

Budowa i funkcje jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF- κ B) oraz jego znaczenie w przewlekłej białaczce limfocytowej

The structure and the role of NF- κ B proteins and their significance in chronic lymphocytic leukemia

Katarzyna Skórka, Krzysztof Giannopoulos

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (1): 54–62

Streszczenie

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF- κ B) pełni znaczącą rolę w procesach odpornościowych i zapalnych. Zdolność NF- κ B do hamowania apoptozy, indukcji proliferacji oraz nasilania procesu angiogenezy sugeruje, że NF- κ B może być istotnym czynnikiem w procesie onkogenezy i progresji nowotworu. Przekaznictwo sygnału NF- κ B w guzach litych, a także w nowotworach hematologicznych, w tym w przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL) jest stale poznawane. Biorąc pod uwagę fakt, że NF- κ B jest niezbędny do przeżycia komórek białaczkowych, należy sądzić, że może stanowić on dobry cel terapeutyczny w PBL. W artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat struktury i funkcji białek NF- κ B, a także mechanizmów ich aktywacji i znaczenia w PBL.

Słowa kluczowe: NF- κ B, przewlekła białaczka limfocytowa, nowotworzenie

Abstract

The Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) plays a crucial role in immune and inflammatory processes. Moreover NF- κ B ability to inhibition of apoptosis, induction of proliferation and angiogenesis suggest that NF- κ B could be very significant in oncogenesis and tumor progression. Knowledge on NF- κ B signaling in solid tumors and haematological malignancies as well as CLL (chronic lymphocytic leukemia) constantly expanding. Since NF- κ B is essential to CLL cells survival it is suggested that NF- κ B could be a new therapeutic target in CLL. In this manuscript we summarize current knowledge about the structure and the functions of NF- κ B components and mechanisms of their activation and importance in CLL.

Key words: NF- κ B, CLL, leukemogenesis

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Otrzymano: 9.01.2012
Zaakceptowano do druku: 4.04.2012

Samodzielna Pracownia Hematoonkologii
Doświadczalnej,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Kierownik: dr hab. Krzysztof Giannopoulos

Adres do korespondencji:
Katarzyna Skórka
Ul. Chodźki 4a
20-093 Lublin
tel. 817564812, fax. 817564813
e-mail: katarzyna.skorka7@gmail.com

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF- κ B; *Nuclear Factor kappa B*) odkryli w 1986 roku badacze Sen i Baltimore w jądrach mysich limfocytów B jako białko konstytutywne, które jest niezbędne do transkrypcji łańcucha lekkiego kappa immunoglobulin, ponieważ wiąże się z promotorem tego genu [1]. Wykazano, że białka z rodziny NF- κ B występują powszechnie w komórkach ludzkich [2]. Przekaznictwo NF- κ B jest zintegrowane z innymi szlakami sygnalizacji wewnątrzkomórkowej biorącymi udział w syntezie wielu białek mających istotne znaczenie w procesach zapalnych, obronnych, a także w nowotworzeniu [3, 4]. Rola NF- κ B w procesach odpornościowych i zapalnych jest znana od wielu lat, natomiast znaczenie NF- κ B w procesach proliferacji, apoptozy i angiogenezy zostało opisane w badaniach ostatniej dekady. Przekaznictwo NF- κ B w guzach litych, a także w nowotworach hematologicznych, jest stale poznawane. Podobnie wciąż jest pogłębiana wiedza na temat znaczenia NF- κ B w przewlekłej białaczce limfocytowej,

która jest najczęstszą białaczką starszych osób dorosłych na półkuli zachodniej.

Budowa i funkcje czynników transkrypcyjnych należących do rodziny białek NF- κ B

Białka rodziny NF- κ B wykazują obecność strukturalnie konserwatywnego regionu – domeny RHD (*Rel homology domain*) w N-końcowym odcinku łańcucha polipeptydowego. Domena ta odpowiada za dimeryzację białek Rel/NF- κ B, wiązanie się z odpowiednią sekwencją „ κ B” składającą się z 10 par zasad (5'GGGPuNNPyPyCC-3', Pu-puryna, N-dowolna zasada Py-pirymidyna) w obrębie DNA oraz łączenie się z białkami I κ B (inhibitorami jądrowego czynnika κ B). W obrębie tej struktury znajduje się domena NLS (*nuclear localization domain*) odpowiadająca za translokację dimerów do jądra komórkowego, w którym to odgrywają swoje funkcje, regulując ekspresję wielu

różnych genów. Rodzina białek NF- κ B u ssaków składa się z 5 czynników transkrypcyjnych, które pod względem różnic w budowie, funkcji oraz mechanizmie powstawania można podzielić na 2 grupy. Do jednej grupy należą białka: RelA, RelB i cRel, natomiast do drugiej białka: NF- κ B1 oraz NF- κ B2 [3, 5–7].

Białka RelA, RelB oraz cRel charakteryzują się obecnością sekwencji TAD (*transcription activation domain*) w C-końcowym odcinku łańcucha polipeptydowego, dzięki której mają zdolność do aktywacji transkrypcji cząsteczek DNA. Syntetyzowane są jako dojrzałe białka [3]. Ekspresja białka RelA jest wszechobecna, inne białka Rel wykazują ekspresję głównie w komórkach układu hemopoetycznego. Ekspresja białka RelB występuje przede wszystkim w komórkach dendrytycznych [8].

Białka NF- κ B1(p50/p105) i NF- κ B1(p52/p100) należące do drugiej grupy są syntetyzowane jako białka prekursorowe i nieaktywne p105 i p100 mające w C-końcowym odcinku łańcucha polipeptydowego domeny ARD (*ankirin repeat domain*) zawierające wiele powtórzeń ankirynowych, typowych dla białek I κ B. W związku z tym mają zdolność do retencji białek Rel w cytoplazmie. Powtórzenia ankirynowe odpowiadają także za wiązanie się z sekwencją NLS. Na skutek proteolizy powstają z nich formy dojrzałe, aktywne, krótsze p50 oraz p52. Białka p50 i p52 mają domeny RHD, dzięki czemu mogą wiązać się z DNA. Natomiast białka te nie posiadają domen TAD niezbędnych do aktywacji transkrypcji, dlatego też funkcjonują jako represory transkrypcji. Jednak, w sytuacji gdy utworzą dimery z białkami RelA, RelB i cRel, posiadają zdolność do aktywacji transkrypcji [3, 9–11].

Formy aktywne rodziny białek NF- κ B

Dimery powstające na skutek dimeryzacji białek z obu grup są formami aktywnymi. Funkcjonują jako regulatorowe białka transkrypcyjne. Poza białkiem RelB, które tworzy jedynie heterodimery, wszystkie podjednostki mogą tworzyć hetero- i homodimery. Efekt biologiczny wywierają tylko heterodimery. Dimer p50/RelA (nazywany NF- κ B) jest najbardziej rozpowszechnionym dimerem w organizmie [10, 12].

W zależności od budowy dimery regulują ekspresję genów w zróżnicowany sposób, mają różne

powinowactwo do poszczególnych miejsc promotorowych, wywierają odmienny efekt biologiczny. Czas przenikania heterodimerów do jądra również wpływa na proces regulacji transkrypcji genów [10]. Rodzaj genów, które regulują dimery, zależy również od środowiska komórkowego i typu komórki, ponieważ ten układ zintegrowany jest z innymi ścieżkami przekazywania sygnału [16].

Drogi aktywacji rodziny białek NF- κ B

Dimery NF- κ B występują w cytoplazmie większości komórek w postaci nieaktywnej, ponieważ związane są z I κ B, które dzięki obecności powtórzeń ankirynowych wiążą się z sekwencją NLS białek rodziny NF- κ B i uniemożliwiają ich translokację do jądra komórkowego [17]. Wykazano też, że I κ B w połączeniu z NF- κ B mogą występować w mitochondriach [18, 19]. Pod wpływem działania określonych czynników stymulujących aktywowane są odpowiednie kinazy, które prowadzą do fosforylacji I κ B. Wówczas I κ B ulegają ubikwitynacji, a następnie degradowane są w proteasomie. Na skutek wyżej wymienionych procesów wolne dimery NF- κ B transportowane są do jądra komórkowego, gdzie ulegają dalszej aktywacji i regulują ekspresję genów będących pod ich kontrolą. W zależności od bodźców stymulujących mechanizmu aktywacji wyróżniono drogi aktywacji białek NF- κ B: klasyczną, alternatywną i atypowe [12, 17]. Czynniki stymulujące oraz funkcje dróg aktywacji przedstawione są w tabeli II.

Klasyczna droga aktywacji jest zależna głównie od podjednostki IKK β kompleksu kinaz inhibitorów κ B (IKK). Kinaza IKK β fosforyluje 2 specyficzne reszty serynowe Ser-32 i Ser-36 w N-końcowym regionie I κ B α . Ufosforylowane białka I κ B α ulegają ubikwitynacji przez ligazę ubikwintyny SCF i są degradowane w proteasomie 26S, dzięki czemu wolne dimery p50/RelA i p50/c-Rel transportowane są z cytoplazmy do jądra komórkowego [17, 20].

Alternatywna droga aktywacji jest zależna od aktywowanej przez kinazę NIK podjednostki IKK α wchodzącej w skład kompleksu IKK, która to fosforyluje białko p100 wchodzące w skład nieaktywnego jeszcze transkrypcyjnie dimeru p100/RelB. Ufosforylowane białko p100 ulega ubikwitynacji, a następ-

Tabela I. Funkcja dimerów NF- κ B [13–15]

Table I. The role of NF- κ B dimers [13–15]

Rodzaj dimeru	Znaczenie
Homodimery: p50/p50, p52/p52	Inhibitory transkrypcji, ale w połączeniu z białkiem Bcl3 mające zdolność do aktywacji transkrypcji
Heterodimery składające się z RelA lub cRel lub RelB z p50 lub p52	Aktywatory transkrypcji (obecność domeny RHD)
Heterodimer: RelB/RelA	Represory transkrypcji (brak zdolności do związania się z cząsteczką DNA)

Tabela II. Drogi aktywacji NF-κB [3, 11, 12, 24]

Table II. The pathways of NF-κB activation [3, 11, 12, 24]

Rodzaj drogi aktywacji	Czynniki stymulujące	Funkcja
Klasyczna	Cytokiny prozapalne TNFα, i IL-1, bakterie (lipopolisacharydy), wirusy (białka wirusowe, dwuniciowe RNA) przez TLR, mitogeny aktywujące receptory BCR	Aktywacja p50/RelA, p50/cRel, udział w odporności wrodzonej i reakcjach zapalnych
Alternatywna	LTβ, CD40L, BAFF, EBV, LMP1	Aktywacja p52/RelB, zapewnienie rozwoju i prawidłowego funkcjonowania narządów limfoidalnych, udział w odpowiedzi immunologicznej wtórnej, regulacja przeżycia niedojrzałych limfocytów B, udział w odpowiedzi humoralnej
Atypowe niezależne od kompleksu kinaz IKK	Czynniki uszkodzające DNA (UV, doksorubicyna), stres oksydacyjny	Aktywacja p50/RelA
	Hipoksja, H ₂ O ₂	Aktywacja p50/RelA
Atypowa zależna od kompleksu kinaz IKK	Stres genotoksyczny	Aktywacja p50/RelA

TNFα – czynnik martwicy nowotworów α, IL-1 – interleukina 1, TLR – toll like receptor, BCR – receptor komórki B, LTβ – limfotoksyna β, EBV – wirus Epsteina-Barr, LMP1 – latentne białko błonowe 1

nie C-koniec łańcucha białkowego ulega degradacji, na skutek czego powstaje białko p52. Aktywny wówczas transkrypcyjnie dimer p52/RelB przenika do cytoplazmy i wpływa na transkrypcję określonych genów [17, 20].

Ponadto dimery NF-κB aktywowane są także w sposób atypowy, funkcjonalnie znacznie różniący się od drogi aktywacji klasycznej, ale również zależnie od kompleksu kinaz IKK. Ta droga aktywacji zależna jest od podjednostki IKKγ w chodzącej w skład kompleksu IKK [21].

Białka NF-κB mogą być również aktywowane atypowo, niezależnie od kompleksu kinaz IKK. W tej sytuacji stymulacja nie następuje w skutek oddziaływań receptor–ligand. W tej drodze aktywacji, podobnie jak w klasycznej, fosforylowany jest IκBα, ale w odmienny sposób. IκBα może ulegać fosforylacji na skutek aktywacji kinazy p38, która aktywuje CK2 (kinazę kazeiny 2). Wówczas ufosforylowane IκBα są degradowane przez kalpainy [22]. Ponadto IκBα może ulegać fosforylacji w skutek działania kinazy Tyr-42, dzięki czemu dochodzi do oddysocjowania inhibitora od białek NF-κB. Ten mechanizm aktywacji nie wymaga degradacji proteolitycznej inhibitora NF-κB [23].

Rola NF-κB w nowotworzeniu

Na skutek aktywacji szlaku NF-κB dochodzi do kontroli ekspresji genów kodujących między innymi cytokiny zapalne, chemokiny, czynnik wzrostu, białka ostrej fazy, które biorą udział w procesach obronnych i zapalnych organizmu [3, 9, 25]. W wielu chorobach zapalnych, takich jak: astma, reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżyca, wykazano nieprawidłową, stałą aktywację NF-κB i zwiększoną aktywność

transkrypcyjną, co wynika najprawdopodobniej z upośredzonych mechanizmów regulacji układu NF-κB [26, 27]. NF-κB reguluje również ekspresję genów, które kodują białka odgrywające ważną rolę w wielu procesach na poziomie komórkowym, takich jak: proliferacja, różnicowanie, apoptoza, adhezja komórkowa, angiogeneza [3, 9, 25].

Wiele publikacji potwierdza antyapoptotyczne działanie NF-κB. Aktywacja NF-κB chroni komórki przed apoptozą indukowaną zarówno na drodze zewnętrznej, jak i wewnętrznej. NF-κB zwiększa ekspresję białek antyapoptotycznych, takich jak: c-FLIP (białko FLIP komórkowe) (inhibitor apoptozy na drodze zewnętrznej), rodzinę białek IAP (inhibitory apoptozy): cIAP 1 (komórkowy inhibitor apoptozy 1), cIAP2 (komórkowy inhibitor apoptozy 2), XIAP (inhibitor apoptozy związany z chromosomem X) (inhibitory apoptozy na drodze zewnętrznej i wewnętrznej), rodzinę białek Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*): Bcl-x1, Bfl-1/A1. Ponadto NF-κB hamuje ekspresję białek proapoptotycznych, takich jak: białka Bax (*Bcl-2-associated X protein*), JNK (N-końcowa kinaza c-Jun), hamuje aktywność białka p53 (białko kodowane przez gen TP53) (induktor apoptozy na skutek uszkodzeń DNA lub stresu komórkowego). NF-κB aktywuje ekspresję genów, które hamują akumulację ROS (reaktywne formy tlenu), chroniąc komórki przed apoptozą [9, 26].

NF-κB wywiera stymulujący wpływ na proces proliferacji. Ułatwia przejście komórek z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego poprzez pobudzenie transkrypcji cykliny D1 oraz protoonkogenu c-myc. Ponadto NF-κB pobudza proces angiogenezy poprzez zwiększanie ekspresji VEGF (śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń), IL-1 (interleukina 1), IL-8 (interleukina 8), TNF (czynnik martwicy nowotworu) oraz sty-

Tabela III. Udział białek RelA, RelB, c-Rel w procesach immunologicznych i w nowotworzeniu [8, 17, 29, 30]

Table III. The roles of RelA, RelB, c-Rel proteins in immune processes and tumorigenesis [8, 17, 29, 30]

RelA	<ul style="list-style-type: none"> • silny aktywator transkrypcyjny • wchodzi w interakcje z czynnikami wpływającymi na ekspresję genów dla progresji cyklu komórkowego • ma właściwości antyapoptotyczne (wyciszenie tego genu u myszy wywołuje masywną apoptozę komórek wątroby) • stała aktywacja dimerów zbudowanych z RelA w różnych typach komórek nowotworowych jest niezbędna do wzrostu komórek, ich przeżycia i nowotworzenia • związany z niekorzystnym rokowaniem u chorych na PBL • aberracje chromosomowe obejmujące gen RelA opisywano w pojedynczych przypadkach chorych na szpiczaka mnogiego czy chłoniaki nieziarnicze z komórek B • amplifikacje genu RelA obserwowano w komórkach DLBCL (rozlany chłoniak olbrzymiokomórkowy typu B) oraz wielu guzów litych: nowotwory głowy i szyi, gruczolakorak piersi
RelB	<ul style="list-style-type: none"> • dimery z RelB regulują procesy dojrzewania limfocytów i rozwój narządów limfoidalnych
c-Rel	<ul style="list-style-type: none"> • silny transkrypcyjny aktywator • uczestniczy w procesie proliferacji limfocytów i ma wpływ na zachowanie prawidłowych funkcji immunologicznych limfocytów • nie wyjaśniono, czy amplifikacje genu kodującego c-Rel odpowiadają za proces transformacji nowotworowej, czy progresję nowotworu, są badania potwierdzające jego wpływ na oba te procesy • amplifikacji genu kodującego c-Rel towarzyszy zaawansowane stadium choroby i gorsze rokowanie (np. w chłoniakach olbrzymiokomórkowych) • amplifikacji tego genu często towarzyszą defekty chromosomalne związane z progresją nowotworu • c-Rel jest onkogenem u myszy i u kurcząt (jego nadekspresja prowadziła do powstania nowotworów limfoidalnych) • amplifikacje, rearanżacje czy nadekspresja genu kodującego c-Rel występują w nowotworach hematologicznych (chłoniak grudkowy, chłoniak rozlany olbrzymiokomórkowy, chłoniak Hodgkina) i w guzach litych (niedrobnokomórkowy rak płuca)

Tabela IV. Udział białek NF- κ B1 i NF- κ B2 w procesach immunologicznych i nowotworzeniu [8, 10, 29–31]Table IV. The roles of NF- κ B1 and NF- κ B2 proteins in immune processes and tumorigenesis [8, 10, 29–31]

NF-κB1 (p50/p105)	<ul style="list-style-type: none"> • udział w regulacji genów z sekwencjami κB w DNA jest wszechobecny • udział w kontroli funkcji limfocytów i makrofagów w reakcjach obronnych i zapalnych • występowanie niewielu zaburzeń strukturalnych i ekspresji w nowotworach, sugeruje się, że zmiany te mogłyby niekorzystnie wpłynąć na przeżycie i wzrost komórek nowotworowych • obserwowane są chromosomowe rearanżacje w ostrej białaczce limfoblastycznej
NF-κB2 (p52/p100)	<ul style="list-style-type: none"> • p52 wywiera działanie antyapoptotyczne • dimery z p52 regulują proces dojrzewania limfocytów i rozwój narządów limfoidalnych • w końcu C łańcucha polipeptydowego występują powtórzenia ankiryne, a więc ma zdolność do hamowania aktywacji białek NF-κB • posiada domeny śmierci aktywujące kaspazy – właściwości proapoptotyczne • chromosomalne rearanżacje w ludzkich chłoniakach powodują utratę właściwości proapoptotycznych, a przewagę antyapoptotycznych, co sugeruje jego onkogeną aktywność • chromosomalne rearanżacje występują w szpiczaku mnogim, przewlekłej białaczce limfocytowej, chłoniakach nieziarniczych z komórek B

muluje powstawanie przerzutów poprzez zwiększanie ekspresji molekuł adhezyjnych VCAM-1 (cząsteczka adhezji do śródbłonka naczyń I) i ICAM-1 (cząsteczka adhezji międzykomórkowej I) oraz metaloproteinaz MMP-9 (metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 9) i MMP-2 (metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2). NF- κ B bierze udział także w procesie unieśmiertelniania komórek, ponieważ reguluje ekspresję telomerazy [9, 26, 28].

Zdolność NF- κ B do hamowania apoptozy, indukcji proliferacji oraz nasilania procesu angiogenezy sugeruje, że NF- κ B może być istotnym czynnikiem w procesach onkogenezy i progresji nowotworu.

W wielu guzach litych (rak piersi, trzustki, jelita grubego, płuc, tarczycy, pęcherzyka żółciowego, pęcherza moczowego, nowotwory głowy, szyi) oraz w nowotworach hematologicznych (chłoniaki, białaczki) NF- κ B zlokalizowany jest w jądrze komór-

komym i aktywacja jego jest ciągła. Ze względu na różnorodność mechanizmów aktywacji szlaku NF- κ B, który jest sprzężony z innymi szlakami sygnalizacji komórkowej aktywowanymi przez wiele czynników (czynniki wzrostu, cytokiny, receptory i niereceptorowe kinazy tyrozynowe), przyczyn jego stałej aktywacji w chorobach nowotworowych jest wiele. Należą do nich, między innymi: zaburzenia na drodze aktywacji NF- κ B lub jej regulacji, defekty genetyczne genów kodujących białka NF- κ B wywołujące zmiany w ekspresji i aktywacji już samych białek NF- κ B (Tab. III, Tab. IV), a także wpływ wirusowych onkoprotein. Należy podkreślić, że NF- κ B hamuje również apoptozę indukowaną czynnikami uszkadzającymi DNA, takimi jak chemio- czy radioterapia, co skutkuje opornością na apoptozę i stanowi przeszkodę w efektywnej terapii choroby [9, 12, 16, 28, 29].

NF-κB w przewlekłej białaczce limfocytowej (PBL) Aktywność NF-κB w PBL

U chorych na PBL aktywność NF-κB w limfocytach białaczkowych jest wysoce zróżnicowana, jednak zawsze aktywność spoczynkowa (komórek izolowanych białaczkowych niestymulowanych) jest większa w porównaniu z aktywnością zdrowych komórek B. W komórkach PBL dominującymi komponentami NF-κB są białka p50, RelA i c-Rel [32–35]. Ponadto wykazano, że aktywność NF-κB u chorych na PBL jest zwiększona i koreluje z przeżyciem komórek białaczkowych *in vitro* [34–36]. Interesujący jest fakt, że komórki z wyższą aktywnością NF-κB łatwiej ulegają śmierci pod wpływem hamowania NF-κB, co może sugerować wpływ przekazywania NF-κB na przeżycie komórek. Komórki białaczkowe są również bardziej wrażliwe na inhibitory farmakologiczne szlaku NF-κB niż prawidłowe limfocyty [37].

Defekty genetyczne komponentów przekazywania NF-κB w PBL

W przeciwieństwie do innych chłoniaków, zaburzenia genetyczne dotyczące komponentów układu NF-κB w PBL występują rzadziej [38].

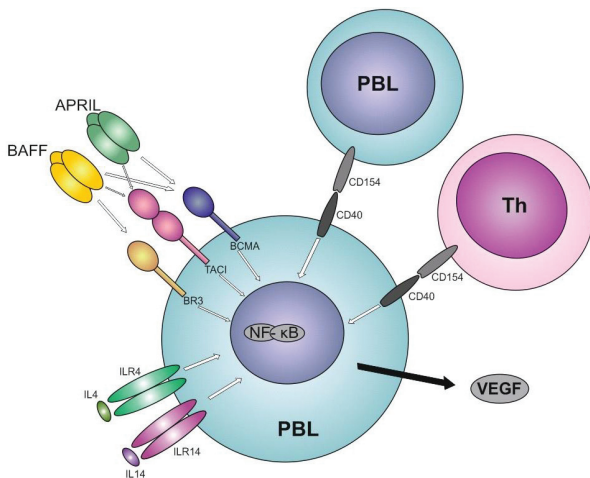
U chorych na PBL z translokacją t(14;19)(q32.2;q13.2) charakterystyczną dla niewielkiego odsetka chorych, dochodzi do nadekspresji białka Bcl3. Wyżej wymienione białko ze względu na podobieństwo strukturalne należy do rodziny inhibitorów κB, ale jest transkrypcyjnym koaktywatorem podjednostek p50 i p52 [30, 39, 40].

U chorych na PBL obserwowane są również zmiany strukturalne chromosomów, takie jak translokacje i delecje występujące w obrębie genu kodującego białko NF-κB2 (p52/p100) [30, 40]. Prawidłowy produkt genu *NF-κB2* syntetyzowany jest w postaci prekursorowej podjednostki białkowej p100, mającej w obrębie końca karboksylowego łańcucha polipeptydowego powtórzenia ankirynowe, dzięki którym hamuje aktywność białek z rodziny NF-κB poprzez blokowanie translokacji dimerów NF-κB/Rel do jądra komórkowego. Białko p100 wykazuje właściwości proapoptotyczne spowodowane występowaniem w obrębie C-końca łańcucha białkowego domen śmierci biorących udział w aktywacji kaspaz. W wyniku proteolizy i degradacji końca karboksylowego z podjednostki p100 powstaje białko p52 [41–43]. Wyżej wymienione aberracje chromosomowe skutkują zniesieniem właściwości proapoptotycznych białka NF-κB2 poprzez skrócenie białka p100, utratę jego powtórzeń ankirynowych i domen śmierci, co podkreśla jego onkogeny charakter. Powodują również generacją stale aktywnego białka antyapoptotycznego p52, które

może mieć wpływ na hamowanie procesu apoptozy komórek białaczkowych [30, 40, 43, 44].

Mechanizmy aktywacji NF-κB i ich znaczenie w PBL

Mechanizm aktywacji NF-κB u chorych na PBL nie jest w pełni wyjaśniony, lecz wiedza na ten temat w ostatnich latach istotnie się poszerzyła. W procesie aktywacji NF-κB w PBL dużą rolę odgrywa wspomagający udział mikrośrodowiska [38, 40]. Wpływ wielu cytokin i komórek mikrośrodowiska zwiększa przeżycie limfocytów białaczkowych, co związane jest właśnie ze wzrostem aktywacji NF-κB [33, 45]. Wykazano, że jednym z mechanizmów prowadzących do aktywacji NF-κB w PBL w szpiku i grudkach chłonnych są interakcje między CD40 i CD40L, co podkreśla wpływ mikrośrodowiska na przeżycie komórek PBL [33, 46]. Furman i wsp. [33] wykazali, że funkcjonalne interakcje między CD40 (zlokalizowanym na komórkach białaczkowych) i CD154 (obecnym na limfocytach T, ale również w niektórych przypadkach na komórkach białaczkowych) prowadzą do aktywacji NF-κB oraz wydłużonego przeżycia komórek białaczkowych w mechanizmie parakrynnym i autokrynnym. Badacze proponują model patogenezы PBL, w którym te interakcje mają kluczowe znaczenie. Furman i wsp. [33] wykazali, że w sytuacji, gdy do komórek białaczkowych CD154+ dodano przeciwciała anti-CD154, dochodziło do zahamowania aktywacji NF-κB, a w konsekwencji do śmierci komórek *in vitro*. Być może zwiększona ekspresja CD154 na komórkach białaczkowych PBL jest wynikiem nadmiernej aktywacji NF-κB. W innych chłoniakach z komórek B zaobserwowano, że ekspresja genu kodującego białko CD154 jest regulowana przez przekazywanie NF-κB [47]. Przekazywanie CD40L może wpływać na ekspresję wielu genów będących pod kontrolą NF-κB, między innymi tych wpływających na przeżycie komórki: c-FLIP, XIAP, jak również genów zaangażowanego w proces apoptozy komórki: CD95 (Fas) [48]. Blokowanie XIAP aktywowanego przez CD40L zwiększa wrażliwość komórek PBL na apoptozę wywołaną CD95 [49]. CD154 ponadto zwiększa ekspresję genu będącego pod kontrolą NF-κB kodującego VEGF, prowadząc do zwiększenia wydzielania tego czynnika przez komórki białaczkowe oraz pobudzenia przeżycia komórek [45]. VEGF jest kolejnym czynnikiem mikrośrodowiska, ważnym zarówno z punktu widzenia patogenezы i rokowania PBL, jak i aktywacji NF-κB w PBL. VEGF jest produkowany przez komórki białaczkowe. Wykryto jego wysoki poziom w surowicy chorych, ale też wykazano zdolność komórek PBL do produkcji VEGF *in vitro*. Ponadto podwyższony poziom VEGF w surowicy oraz zwiększona ekspresja receptora VEGF (VEGFR-2) na komórkach białaczkowych koreluje ze skróconym



Ryc. 1. Schemat mechanizmów aktywacji NF-κB w PBL

Fig. 1. The schematic representation of NF-κB activation in CLL

Rysunek obrazuje wybrane mechanizmy aktywacji NF-κB w komórkach białaczkowych PBL. Należą do nich funkcjonalne interakcje między antygenem CD40 (zlokalizowanym na komórkach białaczkowych) i jego ligandem CD154 (zlokalizowanym na limfocytach pomocniczych oraz, w niektórych przypadkach, na komórkach białaczkowych), a także pobudzający wpływ cytokin, takich jak IL4, IL14, BAFF oraz APRIL, poprzez ich receptory. Białe strzałki oznaczają pobudzający wpływ wyżej wymienionych czynników na aktywację NF-κB w komórce PBL. Czarna strzałka oznacza pobudzenie produkcji VEGF przez komórki PBL na skutek aktywacji NF-κB w wyniku stymulacji przez interakcje CD40-CD40L. Wykaz skrótów: PBL – komórka białaczkowa, Th – limfocyt T pomocniczy, CD40 – antygen różnicowania komórkowego należący do rodziny receptorów TNF, CD154 – ligand dla antygeny CD40 (CD40L), VEGF – śródbłonkowy czynnik wzrostu naczyń, IL-4 – interleukina 4, IL-14 – interleukina 14, IL-4R – receptor dla IL-4, IL-14R – receptor dla IL-14, BAFF – (*B-cell activating factor of TNF family*) czynnik aktywujący komórki B, APRIL – (*proliferation inducing ligand*) czynnik indukujący proliferację, BR3 – BAFF receptor 3, BCMA – (*B-cell maturation antigen*) antygen dojrzewania komórek B, TACI – (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*) transbłonowy aktywator i ligand cyklofiliny

czasem przeżycia chorych na PBL [50–53]. Interesujący jest fakt, że wiązanie CD40 przez CD154 zwiększa poprzez aktywację NF-κB produkcję VEGF, na skutek czego VEGF powoduje translokację NF-κB do jądra komórkowego i aktywuje NF-κB w mechanizmie autokrynnym, tj. w mechanizmie sprzężenia zwrotnego dodatniego [45].

Innym szlakiem przekazywania sygnału związanym z aktywacją NF-κB w PBL, może nie tak dokładnie poznany jak przekaźnictwo CD40L, ale również istotnym, jest szlak P13 K/Akt. Cuni i wsp. [34] wykazali, że kinazy przeżycia, jak kinaza fosfatydyloinozylu 3 (PI3-K) i Akt/kinaza białkowa 2, są stale aktywowane w PBL. Przekazanie sygnału przez P13-K/Akt jest ważne w podtrzymaniu przeżycia komórki. Stała aktywacja tego szlaku prowadzi do zwiększenia ekspresji genów będących pod kontrolą NF-κB kodujących białka antyapoptyczne, takie jak: BCL2, c-FLIP, XIAP. Dochodzi do wzrostu ich ekspresji w komórkach PBL. Ponadto Bernal i wsp. [54] wykazali, że przekazanie sygnału CD40/CD40L przez BCR aktywuje zarówno P13K/Akt, jak i NF-κB.

Aktywność NF-κB w PBL może być regulowana również pod wpływem działania cytokin. Endo i wsp. [32] dowiedli, że cytokiny obecne zarówno w komórkach białaczkowych, jak i w surowicy chorych, takie jak: BAFF (*B-cell activating factor of TNF family*) i APRIL (*proliferation inducing ligand*) aktywują NF-κB. Najważniejsze trzy receptory: BR3 (*BAFF receptor 3*), BCMA (*B cell maturation antigen*), TACI (*transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor*), wiążąc BAFF i APRIL, mogą aktywować NF-κB na drodze klasycznej (BCMA, TACI) oraz alternatywnej (BR3). Aktywacja NF-κB na drodze klasycznej prowadzi do hamowania apoptozy limfocytów białaczkowych *in vitro* [55, 56]. Natomiast aktywacja na NF-κB na drodze alternatywnej wydaje się być istotna w podtrzymy-

waniu przeżycia komórek we współpracy z działaniem czynników mikrośrodowiska [49].

Innymi cytokinami, które mają wpływ na aktywność NF-κB, są interleukiny IL-4 (interleukina 4), IL-14 (interleukina 14) oraz TGF-β (transformujący czynnik wzrostu β). Zaninoni i wsp. [36] wykazali, że aktywność NF-κB w PBL jest modulowana poprzez takie cytokiny, jak: IL-4, IL-14, które zwiększają aktywność NF-κB, wykazując działanie antyapoptyczne. Ponadto TGF-β hamuje aktywność NF-κB, wykazując działanie proapoptyczne. Badacze podkreślają, że ilościowe zmiany tych cytokin wydają się być odpowiedzialne za pozytywne sprzężenie zwrotne podtrzymujące komórki białaczkowe w stanie przedapoptycznym.

Sugeruje się również, że aktywatorem NF-κB w PBL jest GSK-3β (kinaza syntazy glikogenu 3), ale ten mechanizm nie jest do końca wyjaśniony [57]. W raku trzustki GSK-3β podtrzymuje stałą aktywację NF-κB poprzez regulację aktywności IKK [58]. Zaobserwowano nieprawidłową akumulację jądrową GSK-3β u chorych na PBL. Wykazano również, że farmakologiczne hamowanie GSK-3β prowadzi do zmniejszenia jej kumulacji w jądrze komórkowym, hamowania transkrypcyjnej aktywności NF-κB oraz ekspresji białek antyapoptycznych XIAP i BCL-2, co prowadzi do wzmożonej apoptozy komórek PBL [57].

Znaczenie rokownicze NF-κB w PBL

Aktualne poglądy na temat znaczenia rokowniczego białek NF-κB w PBL dotyczą właściwości białka RelA. Hewamana i wsp. [35, 59], stosując metodę ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), przeprowadzili analizę ilościową wiązania RelA z DNA w ekstraktach z jąder komórkowych komórek PBL. Badania wykazały, że zdolność wiązania DNA przez

RelA koreluje z markerami masy guza i aktywności choroby, tzn. z krótszym czasem podwojenia limfocytów oraz większą liczbą białych krwinek we krwi obwodowej [35]. Ponadto, stwierdzono związek między zdolnością wiązania RelA z DNA a zaawansowanym stadium klinicznym choroby wg klasyfikacji Bineta, krótszym czasem do rozpoczęcia leczenia oraz czasem do kolejnego cyklu terapii. Wykazano, że jest to niezależny czynnik rokowniczy co do czasu przeżycia w PBL [59]. Zaobserwowano również, że istnieje korelacja między wiązaniem RelA z DNA a procesem apoptozy komórek PBL w warunkach *in vitro* [35]. Ponadto wykazano, że istnieje korelacja między aktywnością NF- κ B po stymulacji anty-IgM poprzez przekazywanie sygnału przez BCR (receptor komórek B) a ekspresją ZAP-70 i przeżyciem komórek CLL *in vitro*. Badacze sugerują, że komórki mają zdolność do aktywacji NF- κ B po stymulacji poprzez przeobrażenie przez BCR, natomiast ZAP70 może mieć wpływ na zdolność komórek do aktywacji NF- κ B po stymulacji. Te badania podkreślają, że zdolność komórek do aktywacji NF- κ B może mieć istotne znaczenie w patogeniezie PBL i stanowić wraz z ekspresją ZAP-70 marker gorszego rokowania PBL [35]. Jednocześnie badacze dowiedli brak korelacji między spoczynkową zdolnością wiązania RelA z DNA a czynnikami rokowniczymi, takimi jak: ekspresja CD38, ZAP-70 czy stan mutacji *IGVH*. Badania Hewamany i wsp. [35] sugerują, że RelA może stanowić dobry cel terapeutyczny dla chorych na PBL, szczególnie dla tych z gorszym rokowaniem. W doświadczeniach *in vitro* autorzy wykazali odwrotną korelację między wiązaniem RelA z cząsteczkami DNA a wrażliwością na fludarabinę, przez co sugerują, że oporność na fludarabinę może

wynikać z aktywności transkrypcyjnej białka RelA [35]. Obecnie prowadzone są dalsze badania nad oceną podjednostki RelA jako markera rokowniczego i celu do terapii w PBL.

NF- κ B jako cel terapeutyczny w PBL

Biorąc pod uwagę fakt, że NF- κ B jest niezbędny do przeżycia komórek białaczkowych, hamuje apoptozę, stymuluje proliferację i angiogenezę, przyczynia się do powstawania przerzutów, należy sądzić, że może stanowić on dobry cel terapeutyczny w PBL. Ponadto działanie antyapoptotyczne NF- κ B w nowotworach przyczynia się do chemio- i radiooporności, dlatego jego hamowanie mogłoby przyczynić się do zwiększenia odpowiedzi chorego na chemio- czy też radioterapię.

Wyniki dotychczasowych badań dowodzą, że hamowanie aktywności NF- κ B w PBL prowadzi do apoptozy limfocytów białaczkowych, potwierdzając tym samym udział NF- κ B w podtrzymywaniu przeżycia komórek białaczkowych i ich rozprzestrzenianiu [37]. W PBL badane są różne strategie hamowania aktywacji układu NF- κ B (badania przedkliniczne i kliniczne), między innymi hamowanie aktywności IKK, a także wpływ na inne poziomy układu NF- κ B, takie jak: inhibitory proteasomów hamujące degradację I κ B, inhibitory translokacji jądrowej podjednostek NF- κ B czy supresory wiązania NF- κ B z DNA [38].

Wpływ na układ kinaz IKK wydaje się być najbardziej efektywną pośrednią formą hamowania aktywności NF- κ B, ponieważ utrata funkcji kinaz IKK α jak i IKK β skutkuje brakiem aktywacji NF- κ B zarówno na drodze klasycznej, jak i alternatywnej. Nie ma doniesień o selektywnych inhibitorach IKK α . Znane są tylko inhibitory IKK β wykazujące aktywność przeciwbiałaczkową, ale które również mogą hamować IKK α [38].

Badania przedkliniczne potwierdzają większą toksyczność inhibitorów wobec komórek białaczkowych niż wobec zdrowych limfocytów, sugerując większą podatność komórek białaczkowych na ich działanie. Działanie cytotoksyczne polega na aktywacji apoptozy na drodze mitochondrialnej, hamowaniu ekspresji genów kodujących białka antyapoptotyczne, takie jak np. rodzina białek BCL2. Ponadto wykazano, że inhibitory NF- κ B mogą wzmacniać efekt innych leków przeciwnowotworowych, a także przewyższać wpływ mikrośrodowiska na komórki PBL [38].

Keifer i wsp. [60] wykazali, że talidomid hamuje aktywność NF- κ B poprzez hamowanie kinazy (IKK) inhibitora κ β . W następstwie blokuje indukowaną cytokinami ekspresję genów kodujących białka: FLIP (białko hamujące FLICE), IL-8 (interleukina 8), TRAF1 (czynnik związany z receptorem dla TNF), cIAP2, co może tłumaczyć jego właściwości antyonkogenne

Tabela V. Rodzaje inhibitorów przeobrażenia NF- κ B, których aktywność wykazano w PBL [38]

Table V. Inhibitors of NF- κ B signalling whose activity was revealed in CLL [38]

Inhibitory proteasomów	bortezomib
Inhibitory ligacji CD40	przeciwciała monoklonalne anty-CD154
Inhibitory kompleksu kinaz IKK	BAY-117082, BMS345541, kurkumina, partenolid, pochodna partenolidu: LC-1, niesteroidowe leki przeciwzapalne
Inhibitory jądrowej translokacji NF- κ B	DHMEQ
Epigenetyczne wyciszenie genów zależnych od układu NF- κ B	inhibitor GSK-3 β
Supresory wiązania się NF- κ B z DNA	kamebakauryna

BAY-117082 – ((E)-3-((4-methylphenyl)-sulfonyl)-2-propenenitrile), BMS345541 – N-(1,8-Dimethylimidazo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)-1,2-ethanediamine hydrochloride, DHMEQ – Dehydroxymethylperoxyquinomicin

i przeciwzapalne. Interesujące jest to, że skuteczność działania talidomidu w monoterapii u chorych na PBL nie jest zadowalająca. Natomiast wyniki badań ostatnich lat wskazują, że efekt terapeutyczny działania talidomidu w połączeniu z fludarabiną może stanowić skuteczną strategię terapeutyczną u chorych na PBL, szczególnie tych gorzej rokujących [61, 62].

Ze względu na znaczenie NF- κ B w procesach immunologicznych, jego rolę w kluczowych procesach na poziomie komórkowym, takich jak: apoptoza, proliferacja, angiogeneza, istotne stało się poznanie znaczenia tego przekazywania sygnału w PBL. Wiedza dotycząca mechanizmów aktywacji NF- κ B w PBL jest wciąż pogłębiana. Biorąc pod uwagę stałą aktywację NF- κ B w komórkach PBL, interakcje przekazywania NF- κ B z innymi ścieżkami przekazywania sygnału (w tym przekazywność przez BCR), znaczenie rokownicze NF- κ B w PBL, należy sądzić, że NF- κ B może stać się istotnym celem terapeutycznym u chorych na PBL. Być może w przyszłości inhibitory kinaz IKK w połączeniu z innymi lekami staną się nową strategią leczenia tych chorych.

Piśmiennictwo:

- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705–716.
- Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B. The enemy within. *Cancer Cell*. 2004;6:203–208.
- Li X, Stark GR. NF κ B-dependent signalling pathways. *Experimental Hematology* 2002;30:285–296.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor - κ B: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004;82:434–448.
- Chen F, Castranova V, Shi X. New Insights into the role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation. *Am J Pathol* 2001;159:387–391.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after, *Cell* 1986;87:13–20.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann Rev Cell Biol* 1994;10:405–455.
- Grossmann M, Nakamura Y, Grumont R, Gerondakis S. New insight into the roles of Rel/NF- κ B transcription factors in immune function, hemopoiesis and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1209–1219.
- Ravi R., Bedi A. NF- κ B in cancer – a friend turned foe. *Drug Resistance Updates* 2004;7:53–67.
- Piotrowska A, Iżykowska I, Podhorska-Okołów, Zabel M, Dziegiel P. Budowa białek z rodziny NF- κ B i ich rola w procesie apoptozy. *Postępy Hig Med Dosw (online)* 2008;62:64–74.
- Cortes Sempere M, Rodriguez Fanjul V, Sanchez Perez I, Perona R. The role of NF κ B signaling in cancer. *Clin Transl Oncol* 2008;10:143–147.
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy: *BioFactors* 2007;29:19–35.
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through κ B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 1993;72:729–739.
- Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF- κ B p50 homodimers. *Genes Dev* 1993;7:1345–1363.
- Marienfeld R., May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S. Neumann M. RelB forms transcriptionally inactivate complexes with RelA/p65. *J Biol Chem*. 2003;278:19852–19860.
- Pierkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. *CellDeath and Differentiation* 2006;13:759–772.
- Hayden MS, Ghosh S. Signalling to NF- κ B. *Genes Dev* 2004;18:2195–2224.
- Cogswell PC, Kashatus DF, Keifer JA, et al. NF- κ B and I κ B α are found in the mitochondria. *J Biol Chem* 2003;278:2963–2968.
- Bottero V, Rossi F, Samson M, et al. I κ B α , the NF- κ B inhibitory subunit, interacts with ANT, the mitochondrial ATP/ADP translocator. *J Biol Chem* 2001;276:21317–221324.
- Kato T, Delhase M, Hoffman A, Karin M. CK2 is a C-terminal I κ B kinases responsible for NF- κ B activation during the UV response. *Mol Cell* 2003;12:829–839.
- Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280–288.
- Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKK gamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- κ B activation by genotoxic stress. *Cell* 2003;115:565–576.
- Imbert V, Rupec RA, Livolsi A. Tyrosine phosphorylation of I κ B- α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B- α . *Cell* 1996;86:787–798.
- Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *Journal of Cell Science* 2005;118:4589–4592.
- May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunology Today* 1998;19:80–88.
- Escarega RO, Fuentes-Alexandro, Garcia-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. The Transcription Nuclear Factor-kappa B and Cancer. *Clinical Oncology* 2007;19:154–161.
- Perkins ND. The Rel/NF- κ B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:434–440.
- Bharti AC, Aggarwal B.B. Nuclear factor-kappaB and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemical Pharmacology* 2002;64:883–888.
- Rayet B, Gelin C. Abberant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999;18:6938–6947.
- Turco MC, Romano MF, Petrella A, Bisogni R, Tassone P, Venuta S. NF- κ B/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. *Leukemia* 2004;18:11–17.
- Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004;382:393–409.

32. Endo T, Nishio M., Enzler T, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway. *Blood* 2007;109:703–710.
33. Furman RR, Asgary Z, Mascarenhas JO, Liou HC, Schattner EJ. Modulation of NF-kB activity and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* 2000;164:2200–6.
34. Cuni S, Perez-Aciego P, Perez Chacon G et al. A sustained activation of P13/NF-kB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004;18:1391–400.
35. Hewamana S, Alghazal S, Lin TT. The NF-kB subunit Rel A is associated with in vitro survival and clinical disease progression in chronic lymphocytic leukemia and represents a promising therapeutic target. *Blood* 2008;111:4681–4689.
36. Zaninoni A, Impreiali FG, Pasquini C, Zanella A, Barcelini W. Cytokine modulation of nuclear factor-kB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol*. 2003;31:185–90.
37. Pickering BM, de Mel S, Lee M et al. Pharmacological inhibitors of NF-kappaB accelerate apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Oncogene* 2007;26:1166–77.
38. Lopez-Guerra M, Colomer D. NF-kB as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin. Ther. Targets* 2010;14.3:275–288.
39. Ohno H, Doi S, Yabumoto K, et al. Molecular characterization of the t(14;19)(q32;q13) translocation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1993;7:2057–63.
40. Packham G. The role of NF-kB in lymphoid malignancies. *British Journal of Haematology* 2008;143:3–15.
41. Dobrzański P, Ryseck RP, Bravo R. Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* 1995;10:1003–1007.
42. Heusch M, Lin L, Gelezianas R, Greene WC. The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene* 1999;18:6201–6208.
43. Wang Y, Cui H, Schroering A, Ding JL, et al. NF-kB p100 is a pro-apoptotic protein with anti-oncogenic function. *Nat Cell Biol* 2002;4:888–893.
44. Hacker H, Karin M. Is NF-kB2/p100 a direct activator of programmed cell death? *Cancer Cell* 2002;2:431–433.
45. Farahani M, Treweeke AT, Toh Ch, et al. Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia* 2005;19:524–530.
46. Braun T, Carvalho G, Fabre C, Grosjean J, Fenaux P, G.Kroemer. Targeting NF-kB in hematologic malignancies. *Cell Death and Differentiation* 2006;13:748–758.
47. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, et al. Constitutive NF-kappaB an NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. *Blood* 2005;106:3940–7.
48. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, et al. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;106:995–1004.
49. Hertlein E, Byrd JC. Signalling to drugresistance in CLL. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2010;23:121–131.
50. Chen H, Treweeke AT, West DC, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96:3181–3187.
51. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, et al. B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules. *Leukemia* 2002;16:911–919.
52. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;107:605–610.
53. Ferrajoli A, Manshour T, Estrov Z, et al. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2001;7:795–9.
54. Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001;89:3050–7.
55. Endo T, Nishio M, Enzler T, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation on the canonical NF-(kappa) B pathway. *Blood* 2007;109:703–710.
56. Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurse-like cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1 (alpha). *Blood* 2005;106:1012–1020.
57. Ougolkov AV, Bone ND, Fernandez-Zapico ME, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2007;110:735–42.
58. Wilson W, Baldwin AS. Maintenance of constitutive I-kappaB kinase activity by glycogen synthase kinase-3alpha/beta in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2008;68:8156–63.
59. Hewamana S, Lin TT, Rowntree C, et al. Rel a is an independent biomarker of clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27:763–9.
60. Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP, Baldwin AS, et al. Inhibition of NF- B Activity by thalidomide through Suppression of I B Kinase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:22382–87.
61. Chanan Khan A, Miller KC, Takeshita K, et al. Results of a phase 1 clinical trial of thalidomide in combination with fludarabine as a initial therapy for patients with treatment requiring chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2005;106:3348–3352.
62. Giannopoulos K, Dmoszynska A, Kowal M, et al. Thalidomide exerts distinct molecular antileukemic effects and combined thalidomide/fludarabine therapy is clinically effective in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009;23:1771–1778.