

Received: 2004.06.16
Accepted: 2004.10.14
Published: 2004.11.24

Złożony charakter niewrażliwości immunologicznej ludzkiego raka jelita grubego na niektóre cytokiny (TNF-alfa, interferony) na przykładzie linii komórkowej COLO 205. Mechanizm niewrażliwości – z uwzględnieniem białek sygnałowych*

Complex forms of immune insufficiency to some cytokines (TNF-alpha, interferons) in colorectal cancers as exemplified by the COLO 205 cell line. Mechanism of resistance with special reference to signaling proteins and cytokines

Beata Pająk, Arkadiusz Orzechowski

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Praca jest dedykowana śp. Profesorowi Wiesławowi Barejowi, długoletniemu Kierownikowi Katedry Fizjologii Zwierząt, Wydziału Weterynaryjnego SGGW, który pomimo śmiertelnej choroby do ostatnich chwil swego życia pozostał ze swoimi Pracownikami.

Streszczenie

Komórki raka jelita grubego charakteryzują się dużą opornością immunologiczną oraz lekoopornością. Wysiłki badaczy skupiają się dodatkowo na ocenie możliwości zastosowania w przyszłości w leczeniu raka jelita grubego cytokin – w tym w szczególności interferonów, o ile powiodą się próby uwrażliwienia komórek raka jelita grubego na ich działanie. Poznanie mechanizmów sterujących naturalnymi reakcjami zwalczania komórek nowotworowych przez układ odpornościowy oraz sposobów unikania przez komórki nowotworowe apoptozy jest podstawowym warunkiem powodzenia takich działań.

Z przedstawionych w artykule informacji na temat badań mechanizmów przekazywania sygnałów w komórce, przeprowadzonych przede wszystkim na liniach komórek raka jelita grubego wynika, że potrafią one przetrwać atak komórek układu obronnego i immunologicznego. Na przykład, komórki ludzkiego raka okrężnicy linii COLO 205 nie ulegają działaniu cytokin cytotoksycznych zastosowanych indywidualnie, ale już zastosowanie ich w pewnych układach okazuje się skuteczne. Przyczyna tego zjawiska nie jest do końca zrozumiała i może wynikać ze złożonego charakteru przekazywania sygnału, w którym najważniejsze miejsce zajmują czynniki STAT. Innym sposobem unikania przez komórki COLO 205 śmierci jest wykorzystanie „sygnalingu odwrotnego” powodującego zahamowanie aktywności atakujących makrofagów pod wpływem rozpuszczalnych form receptorów TNF- α (sTNF- α R1, sTNF- α R2). Podobne skutki w komórkach COLO

* Artykuł powstał w ramach grantu KBN nr P06T 05422 oraz z myślą by zwrócić uwagę na cele Akcji COST 927 zatytułowanej „Thermally processed foods: possible health implications”.

205 wywołuje cytokina prozapalna IL-6, wytwarzana przez aktywne makrofagi. W odpowiedzi na IL-6, komórki raka okrężnicy wytwarzają przeciwzapalną cytokinę IL-10, która hamuje aktywność PMNC. I w tym przypadku w reakcjach komórek zarówno COLO 205, jak i makrofagów pośredniczą STAT. Należy również pamiętać, że aktywność transkrypcyjna czynników STAT decyduje o wrażliwości komórek na bodźce apoptogenne. Inhibitory STAT hamujące apoptozę wydają się w komórkach raka okrężnicy aktywniejsze niż wynikałoby to z ujemnego sprzężenia zwrotnego, wymaganego dla toru Jak/STAT. Kolejnym zjawiskiem determinującym oporność immunologiczną komórek COLO 205 jest bardzo duża aktywność podstawowa systemów, odpowiedzialnych za przeżycie komórek. Najważniejsze z nich to PI-3K/Akt, cPKC/Raf1/ERK, NF-κB/JNK czy Jak/STAT. Wreszcie to, co przykuwa również naszą uwagę, to zdolność skierowania sygnału śmierci na tor przeżycia, ze wskazaniem STAT1 jako prawdopodobnego modulatora reakcji wywołanej przez cytokiny immunomodulacyjne.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego • COLO 205 • TNF-α • NF-κB • IFN • STAT

Summary

Since colorectal cancer cells are characterized by both high immune- and multidrug-resistance, investigations concerning the search for cytokines, especially interferons, which would delete cancer cells have prospects of success only if cancer cells became sensitive to such treatment. The prerequisite for successful treatment is to discover how the immune system kills colorectal cancer cells.

In this article we focus our attention on signal transduction pathways in colorectal cancer cells, which are characterized by a variety of mechanisms that enable them to survive the hostile microenvironment created by immune system attack. Knowledge relevant to cancer cell immunity to defense mechanisms is crucial for the prospects of cytokine-support therapy. A case in point is the human colorectal cancer cell line COLO 205, which is not affected by individual cytokines, although it becomes vulnerable to combined treatment with some of them. It is not clear what factors make COLO 205 cells resistant to cytotoxins, however; it seems plausible to point to the complex signaling pathways, and STAT proteins in particular. Another feature of COLO 205 cells avoiding cytokine-mediated death signals is the reverse signaling causing activated macrophages to become dormant in response to soluble TNF-α receptors (sTNF-α R1, sTNF-α R2). Similarly, COLO 205 cells respond to the proinflammatory cytokine IL-6 released by activated macrophages. Cancer cells release anti-inflammatory cytokine IL-10, which ceases the action of PMNCs. It should be stressed that STATs mediate and/or activate the transcription of several genes indispensable for cell death. Cancer cells isolated from large bowel tumors express elevated constitutive activity of STATs inhibitors leading to antiapoptosis. Correspondingly, the increased survival rates of these cells could be attributed to accelerated actions of the PI-3K/Akt, cPKC/Raf1/ERK, NF-κB/JNK, or Jak/STAT cascades. Finally, an uncertainty in large bowel cancer cells is whether STATs might redirect the cytokine signal from cell deletion to cell survival.

Key words: colorectal cancer • COLO 205 • TNF-α • NF-κB • IFN • STAT

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6515.pdf

Word count: 3941

Tables: –

Figures: 4

References: 36

Adres autora: dr hab. Arkadiusz Orzechowski, 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: **CD8+** – rodzaj antygenu powierzchniowego limfocytów T; **c-IAP1, c-IAP2** – (cellular inhibitors of apoptosis); **IKKs/NIK** – kinaza indukująca czynnik jądrowy κB (NF-κB-inducing kinase); **CIS** – indukowane przez cytokiny białko zawierające domenę SH2 (cytokine-inducible SH2-domain-containing protein); **CKI** – kinaza kazeinowa typ 1 (casein kinase I); **CPP32** – kaspaza 3; **DISC** – kompleks sygnałowy zapoczątkowujący śmierć (death

initiated signaling complex); **DR4, DR5** – receptory śmierci (death receptors DR4, DR5); **E1** – enzym aktywujący ubikwitynę (ubiquitin-activating enzyme); **E2** – białko transportujące ubikwitynę (ubiquitin carrier protein); **E3** – ligaza ubikwitynowa (ubiquitin-protein isopeptide ligase); **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostowy (epidermal growth factor); **EPO** – erytropoetyna; **FADD** – białko z domeną śmierci wiążące się z receptorem Fas (Fas associated death domain); **FasL** – ligand Fas; **FLICE** – kaspaza 8 (FADD-like interleukin converting enzyme); **GAS** – sekwencja DNA w miejscu aktywacji genu zależna od interferonu gamma (gamma-activated sequence elements); **GCSF** – czynnik pobudzający tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony stimulating factor); **GH** – hormon wzrostu (growth hormone); **ICE** – kaspazy (interleukin 1-beta converting enzymes); **ICH1** – kaspaza 2; **ICS-2/GAS** – wspólna sekwencja DNA w miejscach aktywacji genów zależnych od interferonów i interferonu gamma (interferon consensus sequence/ γ -interferon-activated sequence); **IGF-1** – insulinopodobny czynnik wzrostowy typ 1 (insulin-like growth factor 1); **IFN** – interferon; **I κ B** – podjednostka inhibująca NF- κ B (inhibitory subunit of NF- κ B); **IKK** – kinaza I κ B (I κ B kinase); **IL-3, IL-6, IL-10** – interleukiny; **IRF1** – czynnik regulacyjny zależny od interferonu (interferon regulatory factor 1); **ISRE** – aktywowana przez interferon sekwencja DNA (interferon-stimulated response element); **Jak1, Jak2** – niereceptorowe kinazy tyrozynowe Janusa (Janus kinase 1, -2); **JNK/SAPK** – kinaza aktywowana przez stres (c-Jun N-terminal kinase/stress activated kinase); **JUN, FOS, MYC** – białka, produkty aktywnych protoonkogenów *JUN, FOS, MYC*; **LMP2** – gen (low molecular weight polypeptide 2); **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (mitogen activated protein kinases); **MHC** – główny kompleks zgodności tkankowej (major histocompatibility complex); **mTNF- α** – czynnik martwicy nowotworu (postać transbłonowa) (membrane-bound tumor necrosis factor- α); **NCAM** – cząsteczka przylegania międzykomórkowego typu neuronalnego (neural cell adhesion molecule); **NF- κ B** – czynnik jądrowy kappa B (nuclear factor kappa B); **PIAS** – białkowe inhibitory aktywnych STAT (protein inhibitors of activated STATs); **PI-3K** – 3-kinaza fosfatydylinozytolu (phosphatidylinositol 3-kinase); **PKB/Akt** – kinaza białkowa B, produkt genu *akt* (protein kinase B); **PKC** – kinaza białkowa typu C (protein kinase C); **PMNC** – makrofagi z wielokształtnym jądrem (polymorphonuclear cells); **p53** – gen supresorowy nowotworów; **RIP** – białko adaptorowe łączące się z receptorem TNF- α (TNF- α -receptor interacting protein); **SH2** – domena homologiczna dla Src (Src homology domain 2); **SHP, SHP-2** – domena homologiczna dla Src zawierająca domenę fosfatazy (PTP)-2 (SH2 domain -containing protein tyrosine phosphatase (PTP)-2); **SOCS** – inhibitory przekaznictwa sygnału od cytokin (suppressors of cytokine signaling, SOCS1-SOCS7); **STATs** – czynniki transdukcji i transkrypcji (signal transducers and activators of transcription); **SUMO** – ubikwitynopodobne małe białko modyfikujące (small ubiquitin-like modifier); **TACE** – konwertaza TNF- α (TNF- α -converting enzyme); **TC-PTP** – białkowa fosfataza limfocytów T (T cell protein tyrosine phosphatase); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu (tumour necrosis factor- α); **sTNF- α** – czynnik martwicy nowotworu (postać rozpuszczalna) (soluble tumour necrosis factor- α); **TNF- α R1 i TNF- α R2** – receptory błonowe ligandu TNF- α , sTNF- α R1; **sTNF- α R2** – receptory błonowe ligandu TNF- α (postaci rozpuszczalne); **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** – związany z TNF- α ligand wywołujący apoptozę (TNF- α -related apoptosis-inducing ligand); **Tyk2** – niereceptorowa kinaza tyrozynowa

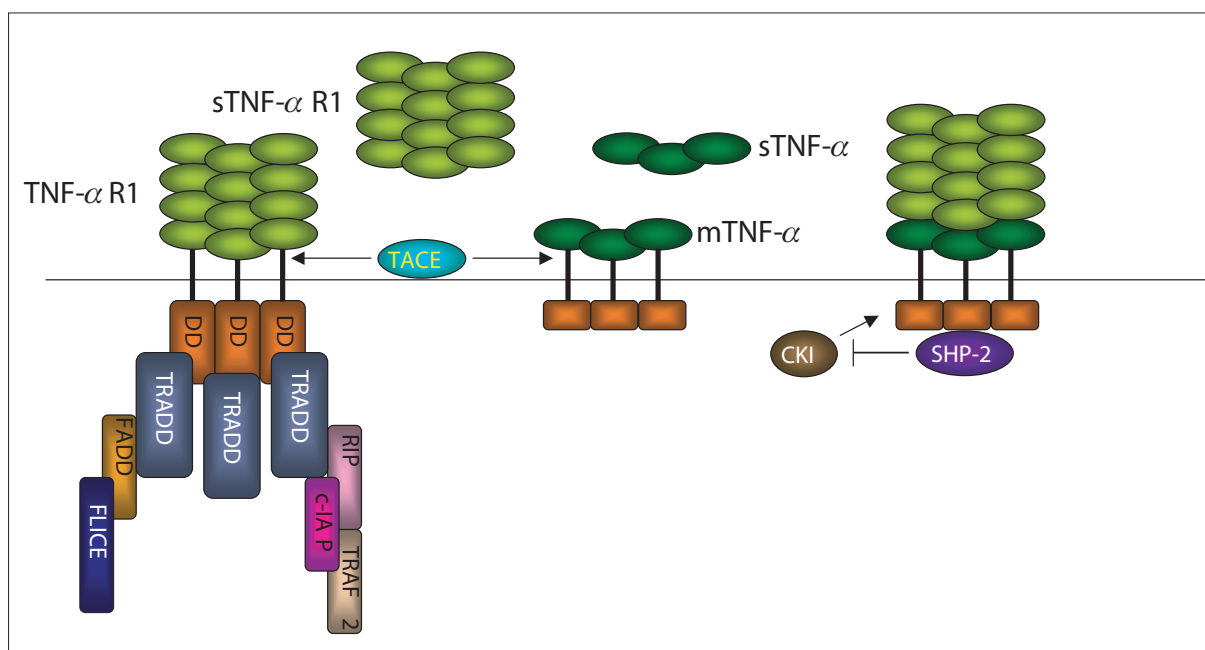
PRZYCZYNY OPORNOŚCI IMMUNOLOGICZNEJ KOMÓREK LUDZKIEGO RAKA OKRĘŻNICY LINII COLO 205

SYGNALING ODWROTNY

Cytokina prozapalna TNF- α , należąca do grupy cytokin immunomodulacyjnych jest wytwarzana w różnych komórkach (m.in. adipocyty, miocyty), lecz głównym jej źródłem są aktywne makrofagi (PMNC). Uwalnianie TNF- α przez makrofagi ma szczególnie i wyjątkowy przebieg. Jak pokazano na ryc. 1 wydzielanie cząsteczek cytokiny (m.c. 26 kDa) poprzedza ich homotrimeryzacja. Już jako homotrimery ulegają zakotwiczeniu w błonie komórkowej tworząc postać transbłonową ligandu (mTNF- α), pełniącą w pewnych warunkach rolę receptora błonowego. Homotrimeryzacja jest również niezbędna do uzyskania przez TNF- α biologicznej aktywności, albowiem – podobnie do innych receptorów śmierci TNF- α R1 i TNF- α R2 stają się funkcjonalne dopiero po oligomeryzacji pod wpły-

wem ligandu TNF- α . Transmembranowe białko TNF- α pod wpływem enzymu konwertującego TNF- α (TACE) ulega proteolitycznemu odłączeniu od błony (złuszczeniu) do postaci rozpuszczalnej (sTNF- α). Ten sam enzym bierze również udział w złuszczeniu receptorów TNF- α R1 i TNF- α R2, powodując powstanie ich postaci rozpuszczalnych (sTNF- α R1, sTNF- α R2). Postać wolna (sTNF- α) ma w porównaniu z mTNF- α mniejszą masę cząsteczkową (17 kDa) i może występować jako mono-, di- lub homotrimer. Z punktu widzenia właściwości fizjologicznych wydaje się interesujące, iż sTNF- α indukuje sygnał dokońcowy po przyłączeniu się do TNF- α R1 (p55, 55 kDa), a ta sama cytokina w postaci mTNF- α (ligand i receptor) w równym stopniu reaguje z TNF- α R1 jak i TNF- α R2 (p75, 75 kDa).

Skuteczność oddziaływania TNF- α na komórkę jest jednak zdecydowanie większa za pośrednictwem TNF- α R1. Istnienie postaci zarówno rozpuszczalnych jak i transbłono-



Ryc. 1. Schemat powstawania postaci rozpuszczalnych TNF-α (sTNF-α) i TNF-α R1 (sTNF-α R1) pod wpływem proteazy TACE (TNF-α-converting enzyme). Na rycinie przedstawiono budowę receptorów TNF-α R1 i mTNF-α wraz z przyłączonymi ligandami, odpowiednio sTNF-α i sTNF-α R1. Ten ostatni ligand indukuje sygnaling odwrotny czyli hamuje aktywność makrofagów dzięki fosfatazie SHP-2, która antagonizuje skutki działania kinazy CKI

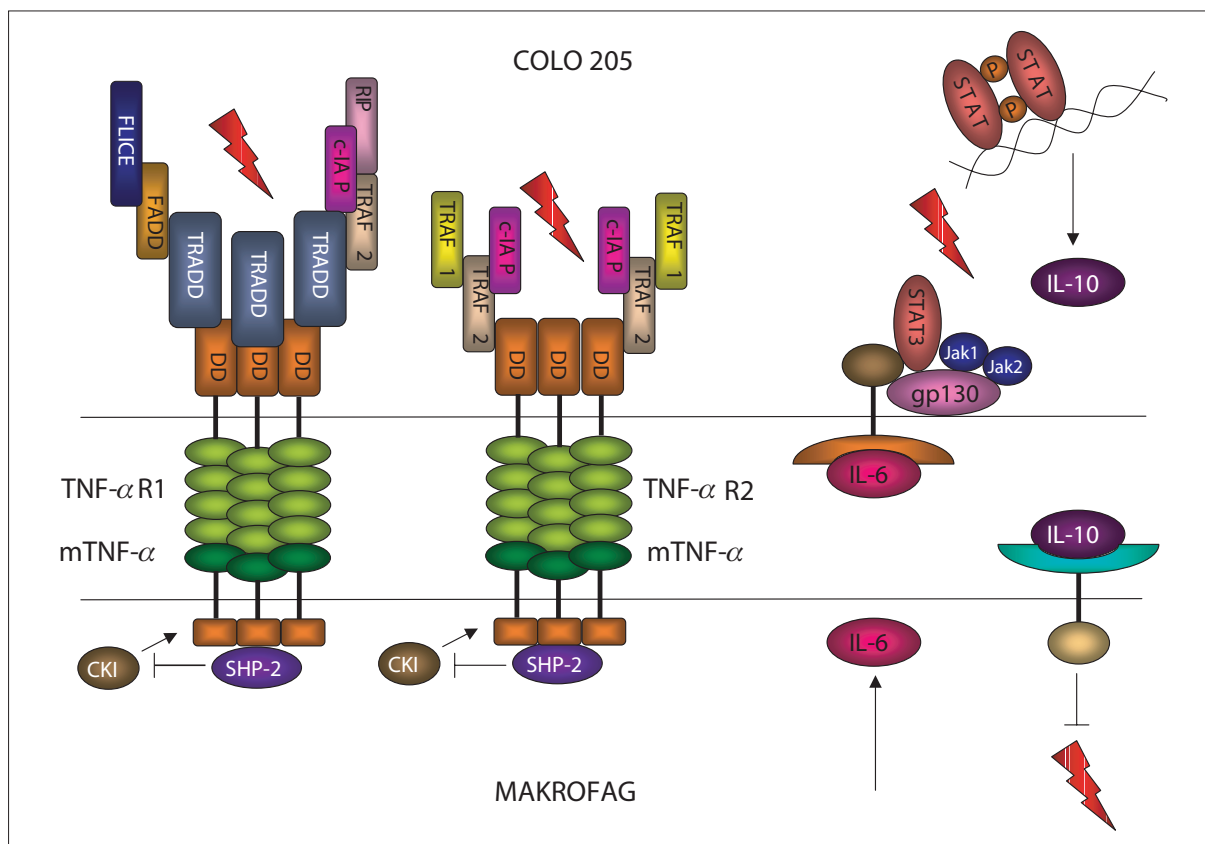
wych TNF-α, TNF-α R1 oraz TNF-α R2 nasunęło podejrzenie, że ligand, którym jest TNF-α dla TNF-α R1, może w pewnych szczególnych okolicznościach spełniać funkcję receptora (mTNF-α), podczas gdy sTNF-α R1 i sTNF-α R2 stają się wówczas ligandami mTNF-α. O ile skutki działania TNF-α na komórki są dość dobrze znane, o tyle mechanizm molekularny tej reakcji pozostaje niezrozumiały. Złożony charakter interakcji zachodzącej między TNF-α a jego receptorami nasunął przypuszczenie istnienia dwóch jakościowo różnych torów przekazywania sygnału; pierwszego pochodzącego od TNF-α R1/R2 i drugiego indukowanego przez transbłonową postać TNF-α. Pierwszy szlak jest aktywowany z chwilą uformowania się podwójnego homotrimerycznego kompleksu TNF-α-TNF-α R1, w którym udostępnieniu ulega domena śmierci receptora, pozwalająca przyłączyć się białku wzmacniającemu TRADD. Za pośrednictwem białka TRADD przyłączają się pozostałe białka, tzw. sygnalosomu np. FADD tworząc DISC i aktywując FLICE, co prowadzi do apoptozy. Alternatywnie z białkiem TRADD może się łączyć TRAF2 i RIP umożliwiając sekwencyjną aktywację NF-κB za pośrednictwem CIKS (NIK) i IKK. Prowadzi to do powstania sygnalosomu, który indukuje fosforylację IκB, jego poliubikwitinację z udziałem białek E1, E2 i E3 oraz proteasomalną degradację [10,35]. W drugim przypadku transbłonowy TNF-α w części N-terminalnej domeny wewnątrzcytoplazmatycznej pozostaje konstytutywnie ufosforylowany przy domenach serynowych (czytaj aktywny) dzięki kinazie serynowo-treoninowej CKI tak długo, aż jej aktywność nie ulegnie zahamowaniu po przyłączeniu ligandu (sTNF-α R1), powodującego aktywację swoistej fosfatazy SHP2 [28]. Ze względu na osobliwy charakter (aktywacja bez ligandu, natomiast inaktywacja przez ligand) ostatni z przytoczonych torów określono mianem sygnalingu odwrotnego (reverse signaling), już wcześniej opisywany dla innych ligandów z ro-

dziny TNF (CD30, CD40, OX40, 4-1BB). Obecnie trudno jeszcze jednoznacznie ocenić fizjologiczną funkcję sygnalingu odwrotnego. Biorąc jednak pod uwagę dużą oporność niektórych komórek nowotworowych na naturalne mechanizmy ich eliminacji oraz zdolność do wytwarzania sTNF-α R1 i sTNF-α R2 przypuszcza się, że ten utrwalony ewolucyjnie proces daje komórkom nowotworowym zdolność lokalnej immunosupresji. Pewnych dowodów na poparcie tej hipotezy dostarczają badania komórek ludzkiego raka okrężnicy linii COLO 205. Komórki COLO 205 należą do niewrażliwych na cytotatyczne i cytotoksyczne skutki działania sTNF-α, natomiast giną w procesie apoptozy, jeśli obecne w ich błonie komórkowej TNF-α R1 i TNF-α R2 ulegną aktywacji przez mTNF-α (ryc. 2).

Wykazano, że makrofagi stawały się wyjątkowo cytotoksyczne wobec komórek COLO 205 jeśli poddano je działaniu BB1101 – inhibitora TACE, uniemożliwiając w ten sposób złączanie sTNF-α, przez co w błonie makrofagów gromadził się mTNF-α [27]. Cytotoksyczność makrofagów ulegała jednak zniesieniu po preinkubacji z sTNF-α R1, potwierdzając supresję wywołaną przez sygnaling odwrotny [27]. Zastosowanie czynników wybiórczo hamujących aktywność TACE w makrofagach może mieć znaczenie kliniczne. Można się bowiem spodziewać uwrażliwienia komórek guza na naturalny mechanizm eliminacji.

ROLA INTERFERONÓW W PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK COLO 205

Zanim zostaną szczegółowo opisane inne mechanizmy chroniące komórki COLO 205 przed cytotoksycznym działaniem cytokin immunomodulacyjnych przypomnijmy pokrótce przebieg transdukcji sygnałów indukowanych przez interferony (IFN). Opisany niżej przebieg reakcji jest w ogólnym zarysie charakterystyczny również dla innych cytokin np. IL-3, IL-6,



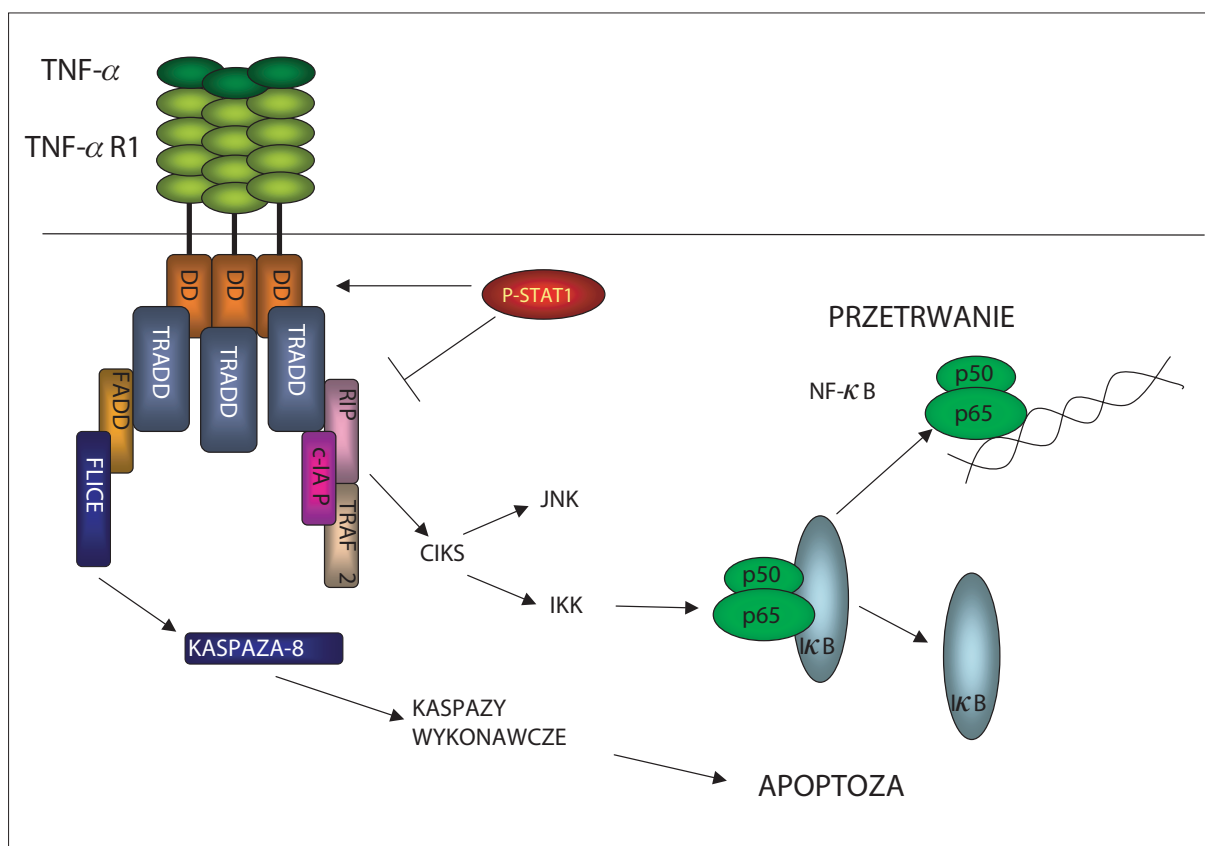
Ryc. 2. Przykłady indukowania śmierci przez makrofagi w komórkach COLO 205 i hamowania aktywności cytotoksycznej makrofagów przez komórki ludzkiego raka okrężnicy linii COLO 205. Po stronie lewej widoczna aktywacja torów przekazywania sygnałów śmierci zależnych od TNF- α R1 i TNF- α R2 w komórkach COLO 205 poprzez przyłączenie mTNF- α , który spełnia rolę ligandu-receptora. Po stronie prawej widać immunosupresję indukowaną przez komórki COLO 205 wydzielające IL-10 w odpowiedzi na IL-6 wydzielaną przez makrofagi

IL-9, czynników wzrostu (EGF, GCSF, IGF-1), hormonów (GH, EPO), a także dwuniciowego RNA. IFN- γ należy do cytokin prozapalnych, działając na receptory błonowe powoduje ich oligomeryzację i rekrutację niereceptorowych kinaz tyrozynowych Jak1 i Jak2. Aktywowane kinazy fosforylują z kolei tyrozynowe domeny receptora. Ufosforylowane reszty tyrozynowe receptora są „rozpoznanawane” przez białka mające domeny SH2. Należą do nich m.in. białka STAT1, które po przyłączeniu do receptora stają się celem działania Jak1 i Jak2 i ulegają fosforylacji przy domenie tyrozynowej Tyr⁷⁰¹ (Y701). Istnieje doniesienie, że Jak2 może również fosforylować STAT1 przy domenie serynowej [36]. Aktywne cząsteczki STAT1 mogą utworzyć homodimery dzięki połączeniom między przeciwnymi domenami SH2 jednego z fosfotyrozyną 701 drugiego białka i odwrotnie. Dimery STAT1 wykazują aktywność transkrypcyjną oddziałując na geny zawierające tzw. sekwencję GAS. Interferony typu I (IFN- α , IFN- β i IFN- ω), powodując heterodimeryzację receptorów IFNAR1 i IFNAR2, analogicznie do IFN- γ aktywują Jak1 i Tyk2, a te z kolei podobnie do Jak1 i Jak2 powodują fosforylację STAT1 i STAT2 przy domenach tyrozynowych. Wykorzystując opisany mechanizm STAT1 i STAT2 tworzą heterodimery, a po połączeniu z białkiem p48 formują kompleks transkrypcyjny ISGF3, regulujący aktywność genów zawierających sekwencję ISRE. Istnieje kilka rodzajów białek STAT (-1, -2, -3, -4, -5, -6) przy czym do pełnej aktywacji STAT1, -3 i -5 potrzebna jest dodatkowo fosforylacja domeny serynowej Ser⁷²⁷ (S727) w części C-terminalnej łańcucha.

W przypadku indukcji przez IFN- α reakcja jest katalizowana przez Jak2 lub kinazę białkową B (Akt). Ta ostatnia aktywowana jest za pośrednictwem 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI-3K) wskutek ufosforylowania tyrozyny w jej podjednostce katalitycznej p85 [33]. O ile aktywność transkrypcyjna STAT1 jest niezbędna do indukcji genów kodujących białka indukcyjne i wykonawczej fazy apoptozy [3], takich jak ICE, CPP32 i ICH1 [14], o tyle aktywność STAT3 wywołana przez IFN- α lub IFN- β na poziomie receptora IFNAR1 prowadzi do aktywacji NF- κ B za pośrednictwem kaskady PI-3K/Akt. Aktywacja jest skutkiem ufosforylowania podjednostki blokującej I κ B przy domenach serynowych, dzięki czemu białko to może ulec ubiquitynacji i proteosomalnej degradacji. Odłączenie i eliminacja I κ B umożliwia heterodimerowi p50/p65 (NF- κ B) przemieszczenie do jądra komórkowego, gdzie wykazuje aktywność transkrypcyjną przyłączając się do nici DNA w regionach (cis-acting κ B) promotorów i enhancerów genów istotnych do przeżycia. Podwyższona aktywność PI-3K/Akt oraz następcza aktywacja NF- κ B służą zatem komórce do poprawienia przeżywalności [33]. Akt dodatkowo hamuje apoptozę komórek pobudzając potencjał transaktywacyjny p50/p65 [15].

ROLA KINAZ NIERECEPTOROWYCH WE WRAŻLIWOŚCI KOMÓREK COLO 205 NA CZYNNIKI APOPTOGENNE

Kwestia udziału białek STAT i przedstawionej powyżej kaskady przekazywania sygnału w odniesieniu do TNF- α nadal



Ryc. 3. Schemat rozwidlenia dróg przekazywania sygnałów od TNF- α R1. Tor śmierci (apoptoza) z udziałem TRADD/FADD/FLICE i kaskadą kaspaz oraz tor przeżycia (przetrwanie) z udziałem TRADD/RIP/TRAF2/c-IAP/CIKS/IKK/NF- κ B-JNK. Hamowanie apoptozy jest skutkiem oddziaływań genomowych NF- κ B i/lub FOS, JUN, MYC

pozostaje kontrowersyjna. Pierwsze doniesienia na temat potencjalnego udziału czynników STAT w transdukcji i wywołaniu przez TNF- α śmierci komórek sugerowały główną rolę STAT1 w utrzymaniu konstytutywnej aktywności kaspaz niezbędnych do wywołania apoptozy [14]. Poszukując drogi działania STAT1 wymienieni autorzy zauważyli, że pomimo zablokowania transkrypcji przez aktywną D (AD) TNF- α indukował apoptozę w komórkach z zachowaną przez STAT1 zdolnością do tworzenia homodimerów. Cytokina nie wykazywała natomiast takiego działania w komórkach, które utraciły funkcjonalne białko STAT1 na skutek mutacji typu „nonsense”. Apoptozę wywołano w komórkach, które utraciły na skutek mutacji typu „missense” zdolność do tworzenia przez STAT1 homodimerów, pod warunkiem, że STAT1 miał domeny SH2 i mógł ulec fosforylacji przy S727 w części C-terminalnej łańcucha. Wydaje się zatem, że do wywołania przez TNF- α śmierci komórek wystarcza sama obecność STAT1 a nie aktywność transkrypcyjna wynikająca ze zdolności do tworzenia przez STAT dimerów. Nie można jednak odrzucać możliwości oddziaływania STAT na geny, albowiem, jak wykazali Chatterjee-Kishore i współpr. [2], pozbawiony fosfotyrozyny (Y701) STAT łączył się z czynnikiem transkrypcyjnym IRF1. Do genów podlegających regulacji przez STAT1 należy m.in. *LMP2* – podjednostka proteasomu 20S niezbędna do zaprezentowania limfocytom T CD8⁺ determinant antygenowych wirusów lub komórek guza w reakcji z udziałem białek głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) klasy I. Aktywacja odbywała się w zachodzącej na siebie wspólnej sekwencji

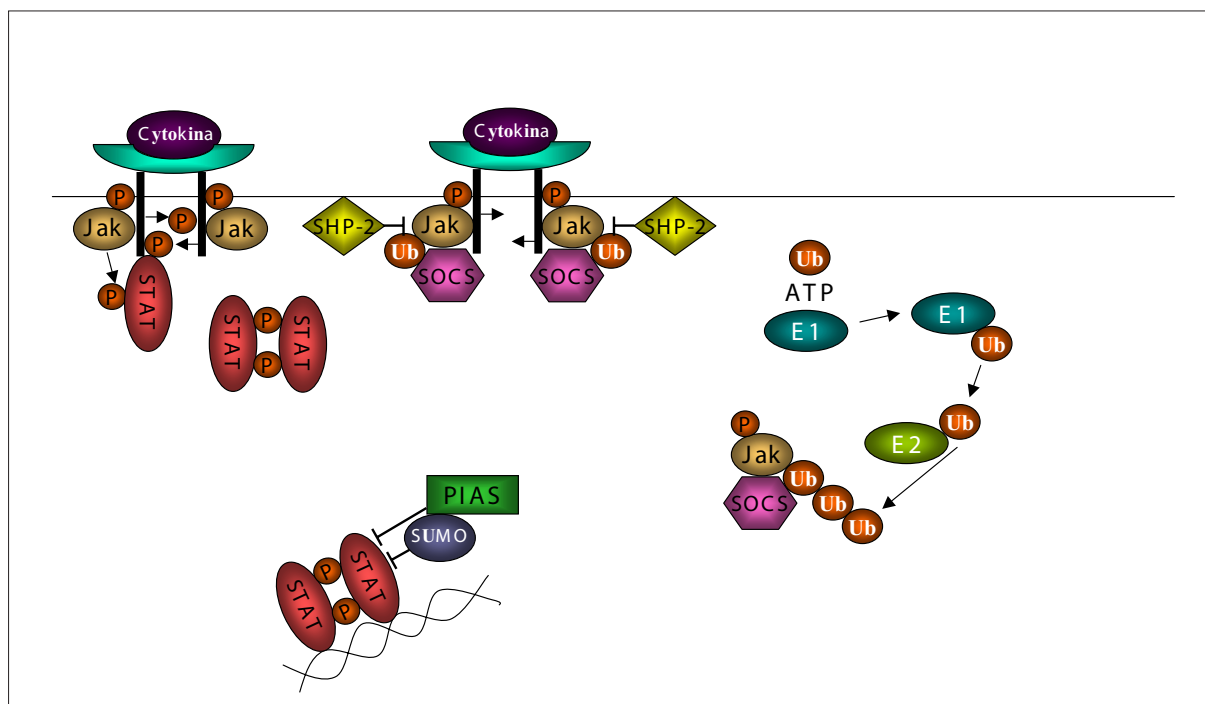
ICS-2/GAS. Badania na myszach transgenicznym potwierdziły, że u osobników niewykazujących ekspresji STAT 1 („STAT-null”) ryzyko rozwoju chorób nowotworowych jest większe, ale nie stwierdza się tak poważnych wad rozwojowych jak u osobników „Cyp32-null” (niewykazujących ekspresji kaspazy 3) [13,16]. Opierając się na zebranych doniesieniach Guo i współpr. [4] a później Wang i współpr. [26] zasugerowali, że STAT1 może brać udział w transdukcji sygnału od receptora TNF- α R1. Guo i współpr. [4] wykazali, że kinazy Jak1, Jak2 i Tyk2 przyłączają się do wewnętrzcytoplazmatycznej domeny receptora TNF- α R1, na który działa TNF- α lub ligand agonista np. swoiste przeciwciało anti-TNF- α R1. Procesom tym towarzyszy fosforylacja (aktywacja) STAT1, STAT3, STAT5 i STAT6 bez następczego oddziaływania na genom, przynajmniej w odniesieniu do STAT1 i STAT3. Opisane zjawisko stwierdzono w ginących pod wpływem TNF- α mysich fibroblastach linii 3T3-L1 oraz komórkach ludzkiej linii HeLa. Molekularny mechanizm śmierci komórek HeLa (podobnie jak i innych linii przebadanych komórek) na skutek przyłączenia TNF- α do receptora TNF- α R1 miały polegać na interakcji STAT1 z białkiem TRADD, bez wpływu na rekrutację białka FADD i uformowanie się kompleksu DISC. Bez przeszkód zachodziłaby więc aktywacja kaspazy 8 i indukowanie apoptozy komórek. W tym samym czasie STAT1 miałby uniemożliwiać transmisję sygnału przetrwania na rozwidleniu dróg sygnałowych od TNF- α -TNF- α R1-TRADD do białek adaptorowych RIP i TRAF2, które warunkują aktywację NF- κ B i przetrwanie komórek (ryc. 3).

W tym miejscu wypada zwrócić uwagę, że w zależności od aktywacji jednej z wymienionych dróg TNF- α może wywołać śmierć komórki (droga zależna od FADD) lub przeżycie (droga zależna od RIP/TRAF2) [9,10]. Zdaniem autorów głównym czynnikiem decydującym o aktywności jednej lub drugiej drogi jest przede wszystkim stopień fosforylacji STAT1 przy Y701, który determinowałby śmierć komórek dzięki inhibicji NF- κ B a w konsekwencji i zależnego od NF- κ B hamowania apoptozy. Nie wykazano, aby proces ten był natomiast zależny od aktywności transkrypcyjnej dimerów STAT1. Opierając się na ostatnim spostrzeżeniu, w wysiłkach nad uniemożliwieniem komórkom nowotworowym „ucieczki” przed odpowiedzią immunologiczną uzasadnione wydaje się poszukiwanie czynników aktywujących STAT1 przez fosforylację Y701 oraz przyłączanie się do TRADD. Zakładając główną rolę STAT1 ufosforylowanego przy Y701 bez znaczenia wydaje się fosforylacja przy S727, która oznacza dla STAT1 podwyższenie aktywności transkrypcyjnej. Poznanie mechanizmów regulacji aktywności Jak1, Jak2 i Tyk2 jako kinaz nadrzędnych dla STAT oraz czynników decydujących o powinowactwie STAT1 do TRADD w przeciwieństwie do aktywności genomowej STAT1 może mieć podstawowe znaczenie. Najnowsze badania nad interakcją pomiędzy STAT1 a TRADD wykazały, że w komórkach poddanych działaniu IFN- γ , STAT1 zespała się z TRADD, przy czym stopień fosforylacji STAT1 jest tym większy im mniejsza jest dostępność TRADD do tworzenia połączeń ze STAT1 (ograniczona wskutek introdukcji siRNA hamującego ekspresję TRADD) [29]. Dotychczas sądzono, że połączenia TRADD-STAT1 są charakterystyczne wyłącznie dla kompleksu sygnałowego powstającego przy TNF- α R1. W świetle zebranych obserwacji wydaje się bardziej prawdopodobne, że kompleksy TRADD-STAT1 wykrywane zarówno w cytoplazmie jak i w jądrach badanych komórek, powstają często w odpowiedzi na działanie co najmniej TNF- α , IFN- α lub IFN- γ . Może to oznaczać, że STAT1 pełni rolę łącznika w poziomych oddziaływaniach pomiędzy szlakami sygnałowymi pochodzącymi od cytokin immunomodulacyjnych. W tym kontekście dokładniejsze poznanie funkcji STAT1 w komórkach COLO 205 jest szczególnie ważne, albowiem są one wyjątkowo odporne na działanie wymienionych wcześniej cytokin zastosowanych indywidualnie, natomiast stają się wrażliwe po zastosowaniu tych samych cytokin w różnych kombinacjach [6]. Na szczególną uwagę zasługuje to, że komórki COLO 205 poddają się łatwo apoptogennemu działaniu TRAIL. Molekularne mechanizmy zaangażowane w wytwarzanie TRAIL przez komórki limfoidalne oraz ekspresja swoistych receptorów dla tego ligandu na komórkach COLO 205, podobnie jak i rola STAT1 w transdukcji sygnału od receptorów TRAIL (DR4, DR5 i inne) czekają na wyjaśnienie. Z najnowszych badań dotyczących właściwości komórek raka jelita grubego w odniesieniu do konstytutywnej aktywności torów przekazywania sygnału wynika, że komórki linii COLO 205, Caco-2, COLO 201 i HT29 w odróżnieniu od LOVO, DLD-1, SW480, SW620 czy HCT116 nie wymagają aktywacji toru Ca²⁺-cPKC-Raf-1-ERK-NF- κ B do zwiększenia ekspresji TRAF1 [25]. Białko adaptorowe TRAF1 może się przyłączać do TRADD i TRAF2 sekwstrując wówczas c-IAP1, c-IAP2, TRADD oraz RIP, odgrywając w ten sposób ważną rolę w hamowaniu apoptozy [11]. Wyniki tych badań nasuwają podejrzenie, że czynnik transkrypcyjny NF- κ B nie jest jedynym ważnym dla komórek COLO 205 regulatorem przetrwania. Ze względu na moż-

liwość aktywowania szlaku zależnego od JNK/SAPK można by przypuszczać, że ta ostatnia droga ratowania komórki przed śmiercią indukowaną za pośrednictwem TNF- α ma większe znaczenie [23]. Aktywacja JNK/SAPK następuje jednak przez odgałęzienie torów sygnału od TNF- α R1 i w wyniku interakcji pomiędzy TRADD a TRAF2/CIKS, a więc drogą, nad którą nadrzedną funkcję ma sprawować STAT1. Na podstawie przedstawionych obserwacji nie wydaje się zatem prawdopodobne by tor przekazywania sygnału zależny od JNK/SAPK stanowił alternatywny szlak przetrwania komórek z aktywnym STAT1. Ważniejszą funkcję od JNK/SAPK pełni raczej p53, albowiem u myszy z mutacją typu „nonsense” w genie *p53* i niefunkcyjnym czynnikiem STAT1 nowotwory rozwijają się w jeszcze większej różnorodności niż u osobników „STAT-null” [13], co potwierdza główną rolę p53 w hamowaniu rozwoju raka. Do wyjaśnienia roli STAT1 w transdukcji sygnału śmierci/przeżycia od receptora TNF- α R1 przyczyniły się badania Mukhopadhyaya i współpr. [19], którzy podjęli się sprawdzenia czy istnieją różnice w przebiegu obydwu reakcji w komórkach stransformowanych ludzkich fibroblastów, które nie wykazują ekspresji STAT1. W jednej z nich dokonano udanej i trwałej transfekcji cDNA dla STAT1. Nie stwierdzili oni różnic w odpowiedzi biologicznej ani w molekularnych mechanizmach reakcji na TNF- α w obu liniach komórek. Bez wątpienia stwierdzili jednak, że STAT1 jest niezbędny do przeniesienia sygnału śmierci na drodze blokowania aktywacji NF- κ B, lecz ligandem do wywołania tego stanu nie jest TNF- α lecz IFN- α . U podstaw tego zjawiska leży mechanizm pośredniczenia przez IFN- α w cytotoksycznych i cytostatycznych skutkach działania TNF- α na komórki. Ostatecznie autorzy przytoczonych obserwacji uważają, że STAT1 nie jest potrzebny do tego by TNF- α nie mógł uaktywnić NF- κ B, JNK i wywołać apoptozę ludzkich fibroblastów. Niewątpliwie, fibroblasty giną pod wpływem TNF- α , ale już komórki COLO 205 nie poddają się apoptogennemu działaniu tej cytokiny, zatem oczekiwanie, że IFN- α wspomogł TNF- α w eliminacji komórek COLO 205 jest mało prawdopodobne. A jednak, Herbeuval i współpr. [6] podjęli się zadania oceny cytotoksycznego oddziaływania różnych cytokin immunomodulacyjnych na komórki kilku linii raka jelita grubego w tym COLO 205 i stwierdzili, że wbrew wcześniejszym doniesieniom innych autorów TNF- α w stężeniu farmakologicznym a IFN- α i TNF- α zastosowane łącznie w stężeniach fizjologicznych powodują wczesną apoptozę komórek linii COLO 205 (nasze badania nie potwierdzają tych spostrzeżeń). Najskuteczniejszym induktorem śmierci komórek COLO 205 okazał się jednak TRAIL.

MAKROFAGI, WSPÓŁPRACA Z INNYMI KOMÓRKAMI A SYNERGIZM DZIAŁANIA CYTOKIN IMMUNOMODULACYJNYCH

Rozważając mechanizmy obronne ustroju odpowiadające za eliminację komórek nowotworowych szczególną uwagę trzeba zwrócić na makrofagi zdolne do naciekania guza (infiltracja), rozpoznawania komórek guza oraz wybiórczego ich zabijania korzystając z narzędzi uruchamianych dzięki kontaktowi makrofag-komórka oraz uwalnianych cytokin cytotoksycznych. Nieco więcej światła na pierwszy z wymienionych mechanizmów zabijania komórek guza jelita grubego rzuciły obserwacje zebrane przez Watta i współpr. [27]. We wspólnej hodowli monocytów linii Mono mac 6 i komórek linii COLO 205 komórki umierały z powodu za-



Ryc. 4. Przykłady hamowania torów sygnału zależnych od niereceptorowych kinaz tyrozynowych Jak/Tyk i STAT. Od strony lewej do prawej: reakcja aktywacji kaskady Jak/STAT; reakcja hamowania aktywacji Jak przez fosfatazę SHP-2 i/lub SOCS; wreszcie poliubikwitynacja Jak. Po przyłączeniu SOCS do Jak nie dochodzi do fosforylacji receptora. Obecność SOCS pozwala rozpoznać Jak jako element docelowy proteasomu. Przyłączenie PIAS i sumoylacja STAT powodują odpowiednio: zahamowanie aktywności oraz poliubikwitynację i proteasomalną degradację STAT

blokowania przez mTNF- α sygnału odwrotnego, ujawniając główną rolę kontaktu makrofag-komórka. W przypadku drugiego z mechanizmów (humoralnego) jak podają Herbeuval i wspólr. [6] nadsącz zebrany z hodowli makrofagów izolowanych z wysięków pobranych od chorych na wczesną postać raka, po wymieszaniu w równych częściach z pożywką zabijał około 40% komórek COLO 205. Takich właściwości nie miał nadsącz zebrany z hodowli makrofagów izolowanych z wysięków pobranych od chorych na zastoinową niewydolność krążenia lub zaawansowaną postać raka. Okazało się, że dla komórek COLO 205 fatalne w skutkach działanie nadsączu spowodował ligand TRAIL, przy czym komórki COLO 205 w warunkach nasilonej apoptozy wykazywały ekspresję od trzynastu do sześciu razy więcej receptorów TRAIL, odpowiednio (DR5) i (DR4). Kiedy wymienione dane porównano z wynikami obserwacji zebranych po zastosowaniu rekombinantów TRAIL, TNF- α i IFN- α okazało się, że TRAIL zastosowany w stężeniu wyższym (10 ng/ml) niż wykryte w nadsącu (około 1 ng/ml) nie zwiększył odsetka apoptotycznych komórek COLO 205, podobnie jak i pozostałe wymienione cytokiny. Niemal 90% komórek COLO 205 ginęło jednak, gdy TRAIL zastosowano razem z IFN- α lub TNF- α , lub z obydwoma cytokinami naraz. Niewątpliwie pomiędzy wymienionymi cytokinami dochodzi do synergizmu działania znacznego stopnia. W jaki sposób TRAIL, IFN- α i TNF- α współdziałają z sobą w indukowaniu apoptozy komórek raka okrężnicy jest obecnie celem intensywnych badań. W rozważaniach na temat przyczyn śmierci komórek wywołanej przez wymienione cytokiny uwaga jest zwrócona na potencjalne blokowanie toru(ów) przetrwania, ewentualnie na aktywację zewnątrzpo pochodnego (zależne-

go od ligandu) toru apoptozy. Należy nadmienić, że FasL nie indukował apoptozy w komórkach linii COLO 205 ani samodzielnie, ani w różnych kombinacjach z pozostałymi cytokinami [6]. W wyjaśnieniu wysokiego wskaźnika przetrwania komórek linii COLO 205 (90%) w odpowiedzi na reakcję układu obronnego pomocne jest założenie zdolności komórek raka do indukowania immunosupresji. Niedawno takie zjawisko w komórkach raka jelita grubego kilku linii ludzkich (COLO 205, COLO 320 i HT29) opisali Herbeuval i wspólr. [7]. Korzystając z opisanego wcześniej modelu doświadczalnego stwierdzili, że dodanie 50% nadsączu znad hodowli makrofagów pobranych od ludzi zdrowych lub chorych na raka do pożywki użytej w hodowli komórek raka jelita grubego powodowało wydzielanie przez te ostatnie IL-10 o działaniu immunosupresyjnym i przeciwzapalnym [32]. W identycznych warunkach IL-10 nie wydzielaly komórki raków: szyjki macicy (HEC1A), gruczołu mlekowego (MCF7), płuc (A549) i gruczołu krokowego (PcPc3). Indukcja wydzielania IL-10 przez komórki raka jelita grubego następowała pod wpływem obecnej w nadsącu IL-6. Ta cytokina prozapalna wydzielana była przez makrofagi i działała za pośrednictwem receptorów IL-6R na komórki raka jelita grubego [8]. Wydzielanie IL-10 uległo zahamowaniu pod wpływem monoklonalnych przeciwciał anti-IL-6 lub anti-IL-6R dodanych do nadsączu. Jednocześnie zablockowana została fosforylacja STAT3, który jak wiadomo spełnia rolę mediatora za pośrednictwem indukowania ekspresji genu *IL-10* [5]. Czynniki STAT3 podlegał zatem fosforylacji (aktywacji) w następstwie oddziaływania IL-6 za pośrednictwem IL-6R i białka adaptorowego/receptora gp130 (ryc. 2). Wspomniano już o zjawisku potencjalnego hamowania

apoptozy przez NF- κ B, JNK, cPKC, PKB/Akt. Czas zatem ujawnić molekularne mechanizmy hamowania aktywności czynników, które decydują o transdukcji sygnału oraz indukcji genów swoistych dla eliminacji komórek.

FOSFATAZY KINAZ TYROZYNOWYCH I ICH ROLA W PRZEŻYCIU KOMÓREK RAKA JELITA GRUBEGO

Hiperaktywny sygnał transdukowany przez STAT oraz kinazy nadrzędne Jak/Tyk oznacza poważne zaburzenia czynności komórek i tkanek. Brak na przykład postaci funkcjonalnej fosfatazy SHP-1 (dawniej PTP1C, SHPTP-1, SHP lub HCP) prowadzi do nadmiernej proliferacji i aktywności makrofagów, które uszkadzają u transgenicznym myszy (SHP1^{-/-}) płuca i skórę (motheaten mice). Właśnie na straży krótkotrwałej aktywności cytosolowych kinaz tyrozynowych Jak/Tyk stoją konstytutywne fosfatazy typu SHP (SH2 containing phosphatases) zawierające domenę SH2. SHP-1 hamuje aktywność cytokin defosforylując fosfotyrozynę transduktorów np. receptora IL-4, receptora c-kit, receptora EPO oraz kinazy Jak2. Może również łączyć się z receptorem insulinowym. Druga z fosfataz – SHP-2 (dawniej Syp, SHPTP-2, SHTP-3, PTP2C lub PTP1D), z wyjątkiem receptora gp130, odgrywa rolę pozytywnego regulatora transdukcji sygnału (ryc. 4).

W przypadku STAT analogiczną niekatalityczną funkcję pełnią konstytutywne inhibitory PIAS. Oprócz wymienionych, istnieje grupa białkowych inhibitorów sygnalingu cytokin, tzw. SOCS i CIS a ich ekspresja jest indukowana (inhibitory indukowalne). Działanie SOCS polega na przyłączaniu się do receptorów zespolonych z kinazami uniemożliwiając im bezpośrednio dalsze przekazywanie informacji od cytokin oraz pośrednio dzięki ułatwieniu ubikwitinacji i proteosomalnej degradacji receptora [30]. PIAS(-y) z kolei po przyłączeniu się do STAT albo hamują wiązanie do DNA (PIAS1/STAT1, PIAS3/STAT3) albo przenoszą aktywność ligazy SUMO (sumoylacja) przy domenie Lizyna 703, a więc blisko domeny Y701 uniemożliwiając aktywację STAT przez kinazy Jak [21] (ryc. 4). Natomiast SOCS dysponując domeną SH2 podobną do STAT3 tworzy połączenia kompetycyjne z receptorami cytokin a nawet z domeną katalityczną Jak2 blokując w ten sposób transdukcję sygnału. Ponadto, kompleks ligazy ubikwitinowej E3 rozpoznaje SOCS przyłączone do białek docelowych i umożliwia ich proteosomalną degradację [12]. Obserwacje przeprowadzone na myszach transgenicznym z zahamowaniem ekspresji genów *socs1*, *socs2* i *socs3* dobrze ilustrują supresyjne funkcje odpowiednich białek. Na przykład myszy *Socs2*^{-/-} są większe ze względu na brak hamowania przekaznictwa sygnału pochodzącego od GH i IGF-1 [17], a myszy *Socs1*^{-/-} umierają przed osiągnięciem 3 tygodnia życia z powodu uogólnionej reakcji zapalnej, przeżywają jednak pod warunkiem, że jednocześnie nie mają genu IFN- γ [1].

Wszystkie pozostałe czynniki – z wyjątkiem SHP-2 – hamują wpływ cytokin różnych typów (czynników wzrostu i cytokin immunomodulacyjnych) wykorzystujących w oddziaływaniu na komórki kaskady Jak/Tyk-STAT. Czy oznacza to zablokowanie zarówno sygnałów apoptogennych (droga śmierci) jak i przetrwania (droga przeżycia), czy tylko jednej z dróg i której zależy od miejsca działania i elementów docelowych. W odniesieniu do fosfataz wydaje się, że działają one zarówno na początku drogi przekaznictwa czyli na

fosfotyrozyny receptora czy kinazy Jak [34], jak również na poziomie jądra komórkowego [24,31]. Niektóre, np. SHP-2 jest fosfatazą o podwójnej swoistości zaangażowaną na obu poziomach (wewnątrzcytoplazmatycznym i wewnątrzjądrowym) w defosforylację reszt fosfotyrozyny i fosfoseryny aktywnego STAT1 modulując w ten sposób zarówno aktywację STAT1 jak i aktywność transkrypcyjną czynnika [31]. Inna fosfataza, która ulega powszechnie ekspresji w limfocytach T (TC-PTP) została zidentyfikowana w innych komórkach jako fosfataza wewnątrzjądrowa inaktywująca przede wszystkim STAT1, ale także STAT3 [24]. Pamiętać należy również o innych genach swoistych fosfataz, w szczególności o PTB-1B czyli fosfatazie receptora insulinowego, która może defosforylować fosfotyrozynę receptorów cytokin oraz kinaz Jak2/Tyk2 [20]. Uwzględniając dużą wrażliwość fosfataz na zmiany homeostazy prooksydacyjno-antyoksydacyjnej, zjawiska dobrze opisanego przynajmniej dla PTB-1B przez Salmeena i współpr. [22] oraz Montforta i współpr. [36] wydaje się uzasadnione zbadanie następstw nadmiaru oksydantów/antyoksydantów dla transdukcji sygnałów pochodzących od cytokin w szczególności kinaz Jak i ich elementów docelowych, czyli receptorów i czynników STAT. Jeśli, jak sugerują Guo i współpr. [4] oraz Wang i współpr. [26], aktywny (czytaj ufosforylowany przy Y701) STAT1 ma niekorzystny wpływ na transmisję sygnału od TNF- α R1 do NF- κ B, to modulacja aktywności fosfataz jako antagonistów Jak i STAT1 z udziałem oksydantów/antyoksydantów powinna przynajmniej częściowo potwierdzić lub zaprzeczyć tej teorii. Jeśli z kolei rację mają Mukhopadhyay i współpr. [19], którzy nie potwierdzają by STAT1 pełnił przypisaną mu funkcję, to obecność oksydantów/antyoksydantów, o których wiadomo, że odpowiednio hamują/aktywują fosfatazy nie powinna wpłynąć na natężenie i przebieg reakcji zależnej od TNF- α .

PODSUMOWANIE

Naturalne mechanizmy humoralne eliminacji komórek nowotworowych wymagają ścisłej współpracy pomiędzy układem immunologicznym i obronnym. Dokładnego poznania wymagają w szczególności procesy molekularne niezbędne do rozpoznania komórek nowotworowych i ich eliminacji. Komórki raka jelita grubego w drodze ewolucji rozwinęły bowiem i utrwały modyfikacje szlaków przewodnictwa sygnałów chroniące przed cytotoksycznym działaniem TNF- α i interferonów. Pozwala to komórkom nowotworowym na unikanie odpowiedzi immunologicznej, co przy rozwijającej się lekooporności znacznie utrudnia leczenie. Poznanie mechanizmów chroniących komórki raka jelita grubego przed cytotoksycznym działaniem cytokin pozostaje nadal głównym celem badań naukowych. W przedstawionym artykule opisano – na przykładzie ludzkiego raka okrężnicy linii COLO 205 – złożony układ sygnalizacji wewnątrzkomórkowej uwzględniający procesy transdukcji sygnału a w ich następstwie transkrypcji prowadzące lub zapobiegające apoptozie. Naszym zdaniem w wyjaśnieniu niewrażliwości immunologicznej komórek raka jelita grubego szczególne znaczenia nabierają właściwości kinaz tyrozynowych i czynników transkrypcyjnych STAT, których funkcje nie zostały do końca poznane. Wyjaśnienie zasad działania aktywowanych przez cytokiny torów sygnałowych STAT powodujących śmierć komórek należy uważać za podstawowy warunek zastosowania w przyszłości rekombinantów cytokin do leczenia raka jelita grubego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alexander W.S., Starr R., Febber J.E., Scott C.L., Handman E., Sprogg N.S., Corbin J.E., Cornish A.L., Darwiche R., Owczarek C.M., Kay T.W., Nicola N.A., Hertzog P.J., Metcalf D., Hilton D.J.: SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*, 1999; 98: 597–608
- [2] Chatterjee-Kishore M., Wright K.L., Ting J.P.-Y., Stark G.R.: How Stat1 mediates constitutive gene expression: a complex of unphosphorylated Stat1 and IRF1 supports transcription of the LMP2 gene. *EMBO J*, 2000; 19: 4111–4122
- [3] Chin Y.E., Kitagawa M., Kuida K., Flavell R.A., Fu X.-Y.: Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 5328–5337
- [4] Guo D.-Q., Dunbar J.D., Yang C.H., Pfeffer L.M., Donner D.B.: Induction of Jak/STAT signaling by activation of the type 1 TNF receptor. *J. Immunol.*, 1998; 160: 2742–2750
- [5] Harroch S., Revel M., Chebath J.: Interleukin-6 signaling via four transcription factors binding palindromic enhancers of different genes. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 26191–26195
- [6] Herbeuval J.-P., Lambert C., Sabido O., Cottier M., Fournel P., Dy M., Genin C.: Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003; 95: 611–621
- [7] Herbeuval J.-P., Lelievre E., Lambert C., Dy M., Genin C.: Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J. Immunol.*, 2004; 172: 4630–4636
- [8] Hirano T.: Interleukin-6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.*, 1994; 16: 249–284
- [9] Hsu H., Huang J., Shu H.-B., Baichwal V., Goeddel D.V.: TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 1996a; 4: 387–396
- [10] Hsu H., Shu H.-B., Pan M.-G., Goeddel D.V.: TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 1996b; 84: 299–308
- [11] Inoue J., Ishida T., Tsukamoto N., Kobayashi N., Naito A., Azuma S., Yamamoto T.: Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.*, 2000; 254: 14–24
- [12] Kamizono S., Hanada T., Yasukawa H., Minoguchi S., Kato R.J., Minoguchi M., Hattori K., Hatakeyama S., Yada M., Morita S., Kitamura T., Kato H., Nakayama K., Yoshimura A.: The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 12530–12538
- [13] Kaplan D.H., Shankaran V., Dighe A.S., Stockert E., Aguet M., Old L.J., Schreiber R.D.: Demonstration of an IFN α -dependent tumor surveillance system in immuno-competent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 7556–7561
- [14] Kumar A., Commune M., Flickinger T.W., Horvath C.M., Stark G.R.: Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*, 1997; 278: 1630–1632
- [15] Madrid L.V., Wang C.-Y., Guttridge D.C., Schottelius A.J.G., Baldwin A.S., Mayo M.W.: Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 1626–1638
- [16] Meraz M.A., White J.M., Sheehan K.C., Bach E.A., Rodig S.J., Dighe A.S., Kaplan D.H., Riley J.K., Greenlund A.C., Campbell D., Carver-Moore K., DuBois R.N., Clark R., Aguet M., Schreiber R.D.: Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 1996; 84: 431–440
- [17] Metcalf D., Greenhalgh C.J., Viney E., Willson T.A., Starr R., Nicola N.A., Hilton D.J., Alexander W.S.: Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signaling 2. *Nature*, 2000; 405: 1069–1073
- [18] Montfort R.L.M., Congreve M., Tisi D., Carr R., Jhoti H.: Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature*, 2003; 423: 773–775
- [19] Mukhopadhyay A., Shishodia S., Fu X.-Y., Aggarwal B.B.: Lack of requirement of STAT1 for activation of nuclear factor- κ B, c-Jun NH2-terminal protein kinase, and apoptosis by tumor necrosis factor- α . *J. Cell. Biochem.*, 2002; 84: 803–815
- [20] Myers M.P., Andersen J.N., Cheng A., Tremblay M.L., Horvath C.M., Parisien J.P., Salmeen A., Barford D., Tonks N.K.: TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 47771–47774
- [21] Rogers R.S., Horvath C.M., Matunis M.J.: SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 30091–30097
- [22] Salmeen A., Andersen J.N., Myers M.P., Meng T.-C., Hinks J.A., Tonks N.K., Barford D.: Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a silylphenyl-amide intermediate. *Nature*, 2003; 423: 769–773
- [23] Song H.Y., Regnier C.H., Kirsching C.J., Goeddel D.V., Rothe M.: Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of Nuclear Factor- κ B and c-Jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 9792–9796
- [24] Ten Hoeve J., Ibarra-Sanchez M. de J., Fu Y., Zhu W., Tremblay M., David M., Shuai K.: Identification of nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 5662–5668
- [25] Wang X., Wang Q., Hu W., Evers B. M.: Regulation of phorbol ester-mediated TRAF1 induction in human colon cancer cells through a PKC/RAF/ERK/NF- κ B-dependent pathway. *Oncogene*, 2004; 23: 1885–1895
- [26] Wang Y., Wu T.R., Cai S., Welte T., Chin Y.E.: Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.*, 2000; 20: 4505–4512
- [27] Watts A.D., Hunt N.H., Madigan M.C., Chaundri G.: Soluble TNF- α receptors bind and neutralize over-expressed transmembrane TNF- κ on macrophages, but not inhibit its processing. *J. Leukoc. Biol.*, 1999a; 66: 1005–1013
- [28] Watts A.D., Hunt N.H., Wanigasekara Y., Bloomfield G., Wallach D., Roufogalis B.D., Chundri G.: A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumor necrosis factor ligand family is implicated in „reverse signaling”. *EMBO J.*, 1999b; 18: 2119–2126
- [29] Wesemann D.R., Qin H., Kokorina N., Benveniste E.N.: TRADD interacts with STAT1- α and influences interferon- γ signaling. *Nat. Immunol.*, 2004; 5: 199–207
- [30] Wormand S., Hilton D.J.: Inhibitors of cytokine signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 2003; 279: 821–824
- [31] Wu T.R., Hong Y.K., Wang X.-D., Ling M.Y., Dragoi A.M., Chung A.S., Campbell A.G., Han Z.-Y., Feng G.-S., Chin Y.E.: SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 47572–47580
- [32] Yanagawa H., Takeuchi E., Suzuki Y., Ohmoto H., Bando H., Sone S.: Presence and potent immunosuppressive role of interleukin-10 in malignant pleural effusion due to lung cancer. *Cancer Lett.*, 1999; 136: 27–32
- [33] Yang C.-H., Murit A., Pfeffer S.R., Kim J.G., Donner D.B., Pfeffer L.M.: Interferon α promotes cell survival by activating nuclear factor κ B through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 13756–13761
- [34] Yin T., Shen R., Feng G.-S., Yang Y.-C.: Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and Jak tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 1032–1037
- [35] Zhang S.Q., Kovalenko A., Cantarella G., Wallach D.: Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation. *Immunity*, 2000; 12: 301–311
- [36] Zhu X., Wen Z., Xu L.Z., Darnell J.E. Jr.: Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 6618–6623