

KOMÓRKOWY SZLAK SYGNALIZACYJNY ZALEŻNY OD JĄDROWEGO CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO NF- κ B I JEGO ZABURZENIA W WYBRANYCH CHOROBAH NOWOTWOROWYCH

NF- κ B-DEPENDENT CELLULAR SIGNALING PATHWAY AND ITS DISRUPTIONS IN SELECTED CANCERS

Ewelina WIŚNIK, Maria KOTER-MICHALAK

Katedra Biofizyki Skazań Środowiska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Łódzki

Streszczenie: Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B należy do rodziny białek NF- κ B, w której obecne są białka zaangażowane m.in. w proces regulacji transkrypcji wielu ważnych genów. Dotychczas zidentyfikowano u ssaków pięć czynników transkrypcyjnych: p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB i c-Rel. Czynnik transkrypcyjny NF- κ B występuje w cytoplazmie większości komórek, w postaci nieaktywnego dimeru utworzonego z białek p50/p65 połączonego z inhibitorami κ B (I κ B). W odpowiedzi na różnorodne bodźce prozapalne nieaktywny dimer p50/p65 ulega aktywacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie reguluje transkrypcję docelowych genów. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B kontroluje ekspresję genów, których produkty białkowe regulują szereg ważnych procesów komórkowych, takich jak: proliferacja i wzrost komórek, apoptoza, czy też reakcje immunologiczne i odpowiedź komórki na stres wywołany różnymi czynnikami. Wyodrębniono trzy główne ścieżki aktywacji białka NF- κ B, których zaburzenia przyczyniają się do rozwoju wielu chorób nowotworowych zarówno guzów litych, jak i nowotworów hematologicznych. Defekty występujące w szlakach aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B odgrywają zasadniczą rolę w nieprawidłowej regulacji metabolizmu komórkowego, reorganizacji cytoskieletu, jak również sprzyjają podziałom komórkowym i rozwojowi guza oraz przerzutowaniu komórek nowotworowych. Ponadto, nieprawidłowa aktywacja NF- κ B leży u podstaw wielu chorób o podłożu immunologicznym czy autoimmunologicznym. Przedmiotem niniejszej pracy jest próba przedstawienia aktualnego stanu wiedzy na temat komórkowego szlaku sygnalizacyjnego prowadzącego do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, a także przyczyny i konsekwencje jego zaburzenia.

Słowa kluczowe: NF- κ B, drogi aktywacji NF- κ B, nowotwór, inhibitory NF- κ B

Summary: Nuclear transcription factor κ B belongs to the NF- κ B protein family, comprising proteins involved, among others, in the transcriptional regulation of many important genes. Five members of this transcription factor family have been identified in mammals so far, designated as p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB and c-Rel. NF- κ B is located in the cytoplasm of the most cells as a dimer composed of p50/p65 proteins, which is inactive in the cytoplasm due to its interaction with κ B inhibitors (I κ B). In response to various inflammatory stimuli, inactive dimer of p50/p65 undergoes activation and translocation into the nucleus, where it regulates transcription of target genes. NF- κ B controls genes expression which proteins regulate many important cellular processes such as cell growth and proliferation, apoptosis or immune reactions and cell response to stress caused by various factors. Many hematological malignancies and solid tumors arise as a consequence of defects of three main NF- κ B activation pathways. Above defects play a major role in the abnormal regulation of cellular metabolism, cytoskeleton reorganization, and promote cell division and tumor growth and metastasis of tumor cells. Furthermore, the abnormal activation of NF- κ B underlies many immune or autoimmune diseases. The aim of this paper is to provide an overview of existing knowledge of the causes and consequences of NF- κ B-dependent cellular signaling pathway disruptions.

Key words: NF- κ B, signaling pathways to NF- κ B, tumor, NF- κ B inhibitors

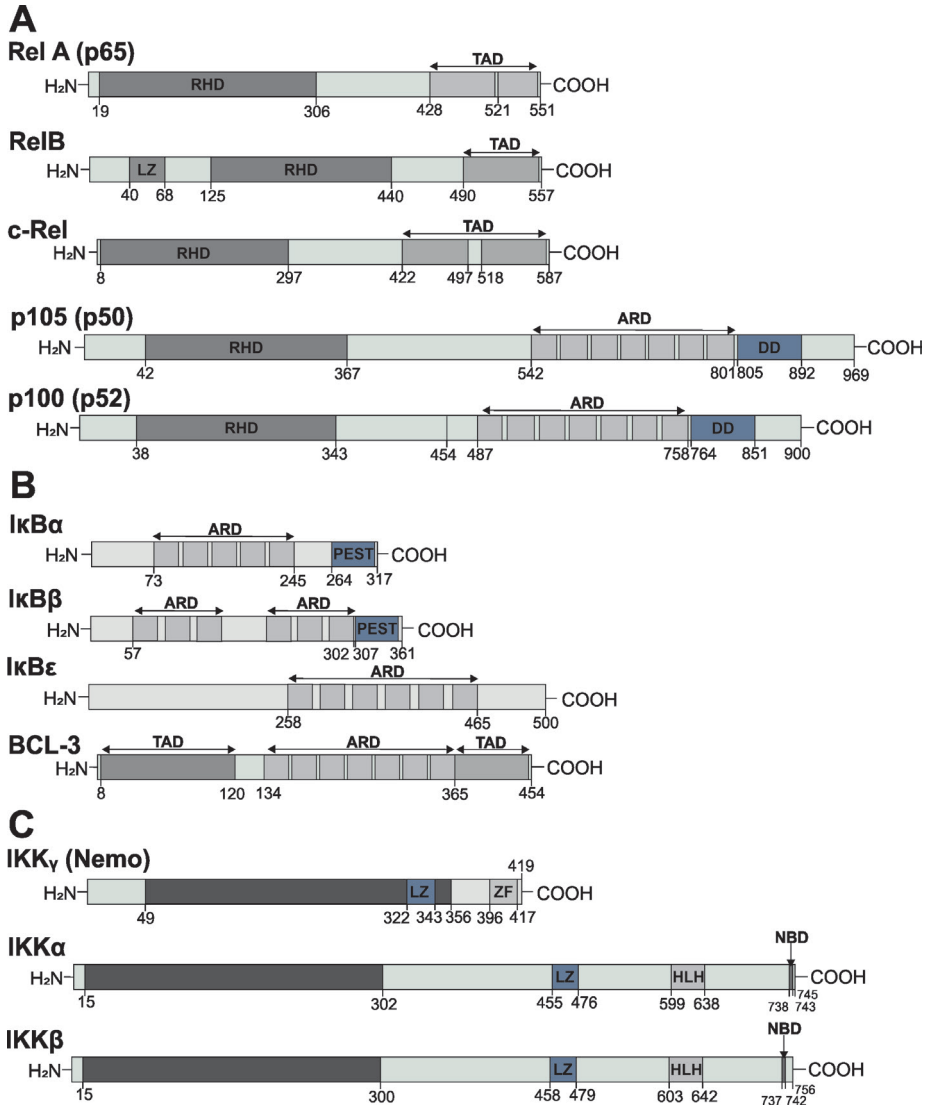
WSTĘP

Mimo wielu badań i znajomości molekularnych podstaw procesów chorobowych, leczenie szeregu chorób nowotworowych nie przynosi do tej pory zadowalających efektów. Coraz większa liczba doniesień naukowych wskazuje, że zahamowanie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. *Nuclear Factor- κ B*), będącego regulatorem ekspresji wielu ważnych genów, powinno być rozważane jako potencjalne działanie terapeutyczne [39]. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, zastał po raz pierwszy opisany w 1986 roku przez badaczy Sen i Baltimore [30]. Dotychczas odkryto u ssaków pięć czynników transkrypcyjnych: p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB i c-Rel, zróżnicowanych nie tylko pod względem budowy, ale i funkcji. Dane naukowe wyróżniają trzy szlaki (klasyczny, alternatywny i atypowy) aktywowania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [27]. Klasyczny szlak NF- κ B, ulega aktywacji w odpowiedzi na wniknięcie obcych dla organizmu czynników i kontrolują ekspresję wielu mediatorów prozapalnych m.in. cytokin i chemokin, działających jako białka sygnalizacyjne, mobilizujące inne komórki układu immunologicznego. Zarówno poziom ekspresji, jak i aktywność czynnika transkrypcyjnego NF- κ B jest ściśle regulowana przez układ ujemnych i dodatnich sprzężeń zwrotnych. Natomiast zaburzenia przekazywania sygnału na szlaku NF- κ B oraz jego konstytutywna aktywacja jest jedną z przyczyn progresji transformacji nowotworowej [8].

BIAŁKA Z RODZINY NF- κ B, INHIBITORY NF- κ B ORAZ KINAZY INHIBITORÓW I κ B – BUDOWA I FUNKCJE

Białka z rodziny NF- κ B, takie jak p65, RelB i c-Rel charakteryzują się obecnością na C-końcu sekwencji TAD (ang. *Transcription Activation Domain*), dzięki której mogą aktywować transkrypcję. Natomiast białka p50 i p52 nie mają domeny TAD i funkcjonują jako represory transkrypcji [7]. Z kolei białka prekursorowe p105 i p100 zawierają na C-końcu domenę ARD (ang. *Ankyrin Repeat Domain*) (ryc. 1A) [21]. Białka NF- κ B tworzą homo- lub heterodimery, natomiast tylko heterodimery funkcjonują jako czynniki transkrypcyjne. Aktywność tych kompleksów jest ściśle regulowana przez ich związanie z inhibitorami z rodziny białek inhibitorowych I κ B. W warunkach fizjologicznych czynnik transkrypcyjny NF- κ B występuje w cytoplazmie w postaci nieaktywnego kompleksu z I κ B [19]. Białka z rodziny NF- κ B zawierają na N-końcowym odcinku łańcucha polipeptydowego domenę RHD (ang. *Relhomology Domain*), w obrębie której znajduje się sekwencja NLS, która odpowiada za translokację NF- κ B z cytoplazmy do jądra komórkowego. Domena RHD odgrywa ważną rolę w dimeryzacji i łączeniu białek NF- κ B z odpowiednią sekwencją DNA oraz uczestniczy w interakcjach NF- κ B z inhibitorami I κ B [20]. Inhibitory NF- κ B możemy podzielić na: klasyczne inhibitory I κ B, takie jak I κ B α , I κ B β i I κ B ϵ , które wiążą się z przynajmniej jedną z podjednostek dimeru NF- κ B, tj. podjednostką p65 lub c-Rel, oraz nieklasyczne inhibitory I κ B, takie jak I κ B ζ , Bcl-3 i I κ B, które są zdolne do wiązania się ze wszystkimi podjednostkami NF- κ B. Białka Bcl-3 i I κ B ζ ze względu na obecność domeny TAD zaliczane są do aktywatorów transkrypcji [19, 27].

Przyłączony do dimeru NF- κ B inhibitor z rodziny I κ B maskuje sekwencję NLS, uniemożliwiając translokację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B do jądra komórkowego. Wszystkie białka inhibitorowe rodziny I κ B zawierają centralnie położoną domenę ARD, odpowiedzialną za oddziaływanie z NF- κ B. Każdy inhibitor I κ B ma swoje preferowane białko NF- κ B, z którym się wiąże [21]. Ponadto, białka I κ B α i I κ B β na C-końcu zawierają domenę PEST (ang. *Proline-glutamic acid-Serine-Threonine*), odpowiedzialną za zlokalizowanie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w cytoplazmie (ryc. 1B) [28]. W aktywacji NF- κ B bierze udział kompleks kinaz serynowo-treoninowych IKK (ang. *Inhibitor of nuclear factor- κ B Kinase*), odpowiadającym za fosforylację I κ B. Kompleks IKK występuje w postaci homo- (α/α lub β/β) lub heterodimeru (α/β) połączonego z białkiem regulatorowym IKK γ , określanym w literaturze także jako Nemo (ang. *NF- κ B essential modulator*) (ryc. 1C) [16, 27].



RYCINA 1. Struktura (A) białek z rodziny NF-κB, (B) białek inhibitorowych IκB oraz (C) trzech najważniejszych kinaz kompleksu IKK. Zaznaczono następujące domeny i motywy: ARD – domena zawierająca powtórzenia ankirowane; DD – domena śmierci; HLH – motyw helisa-pętla-helisa; LZ – motyw palca cynkowego; PEST – domena bogata w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę; NBD – domena umożliwiającą kontakt kinaz z jednostką regulatorową; RHD – domena charakterystyczna dla białek z rodziny NF-κB; TAD – domenę aktywacji transkrypcji

FIGURE 1. Structure of (A) NF-κB proteins, (B) the IκB family of proteins (inhibitors of NF-κB) and (C) the three most important members of IκB kinase (IKK) complex. Motifs and structural domains are indicated as follow: ARD – ankyrin repeat domain, DD – death domain, HLH – helix-loop-helix, LZ – leucine zipper like motif, PEST – proline-glutamic acid-serine-threonine, NBD – NEMO binding domain, RHD – relhomology domain, TAD – transcription activation domain

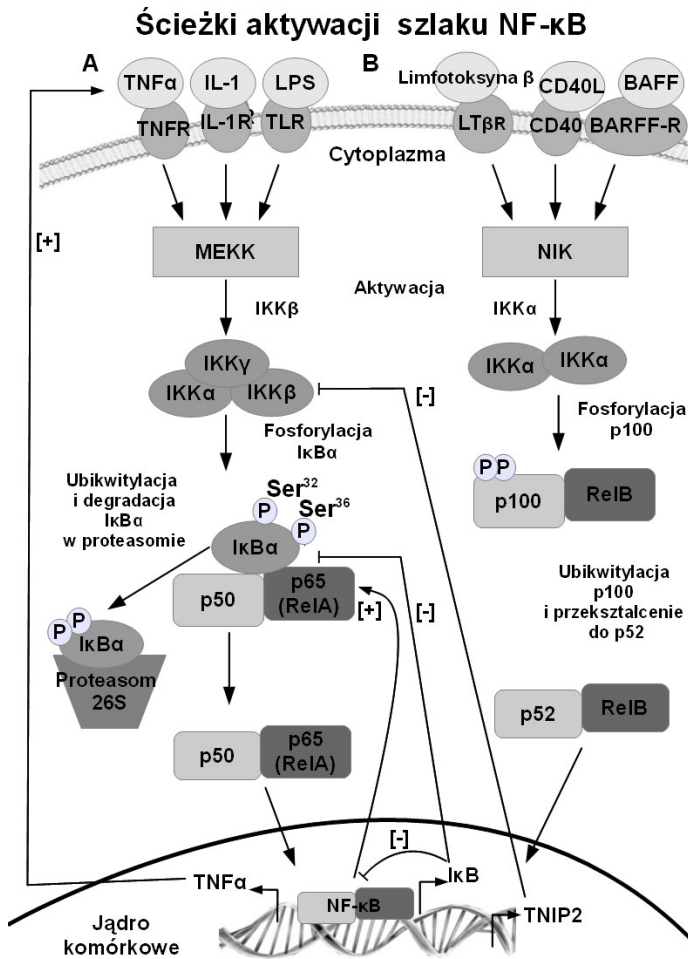
ŚCIEŻKI AKTYWACJI NF-κB

KLASYCZNA DROGA AKTYWACJI SZLAKU NF-κB

Klasyczny szlak NF-κB ulega aktywacji w wyniku oddziaływania ligandów, takich jak: czynnik martwicy nowotworu TNFα (ang. *Tumor Necrosis Factor α*), interleukina-1 – IL1 oraz lipopolisacharyd – LPS z ich błonowymi receptorami [25, 29]. Efektem tych oddziaływań jest aktywacja kinaz indukujących klasyczną ścieżkę aktywacji NF-κB. Do takich inicjatorowych kinaz można zaliczyć kinazy z rodziny MAPKK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*): MEKK (ang. *mitogen activated protein kinase/ERK Kinase Kinase 1*), Akt/PKB (v-akt [*Ak strain transformation*] *murine thymoma viral oncogene homolog/Protein Kinase B*) i MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*). Inicjatorowe kinazy aktywują kompleks kinaz IKK, które z udziałem podjednostki regulatorowej Nemo fosforylują dwie reszty seryny w domenie ARD białek inhibitorowych IκB. Kinazy IKKβ i IKKγ katalizują fosforylację reszt: Ser³² i Ser³⁶ w łańcuchu IκBα, Ser¹⁹ i Ser²³ w IκBβ lub Ser¹⁵⁷ i Ser¹⁶¹ w IκBε [21, 22, 28]. Efektem fosforylacji białek inhibitorowych jest ich degradacja na drodze ubiquitynacji i proteolitycznego rozkładu przez proteasom 26S. Wskutek odłączenia białka inhibitorowego IκB od NF-κB dochodzi do odsłonięcia sekwencji NLS białka NF-κB, co umożliwia jego translokację do jądra komórkowego, gdzie działając jako czynnik transkrypcyjny, reguluje transkrypcję licznych genów docelowych kodujących prozapalne cytokiny, chemokiny, cząsteczki adhezji komórkowej oraz enzymy produkujące czynniki prozapalne, takie jak tlenek azotu czy prostaglandyny [16, 27, 35, 38]. Heterodimer p50/p65 rozpoznaje różnice w sekwencjach DNA przez zmianę położenia domeny RHD i N-końca cząsteczki oraz interakcje ze szkieletem DNA. Następnie łączy się ze swoistą sekwencją w cząsteczce DNA 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' i aktywuje transkrypcję genów docelowych (ryc. 2A) [4, 33].

ALTERNATYWA DROGA AKTYWACJI SZLAKU NF-κB

Alternatywna ścieżka przekazywania sygnału na szlaku NF-κB aktywowana jest w wyniku działania bodźców, takich jak limfotoksyna-β, białko LMP1 (ang. *Latent Membrane Protein 1*), czynnik BAFF aktywujący limfocyty B (ang. *B cell-activating factor belonging to the TNF family*) oraz antygen CD40 (CD40L) [26, 32]. W wyniku połączenia ligandu z jego receptorem dochodzi do aktywacji kinazy NIK (ang. *NFκB Inducing Kinase*), która następnie fosforyluje i aktywuje kinazę IKKα. Z kolei kinaza IKKα fosforyluje nieaktywne białko p100 związane z RelB. Ufosforylowane białko p100 ulega ubiquitynacji, a następnie C-koniec białka p100, ulega degradacji. W wyniku częściowej proteolizy powstaje białko p52. Aktywny dimer białka p52 z białkiem RelB jest transportowany do jądra komórkowego (ryc. 2B) [27, 33].



RYCINA 2. (A) Klasyczna i (B) alternatywna droga aktywacji szlaku NF- κ B
FIGURE 2. (A) The classical and (B) alternative NF- κ B signaling pathway

ATYPOWA DROGA AKTYWACJI SZLAKU NF- κ B

Heterodimery NF- κ B mogą być aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, niezależnie od kompleksu kinaz IKK oraz połączenia ligandu z receptorem. Uszkodzenia DNA spowodowane promieniowaniem jonizującym czy hipoksją powodują fosforylację białka inhibitorowego I κ B w obecności kinazy p38, która aktywuje kinazę kazeiny. Natomiast fosforylacja zachodzi w obrębie C-końca białka I κ B, a nie N-końca jak w przypadku klasycznej aktywacji szlaku NF- κ B

[27, 33]. Ponadto, O'Connor i wsp. [24] opisali atypowy mechanizm aktywacji szlaku NF- κ B niewymagający degradacji inhibitora κ B w proteasomie. Wówczas białka PIR (ang. *Proteasome Inhibitor-Resistant*), których aktywność jest zależna od kompleksu kinaz IKK biorą udział w degradacji białka inhibitorowego I κ B α , a nie I κ B β , następnie powstają dimery p50/c-Rel, wykazujące konstytutywną aktywność w limfocytach B [27].

Zarówno klasyczna, jak i alternatywna droga aktywacji NF- κ B jest regulowana przez układ ujemnych i dodatnich sprzężeń zwrotnych. W tej wewnątrzkomórkowej pętli regulatorowej niejednokrotnie uczestniczą białka kodowane przez docelowe geny aktywowane przez czynnik NF- κ B. Inhibitorowe białko I κ B α , kodowane przez gen, którego aktywność jest regulowana przez NF- κ B, odgrywa ważną rolę w pętli sprzężenia zwrotnego ujemnego. W wyniku aktywacji NF- κ B dochodzi do ekspresji I κ B α i jego nagromadzenia w komórce w ciągu kilkunastu minut, a następnie związania się z obecnym w jądrze komórkowym czynnikiem NF- κ B. Inhibitor I κ B α powoduje translokację NF- κ B z jądra do cytoplazmy i jego inaktywację [5, 33]. Druga wewnątrzkomórkowa pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego obejmuje białko TNIP2 (ang. *TNF Interacting Protein 2*), które bezpośrednio hamuje aktywację kinazy IKK. Natomiast dodatnie zewnątrzkomórkowe sprzężenia zwrotne obejmują białka, takie jak TNF α , IL-1 β , IL-6 i IL-8 (ryc. 2). Ekspresja tych białek również jest kontrolowana przez NF- κ B. Białka te po uwolnieniu do przestrzeni pozakomórkowej wzmacniają pierwotny sygnał prozapalny na drodze klasycznej aktywacji sygnału szlakiem NF- κ B [33, 35].

ZABURZENIA PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU NA SZLAKU NF- κ B W CHOROBYCH NOWOTWOROWYCH

Szereg typów komórek nowotworowych nabywa zdolność konstytutywnej aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, prowadząc do rozwoju transformacji nowotworowej oraz oporności komórek nowotworowych na terapie przeciwnowotworowe [33]. Różnorodne mechanizmy aktywacji szlaku NF- κ B i jego sprzężenie z wieloma innymi szlakami sygnalizacji komórkowej, mogą być przyczyną jego stałej lub nadmiernej aktywacji w chorobach nowotworowych [8]. W nowotworach limfoidalnych, mutacje genów kodujących białka szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B, występują częściej niż w guzach litych. W przewlekłej białaczce limfocytarnej CLL (ang. *Chronic Lymphocytic Leukemia*) czynnik transkrypcyjny NF- κ B wykazuje większą aktywność w limfocytach typu B, w porównaniu z limfocytami ludzi nie chorujących na CLL. Z ryzykiem zachorowania na szpiczaka mnogiego czy przewlekłą białaczkę limfocytarną koreluje obecność chromosomalnych rearanżacji genu kodującego białko p52 (NF- κ B2), które uczestniczą w zniesieniu właściwości proapoptycznych tego białka, czego efektem jest zahamowa-

nie apoptozy komórek białaczkowych. Amplifikacje genu kodującego białko p52 (NF- κ B2) zaobserwowano również w nowotworach głowy i szyi oraz w raku gruczołu piersiowego [31]. Z kolei badania dotyczące amplifikacji genu kodującego białko c-Rel potwierdzają jego wpływ na proces transformacji nowotworowej [8].

Nadekspresja genu kodującego białko c-Rel koreluje z ryzykiem zachorowania zarówno na nowotwory hematologiczne, jak i guzy lite np. niedrobnokomórkowy rak płuc [31]. Zróżnicowaną ekspresję czynnika transkrypcyjnego NF- κ B obserwuje się również w raku wątrobowokomórkowym, raku jelita grubego czy raku piersi [8].

Współczesne dane naukowe wskazują na zróżnicowaną ekspresję czynnika NF- κ B w komórkach nowotworowych raka prostaty PC (ang. *Prostate Cancer*) w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Zaobserwowano podwyższoną ekspresję NF- κ B zarówno na poziomie mRNA, jak i białka w androgenoniezależnym raku prostaty. W efekcie działania czynników indukujących kinazy NIK i IKK dochodzi do konstytutywnej aktywacji NF- κ B, która prowadzi do nadekspresji interleukiny 6 (IL-6), obserwowanej m.in. w komórkach linii komórkowej androgenoniezależnego raka prostaty [4]. W PC występują również nieliczne mutacje genów kodujących białka szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B. Nadekspresja IKK β w raku prostaty jest spowodowana fuzją genów *IKK2* (kodującego IKK β) i *TNPO1* (ang. *transportin1*) kodującego importynę β 2. Akumulacja kinazy IKK α w jądrze komórkowym wykazuje związek z progresją i klinicznym stopniem zaawansowania raka prostaty. Natomiast mechanizm, dzięki któremu IKK α przyczynia się do rozwoju raka prostaty, do tej pory nie został wyjaśniony. Badania przeprowadzone przez Dan i wsp. wskazują, że IKK α zwiększa potencjał przerzutowy na drodze hamowania transkrypcji genu kodującego białko maspinę, mającego zdolność hamowania wzrostu guza nowotworowego [5, 11]. Obecność kinazy IKK β w jądrze komórkowym, prowadzi do ekspresji zależnych od NF- κ B cytokin, czego efektem jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT3 (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) i translokacja do jądra komórkowego w pozostałych komórkach PC aktywnego IKK α . STAT3 i IKK α odgrywają istotną rolę w promocji i proliferacji androgenoniezależnych komórek PC, co prowadzi do rozwoju androgenoniezależnego raka prostaty. Nieufosforylowana postać STAT3 wiąże się do kompleksu NF- κ B, ułatwiając niezależną od IKK aktywację NF- κ B, wydłużając obecność dimeru NF- κ B w jądrze komórkowym, co prowadzi do jego ciągłej aktywacji w komórkach nowotworowych [11]. Istniejące dane literaturowe sugerują, że kinaza Akt, znana również jako kinaza białkowa B, może promować aktywację NF- κ B, w komórkach stymulowanych płytkopochodnym czynnikiem wzrostu PDGF (ang. *Platelet Derived Growth Factor*). Wówczas Akt poprzez połączenie z kinazą IKK prowadzi do jej aktywacji, czego efektem jest fosforylacja inhibitora z rodziny I κ B. Następnie dochodzi do degradacji tego inhibitora i uwolnienia aktywnego dimeru p50/65. Ponadto wykazano, że podwyższona aktywność kinazy Akt w ludzkich liniach komórek raka prostaty PC3 (ang. *Prostate Cancer 3 cell line*) i LNCaP (ang. *Prostate Carcinoma cell Line*) stymuluje

oddziaływanie między kinazą IKK α i kompleksem mTORC1, kontrolując aktywność kinazy mTOR, która bierze udział w szlaku sygnalizacyjnym PI3K/Akt/mTOR [1, 5].

Szlaki sygnalizacyjne, takie jak NF- κ B oraz Wnt/ β -katenina są zaangażowane w proces transformacji nowotworowej jajników, sutka oraz trzonu i szyjki macicy. Konstytutywna aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- κ B prowadzi do wzmożonej progresji raka jajnika. Badania prowadzone przez Hu i wsp. na ludzkiej linii komórkowej raka jajnika wykazały, że zwiększona aktywność szlaku NF- κ B jest związana z podwyższoną ekspresją białka MARCH7 (ang. *Membrane-Associated RING-CH*), zaangażowanego m.in. w proliferację limfocytów T i rozwój komórek neuronalnych. Z kolei obniżenie ekspresji białka MARCH7 skutkuje zahamowaniem translokacji NF- κ B do jądra komórkowego i zmniejszeniem jego aktywności, co koreluje z upośledzoną zdolnością komórek nowotworowych do migracji, inwazji i tworzenia przerzutów [9]. Ponadto, ekspresja cytokin prozapalnych, takich jak TNF α (ang. *Tumor Necrosisfactor α*) czy IL1 β (ang. *Interleukin 1 β*) jest kontrolowana przez klasyczny szlak NF- κ B. Wykazano korelację między ekspresją TNF α i IL1 β , a progresją raka jajnika oraz związek pomiędzy nadekspresją TNF α , a zwiększoną przeżywalnością i proliferacją komórek raka prostaty, angiogenezą, częstością przerzutów oraz zmianami w odpowiedzi na chemioterapię [4, 9].

NF- κ B ulega jednej z potranslacyjnych modyfikacji białek, jaką jest O-GlcNAcylocja, której zwiększony poziom zaobserwowano w komórkach nowotworowych. NF- κ B może być aktywowany przez O-GlcNAcylocję Ser733 w kinazie IKK β , prowadząc do aktywacji tego czynnika transkrypcyjnego oraz poprzez przyłączenie reszty O-GlcNAc do Thr322 i Thr352 podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. W badaniach przeprowadzonych przez Ma i wsp. na komórkach raka trzustki wykazano, że podstawienie Thr322 oraz Thr352 resztą alaniny wpływa na obniżenie zdolności komórek do wzrostu [17]. Z kolei Yang i wsp. dowodzą, że O-GlcNAcylocja Thr322 oraz Thr 352 podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B koreluje z rozwojem raka jelita grubego [36]. Podczas rozwoju nowotworów NF- κ B ulegając O-GlcNAcylocji, może wywierać pośredni wpływ na wzrost przerzutowania komórek nowotworowych poprzez jego wpływ na stabilizację czynnika transkrypcyjnego Snail1 (ang. *Snail family zincfinger 1*) będącego represorem transkrypcyjnym E-kadheryny [17].

Badania prowadzone przez Zhang i wsp. sugerują, że aktywacja NF- κ B może być zaburzona przez białko NIBP (ang. *NIK- and IKK2-Binding Protein*), odgrywające potencjalną rolę w proliferacji, progresji i migracji raka piersi i raka okrężnicy. Wyciszenie białka NIBP przy użyciu lentiwirusa zahamowało fosforylację białek inhibitorowych i uniemożliwiło translokację NF- κ B do jądra komórkowego, hamując ekspresję cytokin zależnych od NF- κ B. Brak aktywnego dimeru NF- κ B uwrażliwiło komórki na apoptozę, skutkując zmniejszeniem proliferacji i progresji komórek raka piersi linii MDA-MB-231 oraz komórek raka okrężnicy linii HCT116. Natomiast nadekspresja białka NIBP korelowała ze zwiększoną inwazyjnością raka [38].

Czynnik transkrypcyjny NF- κ B kontrolują również ekspresję genów kodujących białka z rodziny inhibitorów apoptozy IAP (ang. *Inhibitor of Apoptosis Protein*), których nadekspresję wykazano w raku piersi, raku jelita grubego, raku odbytu czy czerniaku. Badania prowadzone przez Lin i wsp. wykazały, że białka XIAP i cIAP1 należące do rodziny IAP wpływają na ekspresję białka beclin 1 indukującego proces autofagii. W większości przypadków, autofagia indukowana terapią w komórkach nowotworowych umożliwia im przeżycie, promując rozwój nowotworu i potencjalnie prowadząc do występowania oporności na leczenie. Wyciszenie ekspresji tych białek skutkowało zmniejszeniem oporności komórek należących do linii komórkowej chłoniaków na chemioterapię [15].

INHIBITORY SZLAKU NF- κ B

Degradacja białek odpowiadających za transdukcję sygnału, do których należy system ubikwityna-proteasom, odgrywa istotną rolę w procesie sygnalizacji komórkowej. Proteasomy poprzez utrzymanie homeostazy komórkowej uczestniczą w regulacji transkrypcji, cyklu komórkowego, czy onkogenezy. Badania kliniczne potwierdzają skuteczność inhibicji proteasomów zarówno w chemoprewencji nowotworów w połączeniu z konwencjonalnymi lekami, jak i z inhibitorami proteasomów należących do innych grup. Mechanizm działania inhibitorów proteasomów podczas przekazywania sygnału przez komórki nowotworowe na szlaku NF- κ B, polega na zablokowaniu degradacji proteosomalnej białka I κ B, co prowadzi do zahamowania aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, uniemożliwiając jego translokację do jądra komórkowego [14]. Dotychczas poznano wiele grup inhibitorów proteasomów do których należą m.in. aldehydy peptydowe, peptydowe pochodne kwasu boronowego, β -laktony, epoksyketony, syrbaktyny, peptydy cykliczne oraz inhibitory proteasomu pochodzenia naturalnego [18]. Bortezomib (VelcadeTM, PS-341), będący pochodną kwasu boronowego był pierwszym inhibitorem aktywności proteasomu dopuszczonym w 2013 roku przez Food and Drug Administration do terapii pacjentów ze szpiczakiem mnogim w stadium progresji [10, 12]. Bortezomib bezpośrednio wiąże się do rdzenia kompleksu proteasomowego 20S, czego efektem jest zahamowanie centrów aktywnych proteasomów. Badania kliniczne wykazały, że PS-341 hamuje proliferację komórek szpiczaka mnogiego opornych na leki cytotoksyczne w tym melfalan, dokсорubicynę, mitoksantron i deksametazon. Komórki szpiczaka mnogiego charakteryzują się przyleganiem do zrębu kostnego, co wywołuje wydzielanie mediatorów stanu zapalnego, które indukują proliferację tych komórek. Immunomodulujące działanie Bortezomibu pozwala na ograniczenie proliferacji komórek szpiczaka mnogiego poprzez zahamowanie ekspresji cytokin prozapalnych [14, 39]. Badania przeprowadzone przez Kilicciglu i wsp. na ludzkich liniach komórkowych raka prostaty PC3 i LNCaP, potwierdzają skuteczność

Bortezomibu w terapii skojarzonej z trochostatyną A w walce z rakiem prostaty [13]. Kolejnym inhibitorem proteasomu 20S jest syntetyczny peptyd MG-132, należący do grupy aldehydów peptydowych, których działanie opiera się na reakcji grupy aldehydowej z grupą hydroksylową reszty treoniny w miejscu aktywnym proteasomu [39]. MG-132 wykazuje toksyczne działanie na komórki raka prostaty niewrażliwe na TRAIL, skutecznie hamując ich proliferację. Dane naukowe dokumentują, że wymienione inhibitory proteasomów wykazują większą toksyczność w stosunku do komórek nowotworowych niż komórek prawidłowych. Inhibitory te, zwiększają wrażliwość komórek nowotworowych na chemioterapeutyki oraz zmniejszają zjawisko oporności wielolekowej [18].

Najnowsze doniesienia naukowe skupiają uwagę na zastosowaniu związków chemioprewencyjnych zmniejszających ryzyko wystąpienia nowotworu, poprzez regulację aktywności NF- κ B [2]. Badania na ludzkich liniach komórkowych androgenozależnego i androgenoniezależnego raka prostaty prowadzonych przez Guo i wsp. dowiodły, że kurkumina hamowała aktywację NF- κ B przez I κ B α oraz indukowała zatrzymanie cyklu komórkowego komórek androgenozależnego i androgenoniezależnego raka prostaty w fazie G2/M [6]. Natomiast w badaniach prowadzonych przez Chung i wsp. na komórkach raka sutka linii MDA-231 stwierdzono, że kurkumina w połączeniu z galusanem epigalokatechiny EGCG (ang. *Epigallocatechin Gallate*) wykazuje działanie przeciwnowotworowe, nasilając fosforylację białka STAT3 oraz inaktywując czynnik transkrypcyjny NF- κ B [3]. Z kolei badania prowadzone na ludzkiej linii komórkowej raka trzustki MIA PaCa-2 przez zespół Thakkar i wsp. wykazały pozytywny wpływ kurkuminy w terapii skojarzonej z aspiryną i sulforanem na zmniejszenie zdolności wiązania NF- κ B do DNA poprzez obecność I κ B α oraz zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych raka trzustki [34].

Badania prowadzone przez Neelgundmath i wsp. na linii komórkowej raka wątrobowokomórkowego zwracają uwagę na pochodną kumaryny CPP (ang. *7-carbethoxyamino-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methylpyrrolidine-1 carbodithioate*), jako doskonałego inhibitora szlaków prozapalnych zależnych od NF- κ B, ograniczającego migrację i inwazję komórek nowotworowych. Wykazano, że CPP hamuje aktywację NF- κ B wpływając tym samym na ekspresję genów zależnych od tego czynnika transkrypcyjnego, kodujących białka, takie jak: cyklina D1, Bcl-2, surwiwina, MMP12 and C-Myc [23].

PODSUMOWANIE

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B zaangażowany jest w regulację genów, kodujących czynniki prozapalne m.in. cytokiny, chemokiny, cząsteczki adhezyjne oraz wiele innych genów uczestniczących w ważnych procesach komórkowych.

W odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe lub wewnątrzkomórkowe bodźce może dochodzić do nieprawidłowej aktywacji szlaku NF- κ B i różnego rodzaju defektów, które w konsekwencji mogą przyczyniać się do inicjacji i/lub progresji procesu nowotworzenia. Dlatego też szlak NF- κ B stał się celem terapii mających na celu wyciszenie jego nadmiernej aktywacji, która leży u podstaw wielu chorób nowotworowych, ale także chorób o podłożu immunologicznym czy autoimmunologicznym. Identyfikacja genów ulegających ekspresji w odpowiedzi na działanie NF- κ B i związek z progresją różnych typów nowotworów stanowi ważny krok w kierunku lepszego zrozumienia molekularnych podstaw tego mechanizmu i terapii przeciwnowotworowych. Ponadto, dodatkowe badania nad mechanizmami kontrolującymi ekspresję czynników prozapalnych, może stać się podstawą do powstania nowych celów farmakologicznych.

LITERATURA

- [1] AHMAD A, BIERSACK B, LI Y, KONG D, BAO B, SCHOBERT R, PADHYE SB, SARKAR FH. Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B signaling by in dole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; **13**: 1002-1013.
- [2] CHEN J, WANG FL, CHEN WD. Modulation of apoptosis-related cell signaling pathways by curcumin as a strategy to inhibit tumor progression. *Mol Biol Rep* 2014; **41**: 4583-4594.
- [3] CHUNG SS, VADGAMA JV. Curcumin and epigallocatechin gallate inhibit the cancer stem cell phenotype via down-regulation of STAT3-NF κ B signaling. *Anticancer Res* 2015; **35**: 39-46.
- [4] DA SILVA HB, AMARAL EPOLASCO EL, DE VICTO NC, ATIQUÉ R, JANK CC, ANSCHAU V, ZERBINI LF, CORREA RG. Dissecting major signaling pathways throughout the development of prostate cancer. *Prostate cancer* 2013; **13**: 1-23.
- [5] DAN HC, COOPER MJ, COGSWELL PC, DUNCAN JA, TING JP, BALDWIN AS. Akt-dependent regulation of NF-(kappa)B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev* 2008; **22**: 1490-1500.
- [6] GUO H, XU YM, YE ZQ, YU JH, HU XY. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis of prostate cancer cells by regulating the expression of IkappaBalpha, c-Jun and androgen receptor. *Pharmazie* 2013; **68**: 431-434.
- [7] HAYDEN MSM, GHOSH SS. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012; **26**: 203-234.
- [8] HOESEL B, SCHMID JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013; **86**: 1-15.
- [9] HU J, MENG Y, YU T, HU L, MAO M. Ubiquitin E3 Ligase MARCH7 promotes ovarian tumor growth. *Oncotarget* 2015; [Epub ahead of print].
- [10] KANE RC, FARRELL AT, SRIDHARA R, PAZDUR R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 2955-2960.
- [11] KARIN M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **5**: 1-14.
- [12] KARTHIK S, SANKAR R, VARUNKUMAR K, ANUSHA C, RAVIKUMAR V. Blocking NF- κ B sensitizes non-small cell lung cancer cells to histone deacetylase inhibitor induced extrinsic apoptosis through generation of reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother* 2015; **69**: 337-344.
- [13] KILICCIOGLU I, KONAC E, VAROL N, GUROCAK S, YUCEL BILEN C. Apoptotic effects of proteasome and histone deacetylase inhibitors in prostate cancer cell lines. *Genet Mol Res* 2014; **13**: 3721-3731.

- [14] KIM HJ, HAWKE N, BALDWIN AS. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 738-747.
- [15] LIN F, GHISLAT G, LUO S, RENNA M, SIDDIQI F, RUBINSZTEIN DC. XIAP and cIAP1 amplifications induce Beclin 1-dependent autophagy through NFkB activation. *Hum Mol Genet* 2015; **24**: 2899-2913.
- [16] LIN TH, TAMAKI Y, PAJARINEN J, WATERS HA, WOO DK, YAO Z, GOODMAN SB. Chronic inflammation in biomaterial-induced periprosthetic osteolysis: NF-kB as a therapeutic target. *Acta Biomater* 2014; **10**: 1-10.
- [17] MA Z, VOCADLO DJ, VOSSELLER K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-kB activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2013; **288**: 15121-15130.
- [18] MALIŃSKI M, CICHOCKI M. Inhibicja aktywności proteasomu jako nowa strategia w terapii i chemioprewencji nowotworów. *Post Hig Med Dosw* 2013; **67**:90-106.
- [19] MARIENFELD R. RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem* 2003; **278**: 19852-19860.
- [20] MAY MJ, GHOSH S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 1997; **8**: 63-73.
- [21] NAKAJIMA S, KITAMURA M. Bidirectional regulation of NF-kB by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radic Biol Med* 2013; **65**: 162-174.
- [22] NAPETSCHNIG J, WU H. Molecular basis of NF-kB signaling. *Annu Rev Biophys* 2013; **42**: 443-468.
- [23] NEELGUNDMATH M, DINESH KR, MOHAN CD, LI F, DAI X, SIVEEN KS, PARICHARAK S, MASON DJ, FUCHS JE, SETHI G, BENDER A, RANGAPPA KS, KOTRESH O, BASAPP A. Novel synthetic coumarins that targets NF-kB in Hepatocellular carcinoma. *Bioorg Med Chem Lett* 2015; **25**: 893-897.
- [24] O'CONNOR S, SHUMWAY SD, AMANNA IJ, HAYES CE, MIYAMOTO S. Regulation of constitutive p50/c-Rel activity via proteasome inhibitor-resistant Ikb α degradation in B cells. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 4895-4908.
- [25] PERKINS ND, GILMORE TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 2006; **13**:759-772.
- [26] PERKINS ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 49-62.
- [27] PIOTROWSKA A, IZYKOWSKA I, PODHORSKA-OKOŁÓW M, ZABEL M, DZIEGIEL P. Budowa białek z rodziny NF-kB i ich rola w procesie apoptozy. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; **62**: 64-74.
- [28] RUTKOWSKI R, PANCEWICZ SA, SKRZYLEWSKA E, HERMANOWSKA-SZPAKOWICZ T. Właściwości biologiczne czynnika transkrypcji jądrowej NF-kB. *Alerg Astma Immun*2005; **10**: 125-131.
- [29] SCHMID JA, BIRBACH A. IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKKBK) a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; **19**: 157-165.
- [30] SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of k immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kB by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; **47**:921-928.
- [31] SKÓRKA K, GIANNOPOULOS K. Budowa i funkcje jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF-kB) oraz jego znaczenie w przewlekłej białaczce limfocytowej. *Acta Haemat Pol* 2012; **43**: 54-62.
- [32] SUN SC. Non-canonical NF-kB signaling pathway. *Cell Res* 2010; **21**: 71-85.
- [33] SZOLTYSEK K, JANUS P, WIDLAK P. Komórkowa ścieżka sygnałowa zależna od czynnika transkrypcyjnego NF-kB i jej współzależności ze szlakami p53 i HSF1. *Post Biol Kom* 2011; **38**: 159-175.
- [34] THAKKAR A, SUTARIA D, GRANDHI BK, WANG J, PRABHU S. The molecular mechanism of action of aspirin, curcumin and sulforaphane combinations in the chemoprevention of pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2013; **29**: 1671-1677.
- [35] VIRAG L, ROBASZKIEWICZ A, RODRIGUEZ-VARGAS JM, OLIVER FJ. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med* 2013; **34**:1153-1167.
- [36] YANG WH, PARK SY, NAM HW, KIM DO H, KANG JG, KANG ES, KIM YS, LEE HC, KIM KS, CHO JW. NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 17345-17350.
- [37] YANG YR, KIM DH, SEO YK, PARK D, JANG HJ, CHOI SY, LEE YH, LEE GH, NAKAJIMA K, TANIGUCHI N, KIM JM, CHOI EJ, MOON HY, KIM IS, CHOI JH, LEE H, RYU SH, COCCO L, SUH PG. Elevated O-Glc-

- NAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF- κ B signaling. *Oncotarget* 2015; [Epub ahead of print].
- [38] ZHANG Y, LIU S, WANG H, YANG W, LI F, YANG F, YU D, RAMSEY FV, TUSZYSKI GP, HU W. Elevated NIBP/TRAPPC9 mediates tumorigenesis of cancer cells through NF κ B signaling. *Oncotarget* 2015; **20**: 6160-6178.
- [39] ZHENG C, YIN Q, WU H. Structural studies of NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011; **21**: 183-195.

Redaktor prowadzący – Agata Filip

Otrzymano: 03.03.2015

Przyjęto: 20.05.2015

Ewelina Wiśnik

Katedra Biofizyki Skazań Środowiska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

tel.: (42) 6354449

fax: (42) 6354449

e-mail: ewelina-wisnik@wp.pl