou cytoplazmu a jádro bez kondenzovaného chromatinu (C) a u nekrotické ztrátu integrity membrány a buněčného obsahu (D).



Obr. 2. Vnější a vnitřní signální dráha při apoptotické signalizaci.

Podrobnosti viz text. Upraveno dle [92,93].

soce specifický typ programované buněčné smrti je tzv. kornifikace neboli tvorba zrohovatělé vrstvy kůže z mrtvých keratinocytů v pevném proteinovém obalu [4]. Další typy buněčné smrti, které jsou v literatuře často uváděny (anoikis, excitotoxicita, Wallerova degradace, mitotická katastrofa, paraptóza, pyroptóza, entóza a pyronekróza), se zatím nedoporučuje klasifikovat jako samostatné druhy programované buněčné smrti [2].

Kromě morfologických znaků jsou dalším kritériem funkční aspekty, kterými rozlišujeme buněčnou smrt fyziologickou, patologickou, náhodnou či programovanou. Enzymologicky pak lze určit, do jaké míry jsou aktivovány nukleázy a proteázy různých tříd. Aktivace různých typů buněčné smrti se v jednot-

livých buňkách vzájemně nevyklučuje, naopak mohou spolupracovat či sdílet některé signální molekuly [5]. Jsou-li např. makrofágy ve tkáních vystaveny různým stresorům, je většinou současně indukováno více typů buněčné smrti, přičemž apoptóza probíhá nejrychleji, zatímco autofagie nebo nekróza jsou obvykle pozorovatelné až v případech, kdy je apoptóza inhibována [6].

Apoptóza

Termín „apoptosis“ jako první použil J. F. Kerr při objevu a popsání regulované buněčné smrti [3]. Buňka umírající apoptózou vykazuje charakteristické morfologické změny, které ji odlišují od nekrózy – kondenzace a fragmentace chromatinu v jádře, tvorba výběžků cytoplazmatické membrány (membránové

puchýřky), celkové zmenšení a zakulacení buňky a v pozdních fázích rozpad celé buňky do tzv. apoptotických tělísek [2]. Tato tělíska obsahují stále funkční orgány, fragmenty kondenzovaného jádra a udržují si intaktní membránu, která se od membrány zdravých buněk liší přítomností fosfatidylserinu na její vnější straně [7]. To umožňuje rozpoznání a následné pohlčení apoptotických tělísek sousedními buňkami či buňkami imunitního systému [8]. Z biochemického hlediska jsou v umírající buňce typicky aktivovány proteolytické enzymy – kaspázy, které štěpí řadu cílových proteinů, a nukleázy, degradující DNA.

Aby buňka mohla zahájit proces své vlastní eliminace, musí obdržet odpovídající signály. Na obr. 2 jsou zjednodušeně znázorněny dvě hlavní signální

kaskády vedoucí k apoptóze v savčích buňkách. Vnější dráha je aktivována vazbou ligandů smrti (TRAIL, FasL, TNF) na receptory smrti (DR4/DR5, Fas, TNFR a další), které tvoří trimery, a přes další adaptorové proteiny aktivují prokaspázu-8, případně prokaspázu-10 [9,10]. Vnitřní dráha je odpovědná za iniciaci apoptózy v případě neopravitelného poškození DNA. Je to tedy dráha aktivovaná obvykle při onkologické terapii, a proto bude popsána detailněji. Do její regulace se zapojuje celá řada pro- i anti-apoptotických proteinů. Poškození DNA vede ke stabilizaci a aktivaci proteinu p53, který apoptotický signál dále přenáší především prostřednictvím regulace proteinů rodiny Bcl-2 [11]. Role proteinu p53 v regulaci apoptotické dráhy je komplexnější a pro podrobnější studium odkazujeme na přehledové články jiných autorů [12,13].

Zásadní událostí v klasické apoptotické signalizaci je částečná permeabilizace mitochondriální membrány, jež vede k uvolnění pro-apoptotických molekul z mezimembránového mitochondriálního prostoru do cytozolu. Do procesu uvolňování těchto proteinů z mitochondrií významně zasahují další proteiny přítomné v membráně mitochondrií nebo v cytoplasmě, především ty z rodiny Bcl-2 [14,15]. Tato rodina, do které bylo doposud zařazeno 25 proteinů, je charakterizována přítomností BH-domén (Bcl-2 homology) v jejich struktuře. Podle jejich funkce se rozlišují na anti-apoptotické (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1), pro-apoptotické efektorové (Bak, Bax), pro-apoptotické přímé aktivátory (Bid, Bim) či nepřímé aktivátory (Bad, Bik, BMF, HRK, Puma, Noxa) [16]. Aktivátory Bid a Bim po přijetí apoptotického signálu indukují oligomerizaci Bak a Bax, což vede k jejich translokaci z cytoplazmy do membrány mitochondrií a k vytvoření pórů ve vnější mitochondriální membráně. Pro-apoptotické a anti-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 mohou tvořit dimery pomocí BH-3 domény, a tím se navzájem inaktivovat [17,18]. Vzájemný poměr a interakce pro- a anti-apoptotických členů rodiny Bcl-2 tedy rozhoduje o tom, zda bude apoptotická dráha inhibována či posilována. Cytochrom c,

uvolněný z mezimembránového prostoru mitochondrií, se v cytoplasmě spojuje s proteinem Apaf-1 a prokaspázou-9 a v tomto komplexu zvaném apoptozom je prokaspáza-9 štěpena na aktivní kaspázu-9 [19,20]. Z mitochondrií jsou dále uvolňovány proteiny SMAC/DIABLO, ARTS či proteáza Omi/HtrA2, které vážou a inaktivují anti-apoptotické proteiny IAPs přítomné v cytoplasmě (inhibitor of apoptosis; NAIP, c-IAP1/HIAP-2, c-IAP2/HIAP-1, XIAP/hILP, Survivin and BRUCE) [21–23]. Proteiny AIF (apoptosis-inducing factor) a endonukleáza G, rovněž uvolňované z mitochondrií, mohou realizovat program buněčné smrti i v nepřítomnosti kaspáz [24]. Další organela, která může zasahovat do regulace apoptotické signální dráhy, je endoplazmatické retikulum, jež jako odpověď na stres aktivuje prokaspázu-12 [25]. Rovněž lysozomy se mohou účastnit regulace PCD, protože některé stimuly buněčné smrti vedou k částečné permeabilizaci lysozomální membrány, uvolnění proteolytických enzymů do cytozolu a jejich aktivnímu přispění k aktivaci kaspáz [26,27].

Aktivované signální kaspázy-8, -9, -10 a -12 dále aktivují tzv. efektorové kaspázy zajišťující inaktivační či aktivační štěpení řady proteinů, jako jsou regulátory apoptózy, proteiny související s buněčnou adhezí, cytoskeletem, strukturou jádra, buněčným cyklem, opravou a syntézou DNA atd. [28], což nakonec vyústí v úspěšnou eliminaci buňky poškozené nebo z jiných důvodů určené k likvidaci.

Buněčná smrt spojená s autofagií

Autofagie je vysoce konzervativní mechanismus pro degradaci větších objemů buněčného materiálu, včetně celých organel. Poprvé byla popsána Christianem de Duve, který zavedl pojem „*autophagy*“ jako výstižný popis schopnosti buňky strávit a znovu využít své vlastní části (z řečtiny „*autos*“ = sebe, „*phagein*“ = požídat) [29]. Rozlišujeme makroautofagii, mikroautofagii a autofagii zprostředkovanou chaperony [30]. Při makroautofagii (dále jen „autofagie“) jsou organely, dlouho-žijící proteiny nebo agregáty uzavírány do dvoumembránových útvarů zvaných autofago-

zomy, které následně fúzí s lysozomy, a jejich obsah je v nich lysozomálními proteázami degradován [31]. Katabolické produkty jsou pak buňkou znovu recyklovány v biosyntetických procesech, nebo dále degradovány a využity jako zdroj energie v případě, že buňka hladoví. Celý proces je regulován skupinou genů označovaných *ATG* (*autophagy-related genes*) a je detailně popsán např. v přehledovém článku Rosenfeldta a Ryana [32].

Autofagie je především mechanismus, který buňce umožňuje přežití stresových podmínek, jakými jsou nedostatek živin nebo indukce nekrotické smrti v rakovinných buňkách či při ischemicko-reperfúzním poškození tkání [33]. Její role v nádorových buňkách je nejasná a zřejmě závisí na stadiu nádorového onemocnění. Zatímco v raných fázích autofagie spíše suprimuje vývoj nádoru, protože odstraňuje poškozené organely a proteiny s nesprávnou, potenciálně škodlivou konformací [34], v pozdějších stadiích naopak zřejmě pomáhá rakovinným buňkám vyrovnat se se stresovými podmínkami, jako je nedostatek živin či oxidativní stres [35]. Tzv. autofagická buněčná smrt je charakterizována výrazným nárůstem počtu autofagických vakuol v buňce, bez kondenzace jaderného chromatinu, ukončená její smrtí [36]. Ačkoliv je akumulace autofagických vakuol v cytoplasmě často pozorována u buněk umírajících po aplikaci chemoterapie nebo radioterapie, není zcela prokázáno, zda je autofagie v těchto případech příčinou smrti, anebo jen doprovodným jevem [2]. Přímý důkaz, že autofagie může skutečně vést ke smrti konkrétních buněk *in vivo*, byl zatím podán pouze při vývoji slinných žláz *Drosophily*, ve kterých zablokování genů nezbytných pro autofagii vedlo k inhibici vývojové degradace těchto buněk [37]. I pokud by ale autofagie nebyla přímým vykonavatelem buněčné smrti, vzhledem k časté detekci autofagických vakuol v umírajících buňkách zřejmě hraje v tomto procesu důležitou roli, a proto je i nadále nadějným cílem pro vývoj nových léčiv.

Nekroptóza

Za pasivní formu buněčné smrti byla vždy považována nekroza. Ta je charak-

terizována rychlou a neregulovanou ztrátou integrity plazmatické membrány a buněčným kolapsem, ačkoliv integrita jádra zůstává poměrně dlouho zachována. V posledních letech se však objevily studie prokazující, že alespoň část buněk s nekrotickou morfologií umírá regulovaným procesem zvaným programovaná nekróza nebo také nekroptóza [38]. Nekrotická smrt je pro buňku nejen záložní postup v případech, kdy je apoptóza z nějakého důvodu zablokována, ale má i svůj fyziologický význam např. jako obranný mechanismus při virových infekcích. Z hlediska vlivu na nádorové buňky je nekrotická buněčná smrt dvousečnou zbraní. Nekróza vznikající jakožto důsledek chemoterapie přispívá k usmrcování nádorových buněk s defekty v apoptotické dráze. Na druhou stranu lokální zánětlivé procesy způsobené vyplavením obsahu nekrotických buněk např. z hypoxických oblastí nádoru spíše podporují angiogenezi a proliferaci nádorových buněk.

Nekroptózu můžou v buňkách aktivovat různé stimuly: IFN γ , nedostatek ATP, přítomnost patogenů, ischemicko-reperfúzní poškození tkání, dvouřetězcová RNA (dsRNA) a vazba tzv. ligandů smrti (TNF α , TRAIL, FasL) na příslušný receptor [39]. Za normálních okolností tato vazba receptoru a ligandu vede k sestavení proteinového komplexu obsahujícího kaspázu-8, adaptorový protein FADD a kinázu RIP1 (receptor-interacting serine-threonine kinase 1) a následně ke spuštění apoptózy prostřednictvím signální kaskády zahrnující aktivovanou kaspázu-8 [40]. Jestliže jsou však kaspázy z nějakého důvodu inaktivní, je do tohoto proteinového komplexu zahrnuta i kináza RIP3. Kinázy RIP1 a RIP3 vzájemně interagují pomocí RIP-homotypické interakční domény. K této interakci dochází pouze v případě aktivace nekroptotické signální dráhy, jež může být blokována specifickým inhibitorem RIP1-kinázové aktivity – nekrostatinem [41]. Protein RIP1 je spíše znám svou účastí při aktivaci proteinu NF- κ B [42], a je tedy zřejmě důležitý účastník rozhodování, zda buňka přežije díky aktivaci NF- κ B nebo zda bude eliminována apoptotickým, resp. nekroptotickým mechanismem. Síť pro-

teinů zasahujících do regulace programované nekrózy se díky novým poznatkům stále rozrůstá a zahrnuje dále např. PARP1, PAR polymery, NADPH oxidázy a kalpainy [43].

Pro-nekrotický komplex RIP1–RIP3 následně interaguje s metabolickými enzymy a zvyšuje uhlovodíkový a glutaminový metabolismus, což je doprovázeno zvýšením množství reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS) [44]. Právě ROS se zřejmě u většiny buněčných typů významně podílí na exekuční fázi nekrotického usmrcení buňky [45]. Biochemických změn probíhajících v nekrotické buňce je ale celá řada a většina z nich je fatální. Proto zatím nelze přesně říci, které z nich jsou pro osud buňky nejvíce zásadní a určující [46].

Mutace regulátorů programované buněčné smrti v nádorových buňkách

Úspěch chemoterapeutické léčby, která je často zacílena na DNA, je z podstatné části ovlivněn schopností buněk opravovat poškozenou DNA a také aktivovat eliminační apoptotický proces. V nádorových buňkách je mutována celá řada proteinů, jež přímo či nepřímo ovlivňují rezistenci buněk k indukci buněčné smrti. Pro jejich podrobný popis však není v tomto přehledovém článku dost prostoru. Jsou to např. proteiny p53, Ras, Raf, Src, NF- κ B, HSPs a mnoho dalších.

V nádorových buňkách byly detekovány mutace proteinů, které jsou přímou součástí jak vnější apoptotické signální dráhy (vzácněji), tak vnitřní signální kaskády od mitochondriálních regulátorů po kaspázy. Jejich detailnějšímu popisu se budeme dále věnovat.

Receptory smrti

Buněčná smrt indukovaná Fas receptorem může být inhibována tvorbou rozpustného Fas, nedostatečnou expresí Fas na povrchu buňky, nadměrnou expresí inhibičních proteinů (Fas-associated phosphatase-1 nebo FLIP) či mutací v primární struktuře Fas [47–49]. Mutace ve Fas receptoru byly poprvé popsány u mnohčetného myelomu [50] a jsou detekovány v různých typech lymfomů [51].

TRAILem indukovaná apoptóza může být blokována expresí tzv. decoy recep-

torů pro TRAIL, nadměrnou expresí inhibičních proteinů (FLIP) nebo mutací v primární struktuře DR4 a DR5 [52]. Mutace TRAIL-R1 a TRAIL-R2 receptorů byly detekovány např. u metastáz prsních karcinomů, nemalobuněčných prsních karcinomů či nádorů hlavy a krku [53–55].

Rodina Bcl-2

Bcl-2 protein byl původně objeven v buňkách B-lymfomu, v nichž je v důsledku chromozomální translokace t(14;18) jeho gen fúzován se silným promotorem imunoglobulinu. Díky tomu je jeho hladina výrazně zvýšena [56]. Zvýšená hladina Bcl-2 byla pozorována i v solidních nádorech, jako jsou nádory plic, prsu a mozku. Důvodem zvýšené transkripce jsou pravděpodobně hypometylace promotoru či ztráta příslušných miRNA, které negativně regulují expresi *bcl-2* [57].

Vysoká hladina exprese proteinu Bcl-XL byla zjištěna v buňkách mnohčetných myelomů a lymfomů [58]. Zvýšený počet kopií genů *bcl-xl* a *mcl-1* byl dále detekován v řadě jiných nádorů, např. plic a kostí [59].

Také pro-apoptotické proteiny rodiny Bcl-2 mohou zastávat funkci nádorových supresorů. Jejich snížené hladiny v důsledku mutací (Bim, Puma) či epigenetických modifikací (Puma) byly totiž popsány u B-lymfomů nebo Burkittova lymfomu [59–61]. Mutovaný Bax byl zachycen např. u nádorů gastrointestinálního traktu a v leukemiích [62,63].

Apaf-1

Snížená hladina Apaf-1, detekovaná v metastatických melanomech, je spíše důsledek epigenetického umlčení exprese *apaf-1* než mutace v jeho kódující sekvenci [64]. Snížená hladina Apaf-1 je znak špatné prognózy u pacientů s B typem chronické lymfocytické leukemie, pokud se vyskytuje současně s mutací v proteinu p53 [65].

IAPs

Chromozomální region 11q21–22, kódující *CIAP1* a *CIAP2*, je amplifikován v mnoha typech nádorových tkání – hepatocelulárním karcinomu, karcinomu prsu, meduloblastomu, a v karcinomech slinivky, plic, děložního hrdla či

Tab. 1. Přehled potenciálních léčiv, zaměřených na regulátory apoptózy, jež v současné době procházejí klinickými zkouškami.

Cílová molekula	Název preparátu	Princip účinku	Typy testovaných nádorů (www.clinicaltrials.gov)	Klinické zkoušky	Literatura
TRAIL receptory	Mapatumumab (HGS-ETR1)	agonistická TRAIL-R1 protilátka	non-Hodgkinův lymfom, hepatocelulární karcinom, nemalobuněčný typ karcinomu plic (NSCLC), mnohočetný myelom, karcinom děložního hrdla	fáze 2	[76]
	Lexatumumab (HGS-ETR2)	agonistická TRAIL-R2 protilátka	solidní nádory dětí	fáze 1	[77]
	Apomab	agonistická TRAIL-R2 protilátka	non-Hodgkinův lymfom (australiancancertrials.gov.au)	fáze 2	[78]
	Dulanermin (PRO1762)	agonistický fragment proteinu Apo2L/TRAIL	non-Hodgkinův lymfom, kolorektální karcinom	fáze 2	[79]
kaspáza-3	Immunocasp 3	HER2 protilátka fúzovaná s kaspázou-3	buněčná linie lidského lymfomu	preklinické	[80]
	Ad-G/iCasp3	adenovirus s chemicky inducibilní kaspázou-3	buněčné linie nádoru prostaty	preklinické	[81]
IAP	LY2181308	antisense oligonukleotid proti Survivinu	akutní myeloidní leukemie, NSCLC, nádory prostaty	fáze 1	[82]
	AEG35156	antisense oligonukleotid proti XIAP	hepatocelulární karcinom, solidní nádory dospělých, myelomonocytická akutní leukemie	fáze 1, 2	[83]
	AEG40826	malomolekulární pan-IAP inhibitor	solidní nádory dospělých	fáze 1	[84]
	LCL161	malomolekulární pan-IAP inhibitor	solidní nádory dospělých	fáze 1	[85]
	Birinapant	malomolekulární pan-IAP inhibitor	myelodysplastický syndrom, nádory vaječníků	fáze 1	[84]
Bcl-2 rodina	Oblimersen (Genasense)	antisense oligonukleotid proti Bcl-2	akutní myeloidní leukemie, SCLC, chronická lymfocytická leukemie, nádory mléčné žlázy, non-Hodgkinův lymfom a další	fáze 3	[86]
	Obatoclox	malomolekulární inhibitor anti-apoptotických členů rodiny Bcl-2	leukemie (mastocytóza), lymfomy, SCLC	fáze 2	[87]
	Gossypol	malomolekulární inhibitor anti-apoptotických členů rodiny Bcl-2	SCLC, glioblastom, nádory prostaty, mozku, lymfomy	fáze 2	[88]
	Navitoclax	BH3-mimetika, uvolnění pro-apoptotických BH3 proteinů	SCLC, lymfomy, solidní nádory dospělých	fáze 2	[89]
autofagie	Chloroquine + deriváty	inhibuje lyzozomální enzymy a tím i autofagii	nádory slinivky břišní, mozku, mléčné žlázy, mnohočetný myelom a další	fáze 1, 2	[90]

jícnu [66]. Asi u 30 % MALT lymfomů je detekována chromozomální translokace t(11;18) (q21;q21), díky které vzniká chimerický protein N-terminální sekvence cIAP2 spojené s C-terminální sekvencí MALT1 [67]. V lymfocytech mohou IAP proteiny zřejmě naopak působit protinádorově. Mutace v jejich kódujících

sekvencích byly totiž zachyceny v mnohočetných myelomech [68] nebo lymfoproliferativních onemocněních [69].

Kaspázy

Z prozatím testovaných typů nádorových onemocnění byly mutace kaspázy-8 (v kódující sekvenci, intronech

a 3' nepřekládané oblasti) nejčastěji zachyceny v pokročilých stádiích nádorů žaludku [70]. Snížená exprese v důsledku hypermetylace promotoru byla popsána u relabujících glioblastomů, což naznačuje, že kaspáza-8 může mít vliv na vývoj tohoto typu nádorů [71]. Inaktivační mutace kaspáz-3 a -7 byly pouze sporadicky

zachyceny u solidních nádorů různých typů [72,73]. Polymorfismus v regionu regulace transkripce kaspázy-3 byl popsán v buňkách karcinomu skvamózních buněk hlavy a krku [74]. V myších se za-blokovanou tvorbou kaspáz nebyla de-tekována zvýšená incidence nádorových onemocnění. Tyto výsledky tedy nasvěd-čují spíše tomu, že mutace jednotlivých kaspáz nepatří mezi hlavní příčiny neo-plastické transformace buněk [75].

Přehled testovaných léčiv založených na reaktivaci programované buněčné smrti

Při onkologické terapii jsou nejčastějším cílem léčiv proliferativní mechanismy a onkogenní signály podporující přeží-vání nádorových buněk. Vývoj novějších léků je mimo jiné zaměřen na reaktivaci apoptotických signálních drah, a to jak vnější, tak především vnitřní, jež by mohly vést k úspěšné regresi nádoru. Hlavní cí-lové molekuly vytipované pro léčbu, prin-cip účinku preparátu a fáze klinických zkoušek, ve kterých jsou nejnadějnější preparáty testovány, jsou shrnuty v tab. 1.

Závěr

Nádorová onemocnění jsou dlouho-době druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR po nemocech srdce a cév. I přes na-růstající incidenci se u nás daří stabilizo-vat mortalitu díky časnějšímu záchytu onemocnění a také díky novým léčeb-ným metodám. Poznatky základního vý-zkumu na molekulární a buněčné úrovni přináší nové možnosti přesného a efek-tivního zacílení léčby, mimo jiné i na pro-teiny apoptotické signální dráhy, jejíž reaktivace by mohla vést ke zlepšení od-povědi na protinádorovou terapii.

Literatura

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P et al. Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16(1): 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239–257.
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(4): 328–340.
- Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and

- apoptosis. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 22): 5259–5268. doi: 10.1242/jcs.115865.
- Martinet W, Schrijvers DM, Herman AG et al. Z-VAD-fmk induced non-apoptotic cell death of macrophages. *Autophagy* 2006; 2(4): 312–314.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013–2026.
- Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998; 5(7): 551–562.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381): 1305–1308.
- Wachman K, Pop C, van Raam BJ et al. Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry* 2010; 49(38): 8307–8315. doi: 10.1021/bi100968m.
- Michalak EM, Villunger A, Adams JM et al. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ* 2008; 15(6): 1019–1029. doi: 10.1038/cdd.2008.16.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol* 2011; 223(2): 116–126. doi: 10.1002/path.2784.
- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ et al. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 2010; 9(45): 145–152.
- Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* 2003; 7(3): 249–257.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004; 303(5660): 1010–1014.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Lambi F et al. The Bcl-2 family reunion. *Molecular Cell* 2010; 37(3): 299–310. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.025.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E et al. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(17): 7834–7838.
- Vela L, Gonzalo O, Naval J et al. Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *J Biol Chem* 2013; 288(7): 4935–4946. doi: 10.1074/jbc.M112.422204.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR et al. The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275(5303): 1132–1136.
- Zou H, Henzel WJ, Liu A 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): 405–413.
- Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13(3): 239–252.
- Du C, Fang M, Li Y et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102(1): 33–42.
- Gottfried Y, Rotem A, Lotan R et al. The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. *EMBO J* 2004; 23(7): 1627–1635.
- Schafer P, Scholz SR, Gimadutdinov O et al. Structural and functional characterization of mitochondrial EndoG, a sugar non-specific nuclease which plays an important role during apoptosis. *J Mol Biol* 2004; 338(2): 217–228.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403(6765): 98–103.
- Beneš P, Větvíčka V, Fusek M. Cathepsin D – many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68(1): 12–28. doi: 10.1016/j.critrevonc.2008.02.008.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23(16): 2881–2890.
- Fisher U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10(1): 76–100.

- de Duve CH, Wattiaux R. Functions of lysosome. *Annu Rev Physiol* 1966; 28: 435–492.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147(4): 728–741. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 814–822. doi: 10.1038/ncb0910-814.
- Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32(7): 955–963. doi: 10.1093/carcin/bgr031.
- Esposito DD, Domart MC, Sebagh M et al. Autophagy is induced by ischemic preconditioning in human livers formerly treated by chemotherapy to limit necrosis. *Autophagy* 2010; 6(1): 172–174.
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21(11): 1367–1381.
- Yang S, Wang X, Contino G et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 2011; 25(7): 717–729. doi: 10.1101/gad.2016111.
- Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2679–2688.
- Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* 2007; 131(6): 1137–1148.
- Degterev A, Huang Z, Boyce M et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005; 1(2): 112–119.
- Vanlangenakker N, Bertrand MJM, Bogaert P et al. TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members. *Cell Death Dis* 2011; 2(11): e230. doi: 10.1038/cddis.2011.111.
- Scaffidi C, Kirchhoff S, Kramer PH et al. Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(3): 277–285.
- Degterev A, Hitomi J, Germscheid M et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008; 4(5): 313–321. doi: 10.1038/nchembio.83.
- Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 2008; 132(3): 344–362. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45(6): 478–498. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- Zhang DW, Shao J, Lin J et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009; 325(5938): 332–336. doi: 10.1126/science.1172308.
- Lin Y, Choksi S, Shen HM et al. Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 2004; 279(11): 10822–10828.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(10): 700–714. doi: 10.1038/nrm2970.
- Natoli G, Ianni A, Constanzo A et al. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene* 1995; 11(6): 1157–1164.
- Irmiler M, Thome M, Hahne M et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388(6638): 190–195.
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995; 268(5215): 1347–1349.
- Landowsky TH, Qu N, Buyuksal I et al. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997; 90(11): 4266–4270.
- Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with

- extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998; 92(9): 3018–3024.
52. Bin L, Thorburn J, Thomas LR et al. Tumor-derived mutations in the TRAIL receptor DR5 inhibit TRAIL signaling through the DR4 receptor by competing for ligand binding. *J Biol Chem* 2007; 282(38): 28189–28194.
53. Lee SH, Shin MS, Kim HS et al. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 1999; 59(22): 5683–5686.
54. Shin MS, Kim HS, Lee SH et al. 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* 2001; 61(13): 4942–4946.
55. Fisher MJ, Virmani LW, Aplenc R et al. Nucleotide substitution in the ectodomain of TRAIL receptor DR4 is associated with lung cancer and head and neck cancer. *Clin Cancer Res*; 7(6): 1688–1697.
56. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J et al. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229(4720): 1390–1393.
57. Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2011; 18(9): 1414–1424. doi: 10.1038/cdd.2011.17.
58. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 1994; 54(21): 5501–5507.
59. Beroukhi R, Mermel C, Porter D et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010; 463(7283): 899–905. doi: 10.1038/nature08822.
60. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 2005; 24(8): 1348–1358.
61. Garrison SP, Jeffers JR, Yang C et al. Selection against PUMA gene expression in Myc-driven B-cell lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 2008; 28(17): 5391–5402. doi: 10.1128/MCB.00907-07.
62. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275(5302): 967–969.
63. Meijerink JP, Smetsers TF, Sloetjes AW et al. Bax mutations in cell lines derived from hematological malignancies. *Leukemia* 1995; 9(11): 1828–1832.
64. Soengas MS, Capoienci P, Polsky D et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409(6817): 207–211.
65. Sturm I, Bosanquet AG, Radetzki S et al. Silencing of Apaf-1 in B-CLL results in poor prognosis in the case of concomitant p53 mutation. *Int J Cancer* 2006; 118(9): 2329–2336.
66. Dubrez L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as target for drug development in oncology. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 1285–1304.
67. Garrison JB, Samuel T, Reed JC. TRAF2-binding BIR1 domain of c-IAP2/MALT1 fusion protein is essential for activation of NF-kappaB. *Oncogene* 2009; 28(13): 1584–1593. doi: 10.1038/nc.2009.17.
68. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12(2): 115–130.
69. Filipovich AH, Zhang K, Snow AL et al. X-linked lymphoproliferative syndromes: brothers or distant cousins? *Blood* 2010; 116(18): 3398–3408. doi: 10.1182/blood-2010-03-275909.
70. Soung YH, Lee JW, Kim SY et al. Caspase-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(3): 815–821.
71. Martinez R, Setien F, Voelter C et al. CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis* 2007; 28(6): 1264–1268.
72. Soung YH, Lee JW, Kim SY et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Hum Genet* 2004; 115(2): 112–115.
73. Soung YH, Lee JW, Kim HS et al. Inactivating mutations of CASPASE-7 gene in human cancers. *Oncogene* 2003; 22(39): 8048–8052.
74. Chen K, Zhao H, Hu Z et al. CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2008; 14(19): 6343–6349. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1198.
75. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 2011; 18(9): 1441–1449. doi: 10.1038/cdd.2011.30.
76. Greco FA, Bonomi P, Crawford J et al. Phase 2 study of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody which targets and activates the TRAIL receptor-1 in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 61(1): 82–90. doi: 10.1016/j.lungcan.2007.12.011.
77. Zhang I, Zhang X, Barrisford GE et al. Lexatumumab (TRAIL-receptor 2 mAb) induces expression of DR5 and promotes apoptosis in primary and metastatic renal cell carcinoma in a mouse orthotopic model. *Cancer Lett* 2007; 251(1): 146–157.
78. Zinonos I, Labrinidis A, Lee M et al. Apomab, a fully human agonistic antibody to DR5, exhibits potent antitumor activity against primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(10): 2969–2980. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0745.
79. Soria JC, Mark Z, Zatloukal P et al. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(33): 4442–4451. doi: 10.1200/JCO.2011.37.2623.
80. Jia LT, Zhang LH, Yu CJ et al. Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3. *Cancer Res* 2003; 63(12): 3257–3262.
81. Shariat SF, Desai S, Song W et al. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: a novel „death switch“ gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61(6): 2562–2571.
82. Tanioka M, Nokihara H, Yamamoto N et al. Phase I study of LY2181308, an antisense oligonucleotide against survivin, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68(2): 505–511. doi: 10.1007/s00280-010-1506-7.
83. Schimmer AD, Estey EH, Borthakur G et al. Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2009; 27(28): 4741–4746. doi: 10.1200/JCO.2009.21.8172.
84. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(8): 561–574. doi: 10.1038/nrc2889.
85. Qin Q, Zuo Y, Yang X et al. Smac mimetic compound LCL161 sensitizes esophageal carcinoma cells to radiotherapy by inhibiting the expression of inhibitor of apoptosis protein. *Tumor Biol* 2014; 35(3): 2565–2574. doi: 10.1007/s13277-013-1338-2.
86. O'Brien S, Moore JO, Boyd TE et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5208–5212. doi: 10.1200/JCO.2009.22.5748.
87. Goard CA, Schimmer AD. An evidence-based review of obatoclax mesylate in the treatment of hematological malignancies. *Core Evid* 2013; 8: 15–26. doi: 10.2147/CE.542568.
88. Baggstrom MQ, Qi Y, Koczywas M et al. A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(10): 1757–1760. doi: 10.1097/JTO.0b013e31822e2941.
89. Rudin CM, Hann CL, Garon EB et al. Phase II study of single-agent navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(11): 3163–3169. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3090.
90. Chaabane W, User SD, El-Gazzah M et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp* 2013; 61(1): 43–58. doi: 10.1007/s00005-012-0205-y.
91. Ondroušková E, Souček K, Horváth V et al. Alternative pathways of programmed cell death are activated in cells with defective caspase-dependent apoptosis. *Leuk Res* 2008; 32(4): 599–609.
92. Walker NI, Harmon BV, Gobé GC et al. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 1988; 13: 18–54.
93. Brown M, Wilson G. Apoptosis genes and resistance to cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003; 2(5): 477–490.