

**REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO, PROCESU  
APOPTOZY, WYDZIELANIA CYTOKIN I CZĄSTECZEK  
ADHEZYJNYCH W LIMFOCYTACH T I INNYCH  
KOMÓRKACH KRWI OBWODOWEJ ORAZ KOMÓRKACH  
NOWOTWOROWYCH W MECHANIZMIE AKTYWACJI  
*TOLL-LIKE RECEPTORS* (TLRs) I RODZINY CZĄSTECZEK  
TRANSKRYPCYJNEGO CZYNNIKA JĄDROWEGO NF- $\kappa$ B**

REGULATION OF CELL-CYCLE PROCESS, CELL APOPTOSIS,  
CYTOKINES AND ADHESION MOLECULES PRODUCTION  
IN LYMPHOCYTES T AND OTHER BLOOD CELLS AND NEOPLASM  
CELLS IN MECHANISM OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND  
TRANSCRIPTION NUCLEAR FACTOR NF- $\kappa$ B FAMILY ACTIVATION

Katarzyna STARSKA, Marek ŁUKOMSKI

Katedra Otolaryngologii, Klinika Laryngologii i Onkologii Laryngologicznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

*Strzeszenie:* Toll-like receptors (TLRs), receptory dla TNF (TNF-R), NF- $\kappa$ B oraz białka biorące udział w aktywacji transkrypcyjnego czynnika jądrowego mogą wpływać na zjawisko apoptozy, cykl komórkowy, wydzielanie cytokin oraz cząsteczek adhezyjnych za pośrednictwem regulacji transkrypcji określonych genów, które determinują przebieg tych procesów zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej. Celem pracy jest przedstawienie najnowszej wiedzy dotyczącej roli TLRs oraz rodziny cząsteczek NF- $\kappa$ B w regulacji tych zjawisk. W pracy przedstawiono: charakterystykę rodziny Toll-like receptors (TLRs) oraz ich rolę w kaskadzie zjawisk prowadzących do aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B, najważniejsze mechanizmy aktywacji transkrypcji określonych genów kodujących białka uczestniczące w cyklu komórkowym (m.in. cyklina D1, p16INK4A, GADD45), zjawisku apoptozy (m.in. TNF-R, XIAP, cIAP1,2, Bcl-XL) oraz onkogenezie (m.in. p53, VCAM, ICAM, cytokiny) za pośrednictwem TLRs i NF- $\kappa$ B. Poznanie mechanizmów regulacyjnych szlaku TLRs i TNF-R  $\rightarrow$  białka pośredniczące  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  ekspresja genów  $\rightarrow$  produkt ekspresji stwarza w przyszłości możliwość wpływania na proces aktywacji wybranych czynników antyneoplastycznych i zablokowania cząsteczek proneoplastycznych pojawiających się zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej, co być może będzie początkiem nowego podejścia do walki z rozwijającą się chorobą nowotworową oraz da szansę na wprowadzenie nowych metod postępowania leczniczego (immunoterapia, nowe kryteria rozległości zabiegów operacyjnych).

*Słowa kluczowe:* komórki krwi, komórki nowotworowe, TLRs, transkrypcyjny czynnik jądrowy NF- $\kappa$ B, apoptoza, cykl komórkowy, cytokiny, cząsteczki adhezyjne.

*Summary:* Toll-like receptors (TLRs), TNF receptor (TNF-R), NF- $\kappa$ B and the nuclear factor NF- $\kappa$ B family could influence cell-cycle progression, cell apoptosis, cytokines and adhesion molecules by regulation of proper genes which determine these process in neoplasm cells and blood cells. The aim of this study was to introduce the latest knowledge of the nuclear factor NF- $\kappa$ B family role in oncogenesis and neoplasm progression. In this study the characterization of Toll-like receptors family and role in nuclear factor NF- $\kappa$ B family activation, regulatory mechanisms of transcription genes of cell-cycle progression (e.g. cyclin D1, p16INK4A, GADD45), cell apoptosis apoptozy (e.g. TNF-R, XIAP, cIAP1,2, Bcl-XL) and oncogenesis (e.g. p53, VCAM, ICAM, cytokines) which determine these processes in neoplasm cells were introduced. Knowledge of mechanisms of activation by TLRs and TNF-R  $\rightarrow$  intermediary proteins  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  cell-cycle, apoptosis, cytokines and adhesion molecules genes  $\rightarrow$  product of expression, could allow to activate antineoplastic factors and blocked proneoplastic molecules and use new therapeutic methods (immunotherapy, new criterions for operations).

*Key words:* blood cells, neoplasm cells, Toll-like receptors (TLRs), transcription nuclear factor NF- $\kappa$ B, cell apoptosis, cell-cycle process, cytokines, adhesion molecules.

Pomimo braku bezpośrednich dowodów na to, iż komórki nadzoru immunologicznego chronią przed rozwojem nowotworu, pośrednie obserwacje kliniczne oraz badania doświadczalne wskazują na ich aktywność w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym różnego pochodzenia. Niewiele wiadomo również na temat wpływu komórek guza na aktywność komórek krwi krążącej, tj. limfocytów T, komórek NK, monocytów i neutrofilów, wzajemnego modulowania funkcji oraz regulację przeciwnowotworową odpowiedzi immunologicznej w mechanizmie aktywacji *Toll-like receptors* (TLRs), receptorów dla TNF (TNF-R) i rodziny cząsteczek transkrypcyjnego czynnika jądrowego NF- $\kappa$ B. TLRs, TNF-R, NF- $\kappa$ B oraz białka biorące udział w aktywacji tych cząsteczek mogą wpływać na zjawisko apoptozy, cykl komórkowy, wydzielanie cytokin oraz cząsteczek adhezyjnych za pośrednictwem regulacji transkrypcji określonych genów, które determinują przebieg tych procesów zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej. Dokładne poznanie mechanizmów regulacyjnych szlaku TLRs i TNF-R  $\rightarrow$  białka pośredniczące  $\rightarrow$  NF- $\kappa$ B  $\rightarrow$  ekspresja genów związanych z apoptozą, cyklem komórkowym, wydzielaniem cytokin i cząsteczek adhezyjnych  $\rightarrow$  produkt ekspresji stwarza w przyszłości możliwość wpływu na proces aktywacji wybranych czynników antyneoplastycznych i zablokowanie cząsteczek proneoplastycznych pojawiających się zarówno w komórkach nowotworowych, jak i komórkach krwi krążącej, co być może będzie początkiem nowego podejścia do walki z rozwijającą się chorobą nowotworową oraz da szansę na wprowadzenie nowych metod postępowania leczniczego.

Celem pracy jest przedstawienie najnowszej wiedzy dotyczącej roli *Toll-like receptors* TLRs oraz rodziny cząsteczek NF- $\kappa$ B i białek biorących udział w aktywacji transkrypcyjnego czynnika jądrowego w regulacji cyklu komórkowego, apoptozy i produkcji cząsteczek adhezyjnych w onkogenezie i progresji nowotworu.

## I. CHARAKTERYSTYKA RODZINY TLRs

Rodzina *Toll-like receptors* (TLRs) odgrywa fundamentalną rolę w aktywacji procesów wrodzonej odporności [71,75]. Do tej pory w błonach komórkowych (*transmembrane receptors*) populacji ludzkich leukocytów stwierdzono i opisano ekspresję 10 rodzajów tych receptorów [4]. Wszystkie TLRs charakteryzują się obecnością wielokrotnych powtórzeń fragmentów bogatych w leucynę (LRRs) w części zewnątrz błonowej receptora oraz domeny wewnątrz błonowej będącej homologiem IL-1R (TIR), dlatego też TLRs zaliczane są do superrodziny białek IL-1R [105]. Obecność TLR1 została potwierdzona na powierzchni wszystkich ludzkich leukocytów, tj. monocytów, limfocytów T i B, komórek NK oraz na komórkach wielojądrzastych, jak również w błonach komórek nabłonkowych [72]. Występowanie TLR2, TLR4 i TLR5 wykazano natomiast na komórkach szeregu mielomonocytarnego. TLR3 wyodrębniono na komórkach dendrytycznych oraz limfocytach w węzłach chłonnych [71]. Pozostałe receptory TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10 mogą występować również w błonach ludzkich leukocytów, rozpoznając specyficzne ligandy m.in. cząsteczki wirusów (TLR5, TLR7), CpG DNA komórek bakterii (TLR9) [75]. Badania Nishimura i wsp. [75], w których autorzy oceniali mRNA dla TLRs, potwierdziły występowanie tych receptorów w błonach komórkowych wielu tkanek. Największą ekspresję mRNA TLR1 wykazano w płucach, śledzionie i nerkach [75]. Rock i Matsuguhi [67,72] stwierdzili występowanie TLR2 w mózgu, sercu i mięśniach, jak również w płucach i śledzionie. Ekspresja mRNA dla TLR7 i TLR8 była największa w płucach, śledzionie i rdzeniu kręgowym [22]. Ekspresję TLRs potwierdzono również w błonach komórkowych nabłonków różnego pochodzenia, w tym komórkach raków płaskonabłonkowych głowy i szyi, raka pęcherzyka żółciowego i prostaty [63,94].

Regulacja ekspresji LTRs w błonach komórkowych pozostaje nadal w piśmiennictwie przedmiotem licznych dyskusji. Ekspozycja komórek na działanie wielu cząsteczek m.in. prozapalnych cytokin (m.in. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ), przeciwzapalnych cząsteczek (IL-10), lipopolisacharydów (LPS) zwiększa ekspresję LTR4 na monocytach i komórkach wielojądrzastych, podczas gdy IL-10 blokuje ten efekt [71]. Liczne badania potwierdziły działanie prozapalnych cytokin, które indukowały transkrypcję TLR4 [71]. Badania Muzio i wsp. [71] wykazały, że obecność LPS lub IL-10 w środowisku komórek całkowicie blokuje aktywację TLR4 na powierzchni ludzkich monocytów i jednocześnie pozostaje bez wpływu na ekspresję TLR2. Autorzy nie potwierdzili aktywacji TLR1 za pośrednictwem lipopolisacharydów lub cytokin, z wyjątkiem ujemnego wpływu na transkrypcję receptora w limfocytach T stymulowanych mitogenem (PHA) i braku ekspresji TLR2, TLR4 i TLR5 na tych komórkach. W badaniach z wykorzystaniem technik biologii molekularnej stwierdzono, że LTR4 stanowi niezbędny składnik kompleksu receptorowego aktywowanego przez LPS i kontrolującego przebieg zjawisk wrodzonej odpowiedzi immunologicznej *in vivo* [21,41,82]. Inni przedstawiciele rodziny TLRs, m.in. TLR2, mogą również wpływać na zwiększoną wrażliwość komórek na inne cząsteczki występujące w ich środowisku, np. peptydoglikany, zymosan, składniki ściany bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus aureus* [97,98]. Wyniki

TABELA I. Wybrane cząsteczki związane z aktywacją rodziny *Toll-like receptors* (TLRs)

Intracellular adhesion molecule	ICAM1, CD54
Myeloid differentiation primary response gene (88)	MyD88
Suppressor of cytokine signaling 1	SOCS1
Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, 2, 3, 4	IRAK 1, 2, 3, 4
TNF receptor-associated factor 6	TRAF6
NF- $\kappa$ B – inducing kinase	NIK
Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1	MEKK1
Janus kinase	JAK
Signal transducer and activator of transcription	STAT
TIR-containing adaptor-inducing interferon	TRIF
TRIF-related adaptor molecule	TRAM
Mitogen-activated protein	MAP

badan przedstawione w dostępnym piśmiennictwie wskazują na możliwość aktywacji TLRs drogą bezpośrednią (LPS) lub za pośrednictwem cytokin [21,41,71,97,98]. Potwierdza się również wspólne oddziaływanie receptorów rodziny TLRs. Badania Takeuchi i wsp. [96] wykazały, że koekspresja TLR1 hamuje odpowiedź związaną z pobudzeniem TLR2, podczas gdy wspólne występowanie w błonie komórkowej receptorów TLR1 i TLR6 nasila pobudzenie receptora TLR6. Również obecność w środowisku komórek nabłonkowych, czynników prozapalnych jest przyczyną regulacji miejscowej ekspresji TLRs. Abreu i wsp. [2] wykazali wpływ IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  na ekspresję mRNA TLR4 w komórkach nabłonka jelita cienkiego. Obecność tych cytokin w środowisku komórek jelita wiązała się ze wzmożoną ekspresją TLR4, co dowodzi znaczenia cytokin szeregu Th1 w nasilaniu zmian zapalnych przez aktywację TLRs [2].

## II. ROLA RODZINY TLRs W KASKADZIE ZJAWISK PROWADZĄCYCH DO AKTYWACJI CZYNNIKA NF- $\kappa$ B

W licznych badaniach potwierdzono znaczenie pobudzenia receptorów TLRs w kaskadzie zjawisk aktywującej czynnik *NF- $\kappa$ B*. Najlepiej poznanymi są receptory TLR2 i TLR4, które aktywują *NF- $\kappa$ B*, indukują ekspresję IL-1, IL-6, IL-8 i cząsteczki kostymulatora B7 [5,14,47,69]. Podczas aktywacji TLRs tworzą homodimery, co powoduje charakterystyczne zmiany konformacyjne domeny TIR i prowadzi do aktywacji cząsteczki adaptacyjnej MyD88 [5,77]. Domena śmierci białka MyD88 aktywuje IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*) poprzez przyłączenie do receptorowego kompleksu [77]. IRAK następnie ulega autofosforylacji, odłącza się od kompleksu i pobudza TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), co aktywuje kolejne kinazy, tj. NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) i MEKK1 (*mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1*) [52]. Dokładny mechanizm tej aktywacji nie jest dokładnie poznany. TRAF6 ma zdolność interakcji z innym białkiem (ESCIT), które pomaga w przejściu MEKK1 w aktywną

formę, podczas gdy NIK może ulec pobudzeniu przez TAK1 (*TGF $\beta$  activated kinase*) [55]. TAK 1 wiąże się z TRAF6 poprzez proteiny TAB1 i TAB2. Cząsteczki NIK i MEKK1 mają zdolność aktywacji kompleksu IKK (*I $\kappa$ B kinase*) [74,95]. Ostatecznie I $\kappa$ B ulega fosforylacji i degradacji, co prowadzi do translokacji NF- $\kappa$ B i transkrypcji genów. Czynniki NF- $\kappa$ B za pośrednictwem TLRs może ulec także aktywacji przy udziale MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), która rozpoczyna kaskadę zdarzeń prowadzącą do transkrypcji TNF $\alpha$  oraz grupy białek zwanych SOCS (*suppressor of cytokine signaling*). SOCS stanowią klasę negatywnych regulatorów dla JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) i hamują szlak związany z pobudzeniem receptorów TLRs [9].

### III. CHARAKTERYSTYKA RODZINY CZĄSTECZEK TRANSKRYPCYJNEGO CZYNNIKA JĄDROWEGO NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B/Rel to rodzina białek będących aktywatorami transkrypcji [7,8,10,34,92,101]. Obejmuje ona białka strukturalnie podobne (u ssaków 5 rodzajów), takie jak: NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB, c-Rel, które wiążą się z DNA jako homo- lub heterodimery i których aktywność jest regulowana przez białka z rodziny I $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B-c, p105, p100) [18]. Wszystkie białka rodziny NF- $\kappa$ B mają homologiczną Rel domenę odpowiedzialną za łączenie się z DNA, dimeryzację i interakcję z I $\kappa$ B [18]. Najlepiej scharakteryzowanym heterodimerem, określanym jako NF- $\kappa$ B jest p50/RelA. Zbudowany jest on z dwóch podjednostek: białka p50, będącego produktem genu NF- $\kappa$ B1 i białka p65, stanowiącego produkt genu RelA [34]. NF- $\kappa$ B/Rel odpowiedzialny jest za aktywację transkrypcji genów w odpowiedzi na obecność w środowisku pozakomórkowym: cytokin (np. TNF $\alpha$ ), mitogenów (np. PHA, anti-CD3, anti-CD2) oraz bakterii (enterotoksyny *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*), wirusów (HBV, HTLV-1), leków (np. cykloheksamid) i wielu innych czynników [7,8,10,34,83,92,101]. Również jednym z mechanizmów aktywujących NF- $\kappa$ B jest stres oksydacyjny [83]. Do genów aktywowanych przez NF- $\kappa$ B należą m.in. geny dla cytokin (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , LT $\alpha/\beta$ ), czynników wzrostu (GM-CSF), immunoreceptorów (MHC), molekuł adhezyjnych (ICAM, VCAM, ELAM), białek ostrej fazy (SAA), enzymów (iNOS, COX-2), wirusów i wielu innych białek biorących udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej (TGF-beta 1), procesów zapalnych, w kontroli cyklu komórkowego i apoptozy oraz onkogenezy (cIAP1, cIAP2, FasL, c-myc, p53, Cyklina D1) [7,8,10,18,34,48]. NF- $\kappa$ B odpowiedzialny jest także za inicjację m.in. transkrypcji genów chroniących komórkę przez apoptozą lub genów zwiększających oporność komórek guza na stosowane leczenie przeciwnowotworowe [16,31,78,80,101]. We wszystkich komórkach z wyjątkiem limfocytów B nieaktywny NF- $\kappa$ B występuje w cytoplazmie w połączeniu z białkiem I $\kappa$ B [7,10,34,92]. Aktywacja NF- $\kappa$ B występująca w odpowiedzi na zadziałanie sygnału pozakomórkowego polega na translokacji NF- $\kappa$ B z cytoplazmy do jądra komórkowego [28,34]. I $\kappa$ B, ulegający fosforylacji przez IKK $\alpha/\beta$

(*IκB kinase*), hamuje aktywność heterodimeru p50/RelA utrzymując go w cytoplazmie i uniemożliwiając jego wiązanie z DNA [18]. W odpowiedzi na sygnał pozakomórkowy np. TNF $\alpha$  (p55) dochodzi do fosforylacji reszt serynowych IκB, ubikwitinizacji i jego degradacji. Odłączenie IκB i uwolnienie NF-κB pozwala na translokację NF-κB z cytoplazmy do jądra komórkowego, wiązanie z DNA i aktywację odpowiednich genów m.in. genów dla mediatorów zapalenia, karcynogenezy, pro- i antyapoptotycznych regulatorów oraz genów dla IκB [18]. Nowo zsyntetyzowany IκB łączy się w jądrze komórkowym z NF-κB (p50/RelA) i transportuje go z powrotem do cytoplazmy [34]. Nakayama i wsp. [73] podkreślają znaczenie IKK $\alpha$  jako wewnątrzkomórkowego sygnału hamującego różnicowanie komórek nabłonkowych w rakach płaskonabłonkowych, sugerując znaczącą rolę kinazy C – PKC (*protein C kinase*). Według autorów aktywacja kinazy C indukuje wzrost aktywności transkrypcyjnej NF-κB.

### Rola NF-κB w aktywacji apoptozy

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki jest szczególnym mechanizmem eliminowania, tj. samounicestwienia komórek, które stanowią potencjalne lub rzeczywiste zagrożenie. Apoptoza występuje zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Układ regulacyjny apoptozy obejmuje dwa zasadnicze mechanizmy kontroli. Jeden podlega białkom z rodziny Bcl-2/Bax [40,57,84,85,103,104], drugi kontrolowany jest przez kaspazy [20,57,58,66]. Sygnałem do rozpoczęcia apoptozy może być zadziaływanie czynników tak pozakomórkowych, jak i wewnątrzkomórkowych [6,35]. Zainicjowanie apoptozy może wiązać się z pobudzeniem receptora Fas/APO-1/CD95, receptora dla TNF (TNFR-1), receptora dla NGF (NGFR), CD30, CD40, OX40, 4-1BB, które mają części zwane domenami śmierci (DD – *death domain*). Receptory te przekazują sygnał apoptotyczny aktywujący prokaspazy, głównie kaspazę-8. W końcowym etapie apoptozy dochodzi do zmian nieodwracalnych w komórce, m.in. fragmentacji DNA i dezintegracji jądra komórkowego [18]. Sygnałem do rozpoczęcia apoptozy może być uszkodzenie DNA komórki prowadzące do wzrostu ilości białka p53 [18,62]. Wzrost ilości białka p53 poprzez p21 aktywuje geny hamujące proliferację i doprowadza do zatrzymania komórki w fazie G<sub>1</sub> na okres potrzebny do naprawy DNA [57,62,84]. Gdy naprawa DNA nie jest możliwa, p53 kieruje komórkę na drogę apoptozy poprzez aktywowanie transkrypcji Bax i jego translokację z cytoplazmy do mitochondrium [102]. Regulacja apoptozy na poziomie mitochondrium związana jest z działaniem białek promujących apoptozę, tj. Bax, Bak, Bad, Bcl-X<sub>s</sub> oraz białek hamujących apoptozę, tj. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>. Łączą się one w homo- i heterodimery tworząc kanały w błonie mitochondrialnej, które odgrywają istotną rolę w kontroli zmian międzybłonowego potencjału mitochondrialnego [51]. Przesunięcie równowagi w stronę białek promujących apoptozę doprowadza do otwarcia kanałów i ucieczki do cytoplazmy cytochromu c, jonów Ca<sup>2+</sup>, wody i czynnika indukującego apoptozę (AIF – *apoptosis inducing factor*), białka Diablo/Smac [61,99]. Uwolniony cytochrom c rozpoczyna reakcje kaskadową aktywując Apaf-1 (*Apoptosis activation factor*), który dalej aktywuje kaspazę-9 i kaspazę-3. Kaspaza-3 odpowiedzialna jest za proteolizę białek, tj. PAK (p21-*activated kinases*), pRb, białek cytoszkieletu [20,57,61]. Proteina Diablo/Smac uwolniona z

mitochondrium promuje proces apoptozy poprzez przyłączenie się do cząsteczek XIAP, cIAP1 i cIAP2 umożliwiających aktywację kaspaz [99]. Sygnał ten również aktywuje kaspazę-8, a następnie kaspazę-9 i kaspazę-3.

Rola rodziny białek NF- $\kappa$ B w regulacji procesu apoptozy jest nadal dyskutowana. Antyapoptotyczne działanie NF- $\kappa$ B uwidacznia się poprzez m.in. pobudzenie receptora dla TNF $\alpha$  (TNF-R) aktywującego NF- $\kappa$ B, który indukuje transkrypcję i ekspresję inhibitorów kaspaz, tj. XIAP, cIAP1 i cIAP2 oraz aktywuje Bcl-X<sub>L</sub> i Bfl-1 [26,59,79,83,84]. Innym przykładem aktywacji procesu apoptozy związanego z pobudzeniem białka NF- $\kappa$ B jest wzrost ekspresji proteiny, biorącej udział w regulacji cyklu komórkowego, tj. cykliny D1 [37,38,50]. Antyapoptotyczne działanie czynnika jądrowego uwidacznia się również poprzez aktywację cząsteczek TRAF1 i TRAF2 [100]. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć prace potwierdzające znaczenie rodziny białek NF- $\kappa$ B w promowaniu procesu apoptozy w różnych typach komórek [3,12]. Jednym z mechanizmów pobudzenia zjawisk prowadzących do apoptozy jest wpływ NF- $\kappa$ B na wzrost ekspresji genów dla TNF $\alpha$  oraz c-myc [42,68]. Kaur i wsp. [54] potwierdzili w badaniach dotyczących raka wątroby, że NF- $\kappa$ B przeciwdziała aktywności TGF- $\beta$  1, indukującego proces apoptozy poprzez wzmożoną ekspresję genów i produkcję XIAP i Bcl-X(L). Wiele badań wskazuje także na rolę NF- $\kappa$ B w promowaniu apoptozy poprzez pobudzenie transkrypcji receptora FasL [46,53]. Niektórzy badacze nie potwierdzają jednak możliwości aktywacji apoptozy przez NF- $\kappa$ B za pośrednictwem ekspresji genu dla FasL [60,86,87]. Rodriguez i wsp. [87] nie zaobserwowali jednak korelacji ekspresji NF- $\kappa$ B i receptora Fas w guzach regionu głowy i szyi. W regulacji procesu apoptozy ważną rolę odgrywają również wzajemne oddziaływania białek biorących udział w kaskadzie programowanej śmierci komórki. Przykładem jest opisywane w literaturze, potencjalne znaczenie proteiny p53 w aktywności NF- $\kappa$ B. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć prace, które dowodzą istnienia kompetycyjnego współzawodnictwa między NF- $\kappa$ B a p53 o możliwość przyłączenia do koaktywatora p300 [99]. Praca Liu i wsp. [64] potwierdza antagonistyczne działanie p53 w stosunku do NF- $\kappa$ B. Autorzy podkreślają znaczenie enzymu – kinazy fosforyzującej p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, który może fosforylować również karboksylowy koniec cząsteczki I $\kappa$ B- $\alpha$ . Również Gurowa i wsp. [36], analizując wyniki badań dotyczących raka nerki, sugerują możliwość występowania zjawiska inhibicji NF- $\kappa$ B i jednoczesnej aktywacji p53, co może prowadzić do nasilonej apoptozy. Inne doniesienia nie potwierdzają tych spostrzeżeń. Ryan [88] i Perkins [81] dowodzą, że białko p53 może aktywować NF- $\kappa$ B za pomocą nie do końca jeszcze poznanego, mechanizmu lub przez indukcję ekspresji białka p21<sup>Waf1</sup>, które hamuje cyklinę E/Dck2 i blokuje zdolność do łączenia się NF- $\kappa$ B z koaktywatorem p300 i CBP. Chen i wsp. [18] opisują inny mechanizm wzajemnego oddziaływania białek kaskady czynnika NF- $\kappa$ B. Autorzy podkreślają rolę kaspazy-3 w degradacji cząsteczki I $\kappa$ B, co powoduje łatwiejszą jej degradację przez enzymy proteasomów w odpowiedzi na działanie czynników indukujących NF- $\kappa$ B. Badacze podkreślają jednak możliwość przyłączenia i hamowania, również NF- $\kappa$ B. W tym mechanizmie geny antyapoptotycznych cząsteczek nie ulegają transkrypcji, a proces apoptozy nie jest hamowany [18]. Inni autorzy potwierdzają możliwość aktywacji czynnika NF- $\kappa$ B przez kaspazy, pod pewnymi

warunkami. Chaudhary i wsp. [17] opisują rolę kaspazy-8, kaspazy-10 oraz MRIT w aktywacji zjawisk prowadzących do pobudzenia NIK i interakcji z  $IKK\alpha/\beta$  i co za tym idzie czynnika NF- $\kappa$ B. Przytoczone prace wskazują zatem, że regulacja pozytywna lub negatywna procesu apoptozy w drodze aktywacji rodziny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, jest procesem złożonym i zależy od przewagi czynników pobudzających lub hamujących ekspresję białek uczestniczących w kaskadzie opisywanych zjawisk.

### Rola NF- $\kappa$ B w regulacji cyklu komórkowego

Proliferacja kontrolowana jest na poziomie cyklu komórkowego przez szereg czynników ze środowiska zewnętrznego, jak i wewnętrznego. Motorem cyklu komórkowego są kompleksy cyklin z kinazami proteinowymi zwanymi kinazami zależnymi od cyklin (CDK – *cyclin-dependent kinases*) [13,24,27,43,44,91]. Zidentyfikowano 9 typów cyklin oznaczonych od A do I oraz 11 kinaz zależnych od cyklin. Ekspresja cyklin: B1, A, E, D jest periodyczna i występuje w ściśle określonych fazach cyklu. Kompleksy cyklin z kinazami zależnymi od cyklin fosforylują białka w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, umożliwiając przejście komórki z jednej fazy cyklu do drugiej, np. cyklina D (D1, D2, D3) wraz z CDK4 lub CDK6 jest odpowiedzialna za fosforylację pRb, uwolnienie czynników transkrypcyjnych (E2F, DPI 1-2), przejście komórki z fazy  $G_0$  do  $G_1$  i wejście komórki do fazy S. Aktywacja CDK zależy od przyłączenia cykliny, fosforylacji i defosforylacji oraz obecności inhibitorów. Inhibitory hamujące w sposób bezpośredni lub pośredni kompleksy cyklina/CDK podzielono na: INK4 – inhibitor CKD4, w skład którego wchodzi p15, p16, p18, p19 oraz CIP/KIP (*cyclin/kinase inhibitory proteins*) składające się z p21, p27, p57. Inhibitory z grupy INK4 działają wyłącznie na kompleks cykliny D z CDK4 lub CDK6. Inhibitory z grupy CIP/KIP mogą hamować funkcję kompleksów cykliny z CDK występujących w fazie  $G_1$  i S (cyklina D/CDK4, cyklina E/CDK2, cyklina A/CDK2) oraz w mniejszym stopniu cyklina B/CDK1 [13,24,27,43,44,91]. Dodatkową kontrolę sprawują białka z rodziny Rb oraz p53, których działanie polega na supresji proliferacji, np. p53 poprzez zwiększenie ekspresji p21 aktywuje geny hamujące proliferację doprowadzając do zahamowania cyklu komórkowego w fazie  $G_1/S$  i ewentualnie indukcji apoptozy w przypadku uszkodzenia DNA lub zahamowania cyklu w fazie  $G_2/M$ , gdy DNA nie ulegnie replikacji [13,24,25]. Udział białek z rodziny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w regulacji cyklu komórkowego polega na ułatwieniu przejścia z fazy  $G_1$  do S poprzez hamowanie aktywacji lub funkcji p53, jak również wzmożonej ekspresji cykliny D1 [15,37,38,50]. NF- $\kappa$ B może też pobudzać przejście fazy  $G_2$  do M poprzez hamowanie ekspresji GADD45 (*DNA-damage protein 45*), białka blokującego kompleks cyklina B/CDK2 [18].

### Rola NF- $\kappa$ B w onkogenezie

Zdolność białek z rodziny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B w supresji apoptozy oraz regulacji cyklu komórkowego wskazuje, że NF- $\kappa$ B może odgrywać istotną rolę w onkogenezie. Wzmożona ekspresja NF- $\kappa$ B została potwierdzona w wielu rakach, m.in. raku piersi, płuca, tarczycy, prostaty, pęcherzyka żółciowego i wątroby, T i B białaczkach oraz rakach głowy i szyi [11,34,49,70,76,93]. Jiang i wsp. [49] wykazali wzmożoną



ekspresję specyficznych sekwencji (-235/-266) w cząsteczce NF- $\kappa$ B w liniach komórkowych HepG2 raka wątroby. Wcześniejsze prace wskazują na rolę NF- $\kappa$ B w transformacji nowotworowej, co potwierdza fakt, że v-Rel, homolog c-Rel o właściwościach onkogenu powoduje transformację komórek ssaków *in vivo* [18]. Hamowanie aktywności NF- $\kappa$ B przez wzmożoną ekspresję I $\kappa$ B- $\alpha$ , powodowało rozrost komórek T białaczki i związane było z dłuższym przeżyciem transgenicznych myszy [18]. Geny kodujące c-Rel, NF- $\kappa$ B2 (p100/p52), p65/RelA, Bcl-3 są ponadto zlokalizowane w tych regionach genomu, który związany jest m.in. ze zjawiskiem amplifikacji onkogenów. Zjawisko to potwierdzono w przypadkach chłoniaków nieziarniczych (*B non-Hodking lymphoma*), w wielu chłoniakach, w tym chłoniakach skóry oraz komórkach raków [18,34]. Inny mechanizm przedstawia Wadgaonkar i wsp. [100], którzy podkreślają znaczenie antagonistycznego działania NF- $\kappa$ B w stosunku do białka p53, jak i wzmożonej ekspresji cykliny D, co w rezultacie prowadzi do nieograniczonej proliferacji [15,37,-38,50]. Również wzmożona transkrypcja antyapoptotycznych genów dla cIAP1, cIAP2, XIAP, Bcl-X<sub>L</sub> aktywowana za pośrednictwem NF- $\kappa$ B dodatkowo sprzyja możliwości ucieczki mechanizmów zachodzących w komórce spod kontroli i w następstwie tego do zahamowania apoptozy [19]. Czynnikiem sprzyjającym onkogenezie jest także pozytywna regulacja ekspresji genów dla m.in. molekuł adhezyjnych, VEGF, COX-2, chemokin, które bezpośrednio nasilają proces angiogenezy [18]. Abdel i wsp. [1] podkreślają znaczenie regulacyjnej roli NF- $\kappa$ B w ekspresji genów dla cytokin m.in. IL-1 i IL-8 oraz enzymów, które uczestniczą w aktywacji zjawisk immunologicznych prowadzących do nasilenia procesu metaplastji i ontogenezy w gruczolakoraku przelyku.

#### **IV. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH BIAŁEK AKTYWOWANYCH ZA POŚREDNICTWEM NF- $\kappa$ B**

##### **Cyklina D1**

Cyklina D1 jest białkiem produkowanym w wyniku ekspresji genu, uważanego za protoonkogen, CCND1/PRAD1, który zlokalizowany jest na chromosomie 11 (11q13). Cyklina D1 zbudowana jest z 295 aminokwasów o m. cz. 36 kD i należy, wraz z cykliną E do cyklin fazy G<sub>1</sub> cyklu komórkowego. Rolą cykliny D1 jest aktywacja kinaz białkowych serynowo-treoninowych cyklinozależnych CDK4 i CDK6. W fazie G<sub>1</sub> cyklu komórkowego kompleks cyklina D1/CDK4 (CDK6), poprzez fosforylację białka pRb wpływa na jego aktywność. Białko pRb reguluje m.in. proliferację komórek poprzez wpływ na prawidłowy przebieg fazy G<sub>1</sub> i przejście z fazy G<sub>1</sub> do fazy S. Odbywa się to poprzez oddziaływanie postaci ufosforylowanej białka pRb z czynnikiem transkrypcyjnym E2F i postaci ufosforylowanej tego białka z cząsteczką p16INK4A [24,29,32,39].

W komórkach licznych nowotworów stwierdza się nadekspresję cykliny D1, co spowodowane jest najczęściej amplifikacją lub translokacją genu *CCND1/PRAD1* [29,33]. Zaburzenia ekspresji genów regulujących przejście fazy G<sub>1</sub> do fazy S cyklu

komórkowego odgrywają kluczową rolę w transformacji nowotworowej komórki i występują w niemal wszystkich typach nowotworów występujących u człowieka [65].

### Białko p16INK4A

Białko p16INK4A jest kodowane przez gen *p16INK4A* (*cycli-dependent kinase-4-inhibitor*), który jest zlokalizowany na chromosomie 9 (9p21). Produkt białkowy tego genu zbudowany jest z 148 aminokwasów o m. cz. 15,8 kD i zaliczany jest do białek supresorowych. Białko p16INK4A tworzy kompleksy z kinazą CDK4 i CDK6, których jednostkami regulatorowymi są cykliny D. Podstawowa funkcja p16INK4A polega na konkurencyjnym wiązaniu CDK4 i CDK6 i tym samym hamowaniu fosforylacji białka pRb, przeprowadzanej przez cyklozależne kinazy [23,24,30,39].

### Cytokiny

Rola limfocytów T cytotoksycznych (CTL – *cytotoxic lymphocytes*) polega na odróżnianiu i zabijaniu komórek potencjalnie nowotworowych. Limfocyty cytotoksyczne to w większości limfocyty CD8+, które poprzez swoisty receptor TCR (*T Cell Receptor*) mają zdolność rozpoznawania antygeny nowotworowego obecnego na cząsteczce MHC klasy I. Aktywacja limfocytów T cytotoksycznych CD8+ odbywa się z udziałem uprzednio pobudzonych limfocytów T pomocniczych CD4+ [56]. Pobudzenie limfocytu T pomocniczego CD4+ wymaga bezpośredniego kontaktu z komórką prezentującą antygen APC (makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NK), co powoduje pobudzenie limfocytu Th i uwalnianie przez niego do środowiska szeregu cytokin, m.in. IL-2, ale również ekspresję receptorów dla IL-2 i cząsteczek adhezyjnych, np. LFA-1. Wśród cytokin zasadnicze znaczenie ma IL-2, która w drodze autokrynej stymuluje limfocyt Th do ostatecznego różnicowania i proliferacji. Aktywacja limfocytów Th może prowadzić do śmierci limfocytu poprzez apoptozę, anergii, czyli tolerancji immunologicznej lub proliferacji i różnicowania komórek. Pobudzone limfocyty Th mają zdolność do produkowania szeregu cytokin, różnych w zależności od rodzaju subpopulacji limfocytów Th (Th1 i Th2). Największe znaczenie w obronie przeciwnowotworowej pełnią cytokiny profilu Th1: IL-2, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . Wywierają one działanie sprzyjające rozwojowi odpowiedzi typu komórkowego, w którym elementami efektorowymi są limfocyty cytotoksyczne CD8+ [45,56,89,90]. Cytokiny uwalniane przez limfocyty Tc1: IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  biorą udział w nasilaniu reakcji komórkowych skierowanych przeciw komórkom nowotworowym (indukcja apoptozy m.in. w mechanizmie FAS-FAS-L, przy udziale perforyn, granzym i kaspaz) [45,56,89,90]. Należy podkreślić, że aktywność skierowana przeciw komórkom nowotworowym wymaga współpracy różnych typów komórek. Limfocyty Th2 przez IL-4, IL-5, IL-6 wspomagają syntezę swoistych przeciwciał przez limfocyty B, natomiast Th1 i Tc1 przez działanie IFN- $\gamma$  aktywują makrofagi, przez IL-2 aktywują komórki NK. Th1 mogą również bezpośrednio zabijać komórki nowotworowe (TNF- $\beta$ ) lub hamować ich proliferację (interferony, TNF- $\beta$ ). Cytokiny spełniają, zatem bardzo ważną rolę w zjawiskach odporności przeciwnowotworowej. Do tej grupy zaliczane są interleukiny (IL), interferony (IFN- $\alpha,\beta$ ), czynniki martwicy nowotworu (TNF- $\alpha,\beta$ ) oraz czynniki wzrostu

(GM-CSF). Znaczenie tych czynników w onkologii klinicznej opiera się na ich własnościach modyfikowania odpowiedzi immunologicznej. W chwili obecnej największe nadzieje budzi terapia skojarzona z zastosowaniem cytokin: IL-2, a także IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, IFN oraz TNF.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABDEL-LATIF MM, O'RIORDAN JM, RAVI N, KELLEHER D, REYNOLDS JV. Activated nuclear factor-kappa B and cytokine profiles in the esophagus parallel tumor regression following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Dis Esophagus* 2005; **18**(4): 246–252.
- [2] ABREU MT, ARNOLD ET, THOMAS LS. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial. *J Biol Chem* 2002; **277** (23): 20431–20436.
- [3] AGGARWAL BB. Apoptosis and nuclear factor –  $\kappa$ B: a tale of association and dissociation. *Biochem Pharmacol* 2000; **60**: 1033–1038.
- [4] AKIRA SJ. *Biol Chem* 2003; **278**: 38105–38110.
- [5] ANDERSON KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 13–18.
- [6] ASHKENZAI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; **281**: 1305–1310.
- [7] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 1996; **87**: 13–18.
- [8] BAEUERLE PA, HENKEL T. Function and activation of NF $\kappa$ B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1994; **12**: 141–146.
- [9] BAETZ A, FREY M, HEEG K. Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins Indirectly Regulate Toll-like Receptors Signaling in Innate Immune Cells. *J Biol Chem* 2004; **279**, 52: 54708–54713.
- [10] BALDWIN Jr AS. The NF $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 1996; **14**: 649–654.
- [11] BARGOU RC, LENG C, KRAPPMANN D. High-level nuclear NF $\kappa$ B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Stenberg cells. *Blood* 1996; **87**: 4340–4345.
- [12] BARKETT M, GILMORE TD. Control of apoptosis by Rel/NF $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6910–6915.
- [13] BARTEK J, BARTKOVA J, LUKAS J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res* 1997; **23**: 1–6.
- [14] BEUTLER B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 20–25.
- [15] BISWAS DK, CRUS AP, GANSBERGER E. Epidermal growth factor-induced nuclear factor  $\kappa$ B activation: a major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8542–8547.
- [16] BOLAND MP, FOSTER SJ, O'NEIL LAJ. Danarubicin activates NF $\kappa$ B and induces NF $\kappa$ B-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12952–12957.
- [17] CHAUDHARY PM, EBY MT, JASMIN A. Activation of the NF $\kappa$ B pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* 2000; **19**: 4451–4556.
- [18] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X. New Insights into the role of Nuclear Factor- $\kappa$ B in Cell Growth Regulation. *Am J Pathol* 2001; **159**: 387–393.
- [19] CHEN F, CASTRANOVA V, SHI X. New Insights into the role of Nuclear Factor- $\kappa$ B a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; **45**: 7–15.
- [20] CHINNAIYAN AM, O'ROURKE K, LANE BR. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 1997; **175**: 1122–1127.
- [21] CHOW JC, YOUNG DT, GOLENBOCK W. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; **174**: 10689–10693.
- [22] CHUANG T, ULEVITH RJ. *Eur Cytokine Netw* 2000; **11**: 372–375.
- [23] CLURMAN BE, GROUDINE M. The CDKN2A tumor-suppressor gene – a tale of two proteins. *N Engl J Med* 1998; **338**: 910–915.

- [24] CORDON-CARDO C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; **147**: 545–150.
- [25] COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Robbins Pathologic Basis of Disease. W.B. Saunders Company, wyd. 6, New York: 1998.
- [26] DAHL AM, KLEIN C, ANDRES PG. Expression of Bcl-XL restores cell survival, but not proliferation of effector differentiation, in CD28-deficient T lymphocytes. *J Exp Med* 2000; **191**: 2031–1035.
- [27] DARZYNKIEWICZ Z, GONG J, JUAN G. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry* 1996; **25**: 1–7.
- [28] DEPTALA A, BEDNER E, GORCZYCA W. Simple assay of activation of nuclear factor kappa B (NFκB) by laser scanning cytometry (LSC). *Cytometry* 1998; **33**: 376–381.
- [29] DONNELLAN R, CHETTY R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol Mol Patol* 1998; **51**: 1–7.
- [30] GABRIEL A, NAMYSŁOWSKI G, ZIÓŁKOWSKI A, MORAWSKI K, URBANIEC P. Porównanie przydatności stopnia zróżnicowania histologicznego G i zaawansowania nowotworu w froncie guza w przewidywaniu czasu przeżycia i wznowy u chorych z rakiem krtani. *Otolaryngol Pol* 1997; **28**, 51: 188–193.
- [31] GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB. NFκB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Ann Rev Immunol* 1998; **16**: 225–230.
- [32] GILLET CE, BARNES DM. Cell cycle. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1998; **51**: 310–316.
- [33] GILLET CE, MILES DW, RYDER K. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2001; **193**: 433–438.
- [34] GILMORE TD, KOEDOOD M, PIFFAT KA. Rel/NF-κB/IκB proteins and cancer. *Oncogene* 1996; **13**: 1367–1374.
- [35] GREEK DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1315.
- [36] GUROVA KV, HILL JE, GUO C, PROKVOLIT A, BURDELYA LG, SAMOYLOVA E, KHODYAKOVA AV, GANAPATHI R, GANAPATHI M, TARAROVA ND, BOSYKH D, LVOVSKIY D, WEBB TR, STARK GR, GUDKOV AV. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kappaB-dependent mechanism of p53 suppression in tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Nov **29**;102(48):17448–17453.
- [37] GUTTRIDE DC, ALBANESE C, REUTHER JY. NFκB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5785–5790.
- [38] HINZ M, KRAPPMANN D, EICHTEN A. NFκB function in growth control: Regulation of Cyclin D1 expression and G0/G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 2690–2695.
- [39] HIRAMA T, KOEFLER HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; **86**: 841–846.
- [40] HOCKENBERRY DM. Bcl-2 in cancer, development and apoptosis. *J Cell Sci* 1995; **18**: 51–56.
- [41] HOSHINO K, TAKEUHI O, KAWAI T. Toll-like receptor 4 (TLR4-) deficient mice are hyporesponsive to lipopolisaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; **162**: 3749–3754.
- [42] HSU SC, GAVRILIN MA, LEE HH. NFκB-dependent Fas ligand expression. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 2948–2954.
- [43] HUNTER T, PINES J. Cyclins and cancer. *Cell* 1992; **66**: 441–446.
- [44] HUNTER T. Braking the cycle. *Cell* 1993; **75**: 839–845.
- [45] ITO N, NAKAMURA H, TANAKA Y, OHGIS. Analysis of T Helper Type 1 and 2 Cells and T Cytotoxic Type 1 and 2 Cells by Intracellular Cytokine Detection with Flow Cytometry. *Cancer* 1999; **1**, 85, 11: 2359–2364.
- [46] IVANOV VN, LEE RK, PODACK ER. Regulation of Fas-dependent activation induced T cell apoptosis by cAMP signaling: a potential role for transcription factor NFκB. *Oncogene* 1997; **14**: 2455–2460.
- [47] JANEWAY CA, METZHITOV R. Lipoproteins take their toll on the host. *Curr Opin Immunol* 1999; **9**: 879–883.
- [48] JI GZ, WANG XH, MIAO L, LIU Z, ZHANG P, ZHANG FM, YANG JB. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006 Jan **28**;12(4): 644–648.
- [49] JIANG Q, MATSUZAKI Y, LI K, UITTO J. Transcriptional regulation and characterization of the promoter region of the human ABCC6 gene. *J Invest Dermatol* 2006 Feb; **126**(2): 325–335.
- [50] JOYCE D, BOUZAHZAH B, FU M. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor κB-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25245–25250.
- [51] JURGENSMEIER JM, XIE Z, DEVERAUX Q. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 4997–4983.
- [52] Karin M, BEN-NERIAH Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Ann Rev Immunol* 2000; **18**: 621–627.
- [53] KASIBHATLA S, BRUNNER T, GENESTIER L. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NFκB and AP-1. *Mol Cell* 1998; **1**: 543–548.

- [54] KAUR S, WANG F, VENKATRAMAN M, ARSURA M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) through ubiquitin-mediated proteosomal degradation of the TGF-beta1-activated kinase 1 (TAK1). *J Biol Chem* 2005 Nov 18; **280**(46): 38599–38608
- [55] KOPP EE. ESCIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 1999; **13**: 2059–2064.
- [56] KOWALSKI M. [red.] Immunologia kliniczna cz. I. Immunologia ogólna. *Medicon* 2002: 1–27.
- [57] KUMAR S. The Bcl-2 family of proteins and activation of the ICE-CES-3 family of proteases: a balancing act in apoptosis? *Cell Death Diff* 1997; **4**: 2–7.
- [58] KUWANA T, SMITH JJ, MUZIO M. Apoptosis induction by caspase-8 in amplified through mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* 1998; **273**: 1689–1693.
- [59] LaCASSE EC, BAIRD S, KORNELUK RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; **17**: 3247–3252.
- [60] LATINIS KM, NORIAN LA, ELIASON SL. Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31427–31435.
- [61] LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S. Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994; **371**: 346–351.
- [62] LEVINE AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323–328.
- [63] LI X, GONG Z, LI H. Study on Toll-like receptors expression and cytokines production induced by bacillus Calmette-Guerin in human bladder cancer cell. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2004; **42** (3): 177–183.
- [64] LIU L, KWAK YT, BEX F. DNA-dependent protein kinase phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  regulates NF $\kappa$ B DNA binding properties. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 4221–4229.
- [65] LUNDBERG AS, WEINBERG RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; **35**: 531–536.
- [66] MARZO I, SUSIN SA, PETIT PX. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett* 1998; **427**: 198–193.
- [67] MATSUGUHI T, TAKAGI K, MUSIKACHAROEN J. *Blood* 2000; **95**: 1378–1383.
- [68] HSU SC, GAVRILIN MA, LEE HH. NF $\kappa$ B-dependent Fas ligand expression. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 2948–2954.
- [69] MENZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adoptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394–397.
- [70] MUKHOPADHYAY T, ROTH JA, MAXWELL SA. Altered expression of the p50 subunit of the NF $\kappa$ B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1995; **11**: 999–1004.
- [71] MUZIO M, BOSISIO D, POLENTARUTTI N. Differential Expression and Regulation of Toll-like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cell. *J Immunol* 2000; **164**: 5998–5993.
- [72] MUZIO M, POLENTARUTTI N, BOSISIO D. Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 450–455.
- [73] NAKAYAMA H, IKEBE T, SHIRASUNA K. Effects of I $\kappa$ B kinase alpha on the differentiation of squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2005 Aug; **41**(7): 729–737.
- [74] NINOMIYA-TSUJI J. The kinase TAK1 can activate the NIK-I $\kappa$ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999; **398**: 252–257.
- [75] NISHIMURA M, NAITO S. Tissue-specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-like Receptors and Related Genes. *Biol Pharm Bull* 2005; **28** (5): 886–871.
- [76] ONDREY NG, DONG G, SUNWOO J. Constitutive Activation of Transcription Factors NF $\kappa$ B, AP-1 and NF-IL6 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines that Express Pro-inflammatory Pro-, angiogenic Cytokines. *Molecular Carcinogenesis* 1999; **26**: 119–126.
- [77] O'NEIL LA, GREENE C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in the mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 650–655.
- [78] PAHL HL. Activators and target genes of Rel/NF $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999; **18**: 6853–6858.
- [79] PALLARES J, MARTINEZ-GUITARTE JL, DOLCET X, LLOBET D, RUE M, PALACIOS J, PRAT J, MATIAS-GUIU X. Abnormalities in the NF- $\kappa$ B family and related proteins in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2004 Dec; **204**(5): 569–577.
- [80] PALOMBELLA VJ, RANDO OJ, GOLDBERG AL. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF $\kappa$ B. *Cell* 1994; **78**: 773–778.
- [81] PERKINS N.D, FELZIEN LK, BETTS JC. Regulation of NF $\kappa$ B by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 1997; **275**: 523–528.

- [82] POLTRAK A, HE X, SMIRNOVA I. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in the Tlr4 gene. *Science* 1998; **282**: 2085–2090.
- [83] QIAO L, ZHANG H, YU J, FRANCISCO R, DENT P, EBERT MP, ROCKEN C, FARRELL G. Constitutive activation of NF-kappaB in human hepatocellular carcinoma: evidence of a cytoprotective role. *Hum Gene Ther* 2006 Mar; **17**(3): 280–290.
- [84] REED JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998; **17**: 3225–3229.
- [85] REED JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; **124**: 1–7.
- [86] RIVERA-WALSH I, CVIJK ME, XIAO G. The NFkB signaling pathway is not required for Fas ligand gene induction but mediates protection from activation-induced cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25222–25228.
- [87] RODRIGUEZ-PINILLA M, RODRIGUEZ-PERALTO JL, HITT R, SANCHEZ JJ, SANCHEZ-VERDE L, ALAMEDA F, BALLESTIN C, SANCHEZ-CESPEDES M. Beta-Catenin, NF-kappaB and FAS protein expression are independent events in head and neck cancer: study of their association with clinical parameters. *Cancer Lett* 2005 Dec 8; **230**(1): 141–148.
- [88] RYAN KM, ERNST MK, RICE NR. Role of NFkB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 2000; **404**: 892–896.
- [89] SHEU B, HSU S, HO H, LIN R. Reversed CD4/CD8 Ratios of Tumor-Infiltrating Lymphocytes are Correlated with the Progression of Human Cervical Carcinoma. *Cancer* 1999; **86**, 8: 1537–1542.
- [90] SHEU B, LIN R, LIEN H, HO H. Predominant Th2/Tc2 Polarity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Human Cervical Cancer. *J Immunol* 2001; **167**: 2972–2976.
- [91] SHERR CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; **73**: 1059–1063.
- [92] SIEBENLIST U, FRANZOSO G, BROWN K. Structure, regulation and function of NF-kB. *Ann Rev Cell Biol* 1994; **10**: 405–410.
- [93] SOVAK MA, BELLAS RE, KIM DW. Aberrant nuclear factor kB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2952–2957.
- [94] SUN J, WIKLUND F, ZHENG SL. Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *J Nat Cancer Inst* 2005; **6**, 97 (7): 525–530.
- [95] TAKAESU G. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1, MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 2000; **5**: 649–653.
- [96] TAKEUCHI O, SATO S, HORIUCHI T. *Hemin Immunol* 2004; **16**: 3–9.
- [97] TAKEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; **11**: 443–449.
- [98] UNDERHILL DM, OZINSKY A, HAJJAR A. The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; **401**: 811–815.
- [99] VERHAGEN AM, EKERT PG, PAKUSH M. Identification of Diablo, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; **102**: 43–47.
- [100] WADGAONKAR R, PHELPS KM, HAQUE Z. CREB-binding protein is nuclear integrator of nuclear factor kB and p53 signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1879–1883.
- [101] WANG CY, MAYO MW, KORNELUK RG. NFkB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and cIAP1 and cIAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; **281**: 1680–1685.
- [102] WADGAONKAR R, PHELPS KM, HAQUE Z. CREB-binding protein is nuclear integrator of nuclear factor kB and p53 signaling. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1879–1883.
- [103] WOLTER KG, HSU YT, SMITH CL. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; **139**: 1281–1286.
- [104] WYLELI AH, ARENDS MJ, MORRIS RG. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Seminars Immunol* 1992; **4**: 389–393.
- [105] ZHANG G, GHOSH S. Toll-like receptor-mediated NF-kB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001; **107**, 1: 13–17.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 22.02.2006 r.

Przyjęto: 06.08.2006 r.

ul. Wandurskiego 3a m.22, 93-218 Łódź

email: katarzyna.starska@op.pl