

Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych w badaniu mechanizmów molekularnych indukowanych onkogenami: implikacje kliniczne

Tomasz Skórski

Małgorzata Nieborowska-Skórska

Uniwersytet Thomasa Jeffersona

Filadelfia

Zakład Cytologii Klinicznej

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego

Warszawa

1. Wstęp

Oligonukleotydy antysensowe (antysensy) hamujące wybiórczo ekspresję genu docelowego znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach mających na celu poznanie funkcji danego genu i jego produktu — białka. Dzięki wybiórczemu zahamowaniu genu docelowego za pomocą antysensów można ustalić, które funkcje komórek oraz białek/genów są od niego zależne. Aby potwierdzić dane uzyskane za pomocą strategii antysensowej, badaliśmy zmiany zachodzące w komórkach, w których ekspresja genu/białka była wywoływana sztucznie (transfekcja). Jeżeli używając tych dwóch przeciwstawnych strategii (zahamowanie lub wywołanie ekspresji genu) uzyskiwaliśmy przeciwstawne wyniki, pozwalało nam to upewnić się, że dane zjawisko biologiczne rzeczywiście istnieje, a nie jest artefaktem eksperymentalnym. Z przeprowadzonych badań staraliśmy się wyciągnąć praktyczne wnioski co do możliwości zastosowania antysensów w hamowaniu wzrostu nowotworów. Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych do badania mechanizmów molekularnych indukowanych przez onkogenne kinazy tyrozynowe, a także co z tego może wyniknąć w aspekcie klinicznym, przedstawimy na przykładzie wyników własnych, jak również i innych autorów w aspekcie badań nad przewlekłą białaczką szpikową (PBSz), której bezpośrednią przyczyną jest onkogenna kinaza tyrozynowa BCR/ABL.

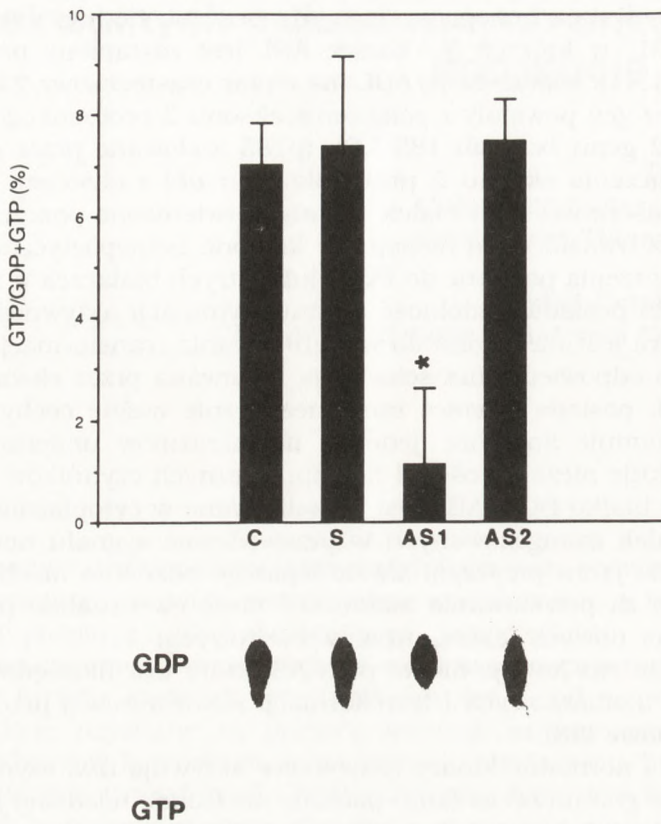
2. Podstawy molekularne

Chromosom Filadelfia wykrywany u większości pacjentów z PBSz i u niektórych pacjentów z ostrymi białaczkami jest wynikiem translokacji chromo-

somowej t(9,22) (17,22,31,53). W wyniku tej translokacji wskutek połączenia fragmentu drugiego eksonu protoonkogenu *c-abl* obecnego na chromosomie 9 z fragmentem pierwszego, drugiego lub trzeciego eksonu genu *bcr* na chromosomie 22, powstają onkogeny – hybrydy *bcr/abl*. Kodują one białka – hybrydy BCR/ABL, w których N – koniec ABL jest zastąpiony przez fragment białka BCR (11,41). Białko BCR/ABL ma ciężar cząsteczkowy 210 kDa (p210 kodowane przez gen powstały z połączenia eksonu 2 protoonkogenu *abl* z eksonem 3 lub 2 genu *bcr*) lub 185 kDa (p185 kodowane przez gen powstały w wyniku połączenia eksonu 2 protoonkogenu *abl* z eksonem 1 genu *bcr*). Onkogenne właściwości tych białek zostały potwierdzone poprzez wykazanie, że geny *bcr/abl* transformują niedojrzałe komórki hemopoetyczne *in vitro* (14) i indukują schorzenia podobne do PBSz lub ostrych białaczek u myszy (7,16). p210 oraz p185 posiadają zdolność do autostymulacji aktywności kinazy tyrozynowej, która jest niezbędna do wyindukowania transformacji nowotworowej. Jest za to odpowiedzialna sekwencja kodowana przez ekson 1 genu *bcr* (34). BCR/ABL posiada również inne niezmiernie ważne cechy dla rozwoju białaczki – hamuje apoptozę (jeden z mechanizmów umierania komórek) (50) oraz indukuje niezależność od hemopoetycznych czynników wzrostowych (24). Ponieważ białko BCR/ABL jest zlokalizowane w cytoplazmie, identyfikacja innych białek zaangażowanych w przewodzenie sygnału nowotworowego z cytoplazmy do jądra przyczyni się do lepszego poznania mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie białaczki i może ewentualnie przyczynić się do wynalezienia nowych leków antynowotworowych.

Protoonkogen *ras* koduje białko p21RAS, które jest niezbędne dla stymulacji podziałów komórkowych i transformacji nowotworowej przez onkogenne kinazy tyrozynowe (28).

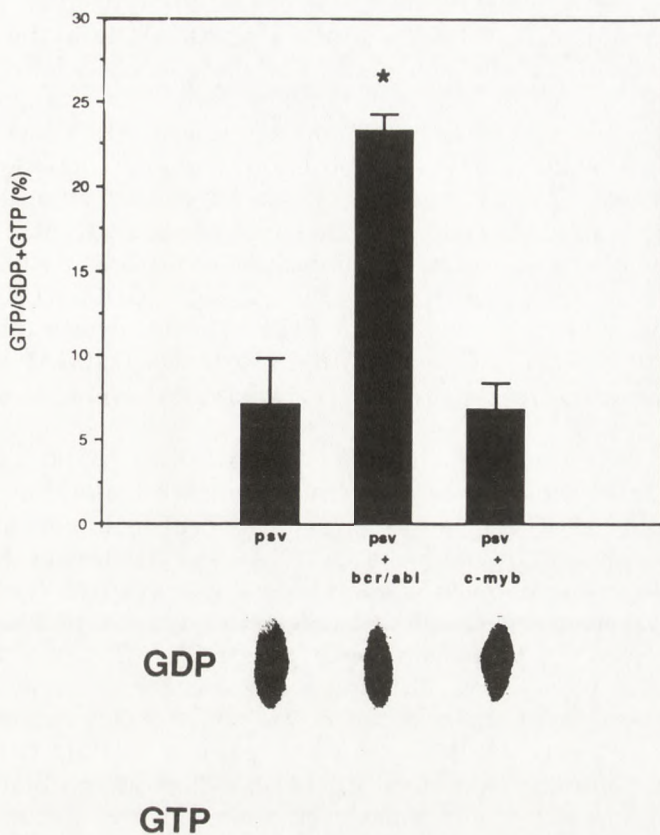
Onkogenne i normalne kinazy tyrozynowe aktywują tzw. czynnik uwalniania nukleotydu guaninowego (ang. *guanine nucleotide releasing factor* = GRF) poprzez interakcję z białkiem mostkowym GRB – 2 (10). Stymuluje to aktywację p21RAS poprzez zwiększenie w komórce jego ilości związanej z GTP (p21RAS – GTP) w stosunku do ilości nieaktywnego p21RAS związanego z GDP (p21RAS – GDP). Sugeruje to, że p21RAS może być zaangażowany w proliferację prawidłowych komórek hemopoetycznych jak i komórek PBSz. Rzeczywiście udało się nam udowodnić, używając koktajlu oligonukleotydów antysensowych, hamujących ekspresję protoonkogenów H –, K –, i N – ras (wszystkie kodują białka p21RAS), że obecność p21RAS jest niezbędna dla proliferacji komórek PBSz (43) i prawidłowych (49). Co więcej, wykazaliśmy, że aktywacja p21RAS w komórkach PBSz jest zależna od BCR/ABL. Zahamowaniu ekspresji BCR/ABL w komórkach białaczkowych przez oligonukleotydy antysensowe towarzyszyło zmniejszenie aktywacji p21RAS (rys. 1); indukcja ekspresji BCR/ABL w fibroblastach stymulowała aktywację p21RAS (rys. 2). Podobne badania wykonaliśmy regulując ekspresję protoonkogenu *c – MYB*, który znajduje się poniżej p21RAS w kaskadzie przewodzenia sygnału. Tak jak należało się spodziewać nie wykazaliśmy wpływu ekspresji *c – MYB* na aktywację p21RAS. Wynika z tego, że zwiększenie aktywacji p21RAS przez



Rys.1. Wpływ zahamowania ekspresji BCR/ABL za pomocą oligonukleotydów antysensowych na aktywację p21RAS w komórkach białaczkowych. Komórki białaczkowe, których wzrost jest zależny od obecności BCR/ABL, były inkubowane ze swoistymi oligonukleotydami antysensowymi (AS1) hamującymi ekspresję BCR/ABL, z oligonukleotydami sensowymi (S) nie wpływającymi na ekspresję BCR/ABL, ze swoistymi oligonukleotydami antysensowymi (AS2), hamującymi ekspresję protoonkogenu c - MYB, lub były inkubowane bez oligonukleotydów (C). Następnie badano w tych komórkach aktywność p21RAS.

BCR/ABL jest zjawiskiem swoistym, a ten typ strategii eksperymentalnej może być używany do określania miejsca danego białka w kaskadzie przewodzenia sygnału wewnątrz komórki. Inna grupa badaczy wykazała równocześnie, że BCR/ABL aktywuje p21RAS poprzez interakcję z GRB - 2 (35).

Dwa inne białka oprócz GRB-2/GRF, białko indukujące aktywność GTPazy p21RAS (ang. *GTPase activating protein* = p120GAP) oraz kinaza 3 - fosfatidyloinozytolu (ang. *phosphatidylinositol 3 - kinase* = PI 3-k) mogą odgrywać ważną rolę w regulacji p21RAS przez BCR/ABL. p120GAP jest szczególnie



Rys. 2. Wpływ wywołania ekspresji BCR/ABL poprzez transfekcję fibroblastów plazmidem zawierającym cDNA kodujące onkogen *bcr/abl*. Komórki tk-ts13 transferowano pustym plazmidem (psv), plazmidem zawierającym cDNA kodujące onkogen *bcr/abl* (psv+bcr/abl) lub plazmidem zawierającym cDNA kodujące protoonkogen *c-myb* (psv+c-myb). Następnie badano w tych komórkach aktywność p21RAS.

interesujące, gdyż może się łączyć zarówno z p21RAS jak i z BCR/ABL (44,55). p120GAP posiada dwa białka towarzyszące p62 and p190, które są fosforylowane w komórkach PBSz (9) oraz w normalnych komórkach stymulowanych niektórymi cytokinami (25). Zgodnie z naszymi wstępnymi wynikami fosforylacja p62 i p190 w komórkach PBSz jest zależna od aktywności kinazy tyrozynowej BCR/ABL (43). Hamując ekspresję BCR/ABL za pomocą oligonukleotydów antysensowych, a także wywołując ekspresję BCR/ABL w fibroblastach poprzez ich transfekcję wykazaliśmy, że fosforylacja p190 i p62 towarzyszyła aktywności tej kinazy tyrozynowej.

p120GAP może hamować aktywność p21RAS poprzez stymulację jego wewnętrznej zdolności do hydrolizy GTP do GDP (55), co powoduje powrót p21RAS do jego nieaktywnej formy (p21RAS – GDP). Aktywność p120GAP może być hamowana przez p190. Wykazano, że p120GAP, który posiada domeny SH2 (odpowiedzialne za interakcję białko-białko poprzez selektywne wiązanie się do krótkich swoistych sekwencji aminokwasów zawierających fosforylowaną tyrozynę, serynę lub treoninę), może wiązać p190 fosforylowane na serynie. p120GAP w kompleksie z p190, które musi być dodatkowo fosforylowane także na tyrozinie, przejawia mniejszą aktywność stymulacji hydrolizy p21RAS – GTP do p21RAS-GDP (27). Sugeruje to, że BCR/ABL może stymulować fosforylację p190 i tworzenie kompleksów p120GAP-p190, co powoduje zmniejszenie hydrolizy p21RAS – GTP do p21RAS – GDP. p120GAP, jak już wspomnieliśmy, poprzez swoje domeny SH2 p120GAP wiąże także autofosforylowane białka BCR/ABL, co stwarza możliwość, że p120GAP może być bezpośrednio zaangażowany w proces przewodzenia sygnału stymulującego z BCR/ABL.

Nie było natomiast wiadomo czy te białka (p120GAP, p190, p62) odgrywają rzeczywiście jakąkolwiek rolę w proliferacji komórek białaczkowych i prawidłowych. Używając strategii antysensowej w celu zahamowania ekspresji p120GAP wykazaliśmy, że ekspresja p120GAP jest niezbędna do wzrostu komórek PBSz oraz normalnych komórek hemopoetycznych szeregu mielo –, erytro – i megakariocytarnego (44). Świadczy to o tym, że p120GAP jest zaangażowany nie tylko w przewodzenie sygnału z BCR/ABL, ale także z aktywowanych ligandem receptorów dla hemopoetycznych czynników wzrostowych. Bardzo intrygujące jest to, że zgodnie z naszymi przewidywaniami, BCR/ABL reguluje zdolność p120GAP do stymulacji hydrolizy GTP do GDP związanego z p21RAS (43). Hamując ekspresję BCR/ABL w komórkach białaczkowych za pomocą oligonukleotydów antysensowych wykazaliśmy, że towarzyszy temu wzrost aktywności p120GAP do indukcji hydrolizy p21RAS – GTP do p21RAS – GDP oraz odwrotnie, transfekcja fibroblastów za pomocą BCR/ABL zmniejsza tę aktywność p120GAP.

Podsumowując, w naszej hipotezie zakładamy, że oba zjawiska: 1) **stymulacja aktywacji** p21RAS poprzez GRB – 2/GRF; 2) **hamowanie inaktywacji** p21RAS poprzez zmniejszenie aktywności p120GAP, są zależne od aktywności kinazy tyrozynowej BCR/ABL i odgrywają główną rolę w proliferacji komórek PBSz.

Na podstawie naszych nie publikowanych jeszcze wyników badań uzyskanych za pomocą oligonukleotydów antysensowych przypuszczamy, że białka p62 i p190, które jak już wspomnieliśmy towarzyszą p120GAP, są zaangażowane w proliferację komórek białaczkowych. Aby potwierdzić te wyniki transfekujemy komórki białaczkowe plazmidami zawierającymi cDNA kodujące dłuższe sekwencje antysensów dla p62 i p190. Pierwsze eksperymenty, jak się wydaje, potwierdzają wyniki uzyskane za pomocą oligonukleotydów antysensowych.

Kinaza 3 – fosfatydyloinozytolu (PI 3-k) także może współdziałać z BCR/ABL

w regulacji aktywacji p21RAS. PI 3-k była odkryta jako białko o aktywności fosforylującej PI na pozycji D-3' w pierścieniu inozytoli (4). PI 3-k jest heterodimerem składającym się z dwóch podjednostek: p85 i p110. p85 zawiera między innymi domenę SH3 i dwie domeny SH2, które są przedzielone fragmentem składającym się z dwustu aminokwasów nazwanym inter-SH2 (iSH2) (20). p85 działa jako białko mostkowe, ponieważ jest odpowiedzialne za interakcję PI 3-k z aktywowanymi receptorowymi i cytoplazmatycznymi kinazami tyrozynowymi, ale samo nie przejawia aktywności enzymatycznej. Interakcja ta zachodzi poprzez oddziaływanie domeny SH2 obecnej na podjednostce p85 i fragmentu drugiego białka zawierającego fosforylowaną tyrozyne. Region iSH2 wiąże podjednostkę p110, która jest odpowiedzialna za aktywność enzymatyczną PI 3-k. Mechanizm regulacji aktywności PI 3-k przez aktywowane kinazy tyrozynowe nie jest w pełni poznany. Prawdopodobnie wiązanie p85 do aktywowanej kinazy tyrozynowej indukuje zmiany w konformacji przestrzennej p85, które stymulują aktywność enzymatyczną podjednostki p110.

Zainteresowanie PI 3-k wzrosło po udowodnieniu, że aktywność PI 3-k jest zależna od fazy cyklu komórkowego i transformacji nowotworowej. Doświadczenia z mutantami protoonkogenów *src* i *abl* wykazały istnienie wyraźnej korelacji pomiędzy aktywnością PI 3-k, indukowanej przez onkogen, a transformacją nowotworową (3). Co więcej, mutant receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor- β receptor* = PGDGF- β R), który nie może łączyć się z PI 3-k, nie jest także zdolny do indukcji mitozy po stymulacji ligandem (12). PI 3-k jest najprawdopodobniej również niezbędna do wzrostu komórek układu immunohematologicznego, gdyż stymulacja komórek swoistymi ligandami receptorów dla erytropoetyny, IL - 2, GM - CSF, M - CSF lub receptora limfocytów T (TCR/CD3) również aktywuje PI 3-k (36). Zgodnie z naszymi wynikami uzyskanymi za pomocą oligonukleotydów antysensowych, proliferacja normalnych komórek hemopoetycznych szeregu czerwokrwinkowego i białokrwinkowego, w przeciwieństwie do megakariocytów, wymaga obecności p85 (T. Skórski, dane nie publikowane).

Aktywność PI 3-k jest immunoprecypitowana razem z BCR/ABL (51) co sugeruje, że PI 3-k może brać udział w przewodzeniu sygnału z BCR/ABL i w proliferacji komórek PBSz. Nasze najnowsze badania, jak się wydaje, w pełni potwierdzają tę hipotezę. Wykazaliśmy, że aktywność enzymatyczna PI 3-k jest regulowana przez BCR/ABL, bowiem zahamowanie ekspresji BCR/ABL za pomocą oligonukleotydów antysensowych spowodowało zmniejszenie aktywności enzymatycznej PI 3-k, natomiast fibroblasty transfekowane BCR/ABL wykazują zwiększoną aktywność PI 3-k. Obecność podjednostki p85 jest także niezbędna do wzrostu komórek PBSz, gdyż zmniejszenie ekspresji p85 za pomocą oligonukleotydów antysensowych hamowało ich proliferację (T. Skórski, dane nie publikowane). p85 obecne w komórkach PBSz jest immunoprecypitowane razem z p120GAP, co sugeruje możliwość wzajemnego oddziaływania pomiędzy tymi białkami, a także BCR/ABL w kompleksie BCR/ABL - p120GAP-p85 (PI 3-k ?). Ostatnio wykazano także, że aktywność PI 3-k może interferować z aktywacją p21RAS (42).

Niedawne odkrycie, że kinaza serynowo/treoninowa p74RAF, kodowana przez protoonkogen *c-raf-1*, wiąże się bezpośrednio do aktywowanego p21RAS (p21RAS - GTP) przez koniec aminowy oraz do aktywowanych mitogenem kinaz białkowych (ang. *mitogen activated protein kinases* = MAPKK, Mek) przez koniec karboksylowy (26), stwarza możliwość, że zarówno p74RAF jak i p120GAP mogą być białkami docelowymi dla p21RAS. Oligonukleotydy antysensowe zmniejszające ekspresję p74RAF, hamowały wzrost komórek PBSz. Udział p74RAF w proliferacji komórek PBSz, jak się wydaje, może potwierdzać również inne spostrzeżenia: 1) aktywne na stałe mutanty p74RAF są onkogenne (37), 2) ekspresja nieaktywnego mutantu p74RAF hamuje zarówno onkogenezę jak i wzrost komórek prawidłowych (21), 3) zahamowanie ekspresji p74RAF hamuje przekazywanie sygnału z receptora dla PDGF (19), 4) IL - 3 i GM - CSF indukują szybką fosforylację i aktywację p74RAF (5). Tworzenie kompleksów p74RAF - MAPKK zależy od aktywacji p21RAS. Powstały kompleks stymuluje z kolei aktywowane mitogenem kinazy białkowe (ang. *mitogen activated protein kinases* = MAPK) (8). Interakcja p21RAS - p120GAP również aktywuje MAPK. MAPK są fosforylowane przez hemopoetyczne czynniki wzrostowe, takie jak: IL - 3, GM - CSF, SCF (KL) (32). MAPK są zlokalizowane w cytoplazmie i jądrze i do pełnej aktywacji wymagają fosforylacji tyrozyny i treoniny przez MAPKK. Mogą one być odpowiedzialne za fosforylację białka jądrowego c - MYC kodowanego przez protoonkogen *c - myc* (40) i są zaangażowane w proliferację komórek (33). Białko c - MYC posiada na końcu aminowym domenę aktywującą transkrypcję (18), a na końcu karboksylowym domenę umożliwiającą połączenie się z białkiem Max (29). Kompleks MYC - Max wiąże się do swoistej sekwencji DNA i aktywuje transkrypcję. Aktywność c - MYC jako onkogenu i czynnika aktywującego transkrypcję zależy od jego interakcji ze wspomnianym białkiem Max, fosforylacji domeny na końcu aminowym, oraz kooperacji z p21RAS. Używając swoistego oligodeoksynukleotydu antysensowego w celu zahamowania ekspresji c - MYC wykazaliśmy, że proliferacja komórek PBSz jest zależna od jego ekspresji (M. Nieborowska - Skórska, dane nie publikowane). Jednoczesne zahamowanie ekspresji BCR/ABL i c - MYC za pomocą dwóch antysensów (anty - BCR/ABL i anty - c - MYC) dawało w rezultacie silny efekt synergistyczny, hamujący wzrost białaczki, co sugeruje, że oba białka współdziałają w stymulacji procesu białaczkowego. Jest to zgodne z późniejszymi doniesieniami innych badaczy, w których wykazano, że c - MYC jest niezbędny do transformacji fibroblastów przez BCR/ABL (39) oraz, że ekspresja c - MYC w komórce jest zależna od BCR/ABL (33). Za to drugie zjawisko może być odpowiedzialne białko c - MYB, które jest niezbędne do wzrostu komórek PBSz, jak i prawidłowych komórek hemopoetycznych (2) oraz stymuluje transaktywację *c - myc* (5).

Podsumowując, szereg białek jest zaangażowanych w indukcję procesu nowotworowego przez BCR/ABL w komórkach PBSz. Zidentyfikowanie tych białek oraz mechanizmów odpowiedzialnych za ich wzajemne oddziaływanie wymaga dalszych badań.

3. Nowe próby terapeutyczne

Faza przewlekła PBSz (PBSz-FP) jest procesem chorobowym, który może być kontrolowany przez konwencjonalną terapię. Jednakże, PBSz – FP po pewnym czasie przechodzi w fazę przyspieszoną, a następnie w fazę blastyczną (PBSz – FB), która kończy się śmiercią pacjenta (17). Jedyną obecnie skuteczną terapią, allogeniczne przeszczepienie szpiku, jest osiągalna tylko dla nielicznych pacjentów (52). Klasyczne leczenie polega na podawaniu chemioterapii (hydroksymocznik, busulfan, arabinozyd cytozyny), interferonu lub zastosowaniu autologicznego przeszczepienia szpiku (17). Obecnie średni czas przeżycia w przypadku PBSz wynosi około 40-70 miesięcy. Podstawą do poszukiwania nowych sposobów leczenia PBSz jest to, że w szpiku kostnym przepelnionym komórkami białaczkowymi udało się znaleźć nieliczne prawidłowe hemopoetyczne komórki macierzyste (15), które mogą być wykorzystane w celach terapeutycznych. Poszukuje się leku lub sposobu leczenia, który poprzez wybiórcze zahamowanie klonu białaczkowego umożliwi prawidłowym komórkom podjęcie swoich funkcji.

Oligodeoksynukleotydy antysensowe (antysensy) stwarzają możliwości praktycznego rozwiązania tego zagadnienia. Poprzez łączenie się z docelowym mRNA (36), powodują zahamowanie translacji i obniżenie ekspresji genu, a w konsekwencji zahamowanie procesu chorobowego, za który dany gen jest odpowiedzialny. Potencjalne kliniczne zastosowania antysensów w leczeniu nowotworów zostały przez nas omówione w artykule przeglądowym (1). Koncentrując się na PBSz wykazaliśmy, że antysensy komplementarne do sekwencji występującej w miejscu połączenia dwóch genów *bcr/abl* (połowa sekwencji antysensu komplementarna do *bcr*, druga do *abl*) hamują *in vitro* wzrost komórek PBSz – FP i PBSz – FB, a jednocześnie nie zaburzają zasadniczo wzrostu i różnicowania prawidłowych komórek krwiotwórczych (49,51). Podobne wyniki zostały uzyskane przez innych badaczy (23), a ostatnio także przez grupy hematologów we Włoszech i Japonii (dane nie publikowane), potwierdzając tym samym możliwości zastosowania antysensów do *bcr/abl* w usuwaniu komórek PBSz ze szpiku kostnego przed przeszczepem autologicznym. W przeprowadzonych przez nas następnym eksperymentach wykazaliśmy wysoką swoistość działania antysensów do *bcr/abl*, które przez zahamowanie ekspresji białka BCR/ABL indukują śmierć komórki w mechanizmie apoptozy (50). Pierwsze próby kliniczne oczyszczania szpiku kostnego z komórek PBSz przy użyciu antysensów do *bcr/abl* zostały już rozpoczęte.

Wyniki te skłoniły nas do przetestowania możliwości zastosowania antysensów do *bcr/abl* w hamowaniu wzrostu białaczki *in vivo*. Używając opisanego przez nas uprzednio modelu PBSz na myszach z ciężkimi niedoborami immunologicznymi (SCID) (46) wykazaliśmy, że podawanie antysensów do *bcr/abl* *in vivo* hamuje wzrost linii komórkowej, wywodzącej się z PBSz (47). Ostatnio stwierdziliśmy, że podobny efekt terapeutyczny można uzyskać u myszy SCID z wszczepionymi komórkami PBSz, pobranymi bezpośrednio od pacjenta (T. Skórski, dane nie publikowane). Podsumowując nasze wyniki

uzyskane *in vivo* sądzimy, że antysensy do *bcr/abl* mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu PBSz.

Ponieważ wyniki uzyskane *in vitro* jak i *in vivo* pokazują, że antysensy do *bcr/abl* nie eliminują całkowicie wzrostu białaczki, a jedynie hamują jej rozwój, postanowiliśmy zastosować terapię skojarzoną, polegającą na kombinacji antysensów do *bcr/abl* i niskiej dawki mafosfamidu (aktywna *in vitro* pochodna cyklofosfamidu indukująca apoptozę) w celu „oczyszczenia” szpiku z komórek PBSz. Okazało się, że ten rodzaj postępowania eliminuje komórki PBSz ze szpiku poniżej poziomu wykrywalności w naszych testach (10^{-4}), a jednocześnie oszczędza o wiele więcej prawidłowych komórek hemopoetycznych w porównaniu do stężenia samego mafosfamidu, które musiałoby być zastosowane, aby uzyskać równie skuteczną eliminację komórek PBSz (45). Zgodnie z naszymi ostatnimi badaniami terapia polegająca na skojarzeniu antysensów z cytotatykami może znaleźć szerokie zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych (30).

Inny, przypuszczalnie bardziej selektywny i skuteczny sposób zwalczania PBSz może wynikać z wykorzystania wiedzy o mechanizmie powstawania i podtrzymywania PBSz. Wspomnieliśmy już, że onkogenna kinaza tyrozynowa BCR/ABL aby wyindukować PBSz musi współdziałać z wieloma białkami i genami. Teoretycznie, obniżenie ekspresji BCR/ABL oraz jednego z jej białek docelowych w łańcuchu przewodzenia onkogenego sygnału, powinno bardziej efektywnie hamować rozwój PBSz niż obniżenie ekspresji tylko BCR/ABL. Tę hipotezę, jak się wydaje, potwierdzają obecnie prowadzone badania. Hamując ekspresję BCR/ABL (białko cytoplazmatyczne) i *c - MYC* (białko jądrowe) za pomocą skojarzonej terapii antysensowej (antysensy do *bcr/abl* + antysensy do *c - myc*) uzyskaliśmy dużo lepszy efekt terapeutyczny w porównaniu do zastosowania pojedynczego antysensu zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (T. Skórski, praca w przygotowaniu). Wyniki te wymagają jednak ciągle dalszych badań, aby można było wyciągnąć ostateczne wnioski.

4. Podsumowanie

Badania podstawowe prowadzone w celu zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za powstanie PBSz i innych chorób nowotworowych otwierają nowe możliwości ich leczenia. Jest to szczególnie ważne, gdyż większość komórek nowotworowych potrafi uruchamiać mechanizmy odporności na obecnie stosowane leki. Zahamowanie ekspresji onkogenów odpowiedzialnych za powstanie choroby nowotworowej za pomocą antysensów jest tylko jedną z możliwych nowych strategii leczenia. Innym, teoretycznie możliwym sposobem postępowania, może być zastosowanie peptydów blokujących interakcję pomiędzy onkogenami a ich białkami docelowymi w łańcuchu przewodzenia sygnału, które są niezbędne dla zaistnienia choroby. Obie wymienione metody postępowania mają wspólną cechę: zaburzają mechanizmy molekularne odpowiedzialne za powstanie i/lub podtrzymywanie choroby nowotworowej.

Literatura

1. Calabretta B., Skórski T., Szczylik C., Zon G., (1992), *Cancer Treat. Rev.*, 19, 169.
2. Calabretta B., Sims R. B., Valtieri M., Caracciolo D., Szczylik C., Venturelli D., Beran M., Gewirtz A., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2351.
3. Cantley L., Auger K. R., Carpenter C., Duckworth A., Graziani R., Kapeller R., Soltoff S., (1991), *Cell*, 64, 281.
4. Carpenter C. L., Cantley L. C., (1990), *Biochemistry*, 29, 11 143.
5. Carroll M. P., Clark-Lewis I., Rapp U. R., May W. S. J., (1990), *Biol. Chem.*, 265, 19 819.
6. Cogswell J. P., Cogswell V. C., Kuehl W. M., Cuddihy A. M., Bender T. M., Engelke U., Marcu K. B., Ting J. P.-Y., (1993), *Mol. Cell. Biol.*, 13, 2858.
7. Daley G. Q., van Etten R. A., Baltimore D., (1990), *Science*, 247, 824.
8. Dent P., Haser W., Haystead T. A. J., Vincent L. A., Roberts T. M., Sturgill T. W., (1992), *Science*, 257, 1404.
9. Druker B., Okuda K., Matulonis U., Salga R., Roberts T., Griffin J. D., (1992), *Blood*, 79, 2215.
10. Egan S., Giddings B. W., Brooks M. W., Buday L., Sizeland A. M., Weinberg R., (1993), *Nature*, 363, 45.
11. Epner D. E., Koeffler H. P., (1990), *Ann. Int. Med.*, 113, 3.
12. Fantl W. J., Escobedo J. A., Martin G. A., Turck C. W., del Rosario M., McCormick F., Williams L. T., (1992), *Cell*, 69, 413.
13. Gewirtz A., Calabretta B., (1998), *Science*, 242, 1303.
14. Gishizky M. L., Witte, O. N., (1992), *Science*, 256, 836.
15. Goto T., Nishikori M., Arlin Z., (1982), *Blood*, 59, 793.
16. Heisterkamp N., Jenster G., den Hoeve J., Zovich D., Pattengale P. K., Groffen J., (1990), *Nature*, 344, 253.
17. Kantarijan H. M., Deisseroth A., Kurzock Z., Estrov Z., Talpaz M., (1993), *Blood*, 82, 691.
18. Kato G. J., Barrett J., Villa G. M., Dang C. V., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, 10, 5914.
19. Kizaka-Kondoch S., Sato K., Tamura K., Nojima H., Okayama H., *Mol. Cell. Biol.*, (1992), 12, 5078.
20. Klippel A., Escobedo J. A., Hu Q., Williams L. T., (1993), *Mol. Cell. Biol.*, 13, 5560.
21. Kolch W., Heidecker G., Lloyd P., Rapp U. R., (1991), *Nature*, 349, 426.
22. LeBeau M. M., Rowley J. D., (1984), *Cancer Surveys*, 3, 371.
23. Mahon F. X., Bellon F., Reiffers J., (1993), *Lancet*, 341, 566.
24. Mandanas R. A., Leibowitz D. S., Gharehbaghi K., Tauchi T., Burgess G. S., Miyazawa K., Jayaram H. N., Boswell H. S., (1993), *Blood*, 82, 1838.
25. Miyazawa K., Hendrie P. C., Mantel C., Wood C., Ashman L. K., Broxmeyer H. E., (1991), *Exp. Hematol.*, 19, 1110.
26. Moodie S. A., Willumsen B. M., Weber M. J., Wolfman A., (1993), *Science*, 260, 1658.
27. Moran M., Polakis P., McCormic F., Pawson T., Ellis C., (1991), *Mol. Cell. Biol.*, 11, 1804.
28. Mulcahy L. S., Smith M. R., Stacey D. W., (1985), *Nature*, 313, 241.
29. Murre C., McCaw P. S., Baltimore D., (1989), *Cell*, 56, 777.
30. Nieborowska-Skórska M., Skórski T., Nakashima M., Ratajczak M. Z., Steplewski Z., Calabretta B., (1994), *Folia Histochem. Cytobiol.*, 32, 35.
31. Nowell P. C., Hungerford D. A., (1960), *Science*, 132, 1497.
32. Okuda K., Sanghera J. S., Pelech S. L., Kanakura Y., Hallek M., Griffin J. D., Druker B. J., (1992), *Blood*, 79, 2880.
33. Pages G., Lenormand P., L'Allemain G., Chambard J. C., Meloche S., Pouyssegur J., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8319.

34. Pendergast A. M., Gishizky M. L., Havlik M. H., Witte O. N., (1993), *Mol. Cell. Biol.*, 13, 1728.
35. Pendergast A. M., Quilliam L. A., Cripe L. D., Bassing C. H., Dai Z., Li N., Batzer A., Rabun K. M., Der C. J., Schlessinger J., Gishizky M. L., (1993), *Cell*, 75, 175.
36. Prasad K. V. S., Janssen O., Kapeller R., Raab M., Cantley L. C., Rudd C. E., (1993), *Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7366.
37. Rapp U. R., Heidecker G., Huleithel M., Cleveland J. L., Choi W. C., Pawson T., Ihle J. N., Anderson W. B., (1988), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 53, 173.
38. Rothenberg M., Johnson G., Laughlin C., Green I., Cradock J., Sarver N., Cohen J. S., (1989), *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 1539.
39. Sawyers C. L., Callahan W., Witte O. N., (1992), *Cell*, 70, 901.
40. Seth A., Alvarez E., Gupta S., Davis R. J., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 23 521.
41. Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R. P., Canaani E., (1985), *Nature*, 315, 550.
42. Sjolander A., Yamamoto K., Huber B. E., Lapetina E. G., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7908.
43. Skórski T., Kanakaraj R., Ku D., Nieborowska-Skórska M., Canaani E., Perussia B., Calabretta B., (1994), *J. Exp. Med.*, 179, 1855.
44. Skórski T., Kanakaraj R., Nieborowska-Skórska M., Ratajczak M. Z., Szczylik C., Arlinghaus R. B., Gewirtz A. M., Calabretta B., (1993), *J. Exp. Med.*, 178, 1923.
45. Skórski T., Nieborowska-Skórska M., Barletta C., Malaguarnera L., Szczylik C., Chen S.-T., Lange B., Calabretta B., (1993), *J. Clin. Invest.*, 92, 194.
46. Skórski T., Nieborowska-Skórska M., Calabretta B., (1991), *Folia Histochem. Cytobiol.*, 30, 91.
47. Skórski T., Nieborowska-Skórska M., Nicolaidis N. C., Szczylik C., Iversen P., Iozzo R. V., Zon G., Calabretta B., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4504.
48. Skórski T., Szczylik C., Malaguarnera L., Calabretta B., (1991), *Folia Histochem. Cytobiol.*, 29, 121.
49. Skórski T., Szczylik C., Ratajczak M. Z., Malaguarnera L., Gewirtz A. M., Calabretta B., (1992), *J. Exp. Med.*, 175, 743.
50. Smetsers T. F. C. M., Skórski T., van der Locht L. T. F., Wessels M. M. C., Pennings A. H. M., de Witte T., Calabretta B., Mensink E. J. B. M., (1994), *Leukemia*, 8, 129.
51. Szczylik C., Skórski T., Nicolaidis N. C., Manzella L., Malaguarnera L., Venturelli D., Gewirtz A., Calabretta B., (1991), *Science*, 253, 562.
52. Thomas E. D., Clift R. A., (1989), *Blood*, 73, 861.
53. WhangPeng J., Henderson E. S., Knutsen T., Freireich E. J., Gart J. J., (1970), *Blood*, 36, 448.
54. Varticovski L., Daley G. Q., Jackson P., Baltimore D., Cantley L., (1991), *Mol. Cell. Biol.*, 11, 1107.
55. Vogel U. S., Dixon R. A. F., Schaber M. D., Diehl R. E., Marshall M. S., Scolnic E. M., Sigal I. S., Gibbs J. B., (1988), *Nature*, 335, 90.

The role of antisense oligodeoxynucleotides in the investigations of the molecular phenomenons activated by oncogenes: therapeutical implications

Summary

Antisense oligodeoxynucleotides are well known as specific inhibitors of targeted genes expression. In this paper we demonstrate that antisenses could be applied for the investigation of the molecular mechanisms activated by oncogenes. These studies may identify new targets for antisense treatment of tumors.

Key words:

antisense oligodeoxynucleotides, oncogenes, signal transduction, tumor therapy.

Adres dla korespondencji:

Tomasz Skórski, Thomas Jefferson University Hospital, Jefferson Cancer Center, BLSB 630, 233 South and 10th Street, Philadelphia, PA 19107, USA.