

## **CÀNCER I APOPTOSI**

MANEL CASCALLÓ, JOAQUIM CALBÓ I ADELA MAZO

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Químiques. Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Adela Mazo. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Químiques. Universitat de Barcelona. Martí i Franqués, 1. 08028 Barcelona. Tel.: 934 021 210. Fax: 934 021 219. Adreça electrònica: *adela@bq.ub.es*.

### **RESUM**

Aquesta revisió pretén donar una visió general dels mecanismes d'apoptosi, i fa un èmfasi especial en la relació que té amb els processos tumorals. Es descriuen les principals rutes apoptòtiques caracteritzades a nivell molecular i es comenten les alteracions trobades a la cèl·lula tumoral en diversos components d'aquestes rutes, així com les relacions establertes entre *oncogenicitat* i *apoptosi*. Finalment, s'analitzen les possibilitats terapèutiques que es comencen a entreveure tenint en compte els espectaculars avenços en el coneixement molecular del procés apoptòtic.

### **SUMMARY**

This review attempts to give an overview of the apoptotic mechanisms, with particular reference to cancer. There are summarized the main apoptotic pathways characterized at molecular level. It is also described the components of these pathways altered in tumour cells and the connections between apoptosis and oncogenic activation. Finally, new therapeutic approaches based on the great advances in the knowledge of apoptosis at molecular level are discussed.

## INTRODUCCIÓ

Totes les cèl·lules de l'organisme estan sotmeses a un rigorós control de la proliferació i diferenciació. Aquests processos són regulats per substàncies anomenades *factors de creixement* i *factors de diferenciació*. Fenòmens com l'apoptosi i la senescència constitueixen mecanismes de regulació complementaris, que contribueixen a l'establiment d'un equilibri natural entre la divisió i la mort cel·lular en tots els teixits (King i Cidlowski, 1995).

L'apoptosi, anomenada també *mort cel·lular programada*, consisteix en una forma de suïcidi cel·lular, molt conservat evolutivament, dirigit fonamentalment a eliminar les cèl·lules danyades o no desitjades en els organismes multicel·lulars. Aquest procés requereix una maquinària especialitzada que, en resposta a diferents estímuls, acaba donant lloc a la desestructuració total de la cèl·lula sense afectar la resta de l'organisme (Steller, 1995; Jacobson *et al.*, 1997).

La regulació del procés apoptòtic és un factor clau en processos tan importants com són el desenvolupament, el manteniment de l'homeostasi tissular o la supressió d'insults patogènics. Així, un excés d'apoptosi pot conduir a alteracions en el desenvolupament i l'aparició de malalties neurodegeneratives, mentre que deficiències en el procés apoptòtic poden conduir a l'agreuament d'infeccions virals o a la formació de tumors (Thompson, 1995).

Als darrers anys, estudis genètics i bioquímics han contribuït espectacularment a la identificació de components que participen en les rutes intracel·lulars de senyalització mitjançant les quals transcorre l'apoptosi. Moltes de les troballes han estat possibles gràcies a l'estudi de les alteracions d'aquest procés que tenen lloc durant la transformació maligna de les cèl·lules. En aquest sentit, és important tenir en compte que molts dels

components de les rutes apoptòtiques tenen un innegable potencial com a eines d'aplicació en les teràpies antitumorals noves i futures (Favrot *et al.*, 1998).

## RUTES APOPTÒTIQUES

El paper fisiològic clau que té l'apoptosi en el destí final de les cèl·lules explica que la resposta apoptòtica sigui desencadenada tant per estímuls extracel·lulars com intracel·lulars, i que inclogui senyals de supervivència i senyals de mort. Així doncs, la pèrdua de contacte amb l'entorn, la detecció d'un dany intracel·lular irreparable o la conjunció de senyals contradictoris referents a la divisió, juntament amb els senyals que provenen dels anomenats *receptors de mort* de les cèl·lules dels mamífers, són tots encebadors d'aquest fenomen altament regulat i d'una complexitat notable.

Malgrat l'ampli ventall de rutes que porten a la seva activació, els mecanismes executors de l'apoptosi són sorprenentment uniformes i estan conservats evolutivament, tal com demostra el fet que hi hagi una morfologia típicament apoptòtica (Kerr *et al.*, 1972). A dia d'avui, dos són els principals programes d'execució que s'impliquen en la pràctica totalitat dels processos apoptòtics: l'activació seqüencial de les caspases, una família de cisteïnoproteases, i la disrupció de la funció dels orgànuls, especialment del mitocondri (Gross *et al.*, 1999). Dissortadament, encara és conegut comparativament poc sobre els processos que s'activen per sota d'aquestes rutes, i que són els responsables últims del tret morfollògic i bioquímics que caracteritzen la cèl·lula apoptòtica (invaginació de la membrana, pèrdua de volum, condensació nuclear i fragmentació del DNA), tot i que els primers vincles ja s'han descrit.

El ràpid i incessant increment en el coneix-

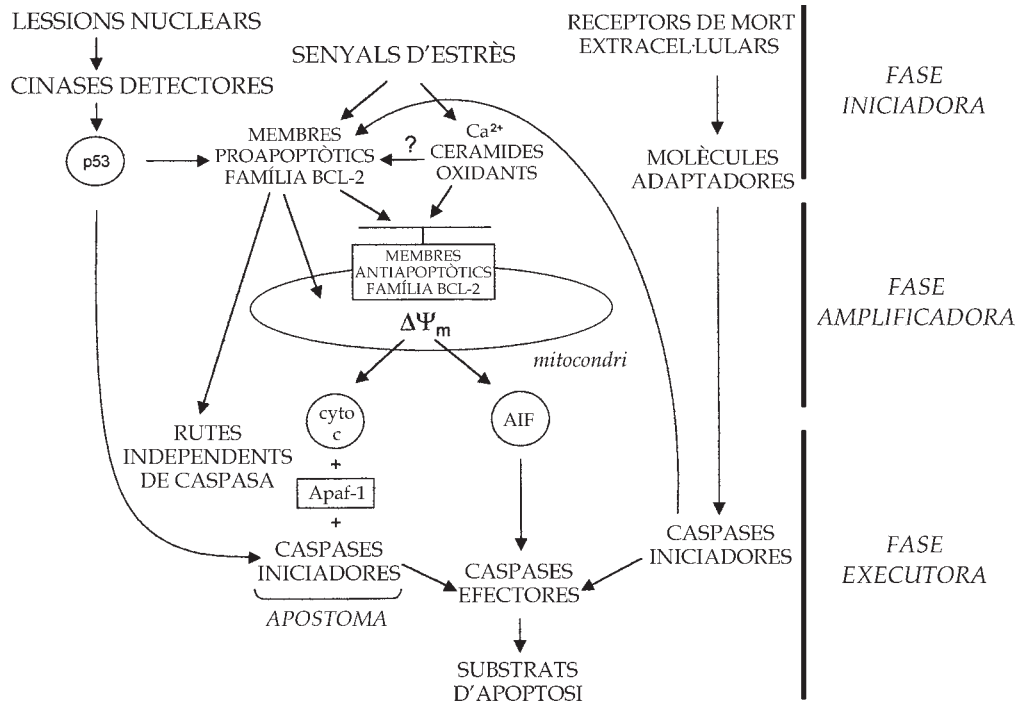


FIGURA 1. Panoràmica general de les principals vies apoptòtiques en mamífers.

xement de la maquinària de mort cel·lular, especialment en els darrers cinc anys, fa impossible resumir tot allò que es coneix sobre aquest camp. El que es pretén aquí és únicament esbossar el paper dels elements i les cascades apoptòtiques que actualment es consideren més importants en mamífers (figura 1) per tal de poder entendre després quina repercussió té la seva alteració en els processos tumorals, i com els influeixen les rutes oncolítics. Per a tal propòsit dividirem aquest complex entramat de rutes en tres grans fases que inclouen la iniciació, l'amplificació i l'execució del programa apoptòtic.

**Fase iniciadora**

Tot i que continuem disposant de poques dades sobre els mecanismes molecu-

lars a través dels quals la cèl·lula canalitza les diverses senyals de mort vers el programa efector comú, clàssicament s'han diferenciat tres grans tipus de rutes (revisat a Dragovich *et al.*, 1998). Així doncs, podem parlar diferencialment de rutes originades a partir de la depleció de factors de creixement i en general situacions d'estrès causades en l'entorn cel·lular, de la detecció de lesions nuclears, bàsicament al DNA i, finalment, de les rutes iniciades via receptors de mort a la membrana citoplasmàtica.

*El senyal provinent de l'estrès cel·lular i la implicació de la família de Bcl-2*

Els senyals produïts durant els processos d'estrès cel·lular, com ara la depleció de factors de creixement, la presència de gluco-

corticoides, la irradiació- $\gamma$ , el xoc tèrmic, i fins i tot l'acció d'alguns agents quimioteràpics, són una de les rutes d'activació apoptòtica subjectes a un estudi més intens. Malgrat això, encara no es coneix amb precisió com es vehiculen tots aquests estímuls. S'ha vist que aquests senyals es tradueixen en alteracions cel·lulars diverses: variacions del potencial d'oxidació-reducció, depleció del metabolisme energètic (això és, balanç ATP / ADP), generació de ceramides, augment dels nivells intracel·lulars de  $Ca^{2+}$  lliure, entre d'altres. La majoria d'aquestes perturbacions poden ser detectades i integrades al mitocondri de la cèl·lula, ja sigui directament, ja sigui a través de segons missatgers. Tal com veurem més endavant, allí és on es produeixen alteracions en la permeabilitat de la membrana (PT), i on es pren la decisió de si la cèl·lula morirà o no. Paral·lelament, després de produir-se un senyal de mort, diferents proteïnes intracel·lulars amb característiques proapoptòtiques semblen activar-se. Moltes d'aquestes proteïnes pertanyen a una família àmpliament caracteritzada pel control de l'apoptosi: la família de Bcl-2 (revisat a Reed, 1998). A més, diferents membres d'aquesta família també estan implicats en la regulació de l'entrada al mitocondri dels senyals intracel·lulars d'estress. Així doncs, el coneixement dels possibles mecanismes d'acció de Bcl-2 i els seus homòlegs es revela com un punt clau en la comprensió del fenomen apoptòtic.

El protooncogen *bcl-2* es localitza al punt de trencament de la translocació cromosòmica t(14;18) dels limfomes fol·liculars de cèl·lula B (Tsujimoto *et al.*, 1984). Des del moment del seu descobriment, diferents homòlegs, tant amb capacitat proapoptòtica com antiapoptòtica, han anat engrandint aquesta família de proteïnes que actualment té més de 16 membres en humans. Els diferents components comparteixen com a mínim un dels quatre dominis d'homologia

descrits amb Bcl-2, anomenats respectivament BH1 a BH4 i que corresponen a diferents fragments  $\alpha$ -helicoidals de la proteïna. Tots els membres antiapoptòtics (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, A1, NR-13, etc.) conserven BH1 i BH2, i tot sovint també BH3 i BH4 (Muchmore *et al.*, 1996). Per contra, els membres proapoptòtics de la família presenten un grau de conservació menor, i hi ha dues subfamílies quant a la seva relació amb Bcl-2: la primera manté els dominis BH1, BH2 i BH3, i inclou membres com Bax, Bak i Bok. La segona només comparteix el domini BH3 amb Bcl-2; Bid, Bad, Bik, Bim i NIP3, entre d'altres, hi pertanyen (Kelekar i Thompson, 1998). L'existència de la família BH3-only, juntament amb diferents estudis de mutagènesi, van permetre inferir que el domini BH3 és un domini crític tant en la dimerització amb altres membres de la família, com en la seva capacitat d'inducció de mort (Chittenden *et al.*, 1995; Kelekar *et al.*, 1997).

Tant Bcl-2 com la major part dels seus homòlegs antiapoptòtics contenen un domini hidrofòbic al seu extrem C-terminal que els converteix en proteïnes integrals de membrana i fa que es trobin a la membrana externa mitocondrial, al reticle endoplasmàtic i a l'embolcall nuclear (Yang *et al.*, 1995). Se'n coneix com a mínim tres funcions: capacitat dimeritzadora amb altres membres de la família Bcl-2, unió a altres proteïnes no homòlogues i capacitat de formació de canals iònics i porus membranosos. Canvis en l'estat de fosforilació d'aquestes proteïnes poden modular algunes de les seves funcions (Haldar *et al.*, 1995). D'altra banda, els membres amb capacitat proapoptòtica es localitzen majoritàriament al citosol (Hsu *et al.*, 1997). L'estímul apoptòtic provoca un canvi de conformació en aquests factors que els permet mobilitzar-se cap al mitocondri, on exerciran algunes de les seves accions. El punt de vista més acceptat és que els membres antiapoptòtics

protegeixen el mitocondri de l'atac que els membres proapoptòtics inicien en desencadenar-se el senyal apoptòtic (Gross *et al.*, 1998).

S'han descrit diversos mecanismes capaços d'explicar el canvi de conformació que experimenten els membres proapoptòtics de la família de Bcl-2 com a resposta als estímuls apoptòtics. Un n'és la dimerització, tal com succeeix amb Bax, per al qual s'ha vist que l'homodimerització permet l'exposició de residus hidrofòbics que li permeten inserir-se en la membrana mitocondrial (Gross *et al.*, 1998), tot i que cal tenir en compte que aquest no és l'únic mecanisme d'activació per aquesta proteïna. En altres casos sembla que l'estat de fosforilació regula l'exposició del domini BH3 dels membres de la família i que això es correlaciona amb la seva localització mitocondrial. En aquest sentit, la depleció de determinats factors de creixement tals com IL-3 provoca la defosforilació i l'alliberament consegüent de Bad, una proteïna que normalment es troba fosforilada per acció de la serinatransferasa Akt/PKB i segregada citosòlicament en aquest estat pel factor 14-3-3 (Zha *et al.*, 1996). També el truncament és capaç de modificar l'afinitat d'aquestes proteïnes pel mitocondri. Un cas paradigmàtic és el de Bid, habitualment citosòlica, i substrat de caspasa-8; el fragment C-terminal que resulta de la seva proteòlisi per caspasa-8 (tBid) és capaç d'unir-se al mitocondri (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Fins i tot hi ha casos en els quals el responsable de la seva activació és l'augment de transcripció d'un factor proapoptòtic.

Diversos estudis d'estructura-funció han posat de manifest que Bax i les proteïnes més similars són capaces d'induir mort cel·lular a través de com a mínim dos mecanismes en principi independents. Aquesta redundància ha estat, i continua sent, una dificultat en l'intent de dissecionar les ru-

tes principals d'actuació d'aquestes proteïnes. D'una banda, la presència del domini BH3 en la seva seqüència els permet suprimir l'acció dels membres antiapoptòtics de la família de Bcl-2 per heterodimerització amb aquests (Sattler *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). En aquest sentit, els nivells relatius de membres pro i membres antiapoptòtics en un moment donat marcarien el *llindar apoptòtic* de la cèl·lula (Oltvai i Korsmeyer, 1994). Aquest mecanisme comú a tots els membres proapoptòtics és l'únic que poden emprar els membres BH3 *only* de la família per induir les cascades de mort. Paral·lelament, però, altres estudis van demostrar l'alt grau d'homologia entre diferents membres de la família de Bcl-2 i molècules bacterianes capaces de formar porus (Muchmore *et al.*, 1996). Això va obrir pas perquè diversos grups suggerissin la possibilitat que alguns membres de la família poguessin regular l'obertura de l'anomenat *porus de transició de permeabilitat* (PT pore) (Antonsson *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997; Zamzani *et al.*, 1998), i permet construir un model capaç d'explicar els canvis de permeabilitat mitocondrial necessaris per a l'alliberament dels factors mitocondrials claus per a l'activació del programa executor al citosol de la cèl·lula. No han estat encara totalment confirmats *in vivo* els resultats obtinguts quan es va sobreexpressar Bax, Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> sobre membranes sintètiques *in vitro*, que demostraven la formació de porus amb característiques diferencials entre els constituïts per membres pro i antiapoptòtics, fins i tot quant a selectivitat iònica (revisat a Schendel *et al.*, 1998). Tot i això, aquest model permetria també explicar perquè Bax és capaç d'induir rutes de mort cel·lular fins i tot en presència de mutacions al domini BH3 (Zha i Reed, 1997).

També s'han proposat altres mecanismes per a explicar les funcions protectores dels membres antiapoptòtics homòlegs a Bcl-2,

relacionats amb la seva capacitat d'unir-se a proteïnes que no són membres de la seva família. En la majoria de casos és el domini BH4 el que està implicat en aquest tipus d'associacions. Així, per exemple, s'ha vist que Bcl-X<sub>L</sub> és capaç d'unir-se directament a Apaf-1 (de *apoptotic protease activating factor-1*) a través d'aquest domini i és possible que aquesta interacció bloquegi la capacitat d'Apaf-1 d'activar la caspasa-9 (Hu *et al.*, 1998, Pan *et al.*, 1998); Bcl-2, però, no sembla tenir gaire afinitat per Apaf-1. Altres proteïnes amb les quals s'han reportat que interaccionen amb la família Bcl-2 són BP53-2 (Nauovski i Cleary, 1996), Raf-1 (Wang *et al.*, 1996), i ANT (Marzo *et al.*, 1998).

#### *La detecció del dany nuclear i la seva implicació en apoptosi*

En vistes al manteniment d'una supervivència a llarg termini, els metazous, a més dels sistemes de reparació del DNA, han desenvolupat mecanismes alternatius de resposta a l'alteració del genoma cel·lular. L'apoptosi n'és un i el més segur en el cas de cèl·lules la supervivència de les quals representa un perill potencial per a l'organisme. Conseqüentment, els diferents senyals intracel·lulars associats amb una progressió anòmala del cicle cel·lular causada per dany al DNA són també activadors del procés apoptòtic.

Com a resposta a aquest tipus de dany, a la cèl·lula s'activen un conjunt de cinases entre les quals destaquen ATM (producte d'un gen defectiu en pacients d'ataxia telangièctasia, una malaltia que correlaciona amb una extrema sensibilitat a la radiació ionitzant) i la proteïna cinasa DNA-dependent (DNA-PK) (revisat a Jackson, 1997). Una de les dianes principals d'ATM (Xu i Baltimore, 1996), i possiblement també de DNA-PK (Shieh *et al.*, 1997), és el gen supressor tumoral *p53*, la qual cosa encaixa amb el paper de *guardià del*

*genoma* que s'assigna clàssicament a aquesta proteïna. L'activació de *p53*, marcada per un augment en els seus nivells, és un mecanisme posttranscripcional que no només implica la fosforilació d'aquesta proteïna, sinó que també és conseqüència de la fosforilació de Mdm-2, una proteïna que dirigeix la degradació de *p53*. La fosforilació d'ambdues proteïnes n'impedeix la interacció, i estabilitza i activa *p53* (Mayo *et al.*, 1997).

Els mecanismes a través dels quals *p53* realitza la seva acció proapoptòtica no estan encara totalment elucidats. Actualment sembla provat que part del seu potencial apoptòtic transcorre a través d'algunes de les seves dianes transcripcionals: Bax (la qual cosa estableix lligams entre la rutes de detecció de lesions intracel·lulars i la via apoptòtica mitocondrial) (Miyashita i Reed, 1995; Yin *et al.*, 1997), el receptor del factor de creixement *insulin-like I* – IGF-I – (Prisco *et al.*, 1997), i IGF-BP3 (Buckbinder *et al.*, 1995), entre d'altres. Ara bé, és un fet que *p53* també pot induir apoptosi mitjançant mecanismes independents de transcripció que encara són poc clars (Caelles *et al.*, 1994; Bissonnette *et al.*, 1997). Les dades de què es disposa permeten entreveure la implicació d'interaccions directes proteïna-proteïna, per exemple amb elements del complex de transcripció/reparació del DNA. En qualsevol cas, aquesta ruta necessàriament ha d'implicar la transducció del senyal des del nucli al citosol, ja que requereix l'acció proteolítica de les caspases, un procés necessàriament citosòlic.

Paral·lelament, existeixen processos apoptòtics desencadenats com a resposta a lesions al DNA independents de l'acció de *p53*. En aquest sentit, experiments realitzats amb cèl·lules procedents de ratolins *knock-out* de *p53* que s'han sotmès a irradiació o a la incubació amb drogues, han demostrat l'activació de rutes apoptòtiques en part inhibibles per Bcl-2 (Strasser *et al.*, 1994).

*Les rutes extracel·lulars dels receptors de mort*

L'apoptosi també pot desencadenar-se davant la necessitat d'un organisme d'eliminar, en un moment donat i activament, un conjunt de cèl·lules com un intent de mantenir l'homeostasi tissular, en un procés que alguns autors han qualificat d'«apoptosi allisonadora» (Ashkenazi i Dixit, 1998). Aquesta tercera via és especialment important en el sistema immunològic i està implicada en processos com ara l'eliminació de cèl·lules infectades amb virus per part de limfòcits T citotòxics, la delecció de cèl·lules T madures activades en perifèria, o l'eliminació de cèl·lules inflamatòries no desitjades (Winoto, 1997; Nagata, 1997). S'inicia a partir de la interacció de lligands específics, dits *ligands de mort*, amb receptors a la membrana cel·lular.

Els receptors implicats en aquests processos pertanyen a la família del receptor del factor de necrosi tumoral, TNFR (Smith *et al.*, 1994; Ashkenazi i Dixit, 1998). Tots els membres d'aquesta superfamília, formada per receptors capaços d'iniciar tant rutes d'apoptosi com rutes de supervivència, es caracteritzen perquè posseeixen un domini extracel·lular ric en cisteïnes; el subgrup dels receptors de mort conté, a més, un domini citosòlic específic capaç d'interaccionar amb la maquinària apoptòtica intracel·lular, que s'anomena *domini de mort* (DD, de *death domain*) (Tartaglia *et al.*, 1993).

Els receptors de mort més estudiats són Fas, també dit CD95, o Apo1 (Nagata, 1997), TNFR1, també dit p55 o CD120a (Smith *et al.*, 1994), DR3 també dit Apo3, o TRAMP (Bodmer *et al.*, 1997), i secundàriament DR4 i DR5, també dit Apo2 o KILLER (Pan *et al.*, 1997; Chaudhary *et al.*, 1997). Un cop activats per unió del seu lligand específic (respectivament CD95L, TNF, Apo3L i Apo2L/TRAIL, sent aquest darrer lligand tant de DR4 com de DR5), els receptors inte-

raccionen a través del domini DD amb molècules adaptadores que contenen també aquest domini. Els adaptadors, a més, inclouen dins la seva seqüència un altre domini funcionalment important per a la inducció de la mort cel·lular: el domini DED (de *death effector domain*); es tracta d'un domini d'interacció homofílic que pertany a un conjunt més ampli de dominis, coneguts en general com a *dominis CARD* (de *caspase recruitment domain*) i que també són presents en moltes caspases (Hofmann *et al.*, 1997). La interacció entre els dominis DED de la molècula adaptadora i d'una caspasa, generalment caspasa-8 (Muzio *et al.*, 1996), provoca l'agregació d'aquesta i l'activació consegüent per autotruncament, i d'aquesta manera s'inicia el braç principal de les rutes executores apoptòtiques.

FADD (*Fas-associated death domain*) és l'adaptador més habitual implicat en la connexió entre els receptors de mort i caspasa-8 (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997). Tot i això, sovint hi ha altres proteïnes adaptadores, com TRADD – *TNFR-associated death domain* – (Hsu *et al.*, 1995), que esdevenen una *plataforma* a través de la qual el senyal del receptor es bifurca, de forma que es permet no només la inducció d'apoptosi (via interacció de TRADD amb FADD, i després caspasa-8) sinó l'activació d'altres rutes de signe oposat, com la de NF- $\kappa$ B o la de la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK). És el cas del receptors TNFR i DR3, on TRADD interacciona també amb TRAF2 – *TNFR-associated factor 2* – (Hsu *et al.*, 1996) i RIP – *receptor interacting protein* – (Ting *et al.*, 1996), factors que poden activar la ruta que acabarà amb l'augment de la transcripció dependent de NF- $\kappa$ B, gràcies al seu paper sobre NIK – *NF- $\kappa$ B-inducing kinase* – (Malinin *et al.*, 1997; Woronicz *et al.*, 1997), i també poden connectar amb la ruta de la JNK via les cinases de la proteïna activada per mitògens MAP (MEKK1) i JNKK (Natoli *et al.*, 1997).

Cal tenir present que la regulació d'aquests processos és molt més complexa respecte d'aquest primer esquema inicial. Un element que introdueix complexitat és l'existència de receptors trampa (*decoy*), amb un domini extracel·lular similar al dels receptors de mort, però sense part citosòlica, que aconsegueixen inhibir la resposta apoptòtica d'aquests per competició amb el seu lligand, la presència o no d'altres molècules adaptadores i inhibidores a diferents nivells (revisat a Golstein, 1997a). La presència d'aquest tipus de receptors, la distribució tissular del conjunt de receptors i el nivell d'expressió dels lligands són alguns dels factors implicats en el control d'aquestes vies. Aquesta xarxa comporta respostes clarament diferents en funció de la cèl·lula i l'entorn, que explica la versatilitat dels receptors d'aquesta superfamília.

#### **Amplificació del senyal apoptòtic al mitocondri**

La visió que actualment es té sobre el paper que apleix el mitocondri en el procés apoptòtic ha experimentat un canvi radical a mesura que s'ha anat aprofundint en l'estudi dels mecanismes moleculars responsables de la mort cel·lular. Tot i els models inicials, que consideraven l'apoptosi un procés exclusivament nuclear, les dades obtingudes posteriorment permeten afirmar que el mitocondri té un paper central en l'apoptosi induïda enfront de molts estímuls. Alguns autors han arribat a afirmar la necessitat d'aquests orgànuls en la totalitat de les rutes (Susin *et al.*, 1998), però el cert és que aquest extrem no és acceptat per tothom.

D'una banda, sembla clar que el senyal produït per la deprivació de factors de creixement, l'augment intracel·lular de  $\text{Ca}^{2+}$ , d'oxidants o de ceramides, i en general tots els estímuls que impliquen en la seva regu-

lació membres de la família de Bcl-2 impliquen el mitocondri (Constantini *et al.*, 1996; Bernardi *et al.*, 1996, Susin *et al.*, 1997). Les alteracions nuclears, majoritàriament sense des per p53, també transcorren parcialment a través del mitocondri, com a mínim en la part que és mediada per Bax, tot i que, tal com ja s'ha assenyalat prèviament, hi ha mecanismes independents de mitocondri per al senyal de p53 (Sentman *et al.*, 1991; Dole *et al.*, 1994). Pels receptors de mort la implicació del mitocondri sembla ser un esdeveniment dependent del tipus cel·lular (Scaffidi *et al.*, 1998): hi ha tipus cel·lulars per als quals el senyal desencadenat pel receptor Fas o altres membres de la família de TNFR no és inhibible per Bcl-2. En aquestes cèl·lules, la interacció de FADD amb caspasa-8 és suficient per a desencadenar la proteòlisi citosòlica de la resta de caspases que actuaran d'efectors finals, i per tant la ruta és independent de Bcl-2 i de mitocondri (Hakem *et al.* 1998). Per contra, en altres línies s'ha demostrat que és necessària l'amplificació del senyal de caspasa-8 al mitocondri per a una activació òptima de la ruta de les caspases (Kuwana *et al.*, 1998). Es coneix que aquesta proteasa és capaç de truncar Bid, un membre proapoptòtic de la família de Bcl-2 en resposta a la senyalització per Fas, i que el fragment C-terminal de la proteïna pot unir-se a la membrana mitocondrial induint l'alliberament de citocrom c i provocant l'activació de la caspasa-9 (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). No és clar el per què d'aquesta conducta diferencial, però alguns estudis correlacionen l'efecte amb els nivells de caspasa-8 activa intracel·lulars.

S'assumeix que la disrupció del potencial transmembranós intern del mitocondri, simbolitzat per  $\Delta\Psi_m$ , és el l'esdeveniment iniciador i responsable dels mecanismes que es desencadenen en aquest orgànu durant l'apoptosi (revisat a Petit *et al.*, 1996). S'han proposat bàsicament dos models dife-



rents per a explicar el canvi de la permeabilitat mitocondrial associat a la pèrdua del  $\Delta\Psi_m$ . D'una banda, en alguns tipus cel·lulars s'ha especulat sobre l'existència de mecanismes d'hiperpolarització de la membrana mitocondrial que revertirien en canvis d'osmolaritat dins de la matriu i el trencament de la membrana mitocondrial externa (Vander Heiden *et al.*, 1997). Alternativament, la ruptura del  $\Delta\Psi_m$  podria ser conseqüència de l'obertura regulada del porus de transició de permeabilitat (PT *pore*), també anomenat *megacanal* (revisat a Marzo *et al.*, 1998a). Tot i que hi ha evidències en favor dels dos models, la possibilitat que el paper modulador dels membres de la família de Bcl-2 funcioni, en part, a nivell d'interacció amb el PT, juntament amb diferents estudis realitzats amb inhibidors específics per aquest canal mitocondrial (Pastorino *et al.*, 1996; Marchetti *et al.*, 1996; Zamzani *et al.*, 1998), sembla indicar que el segon model és més plausible.

Es coneix poc encara sobre la ubicació i la composició del complex proteic PT. Es creu que es troba als punts d'unió entre les membranes mitocondrials externa i interna, i implica proteïnes de la matriu, del citosol i d'ambdues membranes, tals com el canal aniònic depenent de voltatge, VDAC, i el translocador de nucleòsids d'adenina, ANT (revisat a Bernardi *et al.*, 1994). Funcionalment, permet el pas de molècules de pes molecular baix ( $\leq 1,5$  kDa) de manera pràcticament no selectiva, de forma que la seva obertura implica el reequilibri iònic entre l'espai intermembranós i l'interior del mitocondri. Les conseqüències directes d'aquest reajustament d'ions són la dissipació del gradient de  $H^+$  i l'expansió de la matriu mitocondrial per òsmosi, la qual cosa comporta el trencament de la cadena respiratòria, la generació de radicals oxigenats reactius ROS (Petit *et al.*, 1996), i acaba provocant la ruptura de la membrana externa mitocon-

drial, i l'alliberament posterior de les proteïnes presents a l'espai intermembranós. Aquest alliberament, però, també podria ser explicat gràcies a l'obertura a la membrana mitocondrial externa de porus de diàmetre tal que permetrien el pas de proteïnes, i és coherent amb la morfologia mitocondrial intacta que acompanya l'apoptosi de molts tipus cel·lulars (Green i Reed, 1998). Tant l'alliberament de proteïnes al citosol, com l'alteració de la producció energètica són fenòmens que s'han mostrat modulables per la presència de membres de la família de Bcl-2 a la membrana (Kluck *et al.*, 1997; Marzo *et al.*, 1998b).

Entre les proteïnes que apareixen al citosol després de la dissipació del  $\Delta\Psi_m$ , hi ha el citocrom c, la procaspasa-3, i una proteïna activadora de l'apoptosi, coneguda per AIF (de *apoptosis-inducing factor*). El paper que té la procaspasa-3 és poc clar, atès que no es coneix encara si s'activa abans o després del seu alliberament al citosol (Mancini *et al.*, 1998). Per contra, el paper que compleix AIF sembla més definit, atès que aquest factor és capaç de processar la procaspasa-3 i d'activar endonucleases nuclears, com a mínim *in vitro*, cosa que el lliga amb l'activació de la part executora final de l'apoptosi (Susin *et al.*, 1999). A més, la seva activitat és bloquejable per l'acció d'un inhibidor d'activitat caspasa anomenat zVAD-fmk (Susin *et al.*, 1996). D'altra banda, l'alliberament del citocrom c sembla ser un esdeveniment crític, ja que es considera el punt de no-retorn pel que fa al desencadenament de la cascada proteolítica que dona lloc a l'apoptosi. Aquest citocrom (anomenat també Apaf-2, de *apoptotic protease activating factor-2*), juntament amb la procaspasa-9 (també coneguda com Apaf-3) i el factor Apaf-1, forma part del complex citosòlic conegut per *apoptosome* (Liu *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997). L'alliberament del citocrom c té com a resultat l'activació d'Apaf-1, factor que provocarà el

truncament de pro-caspasa-9 a caspasa-9 activa, a través d'un procés dependent d'ATP i bloquejable per Ac-DEVD.cmk, un altre inhibidor general de caspases (Zou *et al.*, 1997). Aquest comportament diferencial enfront dels inhibidors permet concloure que la ruta de AIF i la que implica citocrom c, Apaf-1 i caspasa-9, són molecularment independents.

Estudis amb ratolins *knock-out* de caspasa-9 o Apaf-1, respectivament, han posat de manifest que aquesta ruta és encara més complexa (Kuida *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998). El fet que els *knock-outs* per Apaf-1 presentessin deficiències més severes que els de caspasa-9 posa de manifest que Apaf-1 pot tenir funcions independents de la ruta de les caspases o bé que pot interaccionar amb altres caspases diferents de la caspasa-9. D'altra banda, s'ha postulat la necessitat que hi hagi molècules similars a Apaf-1 encara no caracteritzades (Cecconi *et al.*, 1998).

A més, sembla clar que la pèrdua del  $\Delta\Psi_m$  pot portar no només a l'adquisició de fenotip apoptòtic, sinó també a necrosi a través d'un procés generalment més lent. Els factors que poden controlar quin procés serà el responsable final de la mort cel·lular inclouen el grau d'activació de les caspases (McCarthy *et al.*, 1997), i els nivells intracel·lulars d'ATP (Eguchi *et al.*, 1997). Es perfila un model segons el qual la intensitat de la despolarització mitocondrial i els nivells endògens de citocrom c són determinants en el manteniment d'una cadena respiratòria funcional que garanteixi la síntesi d'ATP. Si els nivells d'ATP són suficients per a activar les caspases i aquesta acció no és contrarestatada per uns nivells massa elevats d'inhibidors endògens de caspases, la cèl·lula morirà per apoptosi. Per contra, si és impossible induir la mort per aquestes vies, o bé hi ha un descens molt brusc de la permeabilitat mitocondrial, la cèl·lula anirà cap a necrosi (Susin *et al.*, 1998).

## La maquinària executora final: caspases i degradació cel·lular

### La família de les caspases

El senyal apoptòtic, ja sigui procedent del mitocondri, de la membrana cel·lular o del nucli, acaba sent traduït en un conjunt de canvis bioquímics mediat per la família de les caspases (Yuan *et al.*, 1993), que esdevenen així el braç executor de la ruta. Aquestes es defineixen per homologia (tant estructural com d'activitat, pel que fa al seu requeriment d'activitat catalítica damunt residus d'aspàrtic) amb l'enzim convertidor d'interleucina-1 $\beta$  (ICE, o també caspasa-1) i actualment se'n coneixen un mínim de 14, tot i que no totes estan totalment caracteritzades.

Els membres de la família consten de quatre dominis (Wilson *et al.*, 1994; Rotonda *et al.*, 1996): l'extrem N-terminal, de longitud variable, un domini gran (20 kDa aprox.), un de petit (10 kDa aprox.) i una regió pont que els uneix; la seva especificitat de substrat resideix en la subunitat petita. L'activació de la capacitat catalítica necessita l'eliminació del prodomini N-terminal i de la regió pont, que provoca l'acoblament de les dues subunitats catalítiques (revisat a Nicholson i Thornberry, 1997). Cal fer notar que els *locus* de truncament interns són dominis consens d'activitat caspasa, i implica que es tracta d'una activació seqüencial en cascada, i alternativament en autocatàlisi.

Les caspases s'han classificat sobre la base de la seva posició en la cascada proteolítica (Nunez *et al.*, 1998). Així, podem parlar de caspases iniciadores i de caspases efectores. Les primeres són les responsables d'interaccionar amb els activadors específics de la ruta, i per a tal fi contenen un prodomini llarg que conté mòduls d'interacció directa tipus CARD o DED (Hofmann *et al.*, 1997). Formen part d'aquest subgrup la caspasa-8

(que com ja s'ha vist conté un domini DED que li permet unir-se als receptors de membrana de mort via adaptadors), la caspasa-9 (el senyal d'activació de la qual prové del mitocondri, via interacció entre dominis CARD presents a la seva estructura i a la d'Apaf-1), així com les caspases-1, -2, -4, -5, -10, -11, -12 i -13. Diversos models s'han proposat per a explicar com la interacció amb els dominis CARD o DED en modula l'activitat. Tant l'oligomerització (Muzio *et al.*, 1998), com l'existència de canvis conformationals que provocarien l'autocatàlisi, com l'alteració de la compartimentalització de les caspases i els respectius cofactors (Liu *et al.*, 1996), han estat proposats com a mecanismes plausibles. També es coneix l'existència de proteïnes amb propietats inhibidores sobre l'activació de les caspases iniciadores. Per exemple, les proteïnes de la família *v*-FLIP (*viral FADD-like ICE inhibitory proteins*) competeixen amb caspasa-8 per la unió amb els seus cofactors (Thome *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997), o bé altres proteïnes virals com CrmA (Ray *et al.*, 1992).

Per contra, les caspases efectores (caspasa-3, -6, -7 i -14) presenten prodominis curts i seqüències de reconeixement per a caspases iniciadores, un tret que demostra la seva implicació en un punt posterior de la cascada. Així, per exemple, la caspasa-3 normalment és processada per caspasa -8 o -9. Es coneixen alguns factors inhibidors específics de l'activitat de les caspases efectores. Alguns membres de la família c-IAP (de *cellular-inhibitors of apoptosis proteins*, un subgrup de la família d'inhibidors d'apoptosi anàlegs a proteïnes de baculovirus) han demostrat ser capaços d'inhibir caspasa-3 i -7 per mecanismes encara desconeguts i que probablement impliquen més d'un punt de la via (Roy *et al.*, 1997).

És important destacar que sovint diferents caspases tenen funcions redundants, i a més també poden actuar concertadament

per a l'execució del programa apoptòtic dels mamífers depenent del tipus cel·lular i de l'estímul, la qual cosa dificulta l'estudi de la funció específica de cada una. D'altra banda, es té coneixement de processos apoptòtics independents de caspasa que discorren per mecanismes encara no dilucidats. Exemples d'això són la sobreexpressió de Bax i l'acció d'alguns agents quimioteràpics que indueixen apoptosi fins i tot en presència de diferents inhibidors de caspases (Xiang *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1997).

#### *Més enllà de les caspases: dianes cel·lulars*

Les caspases efectores tenen com a substrats diferents proteïnes implicades en el manteniment del citoesquelet cel·lular, la reparació del DNA, la transducció de senyal, el contacte amb l'entorn i el control del cicle cel·lular, entre d'altres. La proteòlisi i la inactivació consegüent d'aquestes dianes representen un programa ben planificat i executat encaminat a desintegrar la cèl·lula en cossos apoptòtics, i fer-la recognoscible per a la fagocitosis. Malauradament, el coneixement que es té d'aquesta darrera etapa és encara massa fraccionari.

S'han classificat aquests substrats en dues categories molt genèriques (Nunez *et al.*, 1998): d'una banda, reguladors del procés apoptòtic (el truncament dels quals pot representar tant l'activació com la inhibició) i, de l'altra, proteïnes protectores de la viabilitat cel·lular, i que un cop degradades permeten el correcte desencaix de la cèl·lula. Dins de la primera categoria es podria assenyalar MEKK1 (Cardone *et al.*, 1997), Mst1 (Graves *et al.*, 1998), i la cinasa 2 activada per p21 (PAK2) (Rudel *et al.*, 1997). També diverses proteïnes de caràcter antiapoptòtic, com ara Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>, Akt, la cinasa d'adhesió focal (FAK) i Raf-1 són substrats de les caspases (Grandgirard *et al.*, 1998; Gervais *et al.*, 1998; Widmann *et al.*, 1998). Un altre

substrat interessant dins d'aquesta categoria és la proteïna supressora tumoral pRb, que tot i estar bàsicament relacionada amb la progressió del cicle cel·lular, també té funcions clarament antiapoptòtiques (Fattman *et al.*, 1997; Dou i An, 1998). Entre les proteïnes protectores de la viabilitat, podem trobar factors estructurals, com l'actina i proteïnes implicades en la seva regulació — $\alpha$ -fodrina, etc.— (Mashima *et al.*, 1997; Cryns *et al.*, 1996), gelsolina (Kothakota *et al.*, 1997) i les lamines nuclears, components claus del citoesquelet nuclear, el truncament de les quals dona lloc a la condensació cromosòmica (Orth *et al.*, 1996), a més de factors implicats en els processos de síntesi i reparació del DNA —la poly-ADP-ribosapolimerasa, PARP, el factor de replicació C, RF-C— (Rheume *et al.*, 1997). També l'inhibidor de nucleasa ICAD és substrat de les caspases. La seva degradació permet l'alliberament de la nucleasa dependent de caspasa, CAD, i el seu direccionament al nucli iniciant la condensació nuclear (Sakahira *et al.*, 1998).

## RELACIONS ENTRE L' APOPTOSI I ELS MECANISMES DE TUMORIGÈNESI

### Alteracions de la maquinària apoptòtica en la cèl·lula tumoral

Les primeres evidències de la importància de l'apoptosi en l'eliminació de cèl·lules tumorals deriven dels experiments realitzats amb virus oncogènics. De fet, el procés apoptòtic és en si mateix altament eficient en l'eliminació de les cèl·lules que estan treballant per perpetuar el creixement viral i és per això que alguns virus codifiquen per proteïnes que bloquegen l'apoptosi per diferents vies (Shen i Shenk, 1995). Així, la regió E1B del genoma dels adenovirus conté una proteïna de 55 kD que s'uneix a la pro-

teïna p53 provocant-ne la inactivació i una altra de 19 kD que realitza una funció anàloga a la de Bcl-2 (White, 1996). Altres virus amb propietats transformants com els virus del papiloma o el virus Epstein-Barr també contenen gens que codifiquen per proteïnes inactivadores de la funció p53 (Scheffner *et al.*, 1993; Mossialos *et al.*, 1995).

A més de la implicació de les proteïnes virals, moltes altres dades experimentals posen de manifest que la inactivació de l'apoptosi contribueix al mecanisme general de la transformació tumoral de maneres molt diverses. Així, s'ha evidenciat que les diferents alteracions del procés apoptòtic poden proporcionar a la cèl·lula un entorn permissiu per a la inestabilitat genètica i l'acumulació de mutacions, poden contribuir a desobeir les ordres dels sistemes de vigilància del cicle cel·lular que induïrien apoptosi, a facilitar la supervivència independent de factors de creixement i d'hormones, de l'ancoratge al substrat, i de l'oxigen, així com a augmentar la resistència a la resposta immune del pacient i a les accions de drogues quimioteràpiques i radiacions (revisat a Reed, 1999).

Totes aquestes evidències han portat a la necessitat d'aprofundir en el coneixement a nivell molecular dels lligams entre alteracions de l'apoptosi i tumorigènesi. Una informació molt útil prové dels efectes observats en els ratolins *knock-out* per als principals gens implicats en les rutes apoptòtiques (revisat a Li i Yuan, 1999). També, però, són necessàries per tal de fer valoracions sobre el seu grau d'implicació en els processos tumorigènics humans, dades provinents de *screenings* massius de les alteracions i/o variacions de l'expressió d'aquests gens a les cèl·lules i teixits tumorals. A partir d'aquí, el pas següent consisteix en una anàlisi més exhaustiva de quina és la funció que exerceixen aquestes alteracions en el desenvolupament dels tumors i en la resposta a

diferents teràpies. Aquest nivell solament s'ha assolit en el cas d'alguns elements, com ara p53, Bcl-2 o Fas, mentre que per a la majoria, incloent-hi les diferents caspases o els seus inhibidors, els estudis es troben encara en etapes molt més primerenques.

### Alteracions de la família de Bcl-2

Atès el paper clau que les proteïnes de la família Bcl-2 tenen en el control de la maquinària de mort cel·lular, no és sorprenent trobar alteracions en els nivells i/o la funció d'alguns dels membres d'aquesta família. Incrementos patològics dels nivells de Bcl-2 i altres factors antiapoptòtics han estat detectats en molts tipus de càncer, si bé els mecanismes responsables d'aquesta sobreexpressió no són coneguts totalment (Kerr *et al.*, 1994; Choi; 1995, D'Sa Eipper *et al.*, 1998). Tots els gens antiapoptòtics de la família Bcl-2 són potencialment oncogènics i sembla que algunes mutacions poden incrementar-ne l'expressió (Adams i Cori, 1999). També ha estat descrit en cèl·lules hematopoiètiques que oncogens com ara *Myb* o *Ras* induïen l'expressió de Bcl-2 (Taylor *et al.*, 1996; Klampfer *et al.*, 1996). Sinergies entre les accions de *Myc* i Bcl-2 han estat demostrades *in vitro* i posteriorment en limfomes i càncers de mama treballant amb ratolins bitransgènics (Jager *et al.*, 1997).

En referència als membres d'aquesta família implicats en la inducció d'apoptosi, s'han descrit baixades significatives de Bax i Bak en diferents càncers (revisat a Reed, 1999). També s'han identificat mutacions inactivants del gen *bax* en tumors de còlon i estómac, així com en un elevat percentatge de malignitats hematopoiètiques (Rampino *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1997; Meijerink *et al.*, 1998). La informació procedent de ratolins *knock-out* per al gen *bax* també deixa clar el seu paper supressor *in vivo*, si bé la seva pèrdua redueix l'apoptosi i augmenta

la tumorigenicitat solament un 50 % respecte del que s'ha observat en cèl·lules p53-negatives, fet que demostra que l'apoptosi induïda per p53 no sempre és dependent de l'acció de Bax (Yin *et al.*, 1997; McCurrach *et al.*, 1997). A més a més, s'han trobat mecanismes d'inactivació per fosforilació duta a terme per components de la via de Ras o de receptors de factors de creixement. Així, s'ha descrit que la fosforilació de la proteïna Bad per part de la cinasa Akt/PKB impedeix que Bad dimeritzi amb les proteïnes Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (Gajewski i Thompson, 1996; Marte i Downward, 1997).

Aquesta família de proteïnes també s'ha trobat implicada en la resistència a teràpies antitumorals. Hi ha nombroses evidències que la proteïna Bcl-2 representa un nou tipus de proteïna de resistència ja que pot provocar importants retardaments, i arriba en alguns casos a l'anul·lació de l'apoptosi induïda per radiacions i agents antitumorals emprats en clínica (revisat a Reed, 1995), fet que ha donat lloc a la reducció dels nivells de Bcl-2 amb finalitats terapèutiques, com es comentarà més endavant.

### Alteracions en les vies de receptors de mort

Les accions apoptòtiques induïdes per les proteïnes de la família dels receptors de mort poden modular-se per mecanismes d'inhibició no relacionats directament amb Bcl-2. Un és l'executat per les proteïnes que contenen dominis efectors de mort (DED). La presència d'aquest domini comporta que aquestes proteïnes puguin competir amb les caspases que són reclutades per interaccions DED-DED, que actuen com a inhibidors transdominants de la ruta de receptors de mort. Alguns membres d'aquesta família han estat trobats sobreexpressats en diferents tumors (Irmeler, 1997). Altres mecanismes que contribueixen a la inactivació de

l'apoptosi per alteracions en membres d'aquesta família inclouen: baixades en l'expressió dels receptors de mort, mutacions inactivadores del gen *Fas* i augments d'expressió de receptors *decoy* (trampa) que competeixen amb els lligands de la família del TNF (Pitti *et al.*, 1998; Ashkenazi i Dixit, 1999).

La inactivació d'aquesta ruta té moltes implicacions en la supervivència de les cèl·lules tumorals. En primer lloc, pot ajudar la cèl·lula tumoral a evitar-ne l'eliminació per l'acció de les cèl·lules T citolítiques que empren aquesta via per a induir l'apoptosi a la cèl·lula diana (Golstein, 1997b). A més, aquesta inactivació permet a la cèl·lula tumoral expressar lligands de *Fas* (FasL) sense veure afectada la pròpia viabilitat però sí afectant la viabilitat de cèl·lules T activades encarregades de reconèixer antígens de tumors i de les cèl·lules normals del seu entorn. Aquestes accions afavoreixen la supervivència i la capacitat de migració de la cèl·lula tumoral (Bennet *et al.*, 1998). Finalment, la impossibilitat d'induir apoptosi per aquesta ruta rebaixarà l'eficiència dels diferents agents quimioteràpics que actuen activant els receptors d'aquesta família o d'altres accions que augmenten la transcripció de *Fas* a través de la proteïna p53 (revisat a Kastan, 1997).

### Alteracions en el gen supressor p53

El gen supressor de tumors p53 i la proteïna que codifica han estat objecte de molts estudis, sobretot a partir dels primers *screenings* en què es mostrava que més del 50 % dels càncers humans presentaven alteracions d'aquest gen (Hollstein *et al.*, 1994). Els canvis més freqüentment observats han estat les mutacions sense sentit en un al·lel que donen lloc a l'expressió d'una proteïna amb funcionalitat alterada i la ràpida tendència a l'homozigosi en aquestes cèl·lules (Levine,

1998). Amb una menor freqüència, s'han observat deleccions o mutacions que donen lloc a l'aparició de codons d'aturada, i en aquests casos el que s'observa és un increment en la predisposició al càncer, resultat idèntic al que s'obté amb els ratolins *knock-out* per a aquest gen (Donehower *et al.*, 1992). L'estudi de l'espectre de mutacions al *locus* de p53 en diferents teixits és indicatiu d'accions molt concretes per part de diferents mutàgens ambientals i també de l'existència de certes preferències de teixit (Lutzker i Levine, 1996). A més, s'ha observat una forta selecció d'un grup de mutacions localitzades precisament en el domini d'unió de la proteïna al DNA (Bergh *et al.*, 1995; Aas *et al.*, 1996). També s'han descrit inactivacions de p53 per interacció amb productes virals (White, 1996; Scheffner *et al.*, 1993; Mossialos *et al.*, 1995) i altres mecanismes cel·lulars endògens com, per exemple, la sobreexpressió de Mdm-2 o alteracions en el gen *p19<sup>ARF</sup>* (Oliner *et al.*, 1992; Sherr, 1998).

Totes aquestes dades es troben d'acord amb el paper de p53 com a *guardià del genoma*, induint, a més de les rutes apoptòtiques esmentades a l'apartat anterior, un ampli ventall de processos com ara la reparació del DNA, el control del cicle cel·lular i la senescència (Lane, 1992; Ko i Prives, 1996; Levine, 1998).

La inactivació funcional de la proteïna p53 sovint comporta, a més del seu paper en el procés de transformació tumoral, l'aparició de resistències a agents que causen dany al DNA, com són molts dels agents emprats en quimioteràpia i radioteràpia (Lowe *et al.*, 1993a i 1993b), fet d'importància transcendental a l'hora de dissenyar les teràpies adients per a cada tipus de tumor.

### Alteracions de la maquinària executora

Fins al moment actual, no s'han realitzat gaires *screenings* exhaustius per tal d'ava-

luar l'estat dels gens de la família de les caspases. Tot i això, ja s'han trobat exemples de pèrdua d'expressió o mutacions inactivadores de gens de caspases en línies cel·lulars tumorals humanes (Nunez *et al.*, 1998; Reed, 1999). Tampoc no hi ha gaires estudis referents a les diferències d'expressió de les famílies de proteïnes inhibidores de caspases (IAP) entre teixits normals i tumorals humans. Tanmateix, ja es coneix que la família representada per la survivina es troba sobreexpressada en un alt percentatge de càncers humans, fet que evidencia, per tant, que l'expressió alterada de IAP també té lloc durant la tumorigènesi (Ambrosini *et al.*, 1997). També ha estat descrit que alguns IAP humans poden activar factors de transcripció antiapoptòtics, com ara NF- $\kappa$ B, i que, a la vegada, aquests factors indueixen l'expressió de IAP, i estableixen un *loop* de retroalimentació positiu que sembla ser actiu en el procés de progressió tumoral (Lacasse *et al.*, 1998).

### Relació entre oncogenicitat i apoptosi

Ja fa uns quants anys que es va començar a entreveure que l'acció oncogènica comportava, a més de la inducció de proliferació, un augment de la taxa d'apoptosi. Primer va semblar un contrasentit total, però de mica en mica es van anar afegint dades en favor de l'existència d'aquesta relació entre proliferació i mort, i avui en dia ningú no en dubta atès l'alt nombre d'evidències experimentals, si bé encara no s'ha arribat a elucidar quins són els mecanismes moleculars responsables de coordinar aquestes accions. S'han proposat diferents hipòtesis per tal d'explicar quin és el significat d'aquesta col·laboració. La hipòtesi més probable és que aquesta connexió respongui a un mecanisme de seguretat, atesa la gravetat de l'acció oncogènica, de forma que qualsevol activació d'aquestes proteïnes comporti

a la vegada un senyal de frenada per tal d'impedir que aquesta cèl·lula activada oncogènicament proliferi. No obstant això, el procés de proliferació anòmala pot avançar si altres alteracions en la mateixa cèl·lula fan ineficient aquest sistema de seguretat, perquè les alteracions addicionals afectin directament el funcionament de la maquinària apoptòtica o algun senyal que connecti ambdues accions (Evan i Littlewood, 1998).

Els primers exemples d'aquestes accions van ser els obtinguts per a l'oncogen *c-Myc*. Es va descriure que l'expressió desregulada de *c-Myc* es troba més freqüentment en cèl·lules proliferants que en quiescents com calia esperar ateses les propietats mitogèniques, però també es va veure que aquestes cèl·lules són conduïdes amb major freqüència a mort (Evan *et al.*, 1992; Sakamuro *et al.*, 1995). Analitzant l'estructura de la proteïna *c-Myc* no es van poder separar els dominis responsables de les seves propietats mitogèniques i proapoptòtiques (Amati *et al.*, 1993). No s'ha pogut demostrar que les accions proapoptòtiques de *c-Myc* vinguessin mediades pels complexos *cyc/cdk* que participen en diverses vies de senyalització d'apoptosi, ni per altres proteïnes relacionades amb l'acció de *c-Myc*, com ara l'ornitina descarboxilasa, *Cdc25A* o lactat deshidrogenasa A (Rudolph *et al.*, 1996; Galaktionov *et al.*, 1996). Dades posteriors indiquen, d'una banda, que la inducció d'apoptosi que exerceix *c-Myc* pot ser independent de la seva activitat transcripcional i, de l'altra, que aquesta inducció pot estar relacionada, almenys parcialment, amb una estabilització i activació de la proteïna *p53* (revisat a Prives, 1998).

En el mateix sentit, es poden interpretar les dades obtingudes amb la proteïna viral *E1A*. Les seves propietats oncogèniques també van acompanyades de la inducció d'apoptosi. Les primeres dades es van obtenir treballant amb adenovirus mutants, amb

defectes en la regió E1B que codifica per proteïnes que contraresten les accions provinents de E1A, els quals provoquen una ràpida destrucció del DNA i la mort de la cèl·lula hoste (White i Stillman, 1987). Estudis posteriors van demostrar que E1A és un potent inductor d'apoptosi i que exerceix les seves accions proapoptòtiques per unió al corepressor transcripcional p300 (CBP) i a les proteïnes de la família de pRb, i competeixen per la seva unió amb les proteïnes de la família E2F, en especial E2F-1, accions que també poden donar lloc a estabilitzacions de p53, com es veurà més endavant (Flint i Shenk, 1997; Samuelson i Lowe, 1997).

La proteïna E2F-1 és precisament un element que ha aportat moltes evidències sobre les interconnexions entre oncogènesi i apoptosi. Pertany a una família de proteïnes (família E2F) la funció de les quals consisteix en l'activació transcripcional de proteïnes encarregades de la progressió a través de les fases G1 i S del cicle cel·lular (Johnson i Schneider-Broussard, 1998). Clàssicament considerades oncogèniques per aquesta funció clarament proliferativa, s'ha vist posteriorment que E2F-1 exerceix una acció dual, i és responsable també de portar les cèl·lules cap a apoptosi quan es produeix aquesta desregulació de la seva funció. Les dades provinents dels ratolins *knock-out* d'E2F-1 il·lustren molt bé aquest comportament, ja que aquests animals presenten una susceptibilitat incrementada a l'aparició de tumors (Yamasaki *et al.*, 1996; Field *et al.*, 1996). Tant l'acció proapoptòtica de E2F-1 com les propietats antiapoptòtiques descrites per a la proteïna pRb, semblen estar relacionades, almenys parcialment, amb l'estabilització de la proteïna p53 per acció de la proteïna p19<sup>ARF</sup>, els nivells de la qual varien en funció de la quantitat d'E2F-1 actiu — no unit a pRb — (revisat a Prives, 1998). No obstant això, a l'igual que en el cas de c-Myc, el

paper de p53 en l'apoptosi induïda per E2F-1 no és exempt de controvèrsia. S'han descrit induccions d'apoptosi per E2F-1 en cèl·lules p53 negatives (Agah *et al.*, 1997; Hunt *et al.*, 1997). A més, s'ha demostrat que les accions mitogèniques i apoptòtiques de E2F són separables. Així, no tots els membres de la família E2F exerceixen l'acció dual abans esmentada, ja que E2F-2 i E2F-3 solament comparteixen les accions proliferatives però no induïxen apoptosi en condicions similars a les estudiades per E2F-1 (de Gregory *et al.*, 1997). També ha estat descrit que mutants de E2F-1 que no presenten activitat transcripcional de proteïnes de progressió de cicle són capaços d'induir apoptosi (Hsieh *et al.*, 1998). Aquest conjunt d'evidències ens indica que no sempre la desregulació de la proliferació comporta la inducció d'apoptosi, i viceversa, i són senyals molt específics els que lliguen proliferació descontrolada i mort cel·lular.

L'oncogen *Ras* constitueix un altre exemple de relació entre les rutes de proliferació i apoptosi. Les proteïnes Ras tenen un paper clau en la transducció de senyals mitogènics mitjançant rutes de Raf-MAP-cinases, un fet refrendat per l'elevada freqüència de mutacions activadores de Ras trobada en càncers humans (Rampino *et al.*, 1997). Ras també es troba implicada en la transmissió de senyals de supervivència des de receptors (com ara el receptor de IGF-1) a efectors intracel·lulars com la PI3-cinasa, Akt i Bad (Kauffmann-Zeh, 1997; Dudek, 1997; Kulik, 1997). En principi, doncs, Ras sembla capaç d'activar la proliferació i suprimir l'apoptosi de manera simultània, la qual cosa representa una combinació catastròfica. Tanmateix, de manera paradoxal, s'ha evidenciat que l'activació de Ras en fibroblasts no transformats comporta també respostes clarament anti-proliferatives, com ara un arrest cel·lular mitjançat per p53, freqüentment acompanyat d'apoptosi, accions ambdues que sem-



blen implicar la cinasa de la via de Ras, la proteïna Raf (Kauffmann-Zeh *et al.*, 1997). Únicament quan aquestes respostes no siguin possibles per l'existència d'alteracions addicionals a l'activació de Ras (pèrdua de p16 o p53), poden viabilitzar-se les accions oncogèniques de Ras (Serrano *et al.*, 1997).

Sembla clar, doncs, que les accions proliferatives poden promoure l'apoptosi, però, a més, s'ha demostrat que les accions supressores d'apoptosi, en determinades situacions, també poden suprimir la proliferació, cosa que augmenta encara més la complexitat de totes aquestes interrelacions. Així, ha estat descrit que la sobreexpressió de un factor antiapoptòtic potent, com ara Bcl-2, pot dificultar l'entrada de la cèl·lula al cicle cel·lular (Marvel *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1997) mentre que la sobreexpressió de la proteïna proapoptòtica Bax pot accelerar la progressió del cicle (Brady *et al.*, 1996).

Tot aquest conjunt d'evidències és indicatiu de l'existència de moltes col·laboracions diferents en funció del context cel·lular, i concretament, en cèl·lules tumorals, d'interconnexions que depenen del patró d'alteracions genètiques. Tanmateix, s'estan començant a entreveure mecanismes que poden explicar alguns dels resultats contradictoris observats. Per exemple, les activacions de Myc o E1A, o les alteracions de la ruta de pRb/E2F, provoquen una apoptosi mediada en molts sistemes per p53, però hi ha moltes dades difícils d'encaixar en aquests models. Sembla cada vegada més clar que l'origen d'aquesta controvèrsia pot trobar-se en el fet que l'acció oncogènica, en moltes situacions, no activa directament l'apoptosi via p53 sinó que més aviat sensibilitza la cèl·lula activada a morir per apoptosi en resposta a diferents estímuls, com, per exemple, senyals provinents de la via de Fas (Evan i Littlewood, 1998).

Malgrat que es coneix molt poc pel que

fa als elements concrets responsables d'aquesta sensibilització, algunes dades obtingudes en experiments d'activació d'apoptosi per la proteïna viral E1A indiquen activació de caspases (Fearnhead *et al.*, 1997) i assenyalen cap als components de l'apoptosoma intracel·lular com a possibles candidats (Zou, 1997; Li, 1997).

## ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES

La inducció d'apoptosi representa una eina indiscutible en el disseny de teràpies moleculars en càncer ateses les evidències segons les quals la disminució de la capacitat apoptòtica contribueix significativament al desenvolupament de tumors.

El principal problema que presenten les teràpies en càncer neix de la dificultat d'asolir l'eliminació de totes les cèl·lules tumorals del pacient sense sobrepassar un llindar relativament baix d'efectes tòxics sobre les cèl·lules normals. De fet, la quimioteràpia i la radioteràpia danyen tant cèl·lules tumorals com normals i aquest dany es tradueix, d'una manera o una altra, en mort cel·lular, en molts casos per activació de la maquinària apoptòtica (Lowe, 1993a). Quan aquesta activació no és selectiva de cèl·lula tumoral, l'aproximació terapèutica té poques possibilitats de ser eficient. Encara més, les alteracions en el funcionament de vies implicades en apoptosi presents a les cèl·lules transformades contribueixen en molts casos a la resistència a la quimioteràpia que mostren molts tumors. Per tot això, l'objectiu és aconseguir induir apoptosi de manera específica a les cèl·lules tumorals, i la manipulació genètica dirigida a restituir la funcionalitat de les proteïnes implicades en aquesta inducció és, per tant, molt prometedora.

En aquest context, una de les estratègies pioneres ha estat la restitució mitjançant tècniques de teràpia gènica del gen supressor

de la p53. Tot i ser el gen amb una incidència més elevada d'alteracions en tumors humans, i que la seva posició central en la inducció d'arrest cel·lular i apoptosi és indiscutible, els resultats obtinguts tant *in vitro* com *in vivo* s'han mostrat sovint contradictoris (revisat a Favrot *et al.*, 1998). No obstant això, les dades semblen més explicables si es considera la influència que poden tenir en l'eficiència d'aquestes aproximacions el patró d'alteracions genètiques de les cèl·lules tractades i/o el nivell d'expressió de p53 assolit en les cèl·lules transduïdes (Chen *et al.*, 1996; Cascalló *et al.*, 1999a). S'estan obtenint resultats molt prometedors per combinació de les teràpies convencionals, com ara la radioteràpia i quimioteràpia i la reintroducció del gen de la p53. Tant *in vitro* com *in vivo* la presència del gen correcte de la p53 a les cèl·lules tumorals potencia molt significativament l'eficiència d'aquests tractaments atès el paper de sensor de dany genètic de la proteïna p53 (Hannun *et al.*, 1997). Al nostre grup hem pogut demostrar, treballant amb un model de càncer de pàncrees humà, que aquesta potenciació és molt dependent de l'ordre d'administració dels agents terapèutics (Cascalló *et al.*, 1999b). Aproximacions basades en la combinació de restitució de la funcionalitat de p53 amb quimioteràpia ja han estat portades a fases clíniques i els resultats es mostren esperançadors (Roth, 1996; Schuler *et al.*, 1998; Swicher *et al.*, 1999).

Malgrat tot, la posició excessivament inicial que ocupa p53 en les cascades de senyalització d'apoptosi fa que aquesta restitució no sigui eficient en tots els tipus de tumor. Sembla lògic pensar que com més proper a la fase final d'execució estigui l'agent introduït més possibilitats tindrà de mostrar-se eficient amb independència del conjunt d'alteracions genètiques que presentin els tumors que s'han de tractar. En aquest sentit, han estat proposades aproximacions

terapèutiques dirigides a activar més directament les caspases, per exemple, mitjançant accions sobre els receptors de mort, com ara el receptor de Fas o TNF. L'administració de FasL o TNF han presentat una toxicitat elevada, atribuïda a l'acció sobre els seus receptors en les cèl·lules normals (Nagata, 1997). Més recentment, però, s'han descrit reduccions significatives de tumors per inducció d'apoptosi per tractament amb Apo2L/tTRAIL, que no mostren toxicitat sobre el teixit normal, probablement per l'expressió diferencial dels receptors (DR4 i DR5) específics per a aquest lligand (Ashkenazi *et al.*, 1999). L'èxit d'aquests tractaments augmenta per combinació amb agents que rebaixen els nivells de Bcl-2, com l'actinomicina D (Mori *et al.*, 1999).

També s'han assajat teràpies més directament adreçades a l'activació de caspases, basades en la seva sobreexpressió. Els primers resultats obtinguts per transfecció del gen de la caspasa-1 en cèl·lules de glioma, tant *in vitro* com *in vivo*, van posar de manifest la inducció d'apoptosi independentment de la funcionalitat de p53, però també mostraven la presència de subpoblacions resistents al tractament (Yu *et al.*, 1996). Estudis posteriors han implicat altres caspases com, per exemple, la caspasa-7, que ha estat sobreexpressada també en cèl·lules de glioma, induint l'apoptosi amb independència dels nivells de Bcl-2 (Marcelli *et al.*, 1999).

Altres models terapèutics que estan emergint amb força són els que impliquen les proteïnes de la família de Bcl-2, atès el seu paper central en l'execució de l'apoptosi. S'han desenvolupat aproximacions basades en la reducció dels nivells de Bcl-2 per introducció d'oligonucleòtids antisentit que han estat aplicats amb èxit, tant *in vitro* com *in vivo*, sobre cèl·lules de limfoma (Cotter *et al.*, 1994). S'han assajat també aquestes estratègies en pacients de limfoma no hodgkinià, i s'ha observat una potenciació del trac-

tament de quimioteràpia i una millora molt significativa de la prognosi (Webb *et al.*, 1997). Altres aproximacions han anat adreçades a sobreexpressar el gen de Bax. Els resultats obtinguts *in vitro* i *in vivo* posen de manifest la capacitat de Bax per incrementar l'apoptosi induïda per la radioteràpia i quimioteràpia, si bé les respostes són parcials i dependents del patró d'alteracions genètiques (Bargou *et al.*, 1996). Malgrat tots aquests avenços, la complexitat avui en dia existent sobre el paper que tenen els diferents membres d'aquesta extensa família representa un problema a l'hora de definir una teràpia concreta en cada cas.

Altres aproximacions que es comencen a entreveure se sustenten en la hipòtesi, esmentada a l'apartat anterior, segons la qual

la transformació maligna sorgiria com a resultat de la pèrdua de comunicació entre els senyals proapoptòtics induïts pels oncògens i l'activació de la maquinària apoptòtica (Evan i Littlewood, 1998). Les relacions entre oncogenicitat i apoptosi semblen indicar que, si no fallessin les connexions entre rutes proliferatives i apoptòtiques, les cèl·lules activades oncogènicament serien més susceptibles a la inducció de mort que les cèl·lules normals. En conseqüència, aprofundir en el coneixement de com es pot recuperar aquesta comunicació entre caspases i senyals proapoptòtics i dissenyar estratègies en aquest sentit pot proporcionar una bona oportunitat de matar més selectivament les cèl·lules tumorals (figura 2).

En resum, tots els avenços obtinguts en

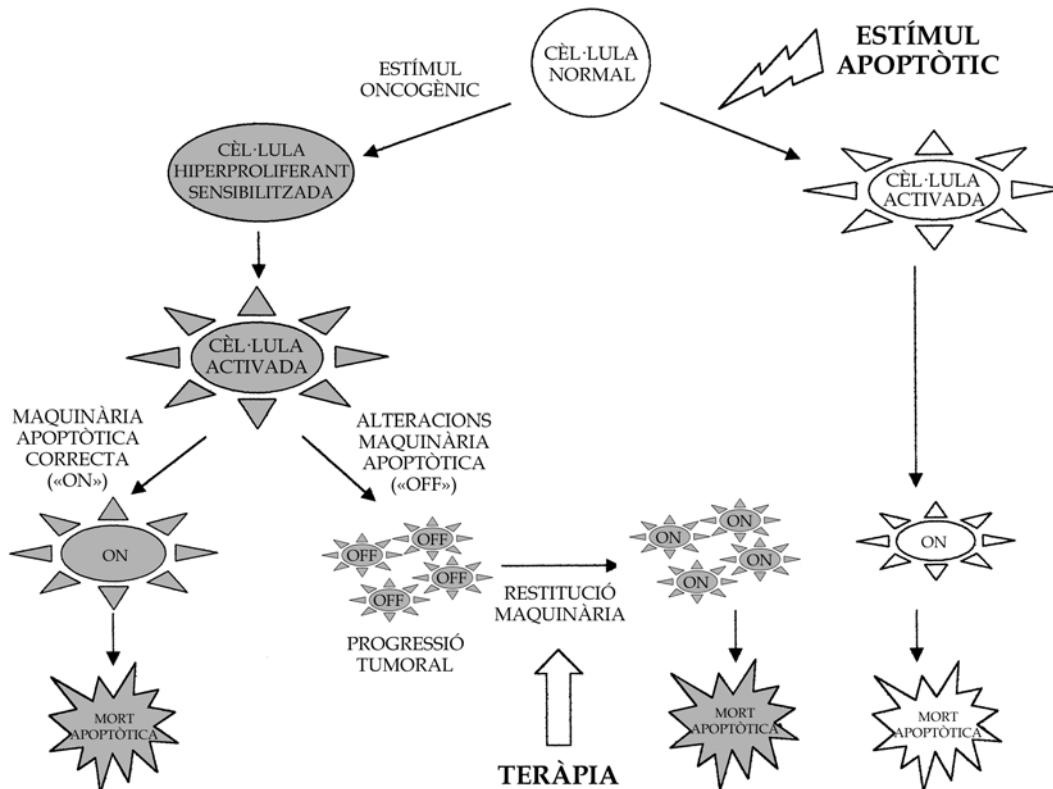


FIGURA 2. Estratègies terapèutiques basades en la recuperació de les interconnexions entre la proliferació anòmla i l'apoptosi.

el coneixement de l'apoptosi i els que vindran properament facilitaran el desenvolupament de noves aproximacions terapèutiques. Com millor es coneixin i s'aprofitin les diferències existents entre les cèl·lules tumorals i les normals en aquestes vies de mort, més probabilitats tindrem d'aconseguir aproximacions amb elevats índexs terapèutics, que són, en definitiva, els que millor ens defineixen l'èxit o el fracàs de la nova teràpia assajada. El principal repte és traslladar la informació que es va generant sobre els mecanismes aberrants de control de mort en càncer cap a oportunitats terapèutiques millors.

## AGRAÏMENTS

Les nostres investigacions han estat finançades per la Marató de TV3 contra el Càncer (94/046) i el Pla nacional de salut (SAF98/042). Manel Cascalló és becari del Programa de formació de personal investigador (FPI) de la Generalitat de Catalunya i Joaquim Calbó gaudeix d'una beca de formació de personal universitari (FPU) del Ministeri d'Educació i Cultura.

## BIBLIOGRAFIA

- AAS, T.; A. L. BORRESEN; S. GEISLER; B. SMITH-SORENSEN; H. JOHNSEN; J. E. VARHAUG; L. A. AKSLEN; P. E. LONNING (1996). «Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients». *Nature Med.*, núm. 2, pàg. 811-814.
- ADAMS, J. M.; S. CORY (1998). «The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival». *Science*, núm. 281, pàg. 1322-1326.
- AGAH, R.; L. A. KIRSHENBAUM; M. ABDELLATIF; L. D. TRUONG; S. CHAKRABORTY; L. H. MICHAEL; M. D. SCHNEIDER (1997). «Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo». *J. Clin. Invest.*, núm. 100, pàg. 2722-2728.
- AMATI, B.; T. D. LITTLEWOOD; G. I. EVAN; H. LAND (1993). «The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max». *EMBO J.*, núm. 12, pàg. 5083-5087.
- AMBROSINI, G.; C. ADIDA; D. ALTIERI (1997). «A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma». *Nature Med.*, núm. 3, pàg. 917-921.
- ANTONSSON, B.; F. CONTI; A. CIAVATTA; S. MONTESSUIT; S. LEWIS; I. MARTINOU; L. BERNASCONI; A. BERNARD; J. J. MERMEOD; G. MAZZEI; K. MAUNDRELL; F. GAMBALE; R. SADOUL; J. C. MARTINOU (1997). «Inhibition of Bax channel forming activity by Bcl-2». *Science*, núm. 277, pàg. 370-372.
- ASHKENAZI, A.; V. M. DIXIT (1998). «Death receptors: signaling and modulation». *Science*, núm. 281, pàg. 1305-1308.
- (1999). «Apoptosis control by death and decoy receptors». *Curr. Opin. Cell. Biol.*, núm. 11, pàg. 255-260.
- BARGOU, R. C.; C. WAGENER; K. BOMMERT; M. Y. MAPARA; P. T. DANIEL; W. ARNOLD (1996). «Overexpression of the death-promoting gene bax which is down-regulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice». *J. Clin. Invest.*, núm. 97, pàg. 2651-2659.
- BENNET, M.; J. O'CONNELL; G. C. O'SULLIVAN; C. BRADY; D. ROCHE; J. K. COLLINS; F. SHANAHAN (1998). «The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma». *J. Immunol.*, núm. 160, pàg. 5669-5675.
- BERG, J.; T. NORBERG; S. SJOGREN; A. LINDGREN; L. HOLMBERG (1995). «Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy». *Nature Med.*, núm. 1, pàg. 1029-1034.
- BERNARDI, P.; K. M. BROEKEMEIER; D. R. PFEIFFER (1994). «Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane». *J. Bioenerg. Biomembr.*, núm. 26, pàg. 509-517.
- BERNARDI, P.; V. PETRONILLI (1996). «The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal». *J. Bioenerg. Biomembr.*, núm. 28, pàg. 131-138.
- BISSONNETTE, N.; B. WASYLYK; D. J. HUNTING (1997). «The apoptotic and transcriptional transactivation activities of p53 can be dissociated». *Biochem. Cell. Biol.*, núm. 75, pàg. 351-358.
- BODMER, J. L.; K. BURNS; P. SCHNEIDER; K. HOFMANN; V. STEINER; M. THOME; T. BORNAND; M. HAHNE; M. SCHROTER; K. BECKER; A. WILSON; L. E. FRENCH; J. L. BROWNING; H. R. MACDONALD; J. TSCHOPP (1997). «TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95)». *Immunity*, núm. 6, pàg. 79-88.

- BRADY, H. J.; G. GIL-GÓMEZ; J. KIRBERG; A. J. BERNS (1996). «Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells». *EMBO J.*, núm. 15, pàg. 6991-7001.
- BUCKBINDER, L.; R. TALBOTT; S. VELASCO-MIGUEL; I. TAKENAKA; B. FAHA; B. R. SEIZINGER; N. KLEY (1995). «Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53». *Nature*, núm. 377, pàg. 646-649.
- CAELLES, C.; A. HELMBERG; M. KARIN (1994). «p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes». *Nature*, núm. 370, pàg. 220-223.
- CARDONE, M. H.; G. S. SALVESEN; C. WIDMANN; G. JOHNSON; S. M. FRISCH (1997). «The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases». *Cell*, núm. 90, pàg. 315-323.
- CASCALLÓ, M.; J. CALBÓ; J. L. GELPÍ; A. MAZO (1999b). «Reintroduction of wt-p53 gene (Ad5CMV-p53) increases the cytotoxicity by apoptosis in human pancreatic tumour cells treated with genotoxic drugs». *Cancer Gene Ther.* [En premsa]
- CASCALLÓ, M.; E. MERCADÉ; G. CAPELLÀ; F. LLUÍS; C. FILLAT; A. M. GÓMEZ-FOIX; A. MAZO (1999a). «Genetic background determines the response to adenovirus-mediated wt-p53 expression in pancreatic tumour cells». *Cancer Gene Ther.*, núm. 6, pàg. 428-436.
- CECCONI, F.; G. ÀLVAREZ-BOLADO; B. I. MEYER; K. A. ROTH; P. GRUSS (1998). «Apaf1 (CED-4 homolog) regulate programmed cell death in mammalian development». *Cell*, núm. 94, pàg. 727-737.
- CHAUDHARY, P. M.; M. EBY; A. JASMIN; A. BOOKWALTER; J. MURRAY; L. HOOD (1997). «Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF- $\kappa$ B pathway». *Immunity*, núm. 7, pàg. 821-830.
- CHEN, X.; L. J. KO; L. YAYARAMAN; C. PRIVES (1996). «p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells». *Genes Dev.*, núm. 10, pàg. 2438-2451.
- CHINNAIYAN, A. M.; K. O'ROURKE; M. TEWARI; V. M. DIXIT (1995). «FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis». *Cell*, núm. 81, pàg. 505-512.
- CHITTENDEN, T.; C. FLEMINGTON; A. B. HOUGHTON; R. G. EBB; G. J. GALLO; B. ELANGOVAN; G. CHINNADURAI; R. J. LUTZ (1995). «A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions». *EMBO J.*, núm. 14, pàg. 5589-5596.
- CHOI, S. S.; I. C. PARK; J. W. YUN; Y. C. SUNG; S. I. HONG; H. S. SING (1995). «A novel Bcl-2 related gene, bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow». *Oncogene*, núm. 11, pàg. 1693-1698.
- COSTANTINI, P.; B. V. CHERNYAK; V. PETRONILLI; P. BERNARDI (1996). «Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 6746-6751.
- CRYNYS, V. L.; L. BERGERON; H. ZHU; H. LI; J. YUAN (1996). «Specific cleavage of alpha-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 31277-31282.
- DE GREGORI, J.; G. LEONE; A. MIRON; L. JAKOI; J. R. NEVINS (1997). «Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 94, pàg. 7245-7250.
- DOLE, M.; G. NÚÑEZ; A. K. MERCHANT; J. MAYBAUM; C. K. RODE; C. A. BLOCH; V. P. CASTLE (1994). «Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma». *Cancer Res.*, núm. 54, pàg. 3253-3259.
- DONEHOWER, L. A.; M. HARVEY; B. L. SGLLE; M. J. MCARTHUR; C. A. MONTGOMERY JR; J. S. BUTEL; A. BRADLEY (1992). «Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors». *Nature*, núm. 356, pàg. 215-221.
- DOU, Q. P.; B. AN (1998). «Rb and apoptotic death». *Front Biosci.*, núm. 3, pàg. 419-430.
- DRAGOVICH, T.; C. M. RUDIN; C. D. THOMPSON (1998). «Signal pathways that regulate cell survival and cell death». *Oncogene*, núm. 17, pàg. 3207-3213.
- D'SA-EIPPER, C.; G. CHINNADURAI (1998). «Functional dissection of Bfl-1, a Bcl-2 homolog: anti-apoptosis, oncogene-cooperation and cell proliferation activities». *Oncogene*, núm. 16, pàg. 3105-3114.
- DUDEK, H.; S. R. DATTA; T. F. FRANKE; M. J. BIRNBAUM; R. YAO; G. M. COOPER; R. A. SEGAL; D. R. KAPLAN; M. E. GREENBERG (1997). «Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt». *Science*, núm. 275, pàg. 661-665.
- EGUCHI, Y.; S. SHIMIZU; Y. TSUJIMOTO (1997). «Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis». *Cancer Res.*, núm. 57, pàg. 1835-1840.
- EVAN, G.; T. LITTLEWOOD (1998). «A matter of life and cell death». *Science*, núm. 281, pàg. 1317-1321.
- FATTMAN, C. L.; B. AN; Q. P. DOU (1997). «Characterization of interior cleavage of retinoblastoma protein in apoptosis». *J. Cell. Biochem.*, núm. 67, pàg. 399-408.
- FAVROT, M.; J. L. COLL; N. LOUIS; A. NEGOESCU (1998). «Cell death and cancer: replacement of apoptotic genes and inactivation of death suppressor genes in therapy». *Gene Ther.*, núm. 5, pàg. 728-739.
- FEARNHEAD, H. O.; M. E. MCCURRACH; J. O'NEILL; K. ZHANG; S. W. LOWE; Y. A. LAZEBNIK (1997). «Oncogene-dependent apoptosis in extracts from drug-resistant cells». *Genes Dev.*, núm. 11, pàg. 1266-1276.
- FIELD, S. J.; F. Y. TSAI; F. KUO; A. M. ZUBIAGA; W. G. KAELIN JR.; D. M. LIVINGSTON; S. H. ORKIN; M. E. GREEN-

- BERG (1996). «E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation». *Cell*, núm. 85, pàg. 549-561.
- FLINT, J.; T. SHENK (1997). «Viral transactivating proteins». *Ann. Rev. Gen.*, núm. 31, pàg. 177-212.
- GAJEWSKI, T. F.; C. B. THOMPSON (1996). «Apoptosis meets signal transduction: elimination of bad influence». *Cell*, núm. 87, pàg. 589-592.
- GALAKTIONOV, K.; X. CHEN; D. BEACH (1996). «Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc». *Nature*, núm. 382, pàg. 511-517.
- GERVAIS, F. G.; N. A. THORNBERRY; S. C. RUFFOLO; D. W. NICHOLSON; S. ROY (1998). «Caspases cleave focal adhesion kinase during apoptosis to generate a FRNK-like polypeptide». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 17102-17108.
- GOLSTEIN, P. (1997a). «Cell death: TRAIL and its receptors». *Curr. Biol.*, núm. 7, pàg. 750-753.
- (1997b). «Controlling cell death». *Science*, núm. 275, pàg. 1081-1082.
- GRANDGIRARD, D.; E. STUDER; L. MONNEY; T. BELSER; I. FELLAY; C. BORNER; M. R. MICHEL (1998). «Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2». *EMBO J.*, núm. 17, pàg. 1268-1278.
- GRAVES, J. D.; Y. GOTOH; K. E. DRAVES; D. AMBROSE; D. K. HAN; M. WRIGHT; J. CHERNOFF; E. A. CLARK; E. G. KREBS (1998). «Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1». *EMBO J.*, núm. 17, pàg. 2224-2234.
- GROSS, A.; J. JOCKEL; M. C. WEI; S. J. KORSMEYER (1998). «Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis». *EMBO J.*, núm. 17, pàg. 3878-3885.
- GROSS, A.; J. M. McDONNELL; S. J. KORSMEYER (1999). «Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis». *Genes & Dev.*, núm. 13, pàg. 1899-1911.
- HALDAR, S.; N. JENA; C. M. CROCE (1995). «Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, núm. 92, pàg. 4507-4511.
- HAKEM, R.; A. HAKEM; G. S. DUNCAN; J. T. HENDERSON; M. WOO; M. S. SOENGAS; A. ELIA; DE LA POMPA, J. L.; D. KAGI; W. KHOO; J. POTTER; R. YOSHIDA; S. A. KAUFMAN; S. W. LOWE; J. M. PENNINGER; T. W. MAK (1998). «Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo». *Cell*, núm. 94, pàg. 339-352.
- HANNUN, Y. A. (1997). «Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy». *Blood*, núm. 89, pàg. 1845-1853.
- HARRIS, C. C. (1996). «Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies». *J. Natl. Cancer Inst.*, núm. 88, pàg. 1442-1455.
- HOFMANN, K.; P. BUCHER; J. TSCHOPP (1997). «The CARD domain: a new apoptotic signalling motif». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 22, pàg. 155-156.
- HOLLSTEIN, M.; D. D. D'SIDRANSKI; B. VOGELSTEIN; C. C. HARRIS (1991). «p53 mutations in human cancers». *Science*, núm. 253, pàg. 49-53.
- HSIEH, J. K.; F. S. CHAN; D. J. O'CONNOR; S. MITTNACHT; S. ZHONG; X. LU (1999). «RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2». *Molecular Cell*, núm. 3, pàg. 181-193.
- HSIEH, J. K.; S. FREDERSDORF; T. KOUZARIDES; K. MARTIN; X. LU (1997). «E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction». *Genes Dev.*, núm. 11, pàg. 1840-1852.
- HSU, H.; H. B. SHU; M. G. PAN; D. V. GOEDEL (1996). «TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways». *Cell*, núm. 84, pàg. 299-308.
- HSU, H.; J. XIONG; D. V. GOEDEL (1995). «The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation». *Cell*, núm. 81, pàg. 495-504.
- HSU, Y. T.; K. G. WOLTER; R. J. YOULE (1997). «Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, núm. 94, pàg. 3668-3672.
- HU, Y.; M. A. BENEDICT; D. WU; N. INOHARA; G. NUNEZ (1998). «Bcl-X<sub>L</sub> interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, núm. 95, pàg. 4386-4391.
- INOHARA, N.; T. KOSEKI; Y. HU; S. CHEN; G. NUNEZ (1998). «CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, núm. 94, pàg. 10717-10722.
- IRMLER, M.; M. THOME; M. HAHNE; D. SCHNEIDER; K. HOFMANN; V. STEINER (1997). «Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP». *Nature*, núm. 388, pàg. 190-195.
- JACKSON, S. P. (1997). «DNA-dependent protein kinase». *International J. Biochem. & Cell Biol.*, núm. 29, pàg. 935-938.
- JACOBSON, M. D.; M. WEIL; M. C. RAFF (1997). «Programmed cell death in animal development». *Cell*, núm. 88, pàg. 347-354.
- JAGER, R.; U. HERZER; J. SHENKEL; H. WEIHER (1997). «Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-Myc induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice». *Oncogene*, núm. 15, pàg. 1787-1795.
- KASTAN, M. (1997). «On the TRAIL from p53 to apoptosis?». *Nature Genet.*, núm. 17, pàg. 130-131.
- KAUFFMANN-ZEH, A.; P. RODRÍGUEZ-VICIANA; E. ULRICH; C. GILBERT; P. COFFER; J. DOWNWARD; G. EVAN (1997). «Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB». *Nature*, núm. 385, pàg. 544-548.

- KELEKAR, A.; B. S. CHANG; J. E. HARLAN; S. W. FESIK; C. B. THOMPSON (1997). «Bad is BH-3 containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-X<sub>L</sub>». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 17, pàg. 7040-7046.
- KELEKAR, A.; C. B. THOMPSON (1998). «Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis». *Trends Cell. Biol.*, núm. 8, pàg. 324-330.
- KERR, J. F. R.; C. M. WINTERFORD; B. V. HARMON (1994). «Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy». *Cancer*, núm. 73, pàg. 2013-2026.
- KERR, J. F.; A. H. WYLLIE; A. R. CURRIE (1972). «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics». *Brit. J. Cancer*, núm. 26, pàg. 239-257.
- KING, K. L.; J. A. CIDLOWSKI (1995). «Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death». *J. Cell Biochem.*, núm. 8, pàg. 175-185.
- KLAMPFER, L.; J. ZHANG; A. O. ZELENETZ; H. UCHIDA; S. D. NIMER (1996). «The AML1/ETO fusion protein activates transcription of Bcl-2». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 93, pàg. 14059-14064.
- KLUCK, R. M.; E. BOSSY-WETZEL; D. R. GREEN; D. D. NEWMAYER (1997). «The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis». *Science*, núm. 275, pàg. 1132-1136.
- KO, L. J.; C. PRIVES (1996). «p53: puzzle and paradigm». *Genes Dev.*, núm. 10, pàg. 1054-1072.
- KOTHAKOTA, S.; T. AZUMA; C. REINHARD; A. KLIPPEL; J. TANG; K. CHU; T. J. MCGARRY; M. W. KIRSCHNER; K. KOTHS; D. J. KWIATKOWSKI; L. T. WILLIAMS (1997). «Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis». *Science*, núm. 278, pàg. 294-298.
- KUIDA, K.; T. F. HAYDAR; C. Y. KUAN; Y. GU; C. TAYA; H. KARASUYAMA; M. S. SU; P. RAKIC; R. A. FLAVELL (1997). «Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9». *Cell*, núm. 94, pàg. 325-337.
- KULIK, G.; A. KLIPPEL; M. J. WEBER (1997). «Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 17, pàg. 1595-1606.
- KUWANA, T.; J. J. SMITH; M. MUZIO; V. DIXIT; D. D. NEWMAYER; S. KORNBLUTH (1998). «Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 16589-16594.
- LACASSE, E. C.; S. BAIRD; R. G. KORNELUK; A. E. MACKENZIE (1998). «The inhibitors of apoptosis (IAPs) and the emerging role in cancer». *Oncogene*, núm. 17, pàg. 3247-3259.
- LANE, D. P. (1992). «p53, guardian of the genome». *Nature*, núm. 358, pàg. 15-16.
- LEVINE, A. J. (1998). «p53, the cellular gatekeeper for growth and division». *Cell*, núm. 88, pàg. 323-331.
- LI, H.; H. ZHU; C. J. XU; J. YUAN (1998). «Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis». *Cell*, núm. 94, pàg. 491-501.
- LI, H.; J. YUAN (1999). «Deciphering the pathways of life and death». *Curr. Opin. Cell Biol.*, núm. 11, pàg. 261-266.
- LI, P.; D. NIJHAWAN; I. BUDIARDJO; S. M. SRINIVASULA; M. AHMAD; E. S. ALNEMRI; X. WANG (1997). «Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade». *Cell*, núm. 91, pàg. 479-489.
- LIU, X.; C. N. KIM; J. YANG; R. JEMMERSON; X. WANG (1996). «Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c». *Cell*, núm. 86, pàg. 147-157.
- LOWE, S. W.; H. E. RULEY; T. JACKS; D. E. HOUSEMAN (1993a). «p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents». *Cell*, núm. 74, pàg. 957-968.
- LOWE, S. W.; E. M. SCHMITT; S. W. SMITH; B. A. OSBORNE; T. JACKS (1993b). «p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes». *Nature*, núm. 362, pàg. 847-849.
- LUO, X.; I. BUDIARDJO; H. ZOU; C. SLAUGHTER; X. WANG (1998). «Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors». *Cell*, núm. 94, pàg. 481-490.
- LUTZKER, S.; A. J. LEVINE (1996). «A functionally inactive p53 protein in embryonal carcinoma cells is activated by DNA damage or cellular differentiation». *Nature Med.*, núm. 2, pàg. 804-810.
- MALININ, N. L.; M. P. BOLDIN; A. V. KOVALENKO; D. WALLACH (1997). «MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1». *Nature*, núm. 385, pàg. 540-544.
- MANCINI, M.; D. W. NICHOLSON; S. ROY; N. A. THORNBERRY; E. P. PETERSON; L. A. CASCIOLA-ROSEN; A. ROSEN (1998). «The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling». *J. Cell. Biol.*, núm. 140, pàg. 1485-1495.
- MARCELLI, M.; G. R. CUNNINGHAM; M. WALKUP; Z. HE; L. STURGIS; C. KAGAN; R. MANNUCCI; I. NICOLETTI; B. TENG; L. DENNER (1999). «Signaling pathway activated during apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP: overexpression of caspase-7 as a new gene therapy strategy for prostate cancer». *Cancer Res.*, núm. 59, pàg. 382-390.
- MARCHETTI, P.; T. HIRSCH; N. ZAMZAMI; M. CASTEDO; D. DECAUDIN; S. A. SUSIN; B. MASSE; G. KROEMER (1998). «Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis». *J. Immunol.*, núm. 157, pàg. 4830-4836.
- MARTE, B. M.; J. DOWNWARD (1997). «PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and

- beyond». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 22, pàg. 355-358.
- MARVEL, J.; G. R. PERKINS; A. LÓPEZ RIVAS; M. K. COLLINS (1994). «Growth factor refractoriness to IL-3 stimulation of proliferation». *Oncogene*, núm. 9, pàg. 1117-1122.
- MARZO, I.; C. BRENNER; G. KROEMER (1998a). «The central role of the mitochondrial megachannel in apoptosis: evidence obtained with intact cells, isolated mitochondria, and purified protein complexes». *Bio-med. & Pharmacother.*, núm. 52, pàg. 248-251.
- MARZO, I.; C. BRENNER; N. ZAMZAMI; J. M. JURGENSMEIER; S. A. SUSIN; H. L. VIEIRA; M. C. PREVOST; Z. XIE; S. MATSUYAMA; J. C. REED; G. KROEMER (1998b). «Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis». *Science*, núm. 281, pàg. 2027-2031.
- MASHIMA, T.; M. NAITO; K. NOGUCHI; D. K. MILLER; D. W. NICHOLSON; T. TSURUO (1997). «Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis». *Oncogene*, núm. 14, pàg. 1007-1012.
- MAYO, L. D.; J. J. TURCHI; S. J. BERBERICH (1997). «Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53». *Cancer Res.*, núm. 57, pàg. 5013-5016.
- MCCARTHY, N. J.; M. K. WHYTE; C. S. GILBERT; G. I. EVAN (1997). «Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak». *J. Cell Biol.*, núm. 136, pàg. 215-227.
- MCCURRACH, M. E.; T. M. CONNOR; C. M. KNUDSON; S. J. KORSMEYER; S. W. LOWE (1997). «Bax deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 94, pàg. 2345-2349.
- MEDEMA, J. P.; C. SCAFFIDI; F. C. KISCHKEL; A. SHEVCHENKO; M. MANN; P. H. KRAMMER; M. E. PETER (1997). «FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)». *EMBO J.*, núm. 16, pàg. 2794-2804.
- MEIJERINK, J. P.; E. J. MENSINK; K. WANG; T. W. SEDLAK; A. W. SLOETJES; T. DE WITTE; G. WAKSMAN; S. J. KORSMEYER (1998). «Hematopoietic malignancies demonstrate loss of function mutations of BAX». *Blood*, núm. 91, pàg. 2991-2997.
- MIYASHITA, T.; J. C. REED (1995). «Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human Bax gene». *Cell*, núm. 80, pàg. 293-299.
- MORI, S.; K. MURAKAMI-MORI; S. NAKAMURA; A. ASHKENAZI; B. BONAVIDA (1999). «Sensitization of AIDS-Kaposi's sarcoma cells to Apo-2 ligand-induced apoptosis by actinomycin D». *J. Immunol.*, núm. 162, pàg. 5616-5623.
- MOSSIALOS, G.; M. BIRKENBACH; R. YALAMANCHILI; T. VAN ARDALE; C. WARE; E. KIEFF (1995). «The Epstein-Barr virus transforming protein LMP-1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family». *Cell*, núm. 80, pàg. 389-399.
- MUCHMORE, S. W.; M. SATTLER; H. LIANG; R. P. MEADOWS; J. E. HARLAN; H. S. YOON; D. NETTESHEIM; B. S. CHANG; C. B. THOMPSON; S. L. WONG; S. L. NI; S. W. FESIK (1996). «X-ray and NMR structure of human Bcl-X<sub>L</sub>, an inhibitor of programmed cell death». *Nature*, núm. 381, pàg. 335-341.
- MUZIO, M.; A. M. CHINNAIYAN; F. C. KISCHKEL; K. O'ROURKE; A. SHEVCHENKO; J. NI; C. SCAFFIDI; J. D. BRETZ; M. ZHANG; R. GENTZ; M. MANN; P. H. KRAMMER; M. E. PETER; V. M. DIXIT (1996). «FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CE3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex». *Cell*, núm. 85, pàg. 817-827.
- MUZIO, M.; B. R. STOCKWELL; H. R. STENNICKE; G. S. SALVESEN; V. M. DIXIT (1998). «An induced proximity model for caspase-8 activation». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 2926-2930.
- NAGATA, S. (1997). «Apoptosis by death factor». *Cell*, núm. 88, pàg. 355-365.
- NATOLI, G.; A. COSTANZO; A. IANNI; D. J. TEMPLETON; J. R. WOODGETT; C. BALSANO; M. LEVRERO (1997). «Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway». *Science*, núm. 275, pàg. 200-203.
- NAUMOVSKI, L.; M. L. CLEARY (1997). «The p53-binding protein 53BP2 also interacts with Bcl-2 and impedes cell cycle progression at G2/M». *Mol. Cell Biol.*, núm. 16, pàg. 3884-3892.
- NICHOLSON, D. W.; N. A. THORNBERRY (1997). «Caspases: killer proteases». *Trends Biochem. Sci.*, núm. 22, pàg. 299-306.
- NUNEZ, G.; M. A. BENEDICT; Y. HU; N. INOHARA (1998). «Caspases: the proteases of the apoptotic pathway». *Oncogene*, núm. 17, pàg. 3227-3245.
- OLINER, J. D.; K. W. KINZLER; P. S. METZLER; D. GEORGE; B. VOGELSTEIN (1992). «Amplifications of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas». *Nature*, núm. 358, pàg. 80-83.
- OLTVAI, Z. N.; S. J. KORSMEYER (1994). «Checkpoints of dueling dimers foil death wishes». *Cell*, núm. 74, pàg. 189-192.
- O'REILLY, L. A.; D. C. HUANG; A. STRASSER (1996). «The cell death inhibitor Bcl-2 and its homologues influence control of cell cycle entry». *EMBO J.*, núm. 15, pàg. 6979-6990.
- ORTH, K.; A. M. CHINNAIYAN; M. GARG; C. J. FROELICH; V. M. DIXIT (1996). «The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 16443-16446.
- PAN, G.; K. O'ROURKE; A. M. CHINNAIYAN; R. GENTZ; R. EBNER; J. NI; V. M. DIXIT (1997). «The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL». *Science*, núm. 276, pàg. 111-113.



- PAN, G.; K. O'ROURKE; V. M. DIXIT (1998). «Caspase-9, Bcl-X<sub>L</sub> and Apaf-1 form a ternary complex». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 5841-5845.
- PASTORINO, J. G.; G. SIMBULA; K. YAMAMOTO; P. A. GLASCOTT JR; R. J. ROTHMAN; J. L. FARBER (1996). «The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 29792-29798.
- PETTIT, P. X.; S. A. SUSIN; N. ZAMZAMI; B. MIGNOTTE; G. KROEMER (1996). «Mitochondria and programmed cell death: back to the future». *FEBS Lett.*, núm. 396, pàg. 7-13.
- PIERCE, A. M.; I. B. GIMÉNEZ-CONTI; R. SCHNEIDER-BROUSSARD; L. A. MARTÍNEZ; C. J. CONTI; D. G. JOHNSON (1998). «Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 95, pàg. 8858-8863.
- PITTI, R.; S. A. MARSTERS; D. A. LAWRENCE; M. ROY; F. C. KISCHKEL; P. DOWD; A. HUANG; C. J. DONAHUE; S. W. SHERWOOD; D. T. BALDWIN (1998). «Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer». *Nature*, núm. 396, pàg. 699-703.
- PRISCO, M.; A. HONGO; M. G. RIZZO; A. SACCHI; R. BASERGA (1997). «The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal». *Mol. Cell Biol.*, núm. 17, pàg. 1084-1092.
- RAMPINO, N.; H. YAMAMOTO; Y. IONOV; Y. LI; H. SAWAI; J. C. REED; M. PERUCHO (1997). «Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype». *Science*, núm. 275, pàg. 967-969.
- RAY, C. A.; R. A. BLACK; S. R. KRONHEIM; T. A. GREENSTREET; P. R. SLEATH; G. S. SALVESEN; D. J. PICKUP (1992). «Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme». *Cell*, núm. 69, pàg. 597-604.
- REED, J. C. (1998). «Bcl-2 family proteins». *Oncogene*, núm. 17, pàg. 3225-3236.
- (1999). «Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer». *Curr. Opin. Oncology*, núm. 11, pàg. 68-75.
- RHEAUME, E.; L. Y. COHEN; F. UHLMANN; C. LAZURE; A. ALAM; J. HURWITZ; R. P. SEKALY; F. DENIS (1997). «The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis». *EMBO J.*, núm. 16, pàg. 6346-6354.
- ROTH, J. A. (1996). «Clinical protocol: modification of tumor suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expressing wild-type p53 and cisplatin». *Hum. Gene Ther.*, núm. 7, pàg. 1013-1030.
- ROTONDA, J.; D. W. NICHOLSON; K. M. FAZIL; M. GALLANT; Y. GAREAU; M. LABELLE; E. P. PETERSON; D. M. RASPER; R. RUEL; J. P. VAILLANCOURT; N. A. THORNBERRY; J. W. BECKER (1996). «The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis». *Nature Struct. Biol.*, núm. 3, pàg. 619-625.
- ROY, N.; Q. L. DEVERAUX; R. TAKAHASHI; G. S. SALVESEN; J. C. REED (1997). «The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases». *EMBO J.*, núm. 16, pàg. 6914-6925.
- RUDEL, T.; G. M. BOKOCH (1997). «Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2». *Science*, núm. 276, pàg. 1571-1574.
- RUDOLPH, B.; R. SAFFRICH; J. ZWICKER; B. HENGLEIN; R. MULLER; W. ANSORGE; M. EILERS «Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis». *EMBO J.*, núm. 15, pàg. 3065-3076.
- SAKAHIRA, H.; M. ENARI; S. NAGATA (1998). «Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis». *Nature*, núm. 391, pàg. 96-99.
- SAKAMURO, D.; V. EVINER; K. J. ELLIOTT; L. SHOWE; E. WHITE; G. C. PRENDERGAST (1995). «c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms». *Oncogene*, núm. 11, pàg. 2411-2418.
- SAMUELSON, A. V.; S. W. LOWE (1997). «Selective induction of p53 and chemosensitivity in RB-deficient cells by E1A mutants unable to bind the RB-related proteins». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, núm. 94, pàg. 12094-12099.
- SATTLER, M.; H. LIANG; D. NETTESHEIM; R. P. MEADOWS; J. E. HARLAN; M. EBERSTADT; H. S. YOON; S. B. SHUKER; B. S. CHANG; A. J. MINN; C. B. THOMPSON; S. W. FESIK (1997). «Structure of Bcl-X<sub>L</sub>-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis». *Science*, núm. 275, pàg. 983-986.
- SCAFFIDI, C.; S. FULDA; A. SRINIVASAN; C. FRIESEN; F. LI; K. J. TOMASELLI; K. M. DEBATIN; P. H. KRAMMER; M. E. PETER (1998). «Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways». *EMBO J.*, núm. 17, pàg. 1675-1687.
- SCHIEFFNER, M.; J. M. HUIBRECTSE; R. D. VIERSTRA; P. M. HOWLEY (1993). «The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53». *Cell*, núm. 75, pàg. 495-505.
- SCHENDEL, S. L.; M. MONTAL; J. C. REED (1998). «Bcl-2 family proteins as ion-channels». *Cell Death Differ.*, núm. 5, pàg. 372-380.
- SCHENDEL, S. L.; Z. XIE; M. O. MONTAL; S. MATSUYAMA; M. MONTAL; J. C. REED (1997). «Channel formation by anti-apoptotic protein Bcl-2». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, núm. 94, pàg. 5113-5118.
- SCHULER, M.; C. ROCHLITZ; J. A. HOROWITZ; J. SCHLEGEL; A. P. PERRUCHOUD; F. KOMMOSS; C. T. BOLLIGER; H. U. KAUCZOR; P. DALQUEN; M. A. FRITZ; S. SWANSON; R. HERRMANN; C. A. HUBER (1998). «A phase I study of

- adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer». *Hum. Gene Ther.*, núm. 9, pàg. 2075-2082.
- SENTMAN, C. L.; J. R. SHUTTER; D. HOCKENBERRY; O. KANAGAWA; S. J. KORSMEYER (1991). «Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes». *Cell*, núm. 67, pàg. 879-888.
- SERRANO, M.; A. W. LIN; M. E. MCCURRAH; D. BEACH; S. W. LOWE. (1997). «Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>ink4a</sup>». *Cell*, núm. 88, pàg. 593-602.
- SHEN, Y.; T. E. SHENK (1995). «Viruses and apoptosis». *Curr. Opin. Genet. Dev.*, núm. 5, pàg. 105-111.
- SHERR, C. J. (1998). «Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway». *Oncogene*, núm. 17, pàg. 3247-3259.
- SHIEH, S. Y.; M. IKEDA; Y. TAYA; C. PRIVES (1997). «DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2». *Cell*, núm. 91, pàg. 325-334.
- SMITH, C. A.; T. FARRAH; R. G. GOODWIN (1997). «The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death». *Cell*, núm. 76, pàg. 959-962.
- STELLER, H. (1995). «Mechanisms and genes of cellular suicide». *Science*, núm. 267, pàg. 1445-1449.
- STRASSER, A.; A. W. HARRIS; T. JACKS; S. CORY (1994). «DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2». *Cell*, núm. 79, pàg. 329-339.
- SUSIN, S. A.; H. K. LORENZO; N. ZAMZAMI; I. MARZO; B. E. SNOW; G. M. BROTHERS; J. MANGION; E. JACOTOT; P. COSTANTINI; M. LOEFFLER; N. LAROCLETTE; D. R. GODLETT; R. AEBERSOLD; D. P. SIDEROVSKI; J. M. PENNINGER; G. KROEMER (1999). «Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor». *Nature*, núm. 397, pàg. 441-446.
- SUSIN, S. A.; N. ZAMZAMI; M. CASTEDO; E. DAUGAS; H. G. WANG; S. GELEY; F. FASSY; J. C. REED; G. KROEMER (1997). «The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis». *J. Exp. Med.*, núm. 186, pàg. 25-37.
- SUSIN, S. A.; N. ZAMZAMI; M. CASTEDO; T. HIRSCH; P. MARCHETTI; A. MACHO; E. DAUGAS; M. GEUSKENS; G. KROEMER (1996). «Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease». *J. Exp. Med.*, núm. 184, pàg. 1331-1341.
- SUSIN, S. A.; N. ZAMZAMI; G. KROEMER (1998). «Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more». *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1366, pàg. 151-165.
- SWISHER, S. G.; J. A. ROTH; J. NEMUNAITIS; D. D. LAWRENCE; B. L. KEMP; C. H. CARRASCO; D. G. CONNORS; A. K. ELNAGGAR; F. FOSSELLA; B. S. GLISSON; W. K. HONG; F. R. KHURI; J. M. KURIE; J. J. LEE; J. S. LEE; M. MACK; J. A. MERRITT; D. M. NGUYEN; J. C. NESBITT; R. PÉREZ-SOLER; K. M. PISTERS; J. B. PUTNAM jr.; W. R. RICHLI; M. SAVIN; M. K. WAUGH (1999). «Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer». *J. Natl. Cancer Inst.*, núm. 91, pàg. 763-771.
- TARTAGLIA, L. A.; M. ROTHE; Y. F. HU; D. V. GOEDEL (1998). «Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor». *Cell*, núm. 73, pàg. 213-216.
- TAYLOR, D.; P. BADIANI; K. WESTON (1996). «A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells». *Genes Dev.*, núm. 10, pàg. 2732-2744.
- THOME, M.; P. SCHNEIDER; K. HOFMANN; H. FICKENSCHER; E. MEINL; F. NEIPEL; C. MATTMANN; K. BURNS; J. L. BODMER; M. SCHROTER; C. SCAFFIDI; P. H. KRAMMER; M. E. PETER; J. TSCHOPP (1997). «Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors». *Nature*, núm. 386, pàg. 517-521.
- THOMPSON, C. B. (1995). «Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease». *Science*, núm. 267, pàg. 1456-1462.
- TING, A. T.; F. X. PIMENTEL-MUINOS; B. SEED (1996). «RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF- $\kappa$ B but not Fas/APO-1-initiated apoptosis». *EMBO J.*, núm. 15, pàg. 6189-6196.
- TSUJIMOTO, Y.; L. R. FINGER; J. YUNIS; P. C. NOWELL; C. M. CROCE (1984). «Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B-cells with the t(14;18) chromosome translocation». *Science*, núm. 224, pàg. 1403-1406.
- VANDER HEIDEN, M. G.; N. S. CHANDEL; E. K. WILLIAMSON; P. T. SCHUMACKER; C. B. THOMPSON (1997). «Bcl-X<sub>L</sub> regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria». *Cell*, núm. 91, pàg. 627-637.
- WANG, H. G.; U. R. RAPP; J. C. REED (1996). «Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria». *Cell*, núm. 87, pàg. 629-638.
- WANG, K.; A. GROSS; G. WAKSMAN; S. J. KORSMEYER (1998). «Mutagenesis of the BH3 domain of Bax identifies residues critical for dimerization and killing». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 18, pàg. 6083-6089.
- WEBB, A.; D. CUNNINGHAM; F. COTTER; P. A. CLARKE; F. DI STEFANO; P. ROSS (1997). «Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma». *Lancet*, núm. 349, pàg. 1137-1141.
- WHITE, E. (1996). «Life, death and the pursuit of apoptosis». *Genes Dev.*, núm. 10, pàg. 1-15.
- WHITE, E.; B. STILLMAN (1987). «Expression of adenovirus E1B mutant phenotypes is dependent on the host cell and on synthesis of E1A proteins». *J. Virol.*, núm. 61, pàg. 426-435.
- WIDMANN, C.; S. GIBSON; G. L. JOHNSON (1998). «Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 7141-7147.

- WILSON, K. P.; J. A. BLACK; J. A. THOMSON; E. E. KIM; J. P. GRIFFITH; M. A. NAVIA; M. A. MURCKO; S. P. CHAMBERS; R. A. ALDAPE; S. A. RAYBUCK [*et al.*] (1998). «Structure and mechanism of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme». *Nature*, núm. 370, pàg. 270-275.
- WINOTO, A. (1997). «Cell death in the regulation of immune responses». *Curr. Opin. Immunol.*, núm. 9, pàg. 365-370.
- WORONICZ, J. D.; X. GAO; Z. CAO; M. ROTHE; D. V. GOEDEL (1997). «I- $\kappa$ B kinase- $\beta$ : NF- $\kappa$ B activation and complex formation with I- $\kappa$ B kinase- $\alpha$  and NIK». *Science*, núm. 278, pàg. 866-869.
- WYLLIE, A. H.; M. J. ARENDS; R. G. MORRIS; S. W. WALKER; G. EVAN (1992). «The apoptosis endonuclease and its regulation». *Sem. Immunol.*, núm. 4, pàg. 389-397.
- XIANG, J.; D. T. CHAO; S. J. KORSMEYER (1997). «Bax-induced cell death may not require interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme-like proteases». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, núm. 93, pàg. 14559-14563.
- XU, Y.; D. BALTIMORE (1996). «Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control». *Genes & Dev.*, núm. 10, pàg. 2401-2410.
- YAMAMOTO, H.; H. SAWAI; M. PERUCHO (1997). «Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype». *Cancer Res.*, núm. 57, pàg. 4420-4426.
- YAMASAKI, L.; T. JACKS; R. BRONSON; E. GOILLOT; E. HARLOW; N. J. DYSON (1996). «Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1». *Cell*, núm. 85, pàg. 537-548.
- YANG, T.; K. M. KOZOPAS; R. W. CRAIG (1995). «The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2». *J. Cell. Biol.*, núm. 128, pàg. 1173-1184.
- YIN, C.; C. M. KNUDSON; S. J. KORSMEYER; T. VAN DYKE (1995). «Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo». *Nature*, núm. 385, pàg. 637-640.
- YOSHIDA, H.; Y. Y. KONG; R. YOSHIDA; A. J. ELIA; A. HAKEM; R. HAKEM; J. M. PENNINGER; T. W. MAK (1998). «Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development». *Cell*, núm. 94, pàg. 739-750.
- YUAN, J.; S. SHAHAM; S. LEDOUX; H. M. ELLIS; H. R. HORVITZ (1998). «The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme». *Cell*, núm. 75, pàg. 641-652.
- YU, J. S.; M. SENA-ESTEVEZ; W. PAULUS; X. O. BREAKEYFIELD; S. A. REEVES (1996). «Retroviral delivery and tetracycline-dependent expression of IL-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) in a rat glioma model provides controlled induction of apoptotic death in tumor cells». *Cancer Res.*, núm. 56, pàg. 5423-5427.
- ZAMZANI, N.; C. BRENNER; I. MARZO; S. A. SUSIN; G. KROEMER (1998). «Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins». *Oncogene*, núm. 16, pàg. 2265-2282.
- ZHA, H.; J. C. REED (1997). «Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells». *J. Biol. Chem.*, núm. 272, pàg. 31482-31488.
- ZHA, J.; H. HARADA; E. YANG; J. JOCKEL; S. J. KORSMEYER (1996). «Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X<sub>L</sub>». *Cell*, núm. 87, pàg. 619-628.
- ZOU, H.; W. J. HENZEL; X. LIU; A. LUTSCHG; X. WANG (1997). «Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3». *Cell*, núm. 90, pàg. 405-413.