

Received: 2014.04.15
Accepted: 2014.08.14
Published: 2014.09.03

Syntetyczna letalność jako funkcjonalne narzędzie w badaniach podstawowych oraz w terapii przeciwnowotworowej*

Synthetic lethality as a functional tool in basic research and in anticancer therapy

Monika Toma¹, Tomasz Skorski², Tomasz Śliwiński¹

¹Katedra Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

²Department of Microbiology and Immunology, and Fels Institute for Cancer Research, Temple University, School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

Streszczenie

Z roku na rok liczba odnotowanych zachorowań na nowotwory drastycznie wzrasta. Poszukuje się narzędzi, które będą pozwalały eliminować zmienione komórki o fenotypie nowotworowym, nie tylko szybko, ale również bardzo specyficznie, nie uszkadzając przy tym komórek prawidłowych. Takie podejście terapeutyczne niesie za sobą zmniejszenie liczby jej działań niepożądanych, a więc także poprawę rekonwalescencji chorego. Nową nadzieją w stworzeniu skutecznej spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, stało się odkrycie zjawiska syntetycznej letalności. Zauważono, że jednoczesne mutacje niektórych par genów mogą prowadzić do śmierci komórki, podczas gdy każdy z nich zmutowany indywidualnie nie wywołuje efektu letalnego. Ponieważ w komórkach nowotworowych dochodzi do licznych zmian w materiale genetycznym, odnajdując pary oddziałujących ze sobą w ten sposób genów, można się przyczynić do powstania potencjalnej terapii przeciwnowotworowej. Przypuszcza się, że proces taki wyewoluował, by uodpornić komórkę na uszkodzenia pojedynczych genów – dany szlak nie zależy wówczas od pojedynczego wariantu. Takie procesy komórkowe doprowadziły jednak do powstania chorób o złożonej etiologii, takich jak nowotwory. Obecnie prężnie rozwijająca się technika badania z użyciem iRNA, shRNA czy małowcząsteczkowych inhibitorów, pozwala na odnajdywanie oddziaływań międzygenowych, mających znaczenie w powstawaniu zjawiska syntetycznej letalności. Umożliwia to nie tylko wykorzystanie tego zjawiska jako potencjalnej terapii przeciwnowotworowej, ale również jako narzędzia do identyfikowania funkcji nowo poznanych genów. Syntetyczna letalność pozwala także na poszerzenie wiedzy na temat biologii molekularnej nowotworów, która jest wykorzystana do stworzenia nowych i bardzo skutecznych spersonalizowanych terapii przeciwnowotworowych.

Słowa kluczowe:

syntetyczna letalność • terapia przeciwnowotworowa • oddziaływania międzygenowe • iRNA • shRNA • małowcząsteczkowe inhibitory

Summary

Nowadays, cancer and anticancer therapy are increasingly mentioned topics. Groups of researchers keep looking for a tool that will specifically and efficiently eliminate abnormal cells without any harm for the normal ones. Such method entails the reduction of therapy's side effects, thus also improving patient's recovery. Discovery of synthetic lethality has become

* Praca została sfinansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki (DEC- 2012/07/B/NZ7/04245 – Tomasz Śliwiński, kierownik projektu).

	a new hope to create effective, personalized therapy of cancer. Researchers noted that pairs of simultaneously mutated genes can lead to cell death, whereas each gene from that pair mutated individually does not result in cell lethality. Cancer cells accumulate numerous changes in their genetic material. By defining the pairs of genes interacting in cell pathways we are able to identify a potential anticancer therapy. It is believed that such a process has evolved to create cell resistance for a single gene mutation. Proper functioning of a pathway is not dependent on a single gene. Such a solution, however, also led to the evolution of multifactorial diseases such as cancer. Research techniques using iRNA, shRNA or small molecule libraries allow us to find genes that are connected in synthetic lethality interactions. Synthetic lethality may be applied not only as an anticancer therapy but also as a tool for identifying the functions of recently recognized genes. In addition, studying synthetic lethality broadens our understanding of the molecular mechanisms governing cancer cells, which should be helpful in designing highly effective personalized cancer therapies.
Keywords:	synthetic lethality • anticancer therapy • gene-gene interactions • iRNA • shRNA • small molecule inhibitors
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1119792
Word count:	6153
Tables:	–
Figures:	2
References:	43

Adres autora: dr hab. inż. Tomasz Śliwiński, prof. nadzw. UŁ; Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: tomsliw@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **8-okso-dG** – 7,8-dihydro -8- okso- deoksyguanina; **AKT** – serynowo-treoninowa kinaza białkowa; **AP** – miejsce apurynowe/apirymidynowe; **ATM, ATR** – białka uczestniczące w odpowiedzi komórki na pęknięcia nici DNA; **BCR-ABL** – fuzyjna kinaza powstała w wyniku translokacji; **BER** – naprawa DNA przez wycinanie zasad; **BRCA1, BRCA2** – białka uczestniczące w odpowiedzi komórki na dwuniciowe pęknięcia nici DNA; **CIP/KIP** – rodzina inhibitorów kinaz cyklinozależnych; **CML** – przewlekła białaczka szpikowa; **DSB** – pęknięcia dwuniciowe DNA; **E2F1** – czynnik transkrypcyjny; **EGFR** – receptor czynnika wzrostu naskórka; **GFP** – białko zielonej fluorescencji; **GMP** – monofosforan guanidyny; **HER2/neu** – onkogen; **HPRT1** – fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa; **HR** – naprawa DNA przez homologiczną rekombinację; **IMP** – inozynomonofosforan; **MLH1, MSH2, MSH6, PMS2** – geny kodujące białka naprawy błędnie sparowanych zasad DNA; **MMR** – naprawa błędnie sparowanych zasad DNA; **MTOR** – kinaza biorąca udział w odpowiedzi komórki na stres; **NHEJ** – naprawa DNA przez niehomologiczne łączenie końców; **PARP1** – polimeraza poli-ADP-rybozy; **PCC** – przedwczesna kondensacja chromatyny; **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu; **PINK1** – mitochondrialna kinaza serynowo-treoninowa; **PIP3** – trójfosforan fosfatydylinozytolu; **PTEN** – gen supresorowy; **RAD51, RAD52** – białka naprawy DNA przez homologiczną rekombinację; **RB1** – gen supresorowy, negatywny regulator cyklu komórkowego; **RPA** – białko wiążące jednoniciowy DNA; **XP** – rodzina genów związanych z chorobą *xeroderma pigmentosum*.

WSTĘP

Syntetyczna letalność jest zjawiskiem zachodzącym w komórce, oznaczającym jednoczesne zaburzenia dwóch lub więcej genów, powodujące śmierć tej komórki lub nawet całego organizmu, w skład którego wchodzi. Produkt jednego z tych genów jest istotny w procesie przeżycia komórki. Gdy ulega uszkodzeniu, jego funkcja jest zastępowana przez drugi gen, uczestniczący w szlaku alternatywnym dla procesu, w którym uczestniczył pierwszy. Uszkodzenie bądź celowe wyłączenie obu genów kończy się śmiercią komórki lub organizmu. W komórce nowotworowej utrata funkcji genów

jest bardzo prawdopodobna ze względu na występowanie licznych rearanżacji w jej genomie. Przeżycie komórki jest zatem bezpośrednio uzależnione od działania takich alternatywnych genów. Ze względu na skutek, który jest wywołany w komórce, zagadnienie syntetycznej letalności wydaje się wyjątkowo atrakcyjne i budzi coraz większe zainteresowania naukowców. Jest też przedmiotem coraz liczniejszych badań obejmujących m.in. wykorzystanie leków nowej generacji stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych, opierających się na zjawisku syntetycznej letalności. Genetycy zainteresowali się syntetyczną letalnością również dlatego, ponieważ może dostarczyć istot-

nych informacji o interakcjach między genami, czy też ich produktami. Ponadto zakrojone na szeroką skalę badania z wykorzystaniem tego zjawiska stwarzają możliwość m.in. poszerzenia wiedzy na temat działania obecnie wykorzystywanych leków oraz poznania punktów docelowych terapii.

Dwa geny (A i B) można uznać, że są syntetycznie letalne, jeśli mutacja w każdym z genów oddzielnie nie ma wpływu na żywotność komórki, natomiast jednoczesne mutacje zarówno w genie A, jak i B prowadzą do śmierci komórkowej. Komórka jest zdolna do utrzymania równowagi częściowo przez niezależnienie aktywności metabolicznej od pojedynczego czynnika, który może łatwo ulec zaburzeniu przez mutacje wywołane przez czynniki endo- lub egzogenne. Obecnie uważa się, że taka „odporność” komórek na uszkodzenie pojedynczych genów mogła odgrywać główną rolę w powstawaniu i ewolucji chorób wieloczynnikowych, takich jak nowotwory. Odporność genetyczna jest zapewniana m.in. przez swoistą funkcjonalną „nadmierność genetyczną”, np. przez posiadanie dwóch alleli jednego genu. Innym przykładem mogą być tzw. białka kondensatory (np. białko szoku cieplnego Hsp90), które pozwalają na maskowanie fenotypu nieprawidłowego zwinięcia „zmienionych” białek [37].

Termin „syntetyczna letalność” zaproponował w 1946 r. Theodor Dobzhansky. Przymiotnik „syntetyczna” pochodzi z języka greckiego i oznacza mieszaninę dwóch podmiotów, z której powstaje coś zupełnie nowego. Po raz pierwszy proces ten opisał na początku XX w. Amerykański genetyk Calvin Bridges, który podczas krzyżowania *Drosophila melanogaster*, spostrzegł, że kombinacja pewnych nieallelicznych genów była letalna, mimo iż homozygotyczne osobniki rodzicielskie były żywotne i funkcjonalne. Geny te były dla siebie alternatywą, więc dopiero kombinacja ich rearanzacji, powodowała śmierć osobnika, ze względu na to, iż mutacji uległy geny biorące udział w procesie koniecznym do jego przeżycia [4]. Podobne zjawisko zaobserwował Theodor Dobzhansky u *Drosophila pseudoobscura* [14].

Chcąc poznać procesy molekularne zachodzące w komórkach ludzkich naukowcy skupili się na początku na prostszym i tańszym modelu badawczym, jakim są komórki drożdżowe, których genomy składają się z wielu genów będących ludzkimi ortologami. Badania nad syntetyczną letalnością w drożdżach pozwoliły naukowcom otrzymać złożone mapy oddziaływań zachodzących między genami. Analiza takich sieci powiązań w komórkach ludzkich wydaje się niezwykle atrakcyjnym kierunkiem badań, głównie dlatego, że wiele ludzkich genów wciąż nie ma przypisanych im funkcji, mimo iż upłynęła już dekada od poznania sekwencji ludzkiego genomu. Obecnie, przy wykorzystaniu metod analizy syntetycznej letalności, takich jak biblioteki interferencyjnego RNA, możliwym staje się poznawanie procesów, a nawet całych szlaków komórkowych, których wcześniej nie znano [22]. Oddziaływania fizyczne między genami, wykazywanie ich mniej lub bardziej zbliżonych funkcji, ich jednoczesna ekspresja, czy też kolokalizacja, okazują się elementami pozwalającymi dokładnie poznać interakcje międzygenowe [43]. Jednak bez wykonania odpo-

wiednich badań funkcjonalnych nie można jednoznacznie stwierdzić, czy oznaczane dwa geny stanowią kompensację względem siebie, pod kątem pełnionej przez nie funkcji w komórce. Po bliższym poznaniu genomów drożdżowych naukowcy zaczęli się interesować tym, jaki jest stopień zachowania ewolucyjnego tych oddziaływań między gatunkami. *S. cerevisiae* i *S. pombe*, które uległy rozdzieleniu 400 mln lat temu i współdzielą niespełna 30% interakcji genetycznych. Poddano tym samym w wątpliwość użyteczność modelu drożdżowych interakcji do przewidywania zjawiska syntetycznej letalności u wyższych kręgowców. Uzyskane wyniki badań z wykorzystaniem tego modelu nie są jednoznaczne, co mogło być spowodowane ówczesnymi ograniczeniami technicznymi, bądź też wynikało z preferencyjności zjawiska syntetycznej letalności tylko w niektórych procesach komórkowych [13,38,40]. Najlepszym sposobem na badanie tego procesu u ludzi są badania właśnie na komórkach ludzkich, a nie próby korelacji z wynikami uzyskanymi na organizmach modelowych.

SYNTECZNA LETALNOŚĆ W KOMÓRKACH LUDZKICH

Badania syntetycznej letalności na komórkach ludzkich oparte są przede wszystkim na wykorzystaniu jej potencjału, jako przyszłościowej terapii przeciwnowotworowej, narzędzia do poznawania funkcji genów oraz oddziaływań między nimi. Wiedza o sieciach molekularnych, które przebiegają w komórkach prawidłowych, czy też nowotworowych jest jeszcze ograniczona. Nie pozwala to na wytypowanie genów, stanowiących dla siebie alternatywę, czy też zastępstwo. Istnieje wiele pomysłów na to, jak wykorzystać efekt syntetycznej letalności do tego celu. Zdarzyć się może, że jeden gen koduje produkty spełniające wiele funkcji w komórce. Jest tak w przypadku onkoproteiny E2F1 (E2F transcription factor 1), która odpowiada zarówno za modulowanie cyklu komórkowego, zdolności proliferacyjnych, a także za przebieg apoptozy. Produkt genu E2F1 pozwala komórkom ssaczym na wejście w fazę S cyklu komórkowego, podczas której dochodzi do tworzenia przez niego kompleksu z cykliną A/CDK2 (cyclin-dependent kinase 2). W takim kompleksie zupełnie zniesiona jest zdolność E2F1 do wiązania z DNA. Inhibitorem E2F1, blokującym wejście komórki w fazę S jest białko RB, produkt genu *RB1* retinoblastoma 1; gen supresorowy, negatywny regulator cyklu komórkowego. Natomiast zdolność blokowania RB, ma kompleks cykliny A/CDK2. Zaproponowano model opierający się na zwiększeniu ekspresji takich białek jak E2F1, które pozostają wysoce aktywne w komórkach nowotworowych, wywołującym tym samym przekroczenie progu ekspresji, wymaganego do zajścia apoptozy. Zatrzymanie aktywności RB w celu zajścia dodatniego sprzężenia zwrotnego, w którym E2F1 aktywowałby swój własny promotor, może pozwolić na uśmiercanie komórek transformowanych, pozostawiając nietknięte komórki prawidłowe [1,23]. W badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano, że osobniki pozbawione genu *Cdk2* rozwijały się prawidłowo. Zależność przytoczona wcześniej nie funkcjonuje w przypadku inhibicji działania partnera cykliny A - CDK2. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że obecny jest inny part-

ner katalityczny, który potrafi zastąpić CDK2 w tych interakcjach [3].

Zjawiska syntetycznej letalności mogą być także wykrywane na podstawie obserwacji poszczególnych punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Przedwczesna kondensacja chromatyny PCC (prematurely condensed chromatin) jest zjawiskiem występującym podczas fazy S w komórkach ssaków. Zachodzi, gdy podział rozpoczęty zostanie przed zakończeniem replikacji DNA. Aby zapobiegać takim zdarzeniom, wykształcone zostały punkty kontrolne cyklu komórkowego, w których główną rolę odgrywają białka, takie jak ATR (ataxia telangiectasia and RAD3-related protein) czy p53. Ich zadaniem jest powstrzymanie komórki przed nieprawidłowym podziałem i zatrzymanie jej aktywności. Aktywność genu ATR może być inhibowana przez zastosowanie kofeiny. Kiedy dodatkowo pozbawimy komórkę aktywności p53, dojdzie do przedwczesnej, letalnej kondensacji chromatyny [33].

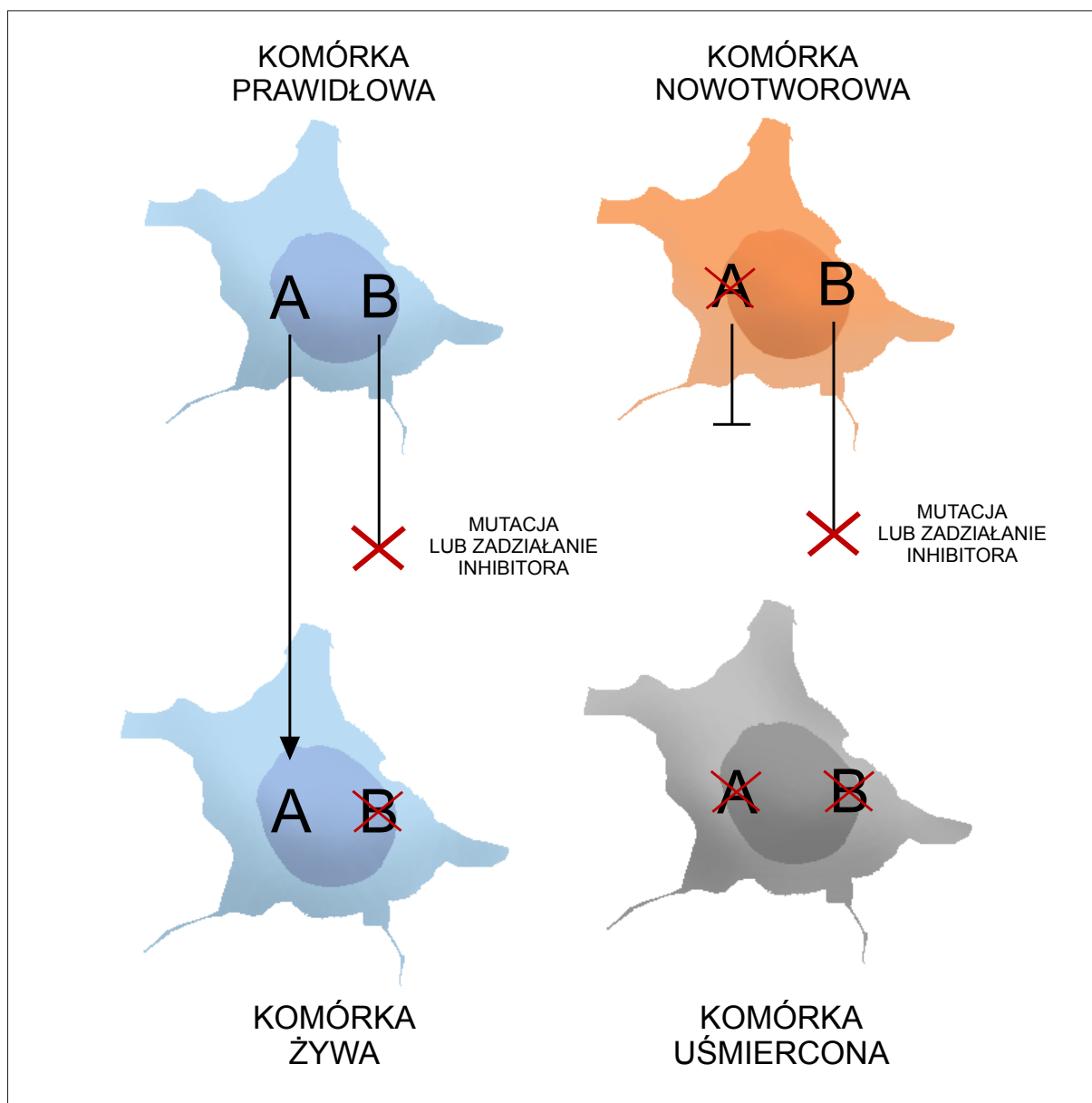
Pojęcie syntetycznej letalności może nieco przypominać zjawisko „uzależnienia od onkogenu”, które przejawiają komórki nowotworowe stając się zależnymi od swoich zmian genetycznych, a więc stają się podatne na nagłe zmiany w swoich onkogenach lub odzyskanie funkcji przez geny supresorowe. Pojawienie się konkretnego fenotypu nowotworu jest uzależnione od pojawiających się w komórce mutacji. Wystąpienie niektórych typów nowotworów jest zależne od pojawienia się mutacji w zaledwie pojedynczym genie. Przykładowo siatkówczak, uwarunkowany jest mutacją w genie *RB1*. Pojedyncza mutacja rzadko może spowodować przemianę komórki prawidłowej w nowotworową, a tym bardziej w jej zezłośliwienie. Natępne mutacje spowodowane postępującym obniżaniem stabilności genetycznej powodują stopniową progresję nowotworu. Nowotwory, a zwłaszcza ich wzrost i podział stają się uzależnione od ekspresji niektórych genów, które podlegały zmianom w toku transformacji. Istnieje obecnie wiele przykładów nowotworów, które wydają się być „uzależnione” od niektórych onkogenów, dodatkowo wyniki badań sugerują również, że komórki nowotworowe mogą być „uzależnione” od inaktywacji genów supresorowych [20]. Termin „uzależnienie onkogenu” zaproponował po raz pierwszy Bernard Weinstein. Domniemywał, że komórka żyje i dzieli się tak długo, dopóki sygnał proliferacyjny jest otrzymywany od onkogenu, a może to być związane ze zdolnością takich onkogenów do zawiązywania skomplikowanych sieci molekularnych, które mogą dostarczać sygnałów proliferacyjnych i antyproliferacyjnych. Jeśli onkogen ulegnie wyciszeniu lub dojdzie do przywrócenia funkcji genu, przewagę osiągną sygnały antyproliferacyjne, co doprowadzi do zahamowania wzrostu lub śmierci komórki. Uzależnienie od onkogenu może leżeć u podstaw skuteczności terapii inhibitorem kinaz - Imatinibem, który powstrzymuje hiperaktywność fuzyjnej kinazy BCR-ABL (BCR - breakpoint cluster region, ABL - c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase) w przewlekłej białaczce szpikowej CML (chronic myeloid leukemia) [9,20,41].

Nowotwory powstają na skutek zmian genetycznych zachodzących etapowo. Z każdą kolejną modyfikacją fenotyp komórki płynnie przechodzi z prawidłowego w nowo-

tworowy. Każde następne zaburzenie zwiększa również prawdopodobieństwo zajścia uzależnienia od onkogenu. Fenotyp nie jest sumą pojedynczych mutacji, gdyż zmienione geny niejednokrotnie biorą udział w wielu złożonych procesach integrując złożone sieci metaboliczne. W komórkach nowotworowych onkogen może odgrywać odmienną i bardziej istotną rolę w porównaniu z jego rolą w komórce prawidłowej, stąd nowotwór może być bardziej zależny od aktywności konkretnego genu. Zmienione geny podlegają ciągłej presji selekcyjnej [42]. Zachowaniu ulegają jedynie mutacje, które są dla nowotworu neutralne lub korzystne względem wariantu dzikiego genu, jedynie wówczas presja selekcyjna działa na ich korzyść. Możliwe jest również, że mutacja pierwotna, która zaszła w jednym z genów, może zmniejszać skutki mutacji, która nastąpiła w innym genie, a nawet nie pozwalać na śmierć komórki w wyniku syntetycznej letalności. Mutacja w genie *RB1* prowadzi do powstania sprzężenia zwrotnego, w którym czynnik E2F1 aktywuje sam siebie. Może to stymulować komórkę zarówno do wejścia w fazę S, a także może promować wejście jej na drogę apoptozy zależnej od białka p53. Jeśli jednak w pierwszej kolejności doszłoby do mutacji w białku p53, niemożliwa stanie się apoptoza komórki. Nie będzie możliwym również zajście efektu syntetycznej letalności w komórkach z mutacją w genie *RB1*. Powstała mutacja może się okazać więc korzystna dla komórki nowotworowej, gdyż spowoduje jej proliferację. Wszystko to będzie jednak uwrażliwiała ją również na utratę takiej wersji genu [20].

Zjawisko uzależnienia od onkogenu może przypominać syntetyczną letalność, gdyż komórka uzależniona zostaje ostatecznie od produktu pojedynczego, zmutowanego genu. Jednak właśnie jednym z mechanizmów tłumaczących zajście uzależnienia komórek nowotworowych od onkogenu jest proces syntetycznej letalności. Na przykład komórka nowotworowa może zostać uzależniona od jakiegoś onkogenu, ponieważ w czasie swojego rozwoju doszło do utraty funkcji innego genu, o podobnej funkcji. Sprowadza się to do wniosku, że syntetyczna letalność może zostać wykorzystana jako potencjalna terapia przeciwnowotworowa. Podejrzewa się jednak, że ze względu na mnogość zmian w komórkach nowotworowych pary genów wykazujące interakcje w komórkach prawidłowych nie zawsze mogą korespondować z istniejącymi w komórkach nowotworowych, co może powodować jeszcze większe ich uzależnienie od danego onkogenu [42].

Uzależnienie od onkogenu może być spowodowane utratą dodatkowych szlaków sygnalizacyjnych. Niestabilność genomu nowotworowego i nieobecność presji selekcyjnej działającej w celu utrzymania dodatkowych dróg sygnalizacyjnych w procesie komórkowym wywołuje efekt zwany „optymalizacją genomu”. Jest to zjawisko, któremu podlega informacja genetyczna mająca dla komórki nieznaczną wartość adaptacyjną. Elementy te muszą być zależne od metabolizmu komórkowego, co stanowi dla komórki dodatkowe obciążenie. Racjonalnym rozwiązaniem wydaje się więc usunięcie ich z genomu [15,21]. Szlaki, które aktywowane zostają na wczesnych etapach



Ryc. 1. Schemat syntetycznej letalności. Komórki prawidłowe mają dwa funkcjonalne, alternatywne wobec siebie szlaki, w procesie niezbędnym do jej przeżycia (np. zależne od genów A i B, istotnych dla tych szlaków). W komórkach nowotworowych, w których często dochodzi do licznych rearanżacji materiału genetycznego, w wyniku której jeden z istotnych szlaków stanowiących alternatywę względem siebie, zostaje wyłączony (brak funkcjonalnego genu, np. A). Powoduje to uzależnienie komórki od szlaku alternatywnego. W chwili zablokowania tego szlaku w wyniku mutacji genu np. B, lub za pomocą np. małowczątkowego czynnika chemicznego, takiego jak inhibitor czy aptamer, oddziałującego na jego produkt, dochodzi do śmierci komórki nowotworowej. Mutacja lub zahamowanie genu B w komórce prawidłowej nie wpływa znacząco na jej przeżywalność, ponieważ wciąż obecny jest funkcjonalny gen A

rozwoju nowotworu, mogą się okazać jednocześnie jego słabym punktem. Z czasem szlaki alternatywne zostaną usunięte w wyniku optymalizacji genomu, a cały szlak oparty będzie na pojedynczym czynniku.

Badania syntetycznej letalności w komórkach ludzkich skupiają się obecnie przede wszystkim na możliwości wykorzystania tego procesu w celach terapeutycznych. Być może niedługo możliwe stanie się spersonalizowanie terapii dla konkretnego profilu choroby, a obecnie

wiadomo, że niestabilność komórek nowotworowych jest zarówno ich mocną stroną, jak i potencjalną szansą uzyskania przez naukowców skutecznych, celowanych terapii przeciwnowotworowej. Przez liczne mutacje powstające w komórkach nowotworowych, powstaje wiele nierozróżnianych jeszcze do końca typów nowotworów. Ta zmienność dostarcza jednak również możliwości dokładnego nakierowania terapii przeciwnowotworowej na jak najbardziej wybiórcze, celowane działanie, wywołujące jak najmniej działań niepożądanych.

POTENCJALNE TERAPIE PRZECIWNOWOTWOROWE

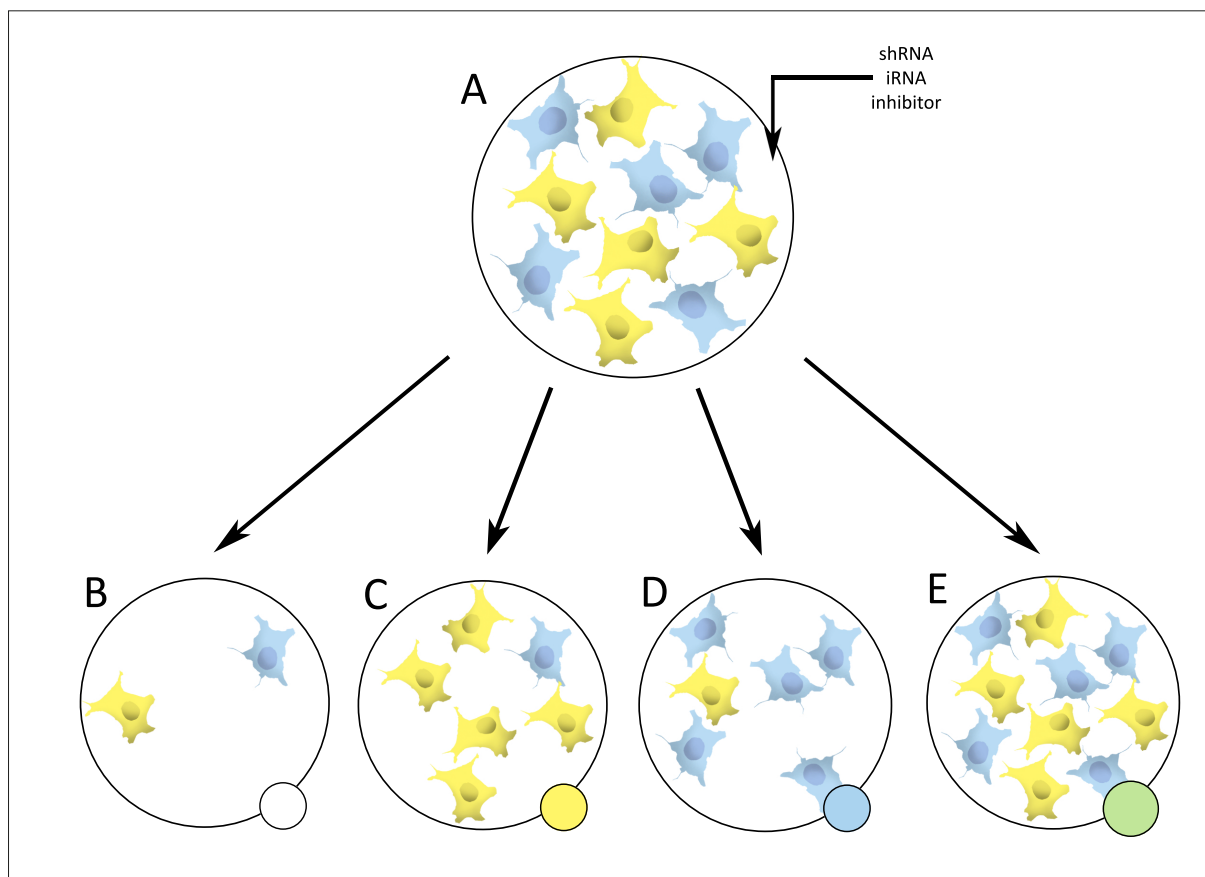
Standardowe związki stosowane w chemioterapii odkryto dzięki ich zdolnościom do eliminowania szybko dzielących się komórek. Niestety, nie są to tylko komórki nowotworowe, ale m.in. również szybko dzielące się komórki w cebulkach włosów, błonach śluzowych układu pokarmowego czy w szpiku kostnym. Ich działania niepożądane, takie jak utrata włosów, nudności czy obniżenie odporności, są ściśle związane z niewybiórczym działaniem chemioterapii. Związki te mogą być toksyczne dla komórek prawidłowych o obniżonym stopniu proliferacji, np. deksorubicyna (działa szkodliwie na serce), bleomycyna (płuca), cytarabina (mózg) [20]. Słabym punktem obecnych poszukiwań bezpiecznej i zarazem skutecznej terapii jest nie tyle niezdolność do odnalezienia związku, który zniszczy komórki nowotworowe, bo przecież takich odkryto wiele w ostatnich 50 latach, lecz odnalezienie związków, które zniszczą nowotwór w stężeniu nieszkodliwym dla pacjenta. Wiele z chemioterapeutyków używanych obecnie charakteryzuje się niskim indeksem terapeutycznym (stosunkiem dawki, która wywołuje objawy toksyczne, do dawki dającej efekt terapeutyczny) i wąskim oknem terapeutycznym (stężeniem leku, w którym można przewidzieć i opanować skutki zastosowania go w terapii – stężenie, w którym działanie terapeutyczne jest najwyższe, a działania niepożądane najmniejsze). Na wielkość tych czynników wpływ ma wiele zmiennych, np. niezwykle istotna jest swoistość działania leku, czyli to, jak wiele jest miejsc docelowych leku, które jednak nie są celem stosowanej terapii. Niezamierzone punkty działania terapii mogą być przyczyną pojawienia działań niepożądanych, a nawet mogą być antagonistami zamierzonych miejsc docelowych leku. Brak wybiórczości w działaniu chemioterapii stał się głównym czynnikiem limitującym wysokość dawki stosowanej podczas leczenia. Zaistniała więc wyraźna potrzeba odnalezienia kuracji, która skutecznie i selektywnie będzie eliminowała wyłącznie komórki nowotworowe, a jednocześnie nie będzie wykazywała działania toksycznego na komórki prawidłowe.

Zmiany genetyczne leżące u podstaw niestabilności genetycznej są niezwykle ważne w badaniach nad nowymi terapiami, ponieważ wszystkie nowotwory są genetycznie niestabilne, a zmiany te są prawdopodobnie niezbędne w procesie progresji i złośliwienia nowotworów. Dobrze wiadomo również, że defekty w wielu genach naprawy DNA, stwarzają możliwość wykorzystania w terapii konkretnego czynnika uszkadzającego DNA. Na przykład, mutacje w genach z rodziny XP (*Xeroderma pigmentosum*) uwrażliwiają komórki na światło ultrafioletowe, a mutacje w genach *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*) bądź *BRCA2* (*breast cancer 2*) uwrażliwiają komórki na promieniowanie jonizujące. Chociaż strategie te pozwalają przekształcić niestabilność genetyczną w potencjalną terapię, zróżnicowanie komórek nowotworowych, wynikające z ich niestabilności genetycznej, może jednocześnie zmniejszać skuteczność zaprojektowanych na tej podstawie leków [18,28].

Obecne badania są skupione na procesach i czynnikach pozwalających na odróżnienie komórek nowotworowych od pozostałych, prawidłowych komórek organizmu. Są to przede wszystkim czynniki, które biorą udział w przemianie komórki prawidłowej do zmienionej nowotworowo, przerzutującej komórki. Kluczowym jest również poznanie potencjalnych miejsc działania terapii. Jednak ich mnogość jest obecnie czynnikiem zarówno dostarczającym materiału badawczego naukowcom, jak i utrudniającym identyfikację poszczególnych typów i podtypów nowotworów. Dotąd badania były nakierowane na swoiste cechy molekularne komórek nowotworowych i przyniosły kilka dobrze zapowiadających się terapii.

Muromonab-CD3 zapisał się na kartach historii jako pierwsze przeciwciało zastosowane w terapii. Stosowany był jako czynnik zapobiegający odrzuceniu przez biorcę przeszczepu. Jest to mysie przeciwciało monoklonalne swoiste dla antygeny CD3 limfocytów T. Wiąże się specyficznie do łańcucha glikoproteiny CD3, która jest zaangażowana w rozpoznawanie antygenów i stymulację limfocyty. Jednak okazało się, że niemodyfikowane przeciwciała mysie wywołujące odpowiedź ze strony układu odpornościowego człowieka, były nietrwałe i na ogół nie działały wydajnie. Pierwszym przeciwciałem zastosowanym przeciwko komórkom nowotworowym był rituximab (Rituxan), który został użyty w terapii nieziarniczego chłoniaka B-komórkowego. W 1998 r. jako potencjalną terapię przeciwko rakowi piersi z wykrytą nadekspresją onkogenu *HER2/neu* (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) (prawie 25% wszystkich nowotworów piersi) wyprowadzono trastuzumab (Herceptin). Takie podwyższenie ekspresji *HER2/neu* jest związane z bardziej agresywnym fenotypem nowotworu oraz gorszym prognozowaniem. Trastuzumab wiąże zewnętrzne domeny receptora *HER2/neu* (należy do rodziny receptorów czynników wzrostowych, jest receptorem kinazy tyrozynowej), zapobiegając tym samym powstawaniu kaskady sygnalizacyjnej i zwiększając stężenie białka p27 (należy do rodziny inhibitorów kinaz cyklicznych zwanej CIP/KIP – *CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*), co ostatecznie doprowadza do zatrzymania cyklu komórkowego. Stąd trastuzumab jest czynnikiem, który jest naprowadzony na szczególną cechę określonego rodzaju nowotworu [8,41].

Dalsze próby stworzenia swego leku przeciwnowotworowego zaowocowały zidentyfikowaniem i rozwojem małowcząsteczkowych związków chemicznych (inhibitorów, aptamerów). Jednym z obecnie stosowanych leków tego typu jest opracowany już na początku lat 90 XX w. imatinib, który znalazł zastosowanie głównie w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej. Niekorzystne działanie na aktywność hybrydowej kinazy tyrozynowej powstałej w wyniku translokacji *bcr-abl* (tzw. chromosom Philadelphia), która jest odpowiedzialna za fenotyp przewlekłej białaczki szpikowej jest związana z konkurencyjnym wiązaniem się leku do domeny wiążącej ATP takiego zmienionego białka, co zaburza jej funkcjonalność. Ponieważ lek nie działał na wszystkie analizowane kinazy tyrozy-



Ryc. 2. Schemat badań przesiewowych pozwalających na identyfikację czynników wywołujących syntetyczną letalność. A – mieszanina komórek prawidłowych (niebieskie) i komórek nowotworowych izogenicznej linii (żółte) wyznakowanych fluorescencyjnie. Inkubacja mieszaniny z czynnikiem mającym wywołać w komórkach syntetyczną letalność, tj. biblioteka siRNA, shRNA czy małą cząsteczkowy związek chemiczny (aptamer, inhibitor); B–E – analiza wybiórczości działania badanego czynnika; B – wywołanie syntetycznej letalności w obu typach komórek (znikoma fluorescencja); C – wybiórcze działanie na komórki prawidłowe (fluorescencja komórek nowotworowych); D – wybiórcze działanie na komórki nowotworowe (fluorescencja komórek prawidłowych); E – brak działania czynnika na komórki (fluorescencja zarówno komórek prawidłowych, jak i nowotworowych)

nowe, wyprowadzono wniosek, iż muszą istnieć różnice w ich domenach wiążących ATP, które stanowią zawadę przestrzenną do wiązania się go. Stwierdzono również, że imatinib działa hamująco na receptory płytkopochodnego czynnika wzrostu PDGF (platelet-derived growth factor), co prowadzi do zablokowania podziałów komórkowych [6].

Niestabilność genetyczna jest cechą typową dla komórek nowotworowych, a zmiany w materiale genetycznym są charakterystyczne dla takich właśnie komórek, zwłaszcza zmiany w genach naprawy DNA, które mogą uwrażliwiać nowotwór na działanie pewnych czynników uszkadzających. Jednym z pierwszych naukowców, którzy zajęli się wykorzystaniem syntetycznej letalności w poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych był Leland Hartwell. Jego prace oparte były na modelu drożdżowym. Sugerował, że czynnikiem limitującym rozwój nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych i identyfikację nowych leków, oprócz problemu określenia bezpiecznej dawki terapeutycznej, jest również identyfikacja selektywnych cech nowotworów. Stąd przedmiotem jego

badania stały się mutacje utraty funkcji genów, takich jak geny naprawy DNA, czy geny supresorowe. Badania w poszukiwaniu syntetycznej letalności mogą być prowadzone w dwojaki sposób: przez analizę genów, które potencjalnie mogą wykazywać interakcje z powstawaniem tego zjawiska bądź też przez analizę całego genomu. Wybór potencjalnych celów wymaga wielu wcześniejszych analiz, niezbędnych do poznania dróg i możliwości wywołania specyficznych mutacji w genach, koniecznych do analizy ostatecznych skutków funkcjonalnych w komórce, wywołanych kombinacją zmutowanych genów. Zespół Hartwella wyprowadził 70 linii izogenicznych *Saccharomyces cerevisiae*, każda z mutacją w pojedynczym genie, będącym elementem odpowiedzi na uszkodzenia, tj. naprawy DNA, czy też genów kodujących białka odpowiedzialne za regulację cyklu komórkowego. Mutanty te mogły więc być uważane za modele komórek nowotworowych. Badania przesiewowe w poszukiwaniu leków, które wywołują wyższą śmiertelność u mutantów, w stosunku do komórek typu dzikiego, pozwoliły na wyłonienie leków o cechach terapeutycznych, zarówno w interakcji z DNA, jak i z białkami odpowiedzialnymi za oddziaływanie z nim. Dobrym

przykładem takiego związku chemicznego jest cisplatyna, która powoduje wiele rodzajów mutacji, co odzwierciedlała mnogość wrażliwych mutantów drożdżowych. Co istotne natomiast, odznaczała się dużą swoistością działania na komórki, w których uszkodzeniu ulegały geny naprawy postreplicacyjnej. Natomiast mitoksantron, będący inhibitorem topoizomerazy II, wykazywał specyficzne działanie na linie drożdżowe z defektami w genach naprawy pęknięć dwuniciowych DNA. Możliwe staje się więc wykorzystanie cisplatyny i mitoksantronu w terapii nowotworów z mutacjami odpowiednio w genach naprawy poreplikacyjnej czy naprawy pęknięć dwuniciowych DNA. Wykazano ponadto potencjalną możliwość wykorzystania tego typu badań do identyfikacji oddziaływań międzygenowych, które mogą zostać wykorzystane do wywołania syntetycznej letalności [18].

Prawdopodobnie największą słabością współczesnych terapii jest niewielka skuteczność działania na zaawansowane postaci nowotworów, ze względu na ich złożoność, wynikającą z wieloetapowej i złożonej drogi ich przejścia od komórki prawidłowej do nowotworu złośliwego. Mimo że wiele wiadomo na temat ogromnej liczby aberracji zachodzących w komórkach nowotworowych, trudno przełożyć tę wiedzę na stworzenie skutecznej, swoistej terapii i minimalizację działań niepożądanych. Niewątpliwą zaletą terapii z wykorzystaniem syntetycznej letalności wydaje się właśnie potencjalna możliwość użycia jej w terapii początkowych, jak i zaawansowanych stadiów nowotworów, zarówno w terapii kombinowanej jak i jednoczynnikowej. Dużą skutecznością może cechować się terapia przez podawanie czynnika biorącego udział w wywoływaniu syntetycznej letalności z czynnikiem cytotoksycznym. Komórka nie będzie zdolna do naprawiania powstających uszkodzeń DNA, a ich nagromadzenie wprowadzi ją na ścieżkę programowanej śmierci.

MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA BADAŃ NAD SYNTETYCZNĄ LETALNOŚCIĄ

W przeszłości badania syntetycznej letalności ograniczały się wyłącznie do organizmów modelowych, takich jak muszka owocowa czy nicień *Caenorhabditis elegans* [11,28]. Analizie podlegał nie tylko profil genetyczny, ale także jego wpływ na fenotyp osobnika, odzwierciedlający wpływ zastosowanego czynnika na organizm. Podobnie model drożdżowy okazał się nieoceniony w wyjaśnieniu zjawiska syntetycznej letalności u człowieka. Okazuje się jednak, że nie wszystkie geny ludzkie znajdują swoje ortologi w organizmach modelowych. Obecnie badania syntetycznej letalności nie ograniczają się wyłącznie do organizmów modelowych bądź też tylko do wybranych genów podstawowych dla komórek nowotworowych. Odnajdowane są wciąż nowe sposoby analiz tego zjawiska, takie jak wykorzystywanie bibliotek siRNA, shRNA, czy małych cząsteczkowych związków chemicznych. Podejście takie pozwala na odnajdywanie w krótkim czasie genów biorących udział w interesujących badacza interakcjach. Przewodzenie badań z wykorzystaniem RNA wiąże się z wykorzystywaniem izogenicznych linii komórkowych, o ściśle zdefiniowanym genotypie, wykorzystywanym w badaniu

oraz czy i jak komórki zareagują na analizowany czynnik. Dokładna analiza, nawet najbardziej nieoczekiwanego wyniku badań, może pozwolić na szczegółowe poznanie właściwości badanego czynnika, a przede wszystkim zwiększyć wiedzę na temat biologii nowotworów przez poznawanie punktów docelowych terapii, jak i swoistych sieci powiązań między genami w tych komórkach [7].

Wykorzystując biblioteki oparte na interferencyjnym RNA można się dowiedzieć, które geny są istotne w kontekście określonego szlaku. Pozwala to na odnajdywanie nieznanych wcześniej szlaków oddziaływań między genami, co nie zawsze pozwala na odnajdywanie potencjalnych kandydatów na czynniki terapeutyczne, ale niemal zawsze dostarcza istotnej wiedzy na temat biologii tych oddziaływań i czynników biorących w nich udział. Decydując się na wykorzystanie w badaniach bibliotek małych cząsteczkowych związków chemicznych, takich jak inhibitory czy aptamery, celem eksperymentu może się stać wytypowanie czynników o właściwościach terapeutycznych dla konkretnego genotypu nowotworu (mających wywoływać syntetyczną letalność przy zadanym genotypie) [24]. Istnieją pewne przesłanki, kiedy do poszukiwań syntetycznej letalności powinno używać się iRNA, a kiedy bibliotek inhibitorów czy aptamerów. Zastosowanie poszczególnych schematów niesie ze sobą różne wady i zalety użycia metody. Przy wykorzystaniu bibliotek RNA działa się czynnikiem „odgórnie”, czyli na jednostkę strukturalną, której funkcji nie zna się, po to, by poszukiwać oddziaływań, co pozwala na dokładną identyfikację funkcji genów i interakcji gen-gen. Wadą metody jest to, iż odnalezione interakcje nie zawsze prowadzą do wyprowadzenia potencjalnej terapii. Związane jest to z tym, że można nie znać czynnika, który mógłby być zastosowany do modulowania tych interakcji. Ponadto nieswoista toksyczność iRNA może prowadzić do fałszowania wyników. Zauważono np., że inhibitor receptora czynnika wzrostu naskórka EGFR (epidermal growth factor receptor) - erlotinib, zwiększał nieznacznie przeżycie w grupie pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem trzustki. W celu zidentyfikowania czynnika, którego inhibicja będzie wzmacniała skutki blokowania EGFR, potraktowano komórki interferencyjnym RNA działającym na niemal 800 zaproponowanych genów, w obecności erlotinibu. Badania wyłoniły kilka kinaz, których zablokowanie poskutkowało obniżeniem przeżywalności komórek raka trzustki [30].

Zaletą metody przeszukiwania bibliotek małych cząsteczkowych związków chemicznych jest to, iż bezpośrednio wyłaniają spośród potencjalnych kandydatów te, które istotnie wpłynęły na komórki. Podejście „oddolne” oznacza tyle, że aby zastosować metodę, trzeba mieć zidentyfikowany cel dla tego czynnika. Nie pozwala to natychmiast wyciągnąć jakichkolwiek wniosków na temat biologii, czy genetyki oddziaływań. Podejście takie okazuje się przydatne do analizy powiązania struktury białek i aktywności czynników, co może się stać pomocne przy optymalizacji działania tych czynników, czy identyfikacji metod zwalczania oporności na leki [7].

Zastosowanie metody genetycznej badania syntetycznej letalności, czyli bibliotek iRNA czy shRNA, jest oparte na prostej zasadzie transfekcji materiału genetycznego z zewnątrz komórki do jej wnętrza, gdzie ulega ekspresji lub interferencji. Dokonywać tego można za pomocą różnych podejść eksperymentalnych. Stosując biblioteki iRNA można umieścić komórki na płytkach, w których jest już obecny iRNA komplementarny do odcinka materiału genetycznego, w który się celuje. Do płytek dodany musi zostać również czynnik transfekcyjny. Obce RNA ze środowiska do wnętrza komórki można przetransportować również w wyniku elektroporacji – metoda opiera się na potraktowaniu komórki polem elektrycznym o odpowiednio wysokim napięciu, w celu odwracalnego zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej i wnikięcia obcego materiału genetycznego do jej wnętrza. Metoda jest stosowana również do przenoszenia leków do wnętrza komórek. Tak potraktowane komórki poddawane są inkubacji, podczas której ma dojść do interferencji. Następnym etapem jest analiza przeżywalności komórek.

Transfekcji można też dokonywać wykorzystując wektory plazmidowe przenoszone np. przez *Escherichia coli*, czy w wyniku infekcji retrowirusowej [2,34]. Zaletą płynącą z wykorzystania plazmidów, jest możliwość dodatkowego zastosowania tzw. „kodów kreskowych”, czyli niezmiennych, charakterystycznych sekwencji flankujących dodawany shRNA. Do linii izogenicznej, u której zmutowano gen A, transfekowany zostaje plazmid, w którym jest obecny gen shRNA blokujący gen B. Gen B jest prawdopodobnie „partnerem” dla genu A w kontekście pojawienia się syntetycznej letalności. Na plazmidzie gen shRNA został oflankowany charakterystyczną sekwencją swoistego „kodu kreskowego”. Komórki poddaje się inkubacji w wybranych przez siebie warunkach, a następnie za pośrednictwem ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy qPCR (z zastosowaniem starterów komplementarnych do sekwencji kodu kreskowego) bądź też z użyciem mikromacierzy analizowana jest liczba poszczególnych sekwencji. Ma ona odzwierciedlać skuteczność działania zadanego shRNA, a więc też to, czy rzeczywiście zachodzi zjawisko syntetycznej letalności w wyniku interakcji między genami A i B [35]. W przypadku próby stworzenia potencjalnej terapii skierowanej przeciwko jednemu z tych genów, niezbędne będzie wykonanie drugiej analizy, w poszukiwaniu czynnika, który zablokuje gen bądź jego produkt. W tym celu przeprowadza się analizę metodą chemiczną, czyli z zastosowaniem np. małocząsteczkowych związków chemicznych, których zadaniem jest inhibicja wybranego czynnika i zablokowanie szlaku. Eksperymentami tego rodzaju były te przeprowadzone przez Hartwella na izogenicznych mutantach drożdży [18]. Do przeprowadzenia analizy tego typu potrzebna jest znajomość interakcji zachodzących między wybranymi genami oraz produktów, które kodują. Badania takie są przydatne nie tylko do poszukiwania potencjalnych terapii przeciwnowotworowych, ale również w przypadku prób ich optymalizacji oraz modyfikacji czynników terapeutycznych (np. odnalezienie najwydajniejszej postaci leku wykorzystywanego w terapii).

Przykładem takiego eksperymentu mogą być badania wykonane przez Arnolda Simonsa, których celem było ustalenie metody chemicznej do analizy zjawiska syntetycznej letalności w komórkach ludzkich. Jako mechanizm modelowy wybrana została biosynteza monofosforanu guanidyny (GMP - guanosine monophosphate), ponieważ składa się z kilku alternatywnych szlaków, które mogą się okazać idealne do przeprowadzenia analizy takich oddziaływań. W warunkach prawidłowych, GMP jest wytwarzane w procesie syntezy *de novo*. Synteza alternatywna przewiduje natomiast konwersję hipoksantyny do inozynomonofosforanu (IMP – inosine monophosphate) lub guaniny bezpośrednio do GMP. Do przejścia szlaków konwersji jest wymagana w obydwu przypadkach, fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa HPRT1 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase), która nie jest niezbędna do przeżycia komórki w warunkach prawidłowych, natomiast w warunkach stresowych, kiedy zablokowane przez inhibitory zostaną szlaki syntezy *de novo*, może się stać istotna. Eksperyment zaprojektowany przez zespół Simonsa niejako integruje podejście genetyczne i chemiczne. Zakłada bowiem umieszczenie w komórkach pozbawionych HPRT1 i hodowanych z inhibitorami szlaku *de novo* (takimi jak kwas mykofenolowy) plazmidu, na którym oprócz białka HPRT1 umieszczony zostanie również gen wytwarzający białko zielonej fluorescencji GFP (green fluorescent protein). Przyrost ilości fluorescencji w detektorze po inkubacji będzie oznaczał wzrost transkrypcji genów *HPRT1*, a zatem również prawidłowe działanie inhibitorów szlaku *de novo*. Takie wysoko wydajne badania przesiewowe czynników, które potencjalnie wywołują w komórce syntetyczną letalność, mogą pomóc w tworzeniu terapii działających na wybraną parę genów, wykazujących opisane wyżej interakcje [39].

Celem przeprowadzania takich analiz jest personalizacja terapii przeciwnowotworowej, w której po przeanalizowaniu profilu ekspresji genów pacjenta cierpiącego z powodu konkretnego typu nowotworu, możliwym będzie przypisanie mu indywidualnego sposobu leczenia, który będzie dla niego wybiórczy i skuteczny. Możliwa dzięki takiemu podejściu stanie się minimalizacja działań niepożądanych, a więc również jakość rekonwalescencji osoby chorej.

BIĄŁKA NAPRAWY DNA A SYNTETYCZNA LETALNOŚĆ W KOMÓRKACH NOWOTWOROWYCH

Doskonałym celem do wywołania skutku syntetycznej letalności mogą zostać czynniki biorące udział w naprawie DNA. Systemy naprawy DNA składają się z wielu szlaków alternatywnych. Naprawa dwuniciowych pęknięć DNA DSBs (double strand breaks) odbywa się za pomocą – naprawy DNA przez rekombinację homologiczną HR (homologous recombination) oraz niehomologicznego łączenia końców NHEJ (non-homologous end joining). Komórki nowotworowe mają często mutacje w jednym ze szlaków naprawy DNA, alternatywnych względem siebie, powodując jego uniczyńnienie. Sytuacja ta może być przydatna w przypadku wyłączenia pozostającego szlaku funkcjonal-

nego, w celu wywołania syntetycznej letalności w tych komórkach. Niezwykle istotnym czynnikiem naprawy DNA przez HR jest białko RAD52, którego rolą jest rozpoznanie uszkodzenia, wiązanie pojedynczej nici DNA i pośrednictwo w łączeniu homologicznych końców DNA. Ponadto wiąże ono białko RAD51 i stymuluje je do homologicznego łączenia nici. Szczególnie istotną rolę odgrywa w komórkach z defektem białka BRCA2 odpowiadającego zarówno za transport RAD51 do jądra komórkowego, jak i za jego umiejscowienie podczas przebiegu naprawy DNA. BRCA2 i RAD52 współdzielą wiele funkcji, takich jak wiązanie jednoniciowego DNA, oddziaływanie z RAD51 i białkami RPA (replication protein A). Pozwala to domniemywać, że możliwe jest wywołanie efektu letalnego w komórkach nowotworowych mających mutację w genie *BRCA2*, przez zastosowania inhibicji białka RAD52 [12,17].

Jeden z eksperymentów, wykorzystujący wyżej opisane geny naprawy DNA, przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych, z których jedna (Capan-1 – komórki ludzkiego raka trzustki) miała tylko jeden gen *BRCA2*, który dodatkowo zawierał delecję, co skutkowało tworzeniem krótszej postaci białka. Druga linia (EUFA423 – komórki wyprowadzone od pacjenta z anemią Fanconiego) wytwarzała natomiast dwie zmutowane wersje tego białka. W pierwszej linii określono niższy poziom ekspresji białka RAD52 i, jak oczekiwano, nie wykryto białka BRCA2 o prawidłowej długości. W przypadku EUFA423 wykrywano jedynie niewielkie ilości zmutowanego BRCA2 zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, co pozwalało domniemywać, że taka postać białka może być niestabilna i szybko ulega degradacji. Białko RAD51 jest obecne w strukturach subjądrowych w postaci tzw. skupisk jądrowych, które nie tylko pozwalają na wykrycie obecności tego czynnika, ale także odzwierciedlają intensywność przebiegu naprawy przez rekombinację homologiczną. Obydwie linie przeanalizowano pod kątem obecności takich miejsc w jądrze przed i po stymulacji promieniowaniem jonizującym. W pierwszej z linii nie wykryto istotnych zmian, natomiast w drugiej zaobserwowano 15% wzrost liczby skupisk RAD51. Ponieważ niewiele cząsteczek BRCA2 w drugiej z linii osiąga jądro komórkowe, podejrzewa się, iż taki wzrost był spowodowany zwiększoną aktywnością RAD52, co mogło być spowodowane niedoborem funkcjonalnej wersji białka BRCA2. Analizowano również oddziaływanie białek RAD52 i RAD51 przez ich kolokalizację. W komórkach, na które nie działało promieniowanie jonizujące, kolokalizacja osiągała niski poziom. Po zastosowaniu czynnika uszkadzającego, oprócz przyrostu w czasie skupisk obydwu tych białek obserwowano również ich umiejscowienie w podobnych miejscach jądra, co potwierdza tezę, że RAD52 funkcjonuje jako regulator funkcji RAD51 pod nieobecność BRCA2. Obniżenie poziomu RAD52 za pomocą siRNA doprowadziło do zmniejszenia zdolności komórek ze zmutowaną wersją genu *BRCA2*, do tworzenia skupisk jądrowych z RAD51, a więc i skuteczności naprawy przez homologiczną rekombinację [17]. Mutacje w genie *BRCA2* nie są jednak często badane, stwierdzano natomiast obniżenie ekspresji tego czynnika np. w spo-

radycznym raku piersi i jajnika. Potencjalnie toksyczność zastosowanych inhibitorów białka RAD52 w komórkach z defektem w genie *BRCA2* może się przyczynić do powstania strategii działania przeciwko tej grupie nowotworów. W układzie takim RAD52 jest syntetycznie letalne względem *BRCA2*.

Inny podejściem było wykorzystanie mutagenезy oraz aptameru, co pozwoliło wskazać fenyloalaninę 79 w domenie I białka RAD52 odpowiedzialnej za wiązanie DNA (RAD52-fenyloalanina 79 aptamer [F79]), jako ważny cel do indukcji syntetycznej letalności w komórkach nowotworowych z niedoborem BRCA1 i/lub BRCA2, bez wpływu na komórki i tkanki prawidłowe. Połączenie aptameru F79 z białkiem RAD52 zakłóca jego oddziaływanie z DNA, co prowadzi do akumulacji pęknięć dwuniciowych tylko w komórkach nowotworowych, w przeciwieństwie do komórek prawidłowych. Ujęcie takie może zainicjować spersonalizowane podejście terapeutyczne u wielu pacjentów z nowotworami wykazujących niedobór BRCA na poziomie genetycznym i funkcjonalnym [10].

Zadaniem polimerazy poli(ADP-rybozy) PARP1 (poly (ADP-ribose) polymerase 1) jest umożliwianie przebiegu naprawy pęknięć jednoniciowych DNA w systemie naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych BER (base excision repair), przez wiązanie się do jednoniciowego DNA i rekrutację białek naprawy do miejsca uszkodzenia. Inhibicja tego enzymu w komórkach z mutacjami w genach *BRCA1* (breast cancer 1) i *BRCA2* prowadzi do niestabilności chromosomowej, zablokowania cyklu komórkowego, a ostatecznie do śmierci komórki. Zahamowanie działania PARP1 powoduje zatrzymanie naprawy BER i konwersję pęknięcia jedno- do dwuniciowego. Naprawą tego typu uszkodzeń zajmuje się natomiast w głównej mierze wcześniej wspomniany szlak HR (szlak NHEJ działa mniej wydajnie w przypadku uszkodzeń z lepkimi końcami). Jeśli w komórce będzie niski poziom białek naprawy DNA przez homologiczną rekombinację, takich jak *BRCA1* i *BRCA2*, dojdzie do gromadzenia pęknięć dwuniciowych, na skutek niewydajnie zachodzącego procesu ich naprawy. Doprowadzi to do zatrzymania cyklu komórkowego i śmierci takiej komórki. Inhibitory PARP1 są jedną z pierwszych zidentyfikowanych grup niskocząsteczkowych czynników, które biorą udział w wywołaniu syntetycznej letalności. Hipotezę potwierdziły badania prowadzone przez zespół H. E. Bryanta. Początkowo były prowadzone na komórkach chomika chińskiego z defektem w naprawie DNA przez HR (dwie linie komórkowe pozbawione XRCC2 (X-ray repair complementing defective repair 2) lub XRCC3 (X-ray repair complementing defective repair 3), które to linie okazały się wrażliwe na działanie inhibitorów PARP. Następnie badania przeprowadzono na modelu bardziej odpowiednim dla komórek ludzkich. Ponieważ defekty genu *BRCA2* są charakterystyczne dla ludzkiego raka piersi, to właśnie takie linie wytypowano do eksperymentu. Przeżywalność obydwu linii znacząco zmniejszyła się po zastosowaniu inhibitorów polimerazy poli(ADP-rybozy). Do komórek dodawano również siRNA, którego zadaniem była minimalizacja ekspresji *BRCA2*. Utrata *BRCA1* lub *BRCA2* i zadziaływanie na komórkę

nowotworową inhibitorami PARP1 jest świetnym sposobem zaaranżowania potencjalnej, nowatorskiej terapii przeciwnowotworowej, opartej na wywołaniu zjawiska syntetycznej letalności, powstałego w wyniku defektu w naprawie DNA [5,16]. Inhibitory tego typu mogą się okazać nieoceanione w walce z nowotworami piersi i jajników, a wiele leków tego typu znajduje się na etapie badań klinicznych [19]. Doskonale rokują również połączenia inhibitorów wywołujących syntetyczną letalność z cytostatykami, takimi jak cisplatyna, karboplatyna czy temozolomid. Dodatkowe uszkodzenia DNA wywoływane przez te cytostatyki, nie są skutecznie usuwane przez niefunkcjonalne, w komórkach nowotworowych, szlaki naprawy DNA. Dochodzi do kumulacji uszkodzeń oraz stopniowego obniżania przeżywalności komórek nowotworowych. Terapia taka działa selektywnie, pozostawiając nienaruszone komórki prawidłowe [31,36].

Naprawa błędnie sparowanych zasad DNA MMR (mismatch repair) jest innym z systemów usuwania uszkodzeń DNA, który odgrywa główną rolę w ustalaniu homeostazy genetycznej komórki. Zadaniem MMR jest m.in. poreplikacyjne usuwanie błędów popełnianych przez polimerazę DNA, ale również naprawa zasad zawierających 8-oxo-guaninę, która powstaje w komórkach na skutek kontaktu guaniny z reaktywnymi formami tlenu. Mutacje w genach MMR, takich jak *MLH1* (MutL homolog 1), *MSH2* (MutS Homolog 2), *MSH6* (MutS Homolog 6) czy *PMS2* (postmeiotic segregation increased 2) skutkować mogą m.in. przyspieszonym starzeniem, powstawaniem nowotworów, czy tzw. syndromu Lyncha (dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością) [25]. Gen *PINK1* (*P-TEN* induced putative kinase 1) koduje natomiast białko kinazy serynowo-treoninowej, która jest umiejscowiona w mitochondriach. Jej główną rolą jest ochrona komórki przed stresem oksydacyjnym, który może być powodem nieprawidłowego działania zarówno tych organelli, jak i całej komórki. Niedobór tego białka prowadzi do akumulacji reaktywnych form tlenu i powstawania oksydacyjnych uszkodzeń DNA, takich jak 8-oxo-dG (8-oxoguanine) w genomie komórek z mutacjami w genach naprawy MMR. Podczas replikacji dochodzi do nieprawidłowego parowania zmienionej guaniny z adeniną, co powoduje później powstawanie miejsca AP (apurinic/aprimidinic site), ma to na celu ograniczenie transwersji GC → TA. W kolejnych cyklach replikacyjnych powoduje to akumulację pęknięć jednoniciowych DNA, co może znacząco wpływać na prawidłowe funkcjonowanie komórki, a także na jej przeżywalność [26]. Wykazano ponadto, iż możliwe jest wywołanie syntetycznej letalności przez zastosowanie inhibitorów polimerazy DNA β w komórkach z niedoborem białka *MSH2* oraz inhibitorów polimerazy DNA γ w komórkach z niedoborem aktywności *MLH1*. Zastosowanie ich, podobnie jak we wcześniejszym, przypadkowo prowadziło do gromadzenia 8-oxo-G w genomie jądrowym w przypadku pary *MSH2/pol β* lub w genomie mitochondrialnym w *MLH1/pol γ* [26].

Gen *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) to gen supresorowy, do utraty funkcji, którego dochodzi

w licznych przypadkach nowotworów, zarówno sporadycznych, jak i dziedzicznych. Jego mutacje są często wykrywane w przypadkach nowotworów piersi, macicy, stercza, tarczycy, skóry czy też w glejakach. *PTEN* wykazuje dwojaką naturę – fosfatazy białkowej i lipidowej. Gen *PTEN* koduje lipidową fosfatazę fosfatydyloinozytolu 3, która odpowiada za defosforylację trójfosforanu fosfatydyloinozytolu PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate). PIP3 działa stymulująco na szlak kinazy AKT (v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1), który zapobiega przebiegowi programowanej śmierci komórki i stymuluje syntezę białek. *PTEN* przez inaktywację PIP3 wpływa na zatrzymywanie cyklu komórki w fazie G1 i doprowadza do jej wejścia na drogę programowanej śmierci. Komórka pozbawiona prawidłowo funkcjonującego genu *PTEN* wymyka się spod kontroli i podlega niekontrolowanym podziałom. Białko MTOR (mechanistic target of rapamycin) bierze udział w mechanizmach regulujących przeżycie komórki w warunkach niedoboru substancji odżywczych. Ponieważ uczestniczy ono w szlaku zależnym od Akt i kinazy PI3, postanowiono przeanalizować interakcje genetyczne zachodzące między MTOR a *PTEN* w sytuacji obniżonej ekspresji tego drugiego. Wykorzystano w tym celu pochodną rapamycyny, która powoduje zatrzymywanie cyklu komórkowego w fazie G1. Działa na MTOR i inhibuje jego fragment odpowiedzialny za fosforylację substratów, takich jak kinaza S6 czy 4E-BP1. Jak się okazało zarówno linie ludzkich komórek nowotworowych, jak i komórki mysie, pozbawione genu *PTEN* były wrażliwe na działanie rapamycyny. Utrata funkcjonalnego *PTEN* może predysponować komórki do podatności na zahamowanie działania MTOR nawet niskimi dawkami pochodnej rapamycyny. Wynik potwierdziła również analiza poziomu kinazy S6 [32]. Gen *PTEN* jest niezwykle istotny do utrzymania stabilności genetycznej komórki. Występujące w nim mutacje mogą zupełnie pozbawić komórkę naprawy DNA przez rekombinację homologiczną. W takiej sytuacji możliwe jest wykorzystanie inhibitorów skierowanych przeciwko białkom szlaku BER, takim jak PARP1. W przypadku niefunkcjonalności tego szlaku, nienaprawione uszkodzenia zostaną przekonwertowane do uszkodzeń dwuniciowych. Niefunkcjonalny szlak HR nie będzie zdolny do naprawy tych uszkodzeń, co doprowadzi do śmierci komórki [29].

Opisane badania są przykładami wykorzystania syntetycznej letalności w badaniach podstawowych, jak i próbach stworzenia spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej. Badania te pozwalają odnaleźć cechy odróżniające komórkę nowotworową od prawidłowej, co powoduje, że potencjalna terapia przeciwnowotworowa może się stać ściśle celowana i wywołać możliwie najmniej działań niepożądanych. Użyteczność wykorzystania narzędzia syntetycznej letalności nie kończy się tylko na identyfikacji potencjalnych terapii przeciwnowotworowych. Niezwykle istotnym celem tego typu analiz jest bowiem poznanie biologii molekularnej nowotworów i interakcji międzygenowych, czy też ich produktów, zachodzących w toku ich rozwoju.

PODSUMOWANIE

Syntetyczna letalność jest niezwykle użytecznym narzędziem zarówno w procesach definiowania funkcji genów, jak i do poznawania biologii nowotworów i poszukiwania potencjalnych terapii przeciwnowotworowych. Postęp technologiczny i możliwość wykorzystania bibliotek iRNA, shRNA, jak i małowzrostkowych związków chemicznych, takich jak inhibitory czy aptamery, okazują się niezwykle użyteczne do poznawania natury syntetycznej letalności i próby jej wykorzystania u ludzi. Chemioterapia jest metodą walki z nowotworami stosowaną od kilku dekad, jednak wciąż nie zmieniały się priorytety jej działania. Stosowane są głównie leki eliminujące szybko

dzielące się komórki. Takie podejście jest przyczyną pojawiania się u pacjentów wielu działań niepożądanych oraz znacząco utrudnia ich rekonwalescencję. Syntetyczna letalność może w obecnej sytuacji okazać się złotym środkiem na selektywne zabijanie wyłącznie komórek nowotworowych. Wykorzystanie jej w połączeniu z radioterapią, czy czynnikami cytotoksycznymi może dodatkowo zwiększać skuteczność tego typu terapii. Badania syntetycznej letalności znajdują się jednak w początkowych etapach i wymagane jest jeszcze przeprowadzenie wielu analiz tak, by dokładnie poznać to zjawisko. Jednak potencjalne, przyszłościowe korzyści dla człowieka, jakie będzie można uzyskać w rezultacie z przeprowadzonych badań, z pewnością zrekompensują poświęcone środki.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adams P.D., Kaelin W.G. Jr.: The cellular effects of E2F overexpression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1996; 208: 79-93
- [2] Barbour L., Xiao W.: Synthetic lethal screen. *Methods Mol. Biol.*, 2006; 313: 161-169
- [3] Berthet C., Aleem E., Coppola V., Tessarollo L., Kaldis P.: Cdk2 knockout mice are viable. *Curr. Biol.*, 2003; 13: 1775-1785
- [4] Bridges C.B.: The origin of variations in sexual and sex-limited characters. *Am. Nat.*, 1922; 56: 51-63
- [5] Bryant H.E., Schultz N., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N.J., Helleday T.: Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 2005; 434: 913-917
- [6] Buchdunger E., Cioffi C.L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., Druker B.J., Lydon N.B.: Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits *in vitro* signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000; 295: 139-145
- [7] Chan D.A., Giaccia A.J.: Harnessing synthetic lethal interactions in anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011; 10: 351-364
- [8] Chan D.A., Giaccia A.J.: Targeting cancer cells by synthetic lethality: autophagy and VHL in cancer therapeutics. *Cell Cycle*, 2008; 7: 2987-2990
- [9] Cohen M.H., Williams G., Johnson J.R., Duan J., Gobburu J., Gobburu J., Rahman A., Benson K., Leighton J., Kim S.K., Wood R., Rothmann M., Chen G., U.K.M., Staten A.M., Pazdur R.: Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 935-942
- [10] Cramer-Morales K., Nieborowska-Skorska M., Scheibner K., Padgett M., Irvine D.A., Sliwinski T., Haas K., Lee J., Geng H., Roy D., Slupianek A., Rassool F.V., Wasik M.A., Childers W., Copland M., Mischen M., Civin C.I., Skorski T.: Personalized synthetic lethality induced by targeting RAD52 in leukemias identified by gene mutation and expression profile. *Blood*, 2013; 122: 1293-1304
- [11] Davierwala A.P., Haynes J., Li Z., Brost R.L., Robinson M.D., Yu L., Mnaimneh S., Ding H., Zhu H., Chen Y., Cheng X., Brown G.W., Boone C., Andrews B.J., Hughes T.R.: The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes. *Nat. Genet.*, 2005; 37: 1147-1152
- [12] Davies A.A., Masson J.Y., McIlwraith M.J., Stasiak A.Z., Stasiak A., Venkiteraman A.R., West S.C.: Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol. Cell*, 2001; 7: 273-282
- [13] Dixon S.J., Fedyshyn Y., Koh J.L., Prasad T.S., Chahwan C., Chua G., Toufighi K., Baryshnikova A., Hayles J., Hoe K.L., Kim D.U., Park H.O., Myers C.L., Pandey A., Durocher D., Andrews B.J., Boone C.: Significant conservation of synthetic lethal genetic interaction networks between distantly related eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 16653-16658
- [14] Dobzhansky T.H.: Genetics of natural populations. XIII. Recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 1946; 31: 269-290
- [15] Dziewit Ł., Bartosik D.: Genomy prokariotyczne w świetle analiz genomicznych. *Postępy Mikrobiol.*, 2011; 50: 87-96
- [16] Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M., Jackson S.P., Smith G.C., Ashworth A.: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 2005; 434: 917-921
- [17] Feng Z., Scott S.P., Bussen W., Sharma G.G., Guo G., Pandita T.K., Powell S.N.: Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 686-691
- [18] Hartwell L.H., Szankasi P., Roberts C.J., Murray A.W., Friend S.H.: Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science*, 1997; 278: 1064-1068
- [19] Hutchinson L.: Targeted therapies: PARP inhibitor olaparib is safe and effective in patients with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2010; 7: 549
- [20] Kaelin W.G. Jr.: The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 689-698
- [21] Kamb A.: Consequences of nonadaptive alterations in cancer. *Mol. Biol. Cell*, 2003; 14: 2201-2205
- [22] Kranz D., Boutros M.: A synthetic lethal screen identifies FAT1 as an antagonist of caspase-8 in extrinsic apoptosis. *EMBO J.*, 2014; 33: 181-197
- [23] Krek W., Xu G., Livingston D.M.: Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell*, 1995; 83: 1149-1158
- [24] Luo J., Emanuele M.J., Li D., Creighton C.J., Schlabach M.R., Westbrook T.F., Wong K.K., Elledge S.J.: A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell*, 2009; 137: 835-848
- [25] Martin S.A., Hewish M., Sims D., Lord C.J., Ashworth A.: Parallel high-throughput RNA interference screens identify PINK1 as a potential therapeutic target for the treatment of DNA mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Res.*, 2011; 71: 1836-1848
- [26] Martin S.A., McCabe N., Mullarkey M., Cummins R., Burgess D.J., Nakabeppu Y., Oka S., Kay E., Lord C.J., Ashworth A.: DNA polymerases as potential therapeutic targets for cancers deficient in the DNA mismatch repair proteins MSH2 or MLH1. *Cancer Cell*, 2010; 17: 235-248

- [27] Matsuda S., Kitagishi Y., Kobayashi M.: Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013; 2013: ID 601587
- [28] McLellan J., O'Neil N., Tarailo S., Stoepl J., Bryan J., Rose A., Hieter P.: Synthetic lethal genetic interactions that decrease somatic cell proliferation in *Caenorhabditis elegans* identify the alternative RFCCTF18 as a candidate cancer drug target. *Mol. Biol. Cell.*, 2009; 20: 5306-5313
- [29] Mendes-Pereira A.M., Martin S.A., Brough R., McCarthy A., Taylor J.R., Kim J.S., Waldman T., Lord C.J., Ashworth A.: Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol. Med.*, 2009; 1: 315-322
- [30] Milosevic N., Kühnemuth B., Mühlberg L., Ripka S., Griesmann H., Lölkes C., Buchholz M., Aust D., Pilarsky C., Krug S., Gress T., Michl P.: Synthetic lethality screen identifies RPS6KA2 as modifier of epidermal growth factor receptor activity in pancreatic cancer. *Neoplasia*, 2013; 15: 1354-1362
- [31] Minami D., Takigawa N., Takeda H., Takata M., Ochi N., Ichihara E., Hisamoto A., Hotta K., Tanimoto M., Kiura K.: Synergistic effect of olaparib with combination of cisplatin on PTEN-deficient lung cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, 2013; 11: 140-148
- [32] Neshat M.S., Mellinghoff I.K., Tran C., Stiles B., Thomas G., Petersen R., Frost P., Gibbons J.J., Wu H., Sawyers C.L.: Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 10314-10319
- [33] Nghiem P., Park P.K., Kim Y., Vaziri C., Schreiber S.L.: ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 9092-9097
- [34] Ngo V.N., Davis R.E., Lamy L., Yu X., Zhao H., Lenz G., Lam L.T., Dave S., Yang L., Powell J., Staudt L.M.: A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*, 2006; 441: 106-110
- [35] Ooi S.L., Shoemaker D.D., Boeke J.D.: DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat. Genet.*, 2003; 35: 277-286
- [36] Plummer R., Lorigan P., Steven N., Scott L., Middleton M.R., Wilson R.H., Mulligan E., Curtin N., Wang D., Dewji R., Abbattista A., Gallo J., Calvert H.: A phase II study of the potent PARP inhibitor, Rucaparib (PF-01367338, AG014699), with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotentiation. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2013; 71: 1191-1199
- [37] Queitsch C., Sangster T.A., Lindquist S.: Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 2002; 417: 618-624
- [38] Roguev A., Bandyopadhyay S., Zofall M., Zhang K., Fischer T., Collins S.R., Qu H., Shales M., Park H.O., Hayles J., Hoe K.L., Kim D.U., Ideker T., Grewal S.I., Weissman J.S., Krogan N.J.: Conservation and rewiring of functional modules revealed by an epistasis map in fission yeast. *Science*, 2008; 322: 405-410
- [39] Simons A., Dafni N., Dotan I., Oron Y., Canaani D.: Establishment of a chemical synthetic lethality screen in cultured human cells. *Genome Res.*, 2001; 11: 266-273
- [40] Tarailo M., Tarailo S., Rose A.M.: Synthetic lethal interactions identify phenotypic 'interologs' of the spindle assembly checkpoint components. *Genetics*, 2007; 177: 2525-2530
- [41] Waldmann T.A.: Immunotherapy: past, present and future. *Nat. Med.*, 2003; 9: 269-277
- [42] Weinstein I.B., Joe A.K.: Mechanisms of disease: Oncogene addiction - a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 2006; 3: 448-457
- [43] Wong S.L., Zhang L.V., Tong A.H., Li Z., Goldberg D.S., King O.D., Lesage G., Vidal M., Andrews B., Bussey H., Boone C., Roth F.P.: Combining biological networks to predict genetic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 15682-15687

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.