

## АПОПТОЗА И ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС

Марија Петровић<sup>1</sup>, Данијела Тодоровић<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Клинички центар Крагујевац

<sup>2</sup> Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

## APOPTOSIS AND CELL CYCLE

Marija Petrović<sup>1</sup>, Danijela Todorović<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Clinical center Kragujevac

<sup>2</sup> Faculty of medical sciences, University of Kragujevac

Примљен/Received: 18.6.2013.

Прихваћен/Accepted: 14.8.2013.

### СКРАЋЕНИЦЕ

**AIF** - фактор индукције апоптозе

**Apaf-1** - апоптотски фактор активације протеаза

**APC** - апоптоза промовишући комплекс

**CDIs** - инхибитори циклин зависних киназа

**Cdks** - циклин зависне киназе

**DISC** - сигнални комплекс који индукује смрт

**NK ћелије** - ћелије природне убице

**TNF рецептор** - рецептор који везује фактор некрозе тумора

**TRAIL рецептор** - рецептор који везује TRAIL лиганд

### САЖЕТАК

Апоптоза, као облик програмиране ћелијске смрти, служи за елиминацију појединачних ћелија окружених нормалном ћелијском популацијом. То је контролисан начин ћелијског умирања у коме ћелија активно учествује, спроводећи прецизан, генски регулисан програм аутодеструкције, тј. ћелијског "самоубиства". За испољавање овог процеса неопходна је активна синтеза макромолекула.

### ABBREVIATIONS:

**AIF** - apoptosis inducing factor

**Apaf-1** - apoptosis protease-activating factor

**APC** - apoptosis promoting factor

**CDIs** - cyclin-dependent kinase inhibitors

**Cdks** - cyclin dependent kinases

**DISC** - death inducing signaling complex

**NK cells** - natural killer cells

**TNF receptor** - tumor necrosis factor receptor

**TRAIL receptor** - TNF-related apoptosis inducing ligand

### ABSTRACT

Apoptosis, a form of programmed cell death, is used to eliminate individual cells surrounded by normal cell population. It is a controlled way of cell death in which the cell actively participates by conducting precise, gene-regulated program of self-destruction, that is, cell "suicide." Active synthesis of macromolecules is necessary during this process. Death of individual cells is necessary to maintain a balance in living systems,

Смрт индивидуалних ћелија је неопходна за одржавање равнотеже у живим системима, тако да је процес апоптозе непрекидно присутан у организму, што омогућава нормално развиће, ткивну хомеостазу и бројне друге физиолошке процесе. Молекуларни механизми који регулишу процес апоптозе су функционално повезани са другим ћелијским механизмима, као што су контрола ћелијског циклуса, ћелијске пролиферације и диференцијације, геномске стабилности и ћелијског метаболизма. Оштећења на молекулу ДНК, настала како спонтано, тако и под дејством различитих хемијских и физичких агенаса, доводе до заустављања ћелијског циклуса и активације механизма који та оштећења поправљају. У зависности од врсте и степена оштећења, ћелија или наставља прогресију кроз ћелијски циклус или активира механизме који је воде у апоптозу. Поремећаји у регулацији процеса апоптозе и ћелијског циклуса представљају молекуларно-биолошку основу многих болести. Због значаја који ови процеси имају у настанку и прогресији тумора њихово коришћење као биолошких маркера представља једну од основних стратегија у формирању терапијских приступа за лечење канцера.

**Кључне речи:** апоптоза, ћелијски циклус, канцер

## АПОПТОТСКА ЋЕЛИЈСКА СМРТ

Сваког тренутка ћелија је изложена утицајима околине, од којих је значајан део потенцијално штетан. Поред тога, у ћелијском метаболизму настају међупродукти који, уколико механизми детоксикације и неутрализације не функционишу на одговарајући начин, могу да наруше, у већој или мањој мери, функцију и структуру ћелије. Реакција оштећене ћелије може да иде у два правца. Настало оштећење може да се делимично или потпуно исправи, или се ћелија елиминише из организма, тј. умире. Међутим, чак и код леталних оштећења, смрт не наступа тренутно, већ ћелије пролазе кроз реверзибилну фазу у којој покушавају да изврше репарацију све до "тачке без повратка", после које наступа неминовна смрт. Поред ове патолошке смрти ћелија, постоји и апоптоза - тзв. физиолошка смрт, која се запаже током ембрионалног развоја или обнове ћелија у ткивима људи<sup>1</sup>.

Апоптоза је активан и генски контролисан процес у коме се морфолошке промене

so the process of apoptosis is continuously present in the body, which allows normal development, tissue homeostasis, and many other physiological processes. The molecular mechanisms that regulate apoptosis are functionally linked to other cellular mechanisms, such as control of the cell cycle, cell proliferation and differentiation, genomic stability and cellular metabolism. Damage to the DNA molecule, caused both spontaneously and under the influence of various chemical and physical agents, leads to the cell cycle arrest and activation of mechanisms that repair the damage. Depending on the type and extent of the damage, the cell either continues progression through the cell cycle, or activates the mechanisms that lead to apoptosis. Disturbances in the regulation of apoptosis and cell cycle present the molecular and biological basis of many diseases. Because of the importance of these processes during the development and progression of tumors, their use as biological markers is one of the main strategies in the formation of therapeutic approaches for the treatment of cancer.

**Key words:** apoptosis, cell cycle, cancer

## АПОПТОТИК ЦЕЛ ДЕАТХ

The cell is exposed to environmental influences at all times, of which substantial part can be potentially dangerous. In addition, in the cellular metabolism intermediate products are formed, which, if detoxification and neutralization mechanisms don't function in an appropriate manner, can impair the function and a structure of the cell. The reaction of the damaged cell can go in two directions. The caused damage can be either partially or totally repaired, or the cell is being eliminated from the organism i.e. dies. However, even with lethal damages, death isn't immediate. Cells pass through a reversible phase in which they try to make reparation up to the "point of no return", after which comes inevitable death. In addition to this pathological death, there is also apoptosis so-called physiological death, which is observed during embryonic development and cell renewal in adult tissues<sup>1</sup>.

Apoptosis is an active and genetically controlled process in which the morphological

дешавају по прецизно одређеном редоследу, због чега је названа и програмирана ћелијска смрт. Апоптоза у многим случајевима настаје спонтано, али може бити индукована физиолошким и нефизиолошким факторима, као и штетним агенсима. Процес апоптозе је непрекидно присутан у организму и омогућава нормално развиће, ткивну хомеостазу и бројне физиолошке процесе. Апоптоза се покреће и при елиминацији оштећених и "опасних" ћелија као што су ћелије са оштећеном ДНК, ћелије са неадекватним митогеним сигнаlima, аутореактивне ћелије имуног система, при елиминацији инфективних ћелија итд. Поремећаји у регулацији процеса апоптозе имају улогу у патогенези многих болести, као што су неуродегенеративне болести, инфаркт миокарда, аутоимуни поремећаји (реуматоидни артритис, системски лупус еритематозус) и друге<sup>2</sup>.

### **МОРФОЛОШКЕ И БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ПРОЦЕСА АПОПТОЗЕ**

У току процеса апоптозе долази до различитих морфолошких промена, које настају одређеним редоследом без обзира на врсту ћелије или околности под којима су те промене изазване.

Апоптоза захвата појединачне ћелије. Прве промене огледају се у губитку међућелијских веза. Волумен ћелије се смањује због кондензације цитоплазматичних протеина. Једро добија облик потковице, услед кондензације и деградације хроматина. Ендонуклеазе фрагментушу молекуле ДНК на фрагменте дужине 50-300 кб, а касније и на мале олигонуклеозомске фрагменте, који се састоје од фрагмената дужине 180-200 бп. Деградација ДНК одвија се на местима између нуклеозома и може се детектовати електрофоретском анализом, која на агарозном гелу даје карактеристичан лествичаст изглед ДНК<sup>3</sup>. Запажа се дилатација ендоплазматичног ретикулума у виду већих везикула. Из митохондрија се ослобађа цитохром Ц. Рано током процеса, долази до инверзије фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу страну плазма мембране. Присуство фосфатидилсерина са спољне стране мембране одговорно је за везивање за рецепторе на фагоцитима<sup>4</sup>. Ћелија се распада на мале, мембраном окружене фрагменте, тзв. апоптотична тела, у којима се налазе делови цитоплазме са морфолошки очуваним орга-

changes occur in a precisely determined manner, and therefore of which it is also called programmed cell death. Apoptosis in many cases occurs spontaneously but can also be induced by physiological and non-physiological factors, as well as by harmful agents. Apoptosis is initiated when eliminating the damaged and "dangerous" cells as well, cells with damaged DNA, cells with inadequate mitogenic signals, auto reactive immune cells, when eliminating infectious cells etc. Disorders in the regulation of apoptosis have a role in the pathogenesis of many diseases such as neurodegenerative diseases, myocardial infarction, autoimmune disorders (rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus) and others<sup>2</sup>.

### **MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FEATURES OF APOPTOSIS**

During the apoptotic process a number of different changes occur regardless of the type of cell or the circumstances under which those changes were provoked.

Apoptosis affects individual cells. The first changes are reflected in the loss of intercellular connections. The volume of the cell decreases due to the condensation of cytoplasmic proteins. Nucleus takes a shape of a horseshoe due to the condensation and degradation of chromatin. Endonucleases cut DNA molecules into fragments of 30-500 kb, and subsequently into the small oligonucleosomal fragments, that consist of fragments 180-200 bps long. Degradation of DNA molecules occurs in the space between nucleosomes and can be detected by agarose gel electrophoresis, as characteristic 180-200 bps ladder-pattern<sup>3</sup>. A dilatation of endoplasmic reticulum is noticed in the form of large vesicles. Cytochrome c is released by mitochondria. The transition of phosphatidylserine from the inner to the outer side of plasma membrane is process that occurs in the early stage of apoptosis. Presence of phosphatidylserine on the outer side of the membrane is responsible for the binding to phagocyte receptors<sup>4</sup>. Cells disintegrate into small fragments surrounded by a membrane, so called apoptotic bodies, which are part of the cytoplasm with morphologically preserved organelles and fragments of the

нелама и фрагментима нуклеуса. Очуваност мембране у току процеса апоптозе спречава изливање ћелијског садржаја у околину, па за разлику од процеса некрозе, нема пратеће инфламаторне реакције. Формирана апоптотска тела брзо фагоцитирају макрофаги или суседне паренхимске ћелије.

Важна карактеристика процеса апоптозе је повећана синтеза протеина. Већина ензима који учествују у овом процесу су или новосинтетисани или су активирани из проензимске форме пошто је ћелија примила апоптотски сигнал. Поред већ поменутих ендонуклеаза, важну улогу у процесу апоптозе имају и каспазе<sup>5</sup>. Каспазе су високо специфичне протеазе, које имају цистеин у свом активном месту и селективно делују на месту иза аспартата у протеинима. Каспазе се синтетишу као неактивни прекурсори – прокаспазе, а активирају се протеолитичким одвајањем веће (око 20 kD) и мање (око 10 kD) субјединице које се затим повезују у облику активног хетеродимера. Каспазе регулишу протеолизу током апоптотске смрти ћелије. Протеазна каскада је иреверзибилна, кад једном достигне критичну тачку на путу деградације, ћелија умире. Различити стимулуси доводе до активације каспаза. Прве каспазе које се активирају су иницијаторске, а оне активирају такозване егзекуторске каспазе. До данас је идентификовано 14 чланова породице каспаза, при чему прокаспазе 2, 8, 9 и 10 убрајамо у иницијаторске, а прокаспазе 3, 6 и 7 у ефекторске каспазе. Каспазе делују на кључне протеине ћелије, као што су протеини који регулишу апоптозу, нуклеарне ламине и компоненте цитоскелета, ензиме-регулаторе ћелијског циклуса, ензиме који су укључени у поправку оштећења молекула ДНК и друге.

Велики број сигнала из спољашње средине може да активира један од два основна апоптотска пута - спољашњи пут апоптозе, који укључује рецепторе смрти, и унутрашњи, митохондријални пут<sup>5</sup>.

Спољашњи пут се покреће директним везивањем лиганда за рецепторе на ћелијској мембрани, као што су Fas, TNF рецептор или TRAIL рецептор или деловањем ензима цитотоксичних Т лимфоцита и NK ћелија (ензим перфорин и гранзим Б). Везивањем лиганда за рецепторе на мембрани, долази до конформационих промена интрацелуларних домена и регрутовања адаптерних и других протеина тако да се формира протеински

nucleus. Preservation of membrane during apoptosis prevents leakage of cellular contents into the environment and in contrast to the process of necrosis there is no accompanying inflammatory reaction. Formed apoptotic bodies are rapidly phagocytosed by macrophages or neighboring parenchymal cells.

An important feature of apoptosis is increased protein synthesis. Most enzymes involved in this process are either newly synthesized or activated from proenzyme form after the cell has received apoptotic signal. Caspases play an important role in apoptosis<sup>5</sup>. Caspases are highly specific proteases, which have cysteine in their active site and selectively act in the site behind the aspartates in proteins. Caspases are synthesized as inactive precursors- pro-caspases, and they are activated by a proteolytic separation of the smaller (about 10 kD) and the bigger (about 20 kD) subunit, which are then connected in a form of active heterodimer. Caspase regulate proteolysis during apoptotic cell death. Protease cascade is irreversible, once it reaches a critical point on the way to destruction, the cell dies. Various stimuli lead to caspase activation. First caspases that are activated are initiator caspases, which in turn activate effector caspases. To date 14 members of the caspase family have been identified, wherein procaspases 2, 8, 9 and 19 belong to the initiator caspases group, whereas procaspases 3, 6 and 7 belong to effector caspases group. Caspases affect the key cell proteins, such as proteins that regulate apoptosis, nuclear lamina and cytoskeletal components, enzymes that regulate the cell cycle, enzymes involved in the reparation of the damaged DNA molecules and others.

A significant number of signals from the outer environment can activate one of two main apoptotic pathways- extrinsic, which includes death receptors and intrinsic, the mitochondrial pathway<sup>5</sup>.

The extrinsic pathway is initiated by direct binding of the ligand to the receptors on the cell membrane, such as Fas, TNF receptor or TRAIL receptor or by action of cytotoxic T lymphocytes and NK cells (enzyme perforin and granzyme). Ligand binding to receptors on the membrane creates a conformational change of intracellular



комплекс DISC (death inducing signaling complex). Са формирањем овог комплекса активирају се прокаспаза 8 и/или прокаспаза 10 које покрећу интраћелијску протеолитичку каскаду водећи ћелију у смрт<sup>6</sup>.

С друге стране, оштећења на молекулу ДНК, изазвана грешком у репликацији, дејством физичких и хемијских агенаса, као и слободним радикалима, покрећу процес апоптозе из саме ћелије. Овај, унутрашњи апоптотички пут започиње ослобађањем проапоптотичких протеина из митохондрија. Ови протеини се нормално налазе у интермембранозном простору мембране митохондрија, а кад се ослободе у цитоплазму доводе до активације протеолитичке каскаде каспаза и апоптотске смрти ћелије. Цитосолни цитохром Ц се везује за адаптерни протеин Араф-1 (Apoptosis protease-activating factor) и прокаспазу 9, коју активира стварајући интрацелуларни комплекс који је познат као апоптозом. Апоптозом активира каспазу 3 која доводи до ћелијске смрти<sup>7</sup>. Осим цитохрома Ц, митохондрије садрже и друге апоптотске факторе као што су АИФ (apoptosis inducing factor) и ендонуклеаза Г.

Инхибитори апоптозе су група структурално и функционално сличних протеина који су ендогени инхибитори каспаза. Они могу инхибирати каспазе везивањем за њихово активно место, стимулисањем деградације активних каспаза или просторним раздвајањем каспаза од својих супстрата<sup>8</sup>.

## РЕГУЛАЦИЈА ПРОЦЕСА АПОПТОЗЕ

Данас је познат читав низ гена, односно њихових продуката, који регулишу апоптотску ћелијску смрт. Протеински продукти фамилије *bcl-2* гена се убрајају у важне регулаторе процеса апоптозе<sup>9</sup>. Неки чланови *bcl-2* фамилије су стимулатори процеса апоптозе (проапоптотски протеини - Bad, Bax, Bak, Bag, Bik, Bid, Hrk, Diva, BNIP3), док су други чланови инхибитори (антиапоптотски протеини, Bcl2, Bcl-xL, Mcl-1, Boo). Ови протеини међусобно стварају хетеродимере и њихов међусобни однос одређује реакцију ћелије према агенсима који индукују апоптозу. Активацијом иницијатора апоптозе долази до формирања пора на мембрани митохондрија кроз које излазе цитохром Ц и други интермембрански митохондријални протеини у цитоплазму. Антиапоптотски протеини се налазе на спољашњој митохондријалној мембрани, на спољашњој страни ендоплазмат-

domain and recruits adapter proteins and others to form a protein complex DISC (death inducing signaling complex). This complex activates procaspase 8 and/or procaspase 10, which initiate intercellular proteolytic cascade leading the cell into death<sup>6</sup>.

On the other side, damages to the DNA molecule, caused by a replication error, the influence of physical and chemical agents as well as free radicals, trigger the process of apoptosis. This intrinsic apoptotic pathway begins by the release of proapoptotic proteins from mitochondria. These proteins are normally located in the intermembrane space of mitochondrial membrane, but when they are released into the cytoplasm, they lead to activation of the proteolytic cascade of caspases and the apoptotic cell death. Cytosolic cytochrome c binds to the adapter protein Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1) and to the procaspase 9, which it activates and form an apoptosome. Apoptosome activates caspase 3, which leads to cell death<sup>7</sup>. Beside cytochrome c, mitochondria also contain other apoptotic factors such as AIF (apoptosis inducing factor) and endonuclease G.

Inhibitors of apoptosis are a group of structurally and functionally similar proteins, which are endogenous inhibitors of caspase. They can inhibit caspases either by attaching themselves to their active site, or by stimulating degradation of active caspases or by spatial separation of caspases from their substrates<sup>8</sup>.

## REGULATION OF APOPTOTIC PROCESS

It is known a series of genes, and their products, which regulate apoptotic cell death. Protein products of *bcl-2* gene family are important regulators of apoptotic process<sup>9</sup>. Some members of *bcl-2* family are stimulators of the process of apoptosis (proapoptotic proteins - Bad, Bax, Bak, Bag, Bik, Bid, Hrk, Diva, BNIP3), while the other members are inhibitors (antiapoptotic proteins-BCL2, Bcl-xL, Mcl-1, Boo). These proteins form heterodimers and their relative ratio determines the cell reaction towards agents inducing the apoptosis. Activation of apoptosis initiator leads to the formation of pores in mitochondrial membrane, through which cytochrome c and other mitochondrial intermembrane space proteins go

ског ретикулума и нуклеарног омотача и они инхибишу апоптозу углавном тако што се везују за проапоптотске протеине. Проапоптотски Bcl-2 протеини обухватају две подфамилије: BH123 (то су Bax и Bak) и BH3only протеини (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad). BH3only протеини промовишу апоптозу тако што инактивишу антиапоптотске протеине, а такође омогућавају и агрегацију Bax и Bak протеина, што доводи до отпуштања интермембранских митохондријалних протеина у цитоплазму<sup>10</sup>.

Тумор супресорски ген, *p53* има одлучујућу улогу у заштити ћелије од малигне трансформације<sup>11</sup>. Оштећења молекула ДНК подстичу транскрипциону активност *p53*, а као последица долази до заустављања ћелијског циклуса у G1 фази и активације механизма који та оштећења поправљају, или до покретања апоптотског механизма, уколико су оштећења непоправљива. Активација апоптотског програма посредством *p53* може да се одигра преко Fas рецептора, Bcl-2 фамилије протеина, као и преко цитохрома Ц из митохондрија<sup>12</sup>.

Продукт прото-онкогена *c-myc* је транскрипциони фактор Myc, који има важну улогу у контроли ћелијског раста и вијабилности, али и у индукцији процеса апоптозе<sup>13</sup>. Протеински производи *c-myc* гена учествују у контроли ћелијског циклуса, регулишући ниво циклина D, A и E, и инхибитора циклин зависних киназа. Прекомерна експресија покреће апоптозу путем механизма који укључује ген *p53*.

## ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС

Ћелијски циклус је низ сложених биолошких процеса који доводе до прецизне дупликације генетичког материјала и дистрибуције у ћелијама-потомцима. Сложени контролни механизми обезбеђују напредовање циклуса у жељеном смеру и проверавају да ли су у одређеној фази испуњени сви неопходни услови за прелазак у следећу фазу. У регулацији ћелијског циклуса важну улогу имају циклин зависне киназе и циклини, као и инхибитори циклин зависних киназа<sup>14</sup>.

Циклин зависне киназе, Cdks (Cyclin dependent kinases) су група ензима чија активност расте и опада у току ћелијског циклуса, регулишући кључне догађаје у репликацији генетичког материјала и ћелијској деоби. Они припадају фамилији серин/треонин киназа и фосфорилишу циљне протеине, што

into the cytoplasm. Anti-apoptotic proteins are located on the outer mitochondrial membrane, on the outer side of the endoplasmic reticulum and of the nuclear envelope and they inhibit apoptosis mainly by binding themselves to proapoptotic proteins. Proteins bcl-2 comprise two subfamilies: BH123 (these are Bak and Bax) and BH3only proteins (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad). BH3only proteins promote the apoptosis by inactivating anti-apoptotic proteins and also enable aggregation of Bak and Bax proteins, which leads to mitochondrial intermembrane space protein release to the cytoplasm<sup>10</sup>.

Tumor suppressor gene *p53* has a decisive role in cell protection from malignant transformation<sup>11</sup>. Damage of a DNA molecule stimulates *p53* transcriptional activity, and as a consequence, a cell cycle arrests in G1 phase of the cell. The mechanisms that repair damage are being activated, or, in case of irreparable damage, the apoptosis mechanisms are initiated, leading cell into death. Activation of the apoptotic program by *p53* can take place through Fas receptors, Bcl-2 families of proteins, as well as through cytochrome c from mitochondria<sup>12</sup>.

The product of proto-oncogene *c-myc* is a transcriptional factor Myc, that plays an important role in control of cell growth and viability, but also in the induction of apoptotic process<sup>13</sup>. The protein product of *c-myc* gene participates in the control of the cell cycle, regulating the level of cyclin D, A and E, and of the cyclin dependent kinase inhibitors. Overexpression of *c-myc* induces apoptosis via mechanism that includes *p53*.

## CELL CYCLE

Cell cycle is a set of complex biological processes that lead to precise duplication of the genetic material and its segregation to the new daughter cells. Complex control mechanisms provide the cycle progression in a desirable direction and check whether all necessary conditions for the transition into the next phase are fulfilled. Important role in the cell cycle regulation have cyclin dependent kinases and cyclins, as well as cyclin dependent kinase inhibitors<sup>14</sup>.

Cyclin dependent kinases, Cdks are a group of enzymes, whose activity grows and descends

доводи до инхибиције или активације молекула.

Циклини су група структурно сличних протеина који се добили име по томе што се циклично синтетишу и деградирају током различитих фаза ћелијског циклуса. Промене нивоа циклина доводе до активације комплекса циклин-Cdk, који фосфорилише своје циљне протеине и индукује специфичне ћелијске догађаје.

Најдужа фаза ћелијског циклуса је G1 фаза, током које је ћелија пријемчива на дејство сигнала из спољне околине. Фактори раста, везивањем за специфичне рецепторе, најчешће дају сигнал за започињање ћелијског циклуса и синтезу циклина D који се синтетише докле год постоји стимулација факторима раста. Ниво циклина D расте у раној G1 фази и достиже свој максимум у касној G1 фази, када ћелија неизбежно прелази у S фазу. Циклин D гради комплексе са Cdk4 и Cdk6 који доводе до фосфорилације протеина ретинобластома, Rb. Наиме, Rb фамилија протеина у хипофосфорилисаном стању за себе чврсто везује транскрипционе факторе E2F и ензим хистон-деацетилазу, одржавајући инхибиторне комплексе на промоторима кључних регулаторних гена ћелијског циклуса. Фосфорилацијом протеина Rb долази до ослобађања транскрипционог фактора E2F-1. Циљни гени за овај транскрипциони фактор су регулатори ћелијског циклуса - циклин E и циклин A, као и ензими потребни за синтезу и репликацију ДНК. Комплекс циклина E и Cdk2 доводи до даље фосфорилације протеина Rb, због чега ћелија пролази рестрикциону тачку и улази у фазу репликације. За прелазак ћелије у S фазу ћелијског циклуса - фазу репликације ДНК, важну улогу има и комплекс циклина A и Cdk2, као и комплекс Cdk1 (познате као Cdc2) и циклина B. Овај комплекс доводи до кондензације хромозома и распада мембране једра. Нагли пораст активности комплекса започиње догађаје у раној митози, када долази до формирања деобног вретена и причвршћивања центромера хромозома за нити деобног вретена. За почетак анафазе и комплетирање митозе, неопходна је активација мултимерног комплекса APC (apoptosis promoting complex). APC је члан убуквитин лигаза фамилије ензима који катализује деструкцију секурина и тако иницира раздвајање хроматида. Овај комплекс је укључен и у разградњу циклина који су активни у S и M фази ћелијског циклуса. Деструкцијом циклина се инактивира

during the cell cycle, regulating key events in the replication of genetic material and cell division. They belong to a serin/threonine kinases family and they phosphorylate target proteins, which leads to inhibition or activation of molecules.

Cyclins are a group of structurally similar proteins that are cyclically synthesized and degraded during different phases of the cell cycle. Changes in the cyclin levels lead to activation of cyclin-Cdk complex, which phosphorylates its target proteins and induces specific cellular events.

The longest phase of the cell cycle is G1 phase, during which the cell is susceptible to the stimuli from external environment. Growth factors, by binding to specific receptors, mainly provide a signal for initiation of the cell cycle and cyclin D synthesis, which is synthesized as long as there is stimulation of growth receptors. Cyclin D level increases in the early G1 phase and reaches maximum at a late G1 phase, when the cell enters the S phase. Cyclin D forms a complexes with Cdk4 and Cdk6, which lead to phosphorylation of retinoblastoma protein, Rb. In fact, Rb protein family in its hypophosphorylated condition firmly attaches transcription factors E2F and enzyme histone deacetylase to itself, keeping inhibitory complexes on promoters of the key regulatory genes of the cell cycle. When protein RB is phosphorylated, transcription factor E2F-1 is released. Target genes for this transcription factor E2F are cell cycle regulators - cyclin E and cyclin A, as well as enzymes necessary for synthesis and replication of DNA. Cyclin E and Cdk2 complex lead to the further phosphorylation of the Rb protein, because of which the cell passes through the restriction point and enters the replication phase. Important role for cell entry into S phase (DNA replication phase) has complex cyclin D and Cdk2, as well as complex Cdk1 (also known as Cdc2) and cyclin B. This complex leads to the condensation of the chromosomes and breakdown of nuclear membrane. Increase of the activity of the complex in early mitosis initiate assembly of the mitotic spindle and attachment of centromeres to the spindle. The activation of a multimeric complex APC (apoptosis promotive complex) is required to start anaphase and complete mitosis. APC is a

већина Cdk у ћелији, а као последица долази до дефосфорилације циљних протеина што је неопходно за завршне кораке митозе и цитокинезе<sup>15</sup>.

Циклин-зависни инхибитори киназа, CDIs (cyclin dependent kinase inhibitors) су укључени у модулацију активности циклин зависних киназа током ћелијског циклуса. Фамилије ових протеина можемо поделити у две категорије: INK 4 (p16, p15, p18, p19) и CIP/Kip (p21, p27, p57) фамилију инхибитора. Прекомерна експресија било ког члана CIP/Kip фамилије проузрокује застој у G1 фази ћелијског циклуса, док прекомерна експресија INK4 чланова доводи до редукције нивоа циклин D/Cdk4 комплекса<sup>16</sup>.

Инхибиторни протеини се синтетишу као одговор на спољашње сигнале за заустављање ћелијског циклуса или и одсуству одговарајућих митогених сигнала.

### **КОНТРОЛНИ МЕХАНИЗМИ (CHECKPOINTS) У ЋЕЛИЈСКОМ ЦИКЛУСУ**

Уколико нису испуњени сви услови за успешну ћелијску деобу долази до заустављања ћелијског циклуса при чему се активирају одговарајући контролни механизми. Ови контролни механизми названи су контролне тачке (checkpoints) и они спречавају репликацију оштећене ДНК у С фази – G1 checkpoint, односно погрешну сегрегацију хромозома – G2 checkpoint<sup>17</sup>.

Оштећења на молекулу ДНК могу настати као резултат спонтаних хемијских реакција у ДНК, као последица грешке током репликације ДНК, или након излагања ћелије хемијским или физичким агенсима. Као одговор на настало оштећење, контролне тачке заустављају ћелијски циклус у датом моменту, дајући времена ћелији да поправи настало оштећење.

Уколико је ДНК оштећење настало пре уласка ћелије у С фазу, долази до повећања активности транскрипционог фактора p53. У нормалној ћелији ниво p53 је низак јер се он брзо разграђује у протеозому посредством убиквитин лигазе. Активација овог тумор супресора омогућава експресију различитих циљних гена укључених у репарацију ДНК, контролу ћелијског циклуса и апоптозу. Активирани p53 доводи до синтезе протеина p21 који инхибира циклин D/Cdk4,6 и циклин E/Cdk2 комплексе узрокујући застој ћелијског циклуса у G1 фази. Уколико се ради о

member of ubiquitin ligase family of enzymes responsible for destruction and initiation of the separation of sister chromatids. This complex is also involved in the degradation of cyclins which are active in the S and M phase of the cell cycle. Cyclin destruction inactivates most of the Cdks in a cell, and leads to dephosphorylation of the target proteins, which is essential for the final steps of mitosis and cytokinesis<sup>15</sup>.

Cyclin-dependent kinase inhibitors, CDIs modulate the activity of cyclin dependent kinases during the cell cycle. The family of these proteins can be divided into two categories: INK 4 (p16, p15, p18, p19) and CIP/Kip (p21, p27, p57) family of inhibitors. Overexpression of any member of the CIP/Kip family causes a cell cycle arrest at the G1 phase. Also, overexpression of any member of the INK4 family leads to reduction in the level of cyclin D/Cdk4 complex<sup>16</sup>.

Inhibitory proteins are synthesized in response to environmental signals for cell cycle arrest or in the absence of mitogenic signals.

### **CHECKPOINTS IN THE CELL CYCLE**

If all conditions for cell division aren't met, the cell cycle progression stops, and activates the appropriate control mechanisms. These control mechanisms are called checkpoints and they prevent the replication of the damaged DNA in S-phase (G1 checkpoint), as well as inadequate chromosome segregation (G2 checkpoint)<sup>17</sup>.

Damages to the DNA molecule can occur as a result of spontaneous chemical reactions in the DNA, as a consequence of error during DNA replication, or after exposure of the cell to chemical or physical agents. As a response to the damage, checkpoints stop the cell cycle progression, giving the cell the time to repair the damage.

If the DNA damage occurs in S-phase, transcription factor p53 increases its activity. In a normal cell p53 level is low, because it is rapidly degraded by ubiquitin ligases. Activation of this tumor suppressor enables expression of different target genes, which participate in the DNA repair, cell cycle control and apoptosis. Activated p53 leads to p21 protein synthesis, which inhibits cyclin D/Cdk4,6 and cyclin E/Cdk2 complexes causing the cell cycle arrest in G1 phase. In case



неповратном оштећењу, p53 активира гене укључене у индукцију процеса апоптозе. Активација апоптотског процеса посредством p53 може да се одигра прека Fas рецептора, Bcl-2 фамилије протеина као и преко цитохрома Ц из митохондрија који се активира посредством протеина p53AIP, Noxa и PUMA<sup>16</sup>.

Заустављање ћелијског циклуса у G2 фази настаје или као последица смањења нивоа циклина В у ћелији или као последица хиперфосфорилације Cdk1. Истраживања показују да и p53 протеин преко p21, чију транскрипцију активира, учествује у заустављању ћелијског циклуса у G2 фази, заустављањем синтезе циклина В и Cdk1<sup>18</sup>.

Ћелија заустављена у одређеној фази циклуса има шансу да исправи оштећење на молекулу ДНК активирањем одговарајућих контролних механизма и онда настави са деобом или да активира апоптотске механизме и заврши свој животни циклус. Који ће од ова два пута да изабере, зависи од врсте и степена оштећења ДНК.

### ПОРЕМЕЋАЈ У РЕГУЛАЦИЈИ АПОПТОЗЕ И ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА У КАНЦЕРСКОЈ ЋЕЛИЈИ

Још седамдесетих година прошлог века уочена је веза између поремећаја у апоптози и чешће појаве тумора. Мутације у генима који учествују у индукцији апоптозе имају важну улогу у процесу канцерогенезе<sup>19</sup>. Агенси могу поново да успоставе апоптотске путеве имају потенцијал да елиминишу канцерске ћелије.

Већ је речено да тумор супресорски протеин p53 учествује у регулацији ћелијског циклуса и у индукцији процеса апоптозе. Који ће од ова два пута ћелија да изабере зависи од великог броја фактора, у првом реду од степена оштећења молекула ДНК. У многим хуманим канцерима је пронађен мутиран ген p53. Ове мутације у гену p53 доводе до експресије неактивног протеина p53, који не може да индукује апоптозу у одговору на оштећења ДНК. Због тога се p53 статус тумора користи као прогностички фактор за терапију тумора<sup>20</sup>.

Познато је такође да и протеин c-Myc директно активира гене који су укључени како у пролиферацију, тако и у индукцију процеса апоптозе. Митогени стимулишу пролиферацију индуковану c-Myc-ом, док антиапоптотски фактори, као што је Bcl-2, затварају

of irreversible damage, p53 activates the genes, involved in the induction of apoptosis. Activation of the apoptotic through p53 activity can be realized through Fas receptors, Bcl-2 protein family and also cytochrome c from mitochondria, which is activated by means of p53AIP, Noxa and PUMA<sup>16</sup>.

Cell cycle arrest in the G2 phase is either the result of the reduction of cyclin B level in the cell, or the result of hyperphosphorylation of Cdk1. Studies show that protein p53 via p21, participates in cell cycle arrest in the G2 phase, by arresting the synthesis of cyclin B and Cdk1<sup>18</sup>.

The cell stopped in a particular phase of the cycle, has a chance to repair the damage on the DNA molecule, by activating adequate control mechanisms and proceed with cell division, or finish its life by activating apoptotic mechanisms. Which one of these two pathways it will choose, depends on the type and degree of DNA damage.

### DISORDERS IN APOPTOSIS AND CELL CYCLE REGULATION IN CANCER CELL

In the eight decade of the last century a connection between disorders in apoptosis and an increased incidence of tumors has been noticed. Mutations of genes involved in the induction of apoptosis have a significant role in the process of cancerogenesis<sup>19</sup>. Agents that can re-establish apoptotic pathways, have the potential to eliminate cancer cells.

It was already mentioned that the tumor suppressor protein p53 participates in the regulation of the cell cycle and in the induction of apoptosis. Which one of these two pathways the cell chooses depends on numerous factors, primarily on the level of damage of the DNA molecule. In many human cancers mutated gene p53 has been found. These mutations in the gene p53 lead to the expression of inactive protein p53, which cannot induce apoptosis as a response to the DNA damages. Therefore p53 status is being used as a prognostic factor for cancer treatment<sup>20</sup>.

It is also been known that protein c-Myc directly activates the genes involved in both proliferation and induction of apoptosis. Mitogens stimulate proliferation induced by c-Myc, while antiapoptotic factors, such as Bcl-2, close the

апоптотски пут индукован овим транскрипционим фактором. Када други сигнали инактивирају ове антиапоптотске факторе, Мус индукује ћелијску смрт.

Протеин Rb има важну улогу како у прогресији ћелијског циклуса тако и у инхибицији процеса апоптозе, јер представља циљни протеин за деловање каспаза. Активно учешће у апоптози имају комплекс циклин A/Cdk2, Cdc2 и циклин D, као и CDIs. Иако Cdkс не припадају апоптотској машинерији, оне активирају неколико сигналних путева који воде ћелију у апоптотску ћелијску смрт.

### **ЗНАЧАЈ АПОПТОЗЕ И ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА У РАЗВОЈУ НОВИХ ТЕРАПИЈСКИХ ПРИСТУПА**

Мутације или инактивација гена који учествују у регулацији процеса апоптозе доводе до неконтролисане деобе ћелија и настанка тумора. Управо ови гени и њихови протеински производи представљају циљне молекуле у терапији канцера.

У многим туморима је инактивиран тумор-супресорски ген p53. Мутације у овом гену доводе до лошег одговора ћелије на примењену терапију. Генска терапија приликом које се врши трансфер овог гена помоћу вирусних вектора истражује се још од 1996. године<sup>21</sup>. Пре клиничке студије су показале да је испољени p53 ген довео до регресије тумора и побољшао преживљавање код животиња без нежељених ефеката у околном ткиву. У комбинацији са зрачном и/или хемио терапијом дошло је до повећања броја апоптотских ћелија у малигном ткиву код тумора плућа, простате и тумора главе и врата<sup>22</sup>. Неколико класа лекова регулише експресију гена који припадају bcl-2 фамилији гена. Ди-спептид је инхибитор хистон деацетилазе који смањује експресију bcl-2, bcl-xL и mcl-1 гена у ћелијама код мултиплог мијелома<sup>23</sup>. Флавопиридол, инхибитор циклин зависних киназа, редукује ниво Mcl-1 протеина у ћелијама карцинома плућа<sup>23</sup>. Многи агенси који се користе у терапији канцера повећавају експресију или активирају тзв. "рецепторе смрти"<sup>24</sup>, као што је случај са TRAIL рецептором код глиома<sup>25</sup> или карцинома колоне<sup>26</sup>.

Терапија усмерена на каспазе и њихове директне и индиректне инхибиторе као што су Аraf 1 и FADD се показала успешном на животињским моделима и на линијама туморских ћелија. Различити приступи укључују фузионе протеине који садрже ефектор-

apoptotic pathway induced by this transcriptional factor. When other signals inactivate these anti-apoptotic factors, Myc induces cell death.

Protein Rb has an important role both in the progression of the cell cycle and in the inhibition of apoptotic process, because it represents a target protein for caspase activity. Active participation in apoptosis have complexes A/Cdk2, Cdc2, cyclin D, as well as CDIs. Though Cdkс don't belong to the apoptotic machinery, they activate few signal pathways that lead cell to programmed cell death.

### **THE IMPORTANCE OF APOPTOSIS AND CELL CYCLE IN DEVELOPMENT OF NEW THERAPEUTIC APPROACHES**

Mutations or inactivation of genes participating in the regulation of apoptosis lead to uncontrolled cell division and formation of tumors. These genes and their protein products are the target molecules in cancer therapy.

Tumor-suppressor gene p53 is inactivated in many tumors. Mutations in this gene lead to poor cell response to the applied therapy. Gene therapy, during which there is transfer of this gene by viral vectors, has been explored since 1996<sup>21</sup>. Preclinical trials showed that expressed p53 gene leads to regression of tumors and improved survival in animals without any side effects in surrounding tissue. Combined with radio- and/or chemotherapy there was an increase in number of apoptotic cells in malignant tissue in lung, prostate and head and neck tumors. Several types of drugs regulate expression of genes belonging to the Bcl2 gene family. Di-peptide is an inhibitor of histone deacetylase, which decreases the expression of bcl-2, bcl-xL, mcl-1 genes in the multiple myeloma cells. Flavopiridol, inhibitor of cyclin-dependent kinases, reduces the level of Mcl-1 protein in the lung carcinoma cells<sup>23</sup>. Many agents that are being used in cancer therapy are enhancing the expression or activating so called "death receptors"<sup>24</sup> as is the case with the TRAIL receptor in glioma<sup>25</sup> or colon carcinoma<sup>26</sup>.

The treatment directed to caspases and their direct and indirect inhibitors such as Apaf-1 and FADD was proven to be successful in animal models and tumor cell lines. Different approaches involve fusion proteins that contain effector caspases as well as small molecules, which di-

ске каспазе као и мале молекуле који директно активирају прокаспазу-3<sup>27</sup>. Терапија у блиској будућности вероватно ће представљати комбинацију конвенционалне терапије и стимулатора апоптозе.

Међу лековима који модулишу ћелијски циклус најзначајнији су директни инхибитори циклин зависних киназа (CDIs). Њихов механизам деловања је компетитивна инхибиција АТР везујућег места на ензиму. Једно од првих синтетисаних једињења је Оломуцин који инхибира комплекс Cdk1-циклин В<sup>28</sup>. Росковитин (10 пута потентнији инхибитор ћелијске пролиферације од оломуцина) и флавопиридол тренутно се налазе у фази клиничких испитивања<sup>29,30</sup>.

## ЗАКЉУЧАК

Узајамно дејство између апоптотских фактора и регулатора ћелијског циклуса одређује судбину ћелије у вишећелијском организму. Преживљавање целог организма такође зависи од баланса између ова два процеса. Поремећаји у регулацији ових процеса доводе до настанка многих болести, укључујући и канцер. С друге стране, управо су молекули који учествују у регулацији ових процеса циљна места за деловање антитуморских агенаса. Због свега тога, разумевање везе између апоптозе и ћелијског циклуса је од изузетне важности у проналажењу нових терапијских стратегија у борби против канцера.

## ЗАХВАЛНИЦА

Овај рад је урађен у оквиру III пројекта (бр. 41010) који је финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

## ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

1. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis and necrosis. *Toxicol Pathology* 1997; 25(1): 82-8.
2. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanism and relevance to disease. *Am J Med* 1999;107:489-506.
3. Ristić-Fira A, Petrović I, Todorović D, et al. Inactivation of HTB63 human melanoma cells by irradiation with protons and gamma rays. *Oncology Rep* 2004;12:1323-8.
4. Paidassi H, Tecnet-Delorme P, Arlaud GJ, Frachet P. How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. *Crit Rev Immunol* 2009; 29: 111-30.
5. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231-41.
6. Finnberg N, El-Deirz WS. TRAIL death receptors as tumor suppressors and drug targets. *Cell Cycle* 2008; 7(11): 1525-28.
7. Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* 2004; 9: 691-704.
8. Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008; 40(4): 278-88.
9. Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* 2010;9(6):417-22.

rectly activate procaspase-3<sup>27</sup>. Therapy in the near future will probably represent a combination of conventional therapy and apoptotic stimulators. Among the drugs that modulate the cell cycle, the most significant are direct inhibitors of cyclin dependent kinases (CDIs). Their mechanism of action is competitive inhibition of ATP binding site on the enzyme. One of the first synthesized compounds is olomoucine, which inhibits Cdk1 – cyclin B complex. Roscovitine (ten times more potent inhibitor of cell proliferation than olomoucine) and flavopiridol are currently in clinical trials<sup>29,30</sup>.

## CONCLUSION

Interactions of apoptotic factors and regulators of the cell cycle determine the fate of the cell in a multicellular organism. Survival of the whole organism also depends on the balance between these two processes. Disorders in regulation of these processes lead to the development of many diseases, including cancer. On the other side, exactly those molecules involved in the regulation of these processes are target spots for the action of anticancer agents. Consequently, comprehension of the relation between the apoptosis and the cell cycle is crucial in finding new therapeutic strategies for the fight against cancer.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was written within the III project (No. 41010), funded by the Ministry of Education, Science and Technological development.

10. Willis SN, Adams JM, Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(6): 617-25.
11. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med* 2010;9(45):145-52.
12. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-mediated apoptosis and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000;102:849-62.
13. Nieminen AI, Partanen JI, Klefstorm J. c-Myc blaying a trail of death. *Cell Cycle* 2007; 6(20): 2464-72.
14. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *Journal of Cell Science* 2012; 125: 4703-11.
15. Hindley C, Philpott A. The cell cycle and pluripotency. *Biochem J* 2013; 451: 135-43.
16. PietenpolJA., StewartZA. Cellcyclecheckpointsignaling: cellcyclearrestversusapoptosis. *Toxicology* 2002; 181-182: 475-81.
17. Langerak P, Russell P. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Phil Trans R Soc B* 2011; 366: 3562-71.
18. Porter LA, Donoghue DJ. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog. Cell Cycle Res* 2003; 5:335-47.
19. Leena Sankari S, Masthan KMK, Aravindha Babu N, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer - an update. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012; 13: 4873-78.
20. Ohnishi T. The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia. *J Cancer Res Ther* 2005;1(3):147-50.
21. Parker LP, Wolf JK, Price JE. Adenoviral-mediated gene therapy with Ad5CMVp53 and Ad5CMVp21 in combination with standard therapies in human breast cancer cell lines. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:395-405.
22. Nemunaitis J, Nemunaitis J. Head and neck cancer: response to p53-based therapeutics. *Head Neck* 2011; 33(1):131-4.
23. Rosato RR, Almenara JA, Kolla SS, et al. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Dent%20P%22%5BAuthor%5D> Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileucemic interaction. *Molecular Cancer Therapy* 2007; 6: 692-702.
24. Elrod H, Su SY. Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2): 163-73.
25. Kuijlen JM, Bremer E, Mooij JJ, den Dunnen WF, Helfrich W. Review: on TRAIL for malignant glioma therapy? *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010; 36(3): 168-82.
26. Zhang C, Wu R, Zhu H, et al. Enhanced anti-tumor activity by the combination of TRAIL/Apo-2L and combretastatin A-4 against human colon cancer cells via induction of apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2011; 302(1): 11-9.
27. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities *Exp Oncol* 2004;26(2):82-97.
28. Veselý J, Havlicek L, Strnad M, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues *Eur J Biochem* 1994;224(2):771-86.
29. Pumfery A, de la Fuente C, Berro R, Nekhai S, Kashanchi F, Chao SH. Potential use of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors as anti-HIV therapeutics. *Curr Pharm Des* 2006;12(16):1949-61.
30. Senderowicz AM. Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia* 2001;15(1):1-9.