

Received: 2004.11.24
Accepted: 2005.02.22
Published: 2005.04.11

FLIP – przeciwnik, który może przegrać pojedynek w walce z czynnikami swoiście hamującymi translację*

FLIP – an enemy which might lose the battle against the specific inhibitors of translation

Beata Pająk, Arkadiusz Orzechowski

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Streszczenie

Oporność immunologiczna oraz lekooporność są następstwem złożonych zjawisk molekularnych, które rozwinęły się i utrwaliły w komórkach nowotworowych w czasie ewolucji. W szczególności uwagę zwracają procesy chroniące komórki nowotworowe przed cytotoksycznymi skutkami oddziaływania ligandów śmierci (TNF- α , CD95/APO-1/FasL, TRAIL). Odkryte pod koniec lat dziewięćdziesiątych ub.w. białko FLIP (Casper/iFLICE/FLAME-1/CASH/CLARP/MRIT/uzurpina) można wskazać jako głównego winowajcę tzw. „ucieczki immunologicznej” wszędzie tam, gdzie dochodzi do uformowania się kompleksu DISC. Proces blokowania przez FLIP aktywacji kaspazy 8 do postaci zapoczątkowującej apoptozę zewnątrzpochodną i w końcu śmierć komórek nie jest wyłącznie cechą komórek nowotworowych. Okazuje się, że znaleźć można liczne przykłady zaangażowania FLIP w procesy regulacyjne o charakterze fizjologicznym jak i zapalnym. Niezależnie od rodzaju komórek, wspólnym następstwem niekorzystnego działania FLIP na sygnał śmierci jest zwiększenie przeżywalności komórek i podwyższenie oporności na TNF- α i inne ligandy śmierci. W przypadku receptora TNF- α R1, przyłączając się do białka FADD należącego do kompleksu DISC, FLIP skierowuje sygnał śmierci na sygnał przeżycia z następczą aktywacją NF- κ B. NF- κ B po uaktywnieniu przemieszcza się do jądra komórkowego i transaktywuje wiele genów antyapoptotycznych, w tym gen *flip* prowadząc do zwiększenia ekspresji białka FLIP. To, co wyróżnia FLIP – w porównaniu z białkami antyapoptotycznymi i sygnalozomą receptorów śmierci – to duża wrażliwość na zahamowanie translacji przez inhibitory metaboliczne. Działanie takie w szczególności wykazuje cykloheksimid lub bisindolylmaleimid, z których każdy w warunkach *in vitro* zastosowany w małych nietoksycznych stężeniach całkowicie blokuje ekspresję białka FLIP i uwrażliwia komórki nowotworowe na ligandy śmierci. Obniżona przeżywalność/wysoka śmiertelność komórek nowotworowych w tym najbardziej złośliwych (czerniaki) oczekiwana po zastosowaniu swoistych inhibitorów translacji białka FLIP skłania do poszukiwań czynników pochodzenia syntetycznego lub naturalnego, które mogłyby w przyszłości skutecznie wspomóc leczenie śmiertelnych chorób, u podłoża których leży zwiększona ekspresja białka FLIP.

Słowa kluczowe:

nowotwory • FLIP • TNF- α • FasL • TRAIL • NF- κ B • cykloheksimid

Summary

Immune- and multidrug-resistance in cancer cells resulted from complex molecular phenomena which developed and were preserved in cancer cells during evolution. Particular interest has

Praca jest dedykowana naszej Koleżance dr Bożenie Bałasińskiej, której Mama zmarła w następstwie powikłań, jakie wystąpiły w trakcie leczenia choroby nowotworowej.

* Artykuł powstał w ramach grantu KBN nr P06T 05422.

been focused on the mechanisms that protect neoplastic cells from deletion by the cytotoxic effects induced by death ligands (TNF- α , CD95/APO-1/FasL, TRAIL). The intracellular protein FLIP (Casper/iFLICE/FLAME-1/CASH/CLARP/MRIT/usurpin), discovered at the end of the 1990's, is thought to be the main causal factor of "immune escape" whenever the death signal is to be initiated by the oligomerization of DISC. However, the FLIP-induced blockade of caspase-8 causing caspase-8 to remain in the inactive form and thus unable to trigger extrinsic apoptosis, does not seem to be unique to cancer cells. Numerous examples of how FLIP contributes to regulatory processes of physiological or inflammatory importance have also been described. Regardless of cell type, the final common path of FLIP's negative influence on death signals results in both elevated viability and resistance to TNF- α and other death ligands. With regard to TNF- α R1, FLIP binds to FADD when DISC is formed and redirects the death signal to cell survival, with subsequent activation of NF- κ B. In consequence, NF- κ B can translocate to the nucleus where it transactivates several antiapoptotic genes, including *flip*, which leads to increased expression of FLIP protein. FLIP is distinct from other antiapoptotic or death receptor signalosome proteins by its high susceptibility to the retarded translation induced by metabolic inhibitors. In *in vitro* studies, such activity is exerted by cycloheximide or bisindolylmaleimide, either of which, at a low, non-toxic concentration, totally abrogates FLIP protein expression or, in turn, sensitizes cancer cells to death ligands. The assumed reduced viability/elevated mortality of cancer cells, including the most malicious (e.g. melanomas), upon treatment with specific metabolic inhibitors of FLIP makes feasible the search for synthetic or natural factors that may promise more efficacious treatment of deadly diseases where basal FLIP protein is overexpressed.

Key words: cancer • FLIP • TNF- α • FasL • TRAIL • NF- κ B 8 cycloheximide

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7204.pdf

Word count: 4550

Tables: –

Figures: 1

References: 53

Adres autora: dr hab. Arkadiusz Orzechowski, profesor SGGW, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, e-mail: orzechowski@alpha.sggw.waw.pl

Wykaz skrótów: **Ab-DR** – przeciwciała antyreceptory śmierci; **AD** – aktynomycyna D; **AICD** – śmierć wywołana przez aktywację (activation-induced cell death); **APO-1/FasL/CD95L** – ligand Fas; **Bcl-2** – białko onkogenu białaczki 2 limfocytów B (oncogene B cell leukemia 2); **Bcl-2/A1** – białko onkogenu białaczki 2 limfocytów B; podtyp A1 (oncogene B cell leukemia 2, A1 isoform); **BIS** – bisindolylmaleimid; **CD40** – receptor błonowy dla liganda CD40 (cluster of differentiation for CD40L); **CD4+** – rodzaj antygenu powierzchniowego limfocytów T; **c-FLIP** – białko FLIP komórkowe (cellular FLIP); **c-IAP1, c-IAP2** – komórkowe inhibitory apoptozy (cellular inhibitors of apoptosis proteins 1, 2); **CHX** – cykloheksimid; **cPKC** – klasyczne kinazy białkowe C; **CPP32** – kaspaza 3; **DC** – komórki dendrytyczne (dendritic cells); **DD** – domena śmierci (death domain); **DED** – wykonawcza domena śmierci (death execution domain); **DISC** – kompleks sygnałowy zapoczątkowujący śmierć (death initiated signaling complex); **DR3, DR4, DR5, DR6** – receptory śmierci (death receptors); **eCG** – gonadotropina kosmówkowa klaczy (equine chorionic gonadotropin); **ERK1/2** – kinazy regulowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe (extracellular signal regulated kinases); **FADD** – związane z Fas białko adaptorowe z domeną śmierci (Fas-associated death domain-containing protein); **Fas** – receptor liganda Fas; **FLICE** – kaspaza 8 (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme); **FLIP, FLIP(L), FLIP(S)** – białka hamujące FLICE, postać natywna, długa lub krótka (FLICE-inhibitory proteins); **GM-CSF** – czynnik wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony stimulating factor); **I κ B** – podjednostka inhibująca NF- κ B (inhibitory subunit of NF- κ B); **IKK γ** – kinaza I κ B (I κ B kinase); **IL-1 β** – prozapalna interleukina 1 beta; **IL-2, IL-6, IL-10** – interleukiny; **LPS** – lipopolisacharyd; **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (mitogen activated protein kinases); **M-CSF** – czynnik wzrostu kolonii makrofagów (macrophage colony stimulating factor); **MEK** – kinaza MAPK (MAPK kinase, MAPKK); **MHC** – główny kompleks zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **mTNF- α** – czynnik martwicy nowotworu (postać transbłonowa) (membrane-bound tumor necrosis factor-alpha); **NF- κ B** – czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B); **RAIDD** – białko wzmacniające zawierające domenę śmierci i wykazujące powinowactwo do receptora TNF- α (TNF- α -receptor-associated interacting death domain-containing protein);

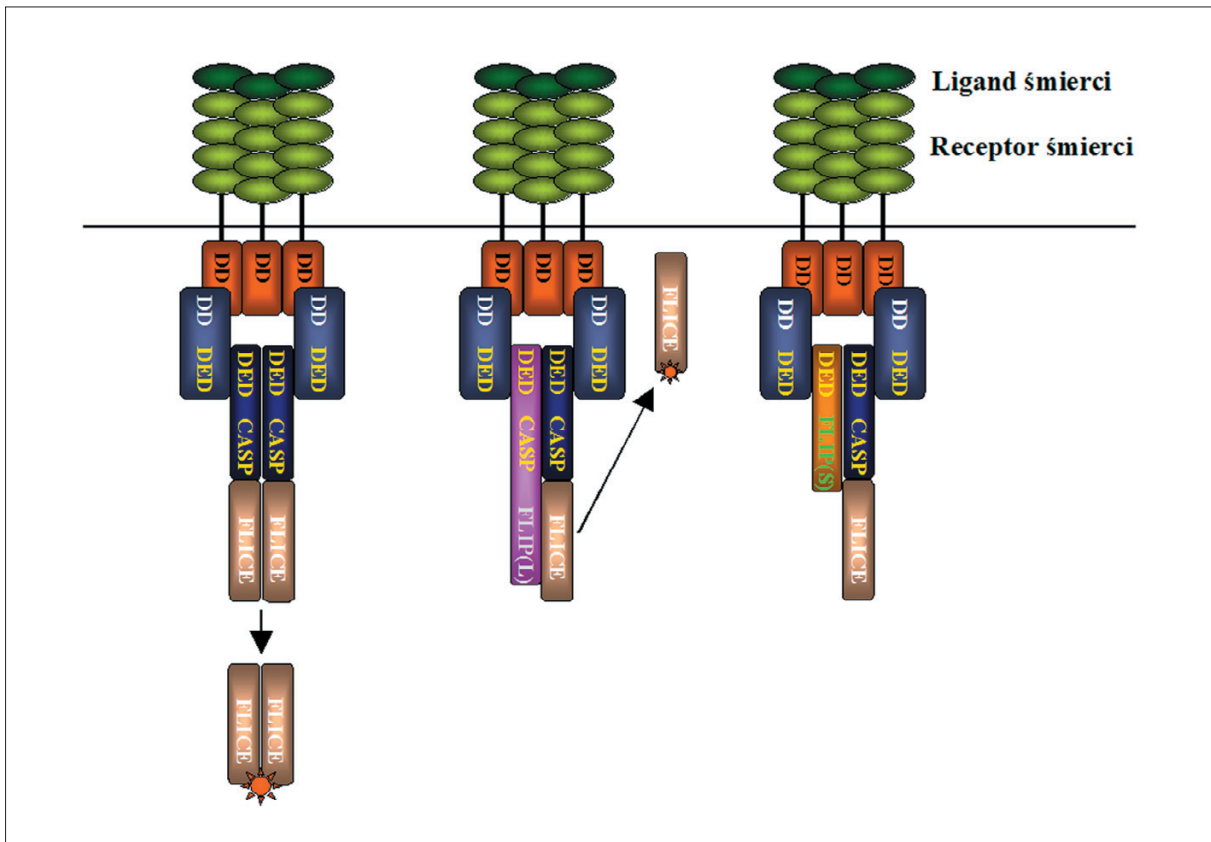
RIP – białko wykazujące powinowactwo do receptora TNF- α (TNF- α -receptor interacting protein); **SODD** – inhibitor białek z domeną śmierci (silencer of death domains); **Th1** – limfocyt T pomocniczy (T cell helper); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu (tumour necrosis factor-alpha); **TNF- α R1** i **TNF- α R2** – receptory błonowe ligandu TNF- α ; **TRADD** – białko wzmacniające z powinowactwem do domeny śmierci receptora TNF- α (TNF- α receptor associated death domain); **TRAF2** – białko adaptorowe typ 2 związane z receptorem TNF- α (TNF- α receptor associated factor 2); **TRAIL** – ligand śmierci związany z TNF- α (TNF- α -related apoptosis-inducing ligand); **TRANCE** – indukowana aktywacją cytokina związana z TNF- α (TNF- α -related activation-induced cytokine); **TRANCE R** – receptor dla liganda TRANCE; **v-FLIP** – białko FLIP wirusowe (viral FLIP); **zVAD.fmk** – keton benzyl-oksy-karbonyl-Val-Ala-Asp-fluorometylu

c-FLIP – PRZEDSTAWICIEL NOWEJ GRUPY BIAŁEK ANTYAPOPTOTYCZNYCH HAMUJĄCYCH APOPTOZĘ ZEWNĄTRZPOCHODNĄ

Obecnie przeważa pogląd, że niedostateczna eliminacja komórek nieprawidłowych leży u podstaw wielu chorób proliferacyjnych, w tym również chorób nowotworowych. Na błonie komórkowej niemal wszystkich komórek stwierdzić można ekspresję receptorów śmierci należących do rodziny TNFR (TNF- α R1, Fas/Apo-1/CD95, TRAMP/WSL-1/DR3/Apo-3/LARD, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5/Apo-2/TRICK-2/KILLER czy DR6), których aktywacja przez odpowiednie ligandy śmierci (TNF- α , FasL, TRAIL) prowadzi do wywołania apoptozy zewnątrzpocho-
dnej. Na straży bezpieczeństwa zapewniającego równowagę pomiędzy ilością komórek usuniętych i pozostawionych przy życiu stoi układ immunologiczny i obronny. Warunkiem zapoczątkowania apoptozy zależnej od receptorów śmierci, ale niekoniecznie kończącej się śmiercią jest powstanie kompleksu DISC. Według teorii klasycznej po przyłączeniu trimery liganda do receptora śmierci dochodzi do oligomeryzacji tego ostatniego i przyłączenia się za pośrednictwem obecnych po stronie wewnątrzcytoplazmatycznej domen DD jednego lub więcej białek adaptorowych, takich jak FADD, TRADD, RIP lub RAIDD [2]. Ostatnio stwierdzono, że receptory śmierci mogą oligomeryzować i indukować powstanie wielocząsteczkowego kompleksu DISC bez udziału swego liganda [4], ale procesowi temu zapobiega białko SODD, które hamuje spontaniczną oligomeryzację receptorów śmierci [43]. W przypadku FADD po przyłączeniu przez domenę DD do wolnej wewnątrzcytoplazmatycznej domeny DED tego białka, za pośrednictwem własnej domeny DED, może się przyłączyć prokaspaza 8 (FLICE lub prokaspaza 10), która podlega homotypowej dimeryzacji i pierwszej autokatalitycznej aktywacji proteolitycznej do częściowo czynnej proteazy (powstaje fragment p43 lub p41, natomiast zostaje uwolniony fragment p10). Aby powstała w pełni aktywna proteaza cysteinowa swoista dla asparaginanu, zdolna do translokacji i uaktywnienia różnych substratów, w tym kaspaz wykonawczych apoptozy (kaspazy 3, 6, i 7) dalsza aktywacja przebiega jako transkatalityczna aktywacja proteolityczna. Pod względem strukturalnym białka z rodziny FLIP (c-FLIP i v-FLIP) i prokaspaza 8 są do siebie uderzająco podobne, mają bowiem dwie domeny DED. Białko c-FLIP może zatem przyłączać się do odpowiedniej domeny DED białka FADD blokując do niego dostęp i uniemożliwiając prokaspazie 8 proteolityczną autoaktywację [11]. Prokaspaza 8 ma bowiem czynną katalitycznie domenę kaspazową, która składa się z podjednostek p20(p18) i p10 niezbędnych do utworzenia czynnego heterotetrameru złożonego z dwóch cząsteczek enzymu (p20/p10)2 [9].

Okazuje się, że białko FLIP w komórkach (c-FLIP) występuje w dwóch postaciach (split variants) – pełnowymiarowej, jako tzw. FLIP(L) (55 kDa) zawierającej dwie domeny DED i katalitycznie zmienioną przez liczne mutacje domenę podobną do kaspazy oraz w postaci krótkiej FLIP(S) (26 kDa) z dwiema domenami DED. Obie postaci podlegają rekrutacji do kompleksu DISC i tworzą heterodimery z prokaspazą 8, przy czym FLIP(S) całkowicie blokuje aktywację prokaspazy 8 (brakuje domeny kaspazowej), zaś FLIP(L) pozwala na pierwszą, częściową aktywację tej proteazy do postaci, która jednak nie jest zdolna do wywołania apoptozy, ponieważ w połączeniu z FLIP(L) nie może ulec transkatalitycznej aktywacji [26] (ryc. 1).

Okazuje się, że FLIP(L), będąc częściowym aktywatorem kaspazy 8, gdy jest z nią połączony sam ulega podziałowi w pozycji Asp-376 na dwa fragmenty: N-terminalny FLIP(p43) i C-terminalny FLIP(p12), przy czym ten ostatni fragment ulega uwolnieniu [32]. Taki częściowo przetworzony FLIP(p43) oraz nieprzetworzony FLIP(L) tworzą heterodimery z kaspazą 8, powodują jej sekwestrację w pobliżu receptora, nie pozwalają na pełną aktywację i w konsekwencji nie może ona działać na substraty w cytosolu (np. kaspazę 3), ale może przetwarzać substraty obecne w pobliżu DISC np. RIP. Skutkiem częściowej oraz ograniczonej lokalnie do okolicy receptora aktywności kaspazy 8 może być hamowanie aktywności NF- κ B w wyniku przekształcania białek TRAF i RIP w postaci nieczynne funkcjonalnie [32]. Zatem, pomimo że w różny sposób, w obydwu przypadkach przewagi ilościowej FLIP (S i/lub L) nad prokaspazą 8 ostatecznie dochodzi do zablokowania apoptozy [26]. Zasadnicze różnice w mechanizmie działania polegają na tym, iż FLIP(L) aktywując częściowo kaspazę 8 absorbuje ją jako substrat i partner heterodimeru, zatrzymuje w pobliżu błony komórkowej i nie pozwala na dotarcie do pozostałych ważnych substratów w cytosolu (kaspaz wykonawczych: kaspazy 3, 6 i 7 oraz polimerazy ADP-rybozy) [10, 29], podczas gdy FLIP(S) po prostu całkowicie uniemożliwia autoaktywację przyłączonej prokaspazy 8. Ostatecznie, niezależnie od rodzaju białka, ilościowa przewaga FLIP nad kaspazą 8 uniemożliwia tej ostatniej zapoczątkowanie wykonawczej fazy apoptozy [41]. Badania molekularne N-terminalnego fragmentu c-FLIP(L)(p43) wykazały, że ma on dodatkowo zdolność funkcjonalnego oddziaływania na białko adaptorowe TRAF-2, decydując pośrednio o aktywacji NF- κ B. Białka FLIP (c-FLIP, v-FLIP), a także inne białka z dwiema domenami DED (FADD, kaspaza 8, kaspaza 10) wykazują także aktywność transkrypcyjną, która ulega represji pod wpływem inhibitorów metabolicznych, takich jak CHX [46]. To oznacza, że mechanizm ochronnego działania FLIP na komórki nie ogranicza się tylko do hamo-



Ryc. 1. Schemat hamowania aktywacji kaspazy 8 (FLICE) przez różne postaci białka FLIP. Od strony lewej do prawej: 1 – autokatalityczne i transkatalityczne przekształcenie dimeru FLICE do aktywnego heterotetrameru przy braku lub niedoborze białka FLIP; 2 – częściowe hamowanie aktywacji FLICE przez FLIP(L) z przekształceniem FLICE bez następczej transkatalitycznej aktywacji; 3 – całkowite zablokowanie aktywacji FLICE przez FLIP(S). Szczegóły procesu aktywacji FLICE i jej hamowania przez FLIP w pracy

wania apoptozy, ale ze względu na modulację aktywności NF- κ B i MAPK (ERK1/2) może – w zależności od typu komórki – stymulować (komórki Jurkat) [23] lub hamować proliferację komórek [18]. Mechanizmy molekularne działania FLIP mają zatem złożony charakter. FLIP oprócz hamowania szlaku śmierci zależnego od kompleksu DISC dodatkowo zwiększa przeżywalność komórek, albowiem aktywuje NF- κ B, który jest czynnikiem transkrypcyjnym o silnym działaniu antyapoptotycznym. Pod jego wpływem aktywacji ulegają m.in. geny takich białek jak IAP-1 i IAP-2, Bcl-2/A1, TRAF-1 i TRAF-2 [5,47,53], a co najciekawsze również gen *flip* [25,31]. Aktywność toru sygnałowego NF- κ B podlega regulacji za pośrednictwem białka inhibującego I κ B, które po ufosforylowaniu przez kinazę IKK- γ , odłączeniu, ubikwitinacji i proteosomalnej degradacji nie może już dalej zapobiegać przemieszczaniu się czynnika NF- κ B do jądra komórkowego i NF- κ B może rozwinąć aktywność transkrypcyjną [13]. W przypadku receptora TNF- α R1 niezbędną rolę pomocniczą w aktywacji NF- κ B spełniają dwa białka adaptorowe: białko TRAF-2, które rekrutuje IKK- γ oraz białko RIP niezbędne do aktywacji kompleksu IKK [7]. Oprócz ważnego elementu docelowego, jakim dla FLIP(L) jest NF- κ B znaleźć można również doniesienia o aktywacji przez FLIP(L) kinaz aktywowanych przez mitogeny (MAPK) typu ERK1/2 przynajmniej w odniesieniu do limfocytów T [22]. Prawdopodobnie aktywacja ERK przebiega pośrednio, w której elementem nadrzędnym jest kinaza cPKC, pobudzająca aktywność

MEK, kinazy nadrzędnej dla ERK [22]. FLIP(L) może zatem odgrywać zasadniczą rolę w skierowaniu apoptogennego sygnału śmierci na sygnał przeżycia (NF- κ B) i proliferacji komórek (ERK). Wydaje się, że ten ostatni efekt jest zależny od typu komórek, albowiem w przebadanych liniach komórek nowotworowych CD95 typu I (formujących kompleks DISC i poddających się uwrażliwieniu na sygnał apoptogenny od CD95, TRAIL lub TNF- α) nie stwierdzono wpływu CHX i AD na rozmiary apoptozy indukowanej przez najsilniejszy znany inhibitor cPKC jakim jest staurosporyna [12]. Ostatecznie w celu potwierdzenia podstawowego znaczenia FLIP dla przetrwania i rozwoju nowotworów przeprowadzono na myszach serię doświadczeń z komórkami nowotworowymi transfekowanymi c-FLIP. W jednym z doświadczeń wykorzystano linię komórek mysiej białaczki MBL2-Fas, którą charakteryzuje duża ekspresja Fas, w drugim linię komórek guza zarodkowego AR6 z małą ekspresją Fas. Do układów kontrolnych zastosowano te same komórki transfekowane pozornie (mock-transfected). U wszystkich myszy po iniekcji komórek transfekowanych c-FLIP rozwinęły się nowotwory, natomiast komórki nowotworowe bez transfekcji c-FLIP zostały u większości zwierząt odrzucone [8,29]. Kiedy doświadczenie powtórzono u myszy atymicznych (nude mice) zarówno z komórek transfekowanych jak i bez transfekcji c-FLIP rozwinęły się nowotwory, potwierdzając ważne znaczenie c-FLIP a nie samego receptora Fas w tumorigenezie. W kolejnym eksperymencie

postanowiono sprawdzić, jak nadekspresja c-FLIP wpływa na rozwój nowotworów z komórek AR6 u myszy z niedoborem perforyny. Okazało się, że nowotwory rozwinęły się w stopniu identycznym z tym jaki wykryto u myszy referencyjnych (wild-type). Taki wynik sugeruje, że o eliminacji wszczepionych komórek nowotworowych CD95 typu I bez reszty decyduje tor śmierci zależny od receptora Fas. Jeszcze ciekawsze obserwacje zebrano z doświadczenia, w którym zweryfikowano znaczenie FLIP w ucieczce immunologicznej przed odpowiedzią komórkową indukowaną przez limfocyty T cytotoksyczne. Otóż w warunkach *in vitro* nadekspresja FLIP nie chroni komórek nowotworowych przed apoptozą indukowaną przez limfocyty T cytotoksyczne wykorzystujące do wywołania lizy układ perforyny/granzym B [23]. Okazało się jednak, że w warunkach *in vivo* nadekspresja FLIP skutecznie uchroniła komórki nowotworowe (MBL2-Fas i AR6) przed mechanizmem indukowania apoptozy przez perforyny/granzym B [29]. Zatem wbrew powszechnemu mniemaniu, że mechanizm ochronnego działania FLIP ogranicza się do szlaków sygnału ligandów śmierci wydaje się, że FLIP może pełnić jeszcze inne funkcje, które jak widać poszerzają zakres przypadków ucieczki immunologicznej komórek z nadekspresją tego białka.

FIZJOLOGICZNA ROLA FLIP

Jak już wspomniano, jednym z warunków prawidłowego funkcjonowania organizmu jest zdolność układu immunologicznego do rozpoznawania i eliminacji komórek nieprawidłowych. Nie mniej ważna jest jednak ochrona komórek, których obecność i prawidłowe funkcjonowanie warunkuje przebieg wielu procesów życiowych. Dlatego też kontrola apoptozy zewnątrzpochodnej indukowanej przez naturalne ligandy śmierci: TNF- α , TRAIL i FasL okazuje się niezbędna do zachowania homeostazy organizmu. Zaburzenie delikatnej równowagi pomiędzy śmiercią a przeżyciem i brak kontroli nad przebiegiem apoptozy z jednej strony może prowadzić do nadmiernego nasilenia zjawiska śmierci komórek będącego podłożem autoimmunologicznych chorób zanikowych, z drugiej zaś niedostateczna stymulacja śmierci prowadzi do rozwoju chorób proliferacyjnych, w tym nowotworów. Dlatego też w komórkach stale lub okresowo i na różnym poziomie ekspresji są obecne czynniki decydujące o ich śmierci bądź przetrwaniu. Zaliczamy do nich białko FLIP, które – jak wykazano – ma swój udział m.in. w embriogenezie, dojrzewaniu komórek rozrodczych oraz rozwoju układu immunologicznego.

Embriogeneza jest procesem, w którym apoptoza komórek ma ogromne znaczenie. W tworzącym się zarodku szybko powstaje wiele nowych komórek, które pozostają niewrażliwe na sygnały apoptogenne, podczas gdy w tym samym czasie inne ulegają eliminacji. Badania prowadzone przez Yeh i wsp. [51] wykazały, że za ochronę powstających komórek przed sygnałami śmierci przede wszystkim odpowiada FLIP. Transgeniczne myszy o genotypie *flip*^{-/-} obumierały około 11 dnia rozwoju, głównie z powodu wad serca. Wyniki te nasunęły przypuszczenie, że FLIP jest niezbędny do prawidłowego rozwoju tego narządu. Fenotyp myszy pozbawionych genu *flip* był identyczny z fenotypem myszy niewykazujących ekspresji kaspazy 8 (*kaspaza 8*^{-/-}) lub FADD (*fadd*^{-/-}) [45, 51]. Wyniki badań nad transgenezą FLIP wskazują, że do prawidłowego rozwo-

ju serca niezbędne jest współdziałanie pomiędzy trzema elementami kompleksu DISC: kaspazą 8, FADD i FLIP. Wydaje się jednak kontrowersyjne czy głównym etapem w rozwoju serca było blokowanie sygnału śmierci czy też współdziałanie tych białek przy jej wywołaniu, gdyż działanie fenotypowe delecji genów było do siebie podobne, a przecież FADD i kaspaza 8 to czynniki warunkujące pomyslny przebieg apoptozy, natomiast FLIP pełni funkcję antyapoptotyczną.

Równie ważną funkcję w procesie rozwoju komórek rozrodczych, a więc procesie o ewolucyjnie priorytetowym znaczeniu spełnia białko FLIP. Białko FLIP jest m.in. zaangażowane w dojrzewanie pęcherzyków Graafa. Xiao i wsp. [50] wykazali, że komórki ziarniste wyizolowane z indukowanego z użyciem eCG dojrzewającego pęcherzyka niedojrzałych płciowo samic szczura są fizjologicznie niewrażliwe na cytotoksyczne działanie TNF- α . Oporność komórek ziarnistych na tę cytokinę jest zdeterminowana wzmożoną ekspresją krótkiej postaci FLIP – FLIP(S), która wzrasta w odpowiedzi na indukcję wywołaną przez działający ligand. Podobnie jak to opisano dla innych typów komórek, w tym ludzkich komórek nabłonka pęcherzykowego jajnika linii OV 2008 [50]. TNF- α aktywuje bowiem czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który pozytywnie reguluje transkrypcję genu *flip*. Znaczenie FLIP(S) dla hamowania indukowanej przez TNF- α apoptozy został potwierdzony poprzez zastosowanie inhibitora syntezy białek – CHX, w obecności którego wrażliwość komórek ziarnistych na TNF- α znacznie wzrosła. Natomiast zastosowanie swoistego antysensownego cDNA, które całkowicie zablokowało ekspresję białka FLIP spowodowało, że komórki ziarniste stały się wrażliwe na apoptogenne oddziaływanie TNF- α bez potrzeby użycia CHX. Udowodniono w ten sposób, że krótka postać FLIP warunkuje przetrwanie komórek ziarnistych niezbędnych do fizjologicznego rozwoju żeńskich komórek rozrodczych. Opisane badania nie wykazały jednak, aby długa postać FLIP- FLIP(L) była zaangażowana w proces ucieczki immunologicznej komórek ziarnistych jajnika. Nie stwierdzono bowiem, aby TNF- α indukował NF- κ B, a ten z kolei, żeby wpływał na ekspresję białka FLIP(L) [50].

Przytoczone przykłady to tylko najbardziej znane spośród wielu, które wyraźnie wskazują na ogromne znaczenie fizjologicznej roli białka FLIP. Trzeba zatem podkreślić, że aktywność FLIP jest niezbędna do prawidłowego rozwoju komórek rozrodczych, a także całego zarodka a nawet płodu. Regulacja apoptozy jest także niezbędnym elementem funkcjonowania w pełni rozwiniętego i dojrzałego organizmu, zwłaszcza jego układu immunologicznego. Najlepiej poznaną funkcją białka FLIP jest jego wszechstronny udział w zachowaniu „homeostazy immunologicznej”. Wykazano bowiem, że FLIP jest obecny zarówno w limfocytach T i B, makrofagach, jak i komórkach dendrytycznych (DC) [38,48]. Regulacja przeżywalności komórek dendrytycznych jest warunkiem utrzymania właściwych proporcji w natężeniu zjawisk, którymi zawiąduje układ odpornościowy. DC pełnią bowiem funkcję modulatorów odpowiedzi immunologicznej. Stąd apoptoza limfocytów T i DC, którą jak się okazuje sterują wzajemne oddziaływania pomiędzy wymienionymi komórkami, jej geny i rozmiary mogą decydować o sprawności działania układu immunologicznego. Dla przykładu apoptoza DC jest

hamowana przez aktywację receptora błonowego CD40. Z kolei indukcja apoptozy w komórkach dendrytycznych i limfocytach T ma złożony charakter i w przypadku gdy wymienione komórki mają z sobą bezpośredni kontakt zapoczątkowanie apoptozy następuje poprzez oddziaływania ligandu TRANCE na swoisty receptor TRANCE-R [49]. Zapoczątkowanie śmierci komórek DC może także zachodzić na skutek ligacji transbłonowego FasL (CD95L) komórek dendrytycznych z transbłonową postacią Fas (CD95), obecną na limfocytach pomocniczych swoistych antygenowo (Th1 CD4+), przy czym eliminacja DC powoduje jednocześnie zahamowanie aktywności Th1 CD4+ [28]. Natomiast Willems i wsp. [48] w doświadczeniu przeprowadzonym na DC wyprowadzonych pozaustrojowo z monocytów zauważyli, że takie komórki potomne nie były zdolne do interakcji z receptorem CD95. Opisane obserwacje potwierdzone zostały w badaniach prowadzonych przez Askhenasy'ego i wsp. [1], którzy wykazali, że tylko niewielki odsetek komórek dendrytycznych pochodzących ze szpiku kostnego i śledziony jest wrażliwy na apoptogenne działanie FasL. Podobnie obserwacje Björcka i wsp. [3] potwierdzają zdolność DC wyizolowanych z krwi pępowinowej do ucieczki immunologicznej. Na podstawie zebranych danych z badań własnych i doniesień innych autorów Willems i wsp. [48] wnioskują, że warunki w jakich zachodzi różnicowanie komórek macierzystych do DC mogą determinować ich wrażliwość na FasL. W szczegółowych badaniach molekularnych wykazali oni, że DC wywodzące się z monocytów swoje przetrwanie i ucieczkę immunologiczną przed ligandami śmierci zawdzięczają podwyższonej ekspresji długiej postaci FLIP(L). Zmniejszenie poziomu białka FLIP pod wpływem CHX lub bisindolylmaleimidu (BIS) i jego pochodnych uwrażliwiło DC na cytotoksyczne działanie FasL. Ponadto wykazano, że ekspresja FLIP(L) była większa w dojrzałych komórkach dendrytycznych, których różnicowanie dodatkowo stymulowano z użyciem LPS. Reasumując, ekspresja c-FLIP ulega podwyższeniu w przebiegu różnicowania komórek obronnych poczynając od monocytów, poprzez makrofagi, a na komórkach dendrytycznych kończąc. Białkiem, które ulega nadekspresji i czyni DC niewrażliwymi na szlak śmierci indukowany przez FasL jest FLIP(L). Fizjologiczne znaczenie hamowania apoptozy zewnątrzkomórkowej przez FLIP w komórkach dendrytycznych warunkuje zatem zdolność do prezentowania antygenów limfocytom T, stąd przetrwanie DC, pomimo obecności w mikrośrodkowisku ligandów śmierci jest gwarantem powodzenia tego procesu. Jak wynika z zebranych obserwacji FLIP(L) odgrywa zasadniczą rolę w ochronie komórek, które mają zapewnić informowanie układu immunologicznego o konieczności wygenerowania odpowiedzi na czynniki obce antygenowo a obecne w organizmie. Monocyty są źródłem nie tylko komórek dendrytycznych, ale mogą się także przekształcać w procesie różnicowania w aktywne makrofagi zdolne m.in. do aktywacji limfocytów T, uwalniania cytokin prozapalnych, usuwania zainfekowanych wirusowo komórek oraz eliminacji komórek nowotworowych w wyniku odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Perlman i wsp. [38] wykazali na modelu komórkowym, że proces różnicowania monocytów linii U937 do makrofagów jest związany ze zwiększoną ekspresją FLIP i ucieczką immunologiczną w następstwie zwiększenia oporności na apoptozę indukowaną przez FasL. Wiadomo, że monocyty przed zróżnicowaniem w makrofagi są wrażliwe na apoptogenne działanie ligan-

dów śmierci i w warunkach *in vitro* ulegają np. spontanicznej apoptozie pod wpływem oddziałującego autokrynnie FasL. Zastosowanie w powyższych warunkach inhibitora pankaspazowego zVAD.fmk lub dodanie surowicy zawierającej czynniki wzrostu, przetrwania i kompetencji (np. GM-CSF, IL-1 β , LPS, TNF- α lub M-CSF) zapobiega samobójczej śmierci monocytów. W tym samym czasie monocyty charakteryzuje duża oporność na wiele czynników apoptogennych, takich jak bezpośrednie oddziaływanie postaci transmembranowych ligandów śmierci np. mTNF- α , [24], czy promieniowania jonizującego [33]. Makrofagi w przeżyciwalności do monocytów były z kolei niewrażliwe na sygnał śmierci od FasL - uwarunkowany jak się okazało podwyższeniem poziomu białka FLIP. Jak już wcześniej wyjaśniono ekspresja białka FLIP wzrastała wraz z postępowaniem różnicowania. W różnicujących się monocytach podwyższenie ekspresji FLIP zarówno na poziomie transkryptów jak i białka następowało już w 3 dniu hodowli pozaustrojowej i dodatnio korelowało ze zwiększoną przeżywalnością komórek. W okresie poprzedzającym nadekspresję FLIP podwyższenie ekspresji białka Bcl-2 indukowane za pośrednictwem transfekcji nie uchroniło monocytów linii U937 przed śmiercią wywołaną przez FasL, natomiast od chwili ucieczki immunologicznej zależnej od FLIP apoptozę w różnicujących się makrofagach można było wymusić przez zastosowanie antysensownych oligonukleotydów dla FLIP [38]. Brak ochrony przed cytotoksycznym działaniem FasL po wprowadzeniu wektora zawierającego gen *bcl-2*, który koduje białko antyapoptotyczne oddziałujące na poziomie mitochondrium oznacza, że monocyty należy zaliczyć do typu I komórek wrażliwych na CD95, w których apoptoza może zachodzić bez czynnego udziału mitochondrium. Z kolei skutki działania antysensownych oligonukleotydów, które zredukowały ekspresję FLIP polegały na podwyższeniu poziomu aktywnej kaspazy 3, co oznacza, że wcześniej dojść musiało do uaktywnienia hierarchicznie nadrzędnej kaspazy 8, której pełna aktywacja była wcześniej zablokowana przez FLIP. Dodatkowo, o niezwykle istotnym znaczeniu niedoboru białka FLIP dla skutecznego wywołania przez FasL apoptozy monocytów świadczyć może to, że transformowane wektorem zawierającym gen *flip* monocyty traciły wrażliwość na FasL. Porównując znaczenie każdej z postaci FLIP stwierdzono, że komórki obronne, w których następowała ekspresja FLIP(S) wykazywały większą żywotność w porównaniu z komórkami, w których stwierdzono zwiększony poziom białka FLIP(L).

Białko FLIP jest także zaangażowane w procesy aktywacji, proliferacji i dojrzewania limfocytów B i T. Zmiany w poziomie ekspresji FLIP w limfocytach B, na przykładzie trzech populacji limfocytów: pierwotnych, limfocytów wytwarzających immunoglobuliny oraz komórek B pamięci immunologicznej opisali Hennino i wsp. [17]. W żadnym z badanych typów komórek nie zidentyfikowano obecności FLIP(S), natomiast FLIP(L) był intensywnie syntetyzowany jedynie w aktywnych limfocytach B. Brak aktywności antyapoptotycznej FLIP(L) w natiwnych komórkach B jest uzasadniony i zapewnia prawidłowy przebieg dojrzewania i nabierania kompetencji przez limfocyty B. Podczas tego procesu w komórkach zachodzą mutacje w sekwencjach genów kodujących immunoglobuliny oraz dochodzi do selekcji limfocytów. Dojrzewające komórki B (limfoblasty) są pobudzane przez antygeny prezentowane przez komór-

ki dendrytyczne grudek limfatycznych. W limfocytach B dochodzi do ekspresji receptorów MHC II i prezentacji antygenów limfocytom T pomocniczym. Limfocyty B, które nie są zdolne rozpoznać i zaprezentować antygeny ulegają eliminacji na skutek apoptozy. Natomiast dojrzałe limfocyty B, które pomyślnie przeszły etap selekcji stają się odporne na apoptogenny sygnał FasL [17]. W porównaniu z komórkami wrażliwymi na sygnał śmierci od FasL nie zauważono zmian w poziomie białek FADD i FLICE, natomiast aktywność kompleksu DISC w komórkach niewrażliwych była blokowana przez FLIP(L). Ponadto Hennino i wsp. [17] wykazali, że w aktywnych limfocytach ekspresja FLIP(L) pozostaje konstytutywnie stała. Z kolei w różnicujących się limfocytach T ekspresja FLIP się zmienia. Badania Inaba i wsp. [20] wykazały, że pierwotne limfocyty T łatwo ulegają apoptogennemu działaniu FasL, czemu towarzyszy mała ekspresja FLIP. Aktywacja limfocytów T przez antygeny stymuluje w tych komórkach ekspresję FLIP, gdy jednak zostanie zahamowana komórki łatwo ulegają działaniu FasL [21]. Część limfocytów T przekształca się w limfocyty T pamięci, które dzięki intensywnej syntezie FLIP są odporne na apoptozę wywołaną powtórną prezentacją antygeny (AICD) zależną od FasL. Nadekspresja FLIP pozwala wówczas na efektywniejsze działanie komórek pamięci w organizmie. Scaffidi i wsp. [41] ocenili zmiany w ekspresji FLIP i wrażliwość komórek T pod wpływem ich aktywacji przez antygeny w obecności IL-2 (czynnika wzrostu limfocytów T). Badacze ci zauważyli, że od pierwszych dni doświadczenia komórki są niewrażliwe na apoptogenny sygnał FasL, ale zwiększenie ekspresji FLIP było zauważalne później. Autorzy zasugerowali, że pierwotna reakcja oporności na FasL jest raczej związana z upośledzeniem formowania się kompleksu DISC niż z blokowaniem przekazywania sygnału śmierci przez FLIP. Natomiast w szóstym dniu doświadczenia FLIP był już syntetyzowany w komórkach limfocytów T i wchodząc w interakcję z FADD hamował aktywację kaspazy 8 i apoptozę. W oparciu o przedstawione dane w rozważaniach nad potencjalnym zastosowaniem inhibitorów translacji w hamowaniu ekspresji FLIP należy wziąć pod uwagę ich działanie immunosupresyjne tym większe im inhibitor są mniej swoiste dla komórek nieprawidłowych.

PRZYKŁADY PATOLOGICZNEGO ODDZIAŁYWANIA FLIP, W TYM RODZINY WIRUSOWYCH FLIP

Zwiększoną ekspresję FLIP opisano w komórkach wielu linii nowotworowych [14,21] oraz w komórkach guzów u chorych na choroby nowotworowe, w tym przede wszystkim nowotworów złośliwych np. czerniaków u ludzi [29,40,44]. W przypadku wielu nowotworów złośliwych u ludzi (czerniak, rak okrężnicy) komórki guzów wykorzystują różne strategie ucieczki immunologicznej, wśród których zwraca uwagę zmniejszenie ekspresji receptora Fas przy jednoczesnym zwiększeniu ilości transbłonowego FasL [15,39]. W komórkach ludzkiego raka jelita grubego opisano wiele różnych sposobów ucieczki immunologicznej [36]. Na przykład transbłonowy FasL zakotwiczony w błonie komórkowej guza oddziałując na receptory Fas komórek układu immunologicznego i obronnego indukuje ich śmierć uprzedzając w ten sposób atak skierowany przeciwko nowotworowi [34]. Udział białka FLIP w ucieczce immunologicznej komórek raka okrężnicy jest niewyjaśniony. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleźliśmy

żadnych doniesień na temat ekspresji FLIP w komórkach ludzkiego raka okrężnicy linii COLO 205, chociaż prowadzone przez nas badania potwierdzają wyjątkową zdolność do uwrażliwienia tych komórek na cytotoksyczne działanie TNF- α pod wpływem klasycznych inhibitorów metabolicznych CHX i/lub AD, które eliminują FLIP [35]. Stąd podejrzewamy, że o oporności immunologicznej komórek COLO 205 na TNF- α może decydować c-FLIP i w tym kierunku są obecnie prowadzone nasze prace. Odnosząc się do tumorogenezy należy wyraźnie podkreślić, że chociaż w badaniach *in vitro* nadekspresja białka FLIP nie zapewnia ochrony przed apoptozą wywołaną przez leki chemioterapeutyczne czy napromienienie gamma [23] nie jest to równoznaczne z poglądem, że w podobnych okolicznościach FLIP nie zapewni guzom działania ochronnego w żywym organizmie. Nawet wówczas, gdy myszom inokulowano komórki nowotworowe MBL-2-Fas bez nadekspresji FLIP wbrew teoretycznym przewidywaniom, w rzadkich przypadkach rozwijały się guzy a w komórkach z nich pobranych stwierdzano nadekspresję FLIP co sugeruje, że układ immunologiczny selektywnie eliminował wyłącznie komórki wrażliwe na sygnały śmierci [29]. Zagadnienie czy wymieniony proces ma wpływ na oporność wielolekową i zmniejszenie wrażliwości na promieniowanie jonizujące czeka na wyjaśnienie i jest przewidziane w naszych planach badawczych.

Do nienowotworowych chorób proliferacyjnych, które wzbudzają uzasadnione zainteresowanie lekarzy i naukowców ze względu na trudne i często nieskuteczne sposoby leczenia należą reumatoidalne zapalenie stawów (reumatoid arthritis – RA) oraz zwyrodnieniowe zapalenie stawów i kości (osteoarthritis – OA). Obie choroby mają przeważnie charakter przewlekły i nieuchronnie prowadzą do trwałego uszkodzenia chrząstek i innych elementów stawów. Dotychczas nie było wiadomo, dlaczego procesy destrukcyjne wywołane przez makrofagi (MA, wybuch tlenowy) i synowiocyty podobne do fibroblastów (fibroblast-like synoviocytes – FLS) przebiegają bez żadnych prób ich ograniczenia przez układ immunologiczny. Pomimo podwyższonej obecności w płynie maziowym ligandów śmierci, takich jak TNF- α czy FasL liczba komórek odpowiedzialnych za procesy zanikowe i degeneracyjne nie zmniejsza się, przeciwnie z upływem czasu nawet wzrasta [27]. Wysłunęto hipotezę, że nieskuteczne oddziaływanie ligandów śmierci na komórki MA i FLS może wynikać ze zwiększonej ekspresji białka FLIP, które pozwala na ucieczkę immunologiczną [11]. Palao i wsp. [37] przeprowadzili skrupulatne badania molekularne na izolowanych komórkach FLS pobranych od chorych na RA i OA. Bez cienia wątpliwości potwierdzili dodatnią korelację oraz związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy zwiększoną ekspresją FLIP a stopniem zaawansowania obydwu chorób. Postacią FLIP odpowiedzialną za oporność immunologiczną okazał się FLIP(L), chociaż podwyższony był również poziom FLIP(S). Podobnie do zjawiska opisanego wcześniej dla innych typów komórek, TNF- α zamiast zabijać makrofagi i komórki FLS gromadząc się w płynie maziowym chorych ludzi podwyższał oporność immunologiczną i przyczyniał się do zwiększenia ich liczby. Podwyższenie progu wrażliwości na ligandy śmierci odbywało się u ludzi poprzez indukowanie genu *flip* za pośrednictwem aktywnego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Ekspresję białka FLIP(L) w komórkach FLS udało się jednak szybko obniżyć do niewykrywalnego pozio-

mu po zastosowaniu CHX użytego w stężeniu tak małym (1,5 µg/ml), że nie zahamował on syntezy innych białek sygnalosomalnego TNF-α R1 [37]. Zgodnie z oczekiwaniami zastosowanie antysensownych oligonukleotydów anty-FLIP dramatycznie uwrażliwiło komórki FLS na apoptozę indukowaną przez FasL.

Ze względu na swoją budowę białka z rodziny FLIP należą do rodziny białek z domeną wykonawczą śmierci tzw. DED. Okazuje się, że wiele takich białek jest składnikami lub powstaje pod wpływem wirusów, w szczególności wirusów ospy i herpes klasy gamma (wirus herpes saimiri, ludzki wirus herpes 8, wirus herpes związany z mięśniakiem Kaposiego, wirus moluscum contagiosum). Biorąc pod uwagę pochodzenie zalicza się je do rodziny wirusowych FLIP (v-FLIP) [19]. v-FLIP podobnie jak c-FLIP przylaczają się do kompleksu DISC przynajmniej w odniesieniu do szlaku sygnałowego śmierci od receptorów CD95, TNF-α R1, DR3 i DR4 [30] za pośrednictwem jednej z dwóch własnych domen DED i blokują aktywację prokaspazy 8, a w konsekwencji apoptozę. Okazuje się, że antyapoptotyczne działanie v-FLIP nie jest niezbędne do replikacji, transformacji czy patogenności wirusów, może mieć zatem inne znaczenie funkcjonalne np. onkogenne. Wskazywać może na to stwierdzenie, że np. u ludzi w komórkach latentnie zakażonych wirusem herpes 8 następuje tylko nieznaczne podwyższenie ekspresji v-FLIP, ale w mięsaku Kaposiego, lub w hodowanych pozaustrojowo komórkach chłoniaka po usunięciu surowicy z pożywki ekspresja białka v-FLIP wyraźnie wzrasta [42].

WPLYW INHIBITORÓW METABOLICZNYCH NA WRAŻLIWOŚĆ NA CYTOKINY CYTOTOKSYCZNE KOMÓREK Z NADEKSPRESJĄ FLIP

Jak to już wielokrotnie wspomniano, hamowanie translacji i/lub transkrypcji z użyciem minimalnych lub umiarkowanych, nietoksycznych stężeń inhibitorów metabolicznych dramatycznie uwrażliwia komórki CD95 typu I odporne na apoptozę na działanie cytokin cytotoksycznych [12,48]. Opisane szczegółowo zjawisko zachodzi szybko i na masową skalę już po kilku godzinach od zastosowania jednocześnie inhibitora translacji np. CHX oraz cytokiny (TNF-α, FasL, TRAIL) lub przeciwciał aktywujących receptory śmierci (Ab-DR). Równie szybko apoptoza pojawia się po preinkubacji komórek z CHX i następczym podaniu do środowiska inkubacyjnego jednej z wymienionych cytokin lub Ab-DR. We wszystkich komórkach, w których indukowano tym sposobem apoptozę stwierdzano niemal zupełny zanik ekspresji FLIP. Prowadzone na szeroką skalę badania molekularne dowiodły, że ekspresja genu *flip* ma

charakter konstytutywny, oraz że turnover białka c-FLIP nie przekracza dwóch godzin. Stąd wniosek, że po to, by komórki mogły się oprzeć naturalnemu sygnałowi śmierci wciąż muszą wytwarzać białko FLIP i blokować nim transdukcję sygnału niezbędnego do wywołania apoptozy zewnątrzopochodnej. Porównano zatem pod względem skuteczności uwrażliwiania na sygnał śmierci kilka różnych inhibitorów translacji (CHX i pochodne bisindolylmaleimidu). Oba inhibitory okazały się niemal równie skuteczne zarówno w badaniach *in vitro* [48] jak i *in vivo* [52].

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach w wyjaśnianiu molekularnych podstaw procesów regulacyjnych dotyczących proliferacji i eliminacji komórek wyraźnie wzrosło znaczenie szlaków przekazywania sygnału od receptorów śmierci. Okazuje się, że wiele zjawisk podlega w zdrowym organizmie precyzyjnej regulacji ze strony układu immunologicznego i obronnego. W zależności od fazy rozwoju (zarodek, płód, osobnik rosnący, dojrzały czy starzejący się) w czasie organogenezy i po jej zakończeniu dla dobra „ogółu” pewna pula komórek musi ulec eliminacji, natomiast część oszczędzona. W tym kontekście szczególna rola przypada białku FLIP, które w zależności od postaci pozwala na częściową aktywację kaspazy 8 [c-FLIP(L)] lub do niej nie dopuszcza [c-FLIP(S)]. Jeśli natomiast w komórce brakuje FLIP, sygnał śmierci bez przeszkód powoduje apoptozę zewnątrzopochodną. Okazuje się, że częściowa aktywacja kaspazy 8 jest niezbędna do przekształceń białek adaptorowych TRAF2, RIP w postaci, z udziałem których i za pośrednictwem NF-κB/ERK zwiększa się żywotność i proliferacja komórek. Ta ostatnia właściwość FLIP związana z silnym hamowaniem apoptozy zależnej od ligandów śmierci może się przyczyniać do szybkiego i niepożądanego wzrostu nowotworów lub gwałtownego postępu chorób proliferacyjnych. W indukcji ekspresji FLIP oprócz wpływów epigenetycznych pewną – nie do końca poznaną – rolę spełniają mogą wirusy o właściwościach onkogennych. Na szczęście represja translacji białka FLIP, choćby z użyciem CHX, wystarcza do wywołania przez niemal każdy ligand śmierci masowej apoptozy komórek dotychczas opornych na takie sygnały. Zdawać sobie trzeba jednak sprawę, że nieswoiste blokowanie syntezy białka w organizmie wywołałoby prawdopodobnie poważne reperkusje zdrowotne, takie jak choćby głęboką immunosupresję. Stąd pilna potrzeba poszukiwania innych niż CHX i BIS inhibitorów metabolicznych translacji po to, by dysponować narzędziami do walki z zaburzeniami spowodowanymi nadekspresją FLIP, w tym w szczególności do walki z guzami złośliwymi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ashany D., Savir A., Bhardwaj N., Elkon K.B.: Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/Apo-1) pathway. *J. Immunol.*, 1999; 163: 5303–5311
- [2] Ashkenazi A., Dixit V.M.: Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998; 281: 1305–1308
- [3] Bjorck P., Banchereau J., Flores-Romo L.: CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int. Immunol.*, 1997; 9: 365–372
- [4] Chan F.K., Chun H.J., Zheng R.M., Siegel K.L., Bui K.L., Lenardo M.J.: A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 2000; 288: 2351–1354
- [5] Chu Z.-L., McKinsey A., Lin L., Gentry J.J., Malim M.H., Ballard D.W.: Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-AP2 is under NF-κappaB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 10057–10062
- [6] Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R., Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S. M., Alnemri E.S., Salvesen G.S., Reed J.C.: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.*, 1998; 17: 2215–2223
- [7] Devin A., Cook A., Lin Y., Rodriguez Y., Kelliher M., Liu Z.G.: The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 1998; 12: 419–429

- [8] Djerbi M., Screpanti V., Catrina A.I., Bogen B., Biberfeld P., Grandien A.: The inhibitor of death receptor signaling. FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 1025–1032
- [9] Donepudi M., Mac Sweeney C., Briand C., Grutter M.G.: Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell*, 2003; 11: 543–549
- [10] Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wang L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G., Alnemri E.S.: *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 7464–7469
- [11] French L.E., Tschopp J.: Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 891–893
- [12] Fulda S., Meyer E., Debatin K.-M.: Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/Fas)-induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. *Cancer Res.*, 2000; 60: 3947–3956
- [13] Ghosh S., Karin M.: Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 2002; 109: S81–S96
- [14] Griffith T.S., Chin W.A., Jackson G.C., Lynch D.H., Kubin M.Z.: Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J. Immunol.*, 1998; 161: 2833–2840
- [15] Hahne M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J.: Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 1996; 274: 1363–1366
- [16] Hennino A., Berard M., Casamayor-Palleja M., Krammer P.H., Defrance T.: Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *J. Immunol.*, 2000; 165: 3023–3030
- [17] Hennino A., Berard M., Krammer P.H., Defrance T.: FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 447–458
- [18] Hu S., Vincenz C., Buller M., Dixit V.M.: A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 9621–9624
- [19] Hu W.H., Johnson H., Shu H.B.: Activation of NF- κ B by FADD, Casper, and caspase 8. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 10838–10844
- [20] Inaba M., Kurasawa K., Mamura M., Kumano K., Saito Y., Iwamoto I.: Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells. *J. Immunol.*, 1999; 163: 1315–1320
- [21] Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J.: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 1997; 388: 190–195
- [22] Kataoka T., Budd R. C., Holler N., Thome M., Martinon F., Irmeler M., Burus K., Hahne M., Kennedy N., Kovacsics K., Tschopp J.: The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways. *Curr. Biol.*, 2000; 10: 640–648
- [23] Kataoka T., Schroter M., Hahne M., Schneider P., Irmeler M., Thome M., Froelich C.J., Tschopp J.: FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J. Immunol.*, 1998; 161: 3936–3942
- [24] Kiener P.A., Davis P.M., Starling G.C., Mehlin C., Klebanoff J.A., Ledbetter J.A., Liles W.C.: Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interaction in human monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.*, 1997; 185: 1511–1516
- [25] Kreuz S., Siegmund D., Scheurich P., Wajant H.: NF- κ B inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 3964–3973
- [26] Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P.H., Kirchhoff S.: Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 20633–20640
- [27] Lalor P.A., Mapp P.I., Hall P.A., Revell P.A.: Proliferative activity of cells in the synovium as demonstrated by a monoclonal antibody, Ki67. *Rheumatol. Int.*, 1987; 7: 183–186
- [28] Matsue H., Edelbaum D., Hartman A.C.: Dendritic cells undergo rapid apoptosis *in vitro* during antigen-specific interaction with CD4–T cells. *J. Immunol.*, 1999; 162: 5287–5298
- [29] Medema J.P., de Jong J., van Hall T., Melief C.J.M., Offringa R.: Immune escape of tumors *in vivo* by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 1033–1038
- [30] Meinel E., Fickenscher H., Thome M., Tschopp J., Fleckenstein B.: Antiapoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol. Today*, 1998; 19: 474–479
- [31] Micheau O., Lens S., Gaide O., Alevizopoulos K., Tschopp J.: NF- κ B signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 5299–5305
- [32] Micheau O., Thome M., Schneider N., Holler N., Tschopp J., Nicholson D.W., Briand C., Grutter M.G.: The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 45162–45171
- [33] Munn D.H., Beall A.C., Song D., Wrenn R.W., Throckmorton D.C.: Activation-induced apoptosis in human macrophages: development regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J. Exp. Med.*, 1995; 181: 127–136
- [34] O'Connell J., O'Sullivan G.C., Collins J.K., Shanahan F.: The fas co-utterattack: fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing fas ligand. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 1075–1082
- [35] Pajak B., Orzechowski A.: Behind the scenes of cycloheximide-mediated sensitization of colorectal cancer cells to TNF α -induced apoptosis. World Conference on Magic Bullets Celebrating Paul Ehrlich's 150th Birthday, Norymberga, Niemcy, 09–11.09.2004; abstract 393
- [36] Pajak B., Orzechowski A.: Złożony charakter niewrażliwości immunologicznej ludzkiego raka jelita grubego na niektóre cytokiny (TNF- α , interferony) na przykładzie linii komórkowej COLO 205. Mechanizm niewrażliwości – z uwzględnieniem białek sygnałowych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 428–437
- [37] Palao G., Santiago B., Galindo M., Paya M., Ramirez J.C., Pablos J.L.: Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis & Rheumatism*, 2004; 50: 2803–2810
- [38] Perlman H., Pagliari L.J., Georganas C., Mano T., Walsh K., Pope R.M.: FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to Fas-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 1679–1688
- [39] Reyher U., Strater J., Kittstein J., Gschwendt M., Krammer P. H., Moller P.: Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res.*, 1998; 58: 526–534
- [40] Ryu B.-K., Lee M.-G., Chi S.-G., Kim Y.-W., Park J.-H.: Increased expression of c-FLIP(L) in colonic adenocarcinoma. *J. Pathol.*, 2001; 194: 15–19
- [41] Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P.H., Peter M.E.: The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 1541–1518
- [42] Stürzl M., Hohenadl C., Zietz C., Castanos-Velez E., Wunderlich A., Ascherl G., Biberfeld P., Monini P., Browning P.J., Ensoli B.: Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999; 91: 1725–1733
- [43] Takada H., Chen N.-J., Mirstos C., Suzuki S., Suzuki N., Wakeham A., Mak T.W., Yeh W.-C.: Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 4026–4033
- [44] Tepper C.G., Seldin M.F.: Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood*, 1999; 94: 1727–1737
- [45] Varfolomeev E.E., Schuchmann M., Luria V., Chiannilkulchai N., Beckmann J.S., Mett I.L., Rebrikov D., Brodianski V.M., Kemper O.C., Kollet O., Lapidot T., Soffer D., Sobe T., Avraham K.B., Goncharov T., Holtmann H., Lonai P., Wallach D.: Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo-1 and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 1998; 9: 267–276
- [46] Wajant H., Haas E., Schwenzer R., Mühlenbeck F., Kreuz S., Schubert G., Grell M., Smith C., Scheurich P.: Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 24357–24366
- [47] Wang C.-Y., Mayo M.V., Korneluk R.G., Goeddel D.V., Baldwin A.S.: NF- κ B antiapoptotic induction of TRAF1 and TRAF2 and cIAP1 and cIAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 1998; 281: 1680–1683
- [48] Willems F., Amaraoui Z., Vanderheyde N., Verhasselt V., Aksoy E., Scaffidi C., Peter M.E., Krammer P.H., Goldman M.: Expression of c-FLIP(L) and resistance to CD95-mediated apoptosis of monocyte-derived dendritic cells: inhibition by bisindolylmaleimide. *Blood*, 2000; 95: 3478–3482
- [49] Wong B.R., Joisien R., Lee S.Y.: TRANCE (tumor necrosis factor (TNF)-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 2075–2080

- [50] Xiao C.W., Asselin E., Tsang B.K.: Nuclear factor κ B-mediated induction of Flice-like inhibitory protein prevents tumor necrosis factor-induced apoptosis in rat granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 2002; 67: 436–441
- [51] Yeh W.C., Itie A., Elia A.J., Ng M., Shu H.B., Wakeman A., Mirtsos C., Suzuki N., Bonnard M., Goeddel D.V., Mak T.W.: Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, 2000; 12: 633–642
- [52] Zhou T., Song L., Yang P., Wang Z., Lui D., Jope R.S.: Bisindolylmaleimide VII facilitates Fas-mediated apoptosis and inhibits T cell-mediated autoimmune diseases. *Nature Med.*, 1999; 5: 42–48
- [53] Zong W.-X., Edelstein L.C., Chen C., Bash C., Gelinas C.: The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- κ B that blocks TNF α -induced apoptosis. *Genes Dev.*, 1999; 13: 382–387