

Received: 2012.07.13
Accepted: 2012.11.04
Published: 2012.11.22

HMGB1 – rola w progresji i terapii przeciwnowotworowej*

HMGB1 – its role in tumor progression and anticancer therapy

Ryszard Smolarczyk, Tomasz Cichoń, Magdalena Jarosz, Stanisław Szala

Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Białko HMGB1 jest ewolucyjnie konserwatywnym białkiem o bardzo szerokim zakresie działania. Głównymi receptorami białka HMGB1 są receptory RAGE i TLR znajdujące się na komórkach układu odpornościowego i komórkach śródbłonkowych. Choć szlaki sygnałowe obu grup receptorów są różne, to aktywują one w końcowym efekcie czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który aktywuje z kolei geny kodujące, m.in. białka adhezyjne, prozapalne cytokiny oraz czynniki proangiogenne. Wewnątrz komórki białko HMGB1 znajduje się głównie w jądrze komórkowym i bierze udział w replikacji, rekombinacji, transkrypcji i naprawie DNA. Po uwolnieniu do przestrzeni pozakomórkowej staje się cytokiną prozapalną. Cytokina ta stymuluje tworzenie nowych naczyń krwionośnych, zwiększa migrację komórek, aktywuje stan zapalny oraz proliferację komórek. Białko HMGB1 bierze także udział w regeneracji uszkodzonych tkanek, a także w stymulacji autofagii.

HMGB1 odgrywa rolę jako potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej. Wzrost ilości białka HMGB1 w komórkach nowotworowych, jak i w krwiobiegu obserwuje się u osób chorych na różnego rodzaju nowotwory. HMGB1 chroni komórki nowotworowe przed apoptozą, ma wpływ na stabilność telomerów. Białko HMGB1 stymuluje wiele białek biorących udział w proliferacji komórek nowotworowych, hamuje sygnały kontrolujące wzrost komórek, ma właściwości proangiogenne i prozapalne. Zahamowanie uwalniania tego białka czy zahamowanie jego aktywności z komórek podczas terapii przeciwnowotworowej wydaje się obiecującym podejściem terapeutycznym. Obecnie znanych jest wiele inhibitorów białka HMGB1, które mogą być użyte w terapii przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe:

HMGB1 • nekroza • apoptoza • terapia przeciwnowotworowa

Summary

HMGB1 is an evolutionarily conserved protein with a wide spectrum of action. Its main receptors are RAGE and TLR found on the surface of immune system cells as well as endothelial cells. Although signaling pathways for both receptor groups are different, ultimately they both activate NF κ B transcription factor which, in turn, activates genes encoding adhesion proteins, proinflammatory cytokines and proangiogenic factors. Inside cells, HMGB1 is found mainly in the cell nucleus, where it participates in replication, recombination, transcription and DNA repair

* Praca finansowana z Grantów MNiSW: NN401 034736, NN401 018337.

processes. Following release into the extracellular space, HMGB1 becomes a proinflammatory cytokine which stimulates formation of new blood microvessels, enhances cell migration, activates the inflammatory condition and affects cell proliferation. HMGB1 protein also takes part in regeneration of damaged tissues and stimulates autophagy.

HMGB1 plays a potential role in anticancer therapy. Increased amounts of HMGB1 in cancer cells and elevated levels in the bloodstream are noted among patients afflicted with various cancers. HMGB1 protects cells from apoptosis, as it affects telomere stability. HMGB1 also stimulates a number of proteins involved in proliferation of cancer cells and inhibits signals that control cell growth. Ability to arrest HMGB1 release from cells or to inhibit its activity appears to be a promising therapeutic approach. At present, several inhibitors of HMGB1 are known and can be used in anticancer therapy.

Key words: HMGB1 • necrosis • apoptosis • anticancer therapy

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1021108>

Word count: 3134

Tables: –

Figures: 3

References: 49

Adres autora: dr Ryszard Smolarczyk, Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: rsmolarczyk@io.gliwice.pl

WSTĘP

Białko HMGB1 (high mobility group box protein 1), niehistonowe białko chromosomalne o masie cząsteczkowej 27 kDa i dużej ruchliwości elektroforetycznej, opisano po raz pierwszy w 1973 roku [8]. Pierwsze doniesienia dotyczące funkcji tego białka w późnej reakcji zapalnej pojawiły się dopiero w 1999 roku [45]. Obecnie białko HMGB1 jest jednym z najintensywniej badanych białek [37].

Funkcje białka HMGB1 zależą w dużym stopniu od „kontekstu”: biologicznych warunków w jakim to białko się znajduje. W jądrze komórkowym białko HMGB1 wiąże się z różnymi strukturami DNA. Tworzy kompleksy z wieloma białkami jądrowymi, m.in. z p53, p73, białkami aktywującymi rekombinację, jądrowymi receptorami hormonów steroidowych [4]. Białko HMGB1 stabilizuje także strukturę nukleosomów. Bierze udział w transkrypcji różnych genów.

Białko HMGB1 niezawierające sekwencji liderowej jest wydzielane, prawdopodobnie w sposób aktywny, za pośrednictwem lizosomów, wyspecjalizowanych pęcherzyków wydzielniczych [5]. Poza komórką, w przestrzeni pozakomórkowej, białko HMGB1 zachowuje się jak typowa cytokina prozapalna: stymuluje aktywność komórek odpornościowych (m.in. biorących udział w reakcji zapalnej monocytów i makrofagów) [48]. Białko HMGB1 bierze także udział w regeneracji uszkodzonych tkanek [13].

W procesie śmierci nekrotycznej komórek nowotworowych białko HMGB1 może być wydzielane w sposób bierny [4,26,27]. Uwolnione białko zachowuje się wtedy jak typowa cząsteczka DAMP (damage associated molecular pattern) [6,9]. Wydzielane przez ginące komórki nowotworowe

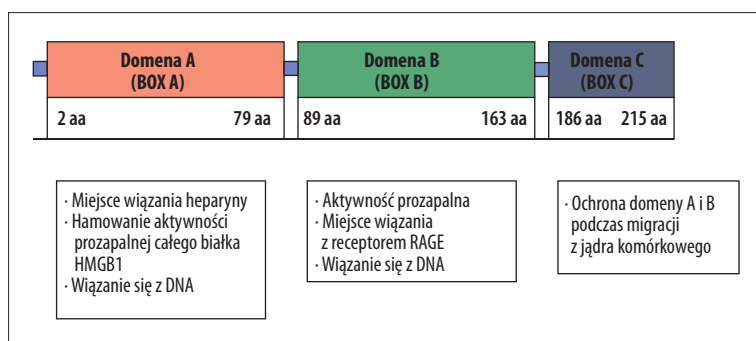
cząsteczki DAMP (zalicza się do nich m.in.: ATP, kwas moczowy, białka S100 wiążące wapń, białka szoku cieplnego) „programują” charakter śmierci obumierających komórek. To, czy śmierć ta będzie miała charakter immunogeny (zdolny wyindukować odpowiedź odpornościową skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym), czy też będzie to nieimmunogenna (niezdolna takiej odpowiedzi wywołać) zależy w dużym stopniu od aktywności cząsteczek DAMP. Harmonijne, skoordynowane działanie różnych cząsteczek DAMP jest konieczne do aktywacji komórek dendrytycznych, zdolnych do prezentacji antygenów limfocytom T [39,40].

BUDOWA BIAŁKA HMGB1

Białko HMGB1 (zwane też amfoteryną) należy do rodziny białek HMG (high mobility group): zasadowych, niehistonowych białek chromosomalnych. Białko HMGB1 zbudowane jest z 215 aminokwasów [14,43], jest białkiem silnie konserwatywnym, występuje prawie we wszystkich komórkach eukariota (homologia między gryzoniami, bydłem i człowiekiem wynosi 98%) [4]. Ludzkie białko HMGB1 różni się od mysiego zaledwie dwoma aminokwasami [32]. Komórki ssaków zawierają dużą liczbę cząsteczek białka HMGB1. W budowie białka HMGB1 można wyróżnić trzy domeny A, B i C (ryc. 1).

Domena A (*box A*) jest umiejscowiona między 2 a 79 aminokwasem, domena B (*box B*) między 89 a 163 aminokwasem, a domena C (*box C*) między 186–215 aminokwasem [14]. Domena C ma kwaśny charakter i składa się prawie wyłącznie z kwasu glutaminowego i asparaginowego. W domenie A znajduje się miejsce wiązania heparyny. Domena ta działa antagonistycznie w stosunku do całego białka HMGB1. W domenie B występuje rejon odpowiedzialny za tzw. aktywność prozapalną oraz miejsce wiązania





Ryc. 1. Struktura białka HMGB1 i jego funkcje. Białko HMGB1 jest zbudowane z trzech domen: A, B, C. Domeny A i B odpowiadają za wiązanie się z DNA. Domena A jest miejscem wiązania heparyny i pełni antagonistyczną funkcję w stosunku do właściwości prozapalnych HMGB1. Domena B jest odpowiedzialna za właściwości prozapalne, a domena C chroni domenę A i B podczas wydzielania z komórki

z receptorem RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Product). Obie domeny wiążą się z DNA. Domena C jest odpowiedzialna za ochronę domeny A i B podczas migracji z jądra komórkowego. Oddziaływania przestrzenne między domenami A i B nadają białku HMGB1 konformację podobną do litery L. Konformacja ta ma także wpływ na zdolność kompleksowania białka HMGB1 z DNA oraz z dostępnością niektórych aminokwasów do tzw. potranslacyjnej modyfikacji. Potranslacyjnej modyfikacji ulegają głównie reszty lizyn i cystein [14]. Ważne wydają się trzy cysteiny w pozycjach 23, 45 i 106. Dwie cysteiny cys23 i cys45 już przy bardzo niskim potencjale redox (-273 mV) tworzą wiązanie disiarczkowe [38]. Połączenie to umożliwia również wiązanie z bekliną 1 i aktywację procesu autofagii. Cysteina w pozycji 106 jest odpowiedzialna za wiązanie z receptorem TLR-4 i aktywację uwalniania cytokin z makrofagów [46]. W modyfikacji cystein główną rolę odgrywają reaktywne formy tlenu (ROS). Utlenienie np. Cys 106 hamuje aktywność cytokinową białka HMGB1. Acetylacja lizyn w dwóch rejonach NLS (Nuclear Localization Signals) (reszty aminokwasowe 28–44 i 179–185) umożliwia sekrecję białka HMGB1 do przestrzeni pozakomórkowej [14]. Podobnie inne modyfikacje: metylacja, poli (ADP) – rybozylacja i fosforylacja ułatwiają translokację białka HMGB1 do cytoplazmy i jego wydzielanie. W sposób aktywny HMGB1 jest uwalniany przez makrofagi stymulowane bakteryjnym lipopolisacharydem LPS [42].

RECEPTORY BIAŁKA HMGB1

Uwalniane do przestrzeni pozakomórkowej białko HMGB1 tworzy kompleksy m.in. z fragmentami DNA, RNA, bakteryjnym liposacharydem (LPS), z nukleosomami, z cytokiną IL-1 β , a nawet z chemokina CXCL12 (SDF1 – czynnik pochodzący z komórek zrębowych) [28, 30]. Kompleksy te są rozpoznawane i przyłączane przez różne receptory znajdujące się na wielu komórkach [30]. Kompleksy HMGB1 z IL-1 β są przyłączone przez receptory IL-1R, z DNA lub RNA przez receptory RAGE, z LPS przez receptory TLR4, z chemokina CXCL12 przez receptory GPCR, z nukleosomami przez receptory TLR2, z DNA przez receptory TLR9, a z RNA przez kompleksy TLR7 [30]. HMGB1 może być także przyłączone przez receptory TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) oraz przez trombospondynę i CD24. Te dwa ostatnie białka odrywają rolę w tzw. negatywnej regulacji aktywności białka HMGB1 [30].

Głównymi receptorami białka HMGB1 są receptory RAGE i TLR znajdujące się na komórkach odpornościowych

i śródbłonkowych [26,32]. Choć szlaki sygnałowe obu grup receptorów są różne, to aktywują one w końcowym efekcie czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który aktywuje z kolei geny kodujące m.in. białka adhezyjne, prozapalne cytokiny oraz czynniki proangiogenne [43].

Aktywacja receptora RAGE uruchamia także szlak sygnałowy Rac1/CDC42, który indukuje w komórkach tzw. fenotyp migracyjny i powoduje zmiany w cytoszkieletcie [43].

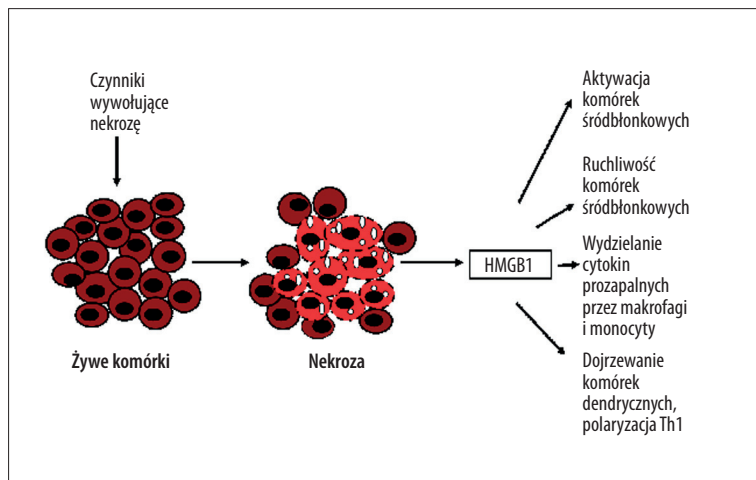
W sygnalizacji białka HMGB1 główną rolę odgrywają receptory RAGE (receptor for advanced glycation end products) oraz kilka receptorów z rodziny TLR (toll like family of receptors) [13]. Są to receptory aktywowane przez cząsteczki molekularne pochodzące z patogenów, które aktywują odpowiedź układu odpornościowego.

RAGE

Receptor RAGE jest białkiem przezbłonowym biorącym udział w aktywacji stanu zapalnego. Był pierwszym, w którym wykazano wiązanie się białka HMGB1. Białko HMGB1 wiąże się z receptorem RAGE i promuje chemotaksję i wytworzenie cytokin [13]. Związanie białka HMGB1 z receptorem RAGE stymuluje dojrzewanie, migrację komórek odpornościowych i wzrost liczby receptorów powierzchniowych komórek.

TLR

Receptory z rodziny TLR biorą udział w odpowiedzi układu odpornościowego zarówno na infekcje, jak i na uszkodzenia. Receptory TLR rozpoznają różne ligandy, np. receptor TLR4 odpowiedzialny jest za rozpoznanie bakteryjnej endotoksyny (LPS). Białko HMGB1 wiąże się swoiście z receptorami TLR4, TLR2 i TLR9. Związanie białka HMGB1 z receptorami TLR4 i TLR2 aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który odpowiedzialny jest za syntezę cytokin i aktywację komórek układu odpornościowego [38,48]. Aktywacja receptora TLR4 przez białko HMGB1 różni się od stymulacji przez LPS. HMGB1 aktywuje zarówno IKK α , jak i IKK β , podczas gdy LPS indukuje tylko IKK β . Poza tym związana z białkiem MAPK aktywacja białek i cytokin jest inna w przypadku białka HMGB1 i różni się od tej związanej z LPS. Aktywacja receptora TLR9 przez białko HMGB1 nie jest związana z wynikiem działania samego białka HMGB1, lecz zależy od jego kompleksu z DNA [1]. Połączenie kompleksu HMGB1-DNA z receptorem TLR9 stymuluje aktywację komórek układu odpornościowego oraz uwalnianie cytokin.



Ryc. 2. Właściwości cytokiny białka HMGB1. Białko HMGB1 uwalniane jest w sposób bierny z komórki podczas procesu nekrozy, stając się prozapalną cytokiną. HMGB1 aktywuje komórki śródbłonkowe, stan zapalny, zwiększa migrację komórek nowotworowych

FUNKCJE BIAŁKA HMGB1

Białko HMGB1, w zależności od tego czy znajduje się w komórce związane z DNA czy jest uwolnione z komórki, pełni różne funkcje.

Białko HMGB1 związane z DNA

W jądrze komórkowym białko HMGB1 tworzy kompleksy z DNA. Kompleksy te wpływają na strukturę nukleosomów oraz regulują ekspresję genów i modulują aktywność hormonów steroidowych [48]. W jądrze komórkowym białko HMGB1 wiąże się z małym rowkiem DNA i stabilizuje nukleosomy oraz konformację aktywnych transkrypcyjnie genów [4]. Wiążąc się z różnymi nietypowymi strukturami DNA (np. trój- lub czteroniciowymi, powstającymi podczas replikacji i rekombinacji DNA) w pośredni lub bezpośredni sposób jądrowe białko HMGB1 może brać udział w procesach replikacji DNA, rekombinacji oraz w reparacji uszkodzeń DNA.

Białko HMGB1 tworzy także kompleksy z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi (m.in. z p53, p73), z białkami aktywowującymi rekombinację (RAG1/2) oraz z jądrowymi receptorami hormonów steroidowych [42].

Po związaniu się z DNA jądrowe HMGB1 bierze udział w reakcji naprawy niesparowanych zasad kwasów nukleinowych. HMGB1 rekrutuje białka biorące udział w naprawie DNA umożliwiając interakcje z egzozukleazami, helikazami, polimerazami i ligazami [4]. Białko HMGB1 uczestniczy w aktywności transkrypcyjnej receptorów steroidowych m.in. receptorów estrogenowych.

Znajdujące się w cytoplazmie białko HMGB1 może odgrywać rolę czynnika indukującego autofagię [41]. Natomiast zlokalizowane w błonie komórkowej białko HMGB1 przyłącza plazminogen oraz tkankowy aktywator plazminogenu (tPA). Oba te białka biorą udział w aktywacji plazminy oraz metaloproteinaz MMP, enzymów odgrywających istotną rolę w migracji i w swobodnym przemieszczaniu się komórek [43].

Jądrowe białko HMGB1 jest częściowo odpowiedzialne za efektywność terapii związkami platyny stosowanymi w leczeniu przeciwnowotworowym. Wynika to z wysokiego

powinowactwa HMGB1 do adduktów DNA. Powstałe wiązania zapobiegają aktywacji wielu mechanizmów naprawy mutacji w genomie komórki; dotąd proces ten nie został jednak do końca wyjaśniony. Zaobserwowano także zwiększenie oporności ludzkich komórek nowotworowych na związki cisplatyny związanej ze wzrostem poziomu białka HMGB1. Wzrost ilości białka HMGB1 jest obserwowany w większości komórek nowotworowych [18]. Nadmiar białka HMGB1 przyspiesza cykl komórkowy przez aktywację czynników transkrypcyjnych.

Białko HMGB1 znajdujące się w przestrzeni pozakomórkowej

Białko HMGB1 nie ma peptydowej sekwencji liderowej i nie jest wydzielane przez klasyczny szlak retikulum endoplazmatyczne – aparat Golgiego. Prawdopodobnie białko to w sposób aktywny ulega sekrecji w makrofagach i monocytach za pośrednictwem lizosomów, wyspecjalizowanych pęcherzyków wydzielniczych [5,7]. Aktywne wydzielanie HMGB1 stymulowane jest przez egzogenne produkty mikroorganizmów, takie jak endotoksyna czy sekwencje CpG obecne w bakteryjnym DNA lub przez endogenne stymulatory, takie jak TNF, IFN- γ czy nadtlenuk wodoru [49]. Poza aktywnym wydzielaniem HMGB1, białko to może być uwalniane biernie w procesie nekrozy [4,38]. W przypadku aktywnego wydzielania HMGB1, białko to jest najczęściej w postaci utlenionej. Natomiast podczas biernego uwalniania białko przyjmuje postać zredukowaną. Te dwie postaci białka pełnią różną rolę w sygnalizacji pozakomórkowej [38]. Aktywnie uwolnione, utlenione białko nie aktywuje odpowiedzi układu odpornościowego, natomiast postać zredukowana aktywuje odczyn zapalny.

Poza komórką, w przestrzeni pozakomórkowej białko HMGB1 zachowuje się jak typowa cytokina prozapalna.

BIAŁKO HMGB1 JAKO CYTOKINA

Uwolnione z komórki w sposób bierny czy aktywny białko HMGB1 staje się cytokiną prozapalną. W przestrzeni pozakomórkowej białko to stymuluje aktywność komórek odpornościowych (m.in. biorących udział w reakcji zapalnej monocytów i makrofagów) oraz aktywuje chemotaksję komórek [26,48]. Białko HMGB1 bierze także udział w regeneracji uszkodzonych tkanek [13] (ryc. 2).



Stymulacja układu odpornościowego przez HMGB1

Uwolnione do przestrzeni pozakomórkowej białko HMGB1 ma działanie cytokiny prozapalnej stymulującej aktywność wielu różnych komórek układu odpornościowego. Uwolnione poza komórkę białko HMGB1 wiąże się z receptorami RAGE i TLR obecnymi głównie na powierzchni komórek układu odpornościowego lub na powierzchni komórek śródłonkowych [49]. Kaskada sygnałowa przebiega w następujący sposób: uszkodzenie komórki powoduje uwolnienie białka HMGB1, dalej aktywację makrofagów, które wydzielają duże ilości dodatkowego białka HMGB1. Białko to aktywuje z kolei komórki NK i NKT, dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz stymuluje limfocyty T CD8⁺ i CD4⁺ [18].

HMGB1 indukuje zatem dojrzewanie komórek dendrytycznych, stymuluje monocyty - zwiększając ich zdolność do adhezji oraz wydzielania różnych cytokin i immunomodulatorów. HMGB1 powoduje także wzrost adhezyjnych i migracyjnych właściwości neutrofilów, aktywuje w nich NF- κ B i syntezę różnych cytokin. Białko HMGB1 wpływa na proliferację i przeżycie limfocytów T oraz ich funkcjonalną polaryzację w kierunku limfocytów Th1. Białko HMGB1 aktywuje także komórki śródłonkowe naczyń. Pod wpływem tego białka komórki śródłonkowe wydzielają TNF- α i IL-8. W aktywowanych komórkach śródłonkowych obserwuje się także wzrost poziomu ICAM-1 i VCAM-1, białek biorących udział w adhezji komórek prozapalnych [13].

Chemotaksja

Wiele badań wskazuje, że białko HMGB1 może stymulować migrację różnego rodzaju komórek, takich jak: neurony, komórki mięśni gładkich, komórki nowotworowe, komórki macierzyste, monocyty, komórki dendrytyczne, neutrofile, komórki śródłonkowe [23,49]. Białko HMGB1, uwolnione poza komórkę w miejscu infekcji lub uszkodzenia, aktywuje odpowiedź nieswoistą układu odpornościowego oraz staje się potencjalnym czynnikiem chemotaktycznym.

Właściwości regeneracyjne HMGB1

Białko HMGB1 nie tylko stymuluje odpowiedź prozapalną, bierze także udział w regeneracji, odbudowie uszkodzonych tkanek [13]. Regeneracja tkanki przez białko HMGB1 odbywa się m.in. przez pobudzanie migracji i proliferacji niektórych komórek macierzystych oraz inicjację procesu angiogenezy [21,29].

Białko HMGB1 jest atraktantem dla komórek macierzystych i może odgrywać znaczącą rolę w regeneracji mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego. Rekrutuje zarówno komórki macierzyste rezydujące w danym narządzie jak i komórki macierzyste w krwiobiegu.

W nowotworach białko HMGB1 uczestniczy w regeneracji uszkodzonej tkanki, zwłaszcza w następstwie radio- czy chemioterapii.

UDZIAŁ BIAŁKA HMGB1 W PROCESIE AUTOFAGII

Białko HMGB1 związane z jądrem komórkowym, uwolnione do cytoplazmy i z komórki stymuluje autofagię [10].

Cytoplazmatyczne białko HMGB1 wiąże się z białkiem Beclin1, które bierze udział w procesie autofagii. Zahamowanie aktywności białka HMGB1 w fibroblastach embrionów mysich, także w komórkach nowotworowych obniża poziom autofagii [11,12,35].

Indukcja autofagii przez białko HMGB1 jest zależna od receptora RAGE i od tego czy białko HMGB1 jest w postaci utlenionej czy zredukowanej. Utlenienie i redukcja dotyczy reszt cysteiny w strukturze białka. Dostarczenie komórkom nowotworowym egzogenego białka HMGB1 prowadzi do śmierci w wyniku autofagii lub apoptozy [10,12,36]. Zredukowane białko HMGB1 (gdzie wszystkie cysteiny nie są utlenione) wiąże się z receptorem RAGE i indukuje autofagię. Jednak utlenione białko HMGB1 indukuje apoptozę komórek przez szlaki mitochondrialne [12].

Białko HMGB1 może zatem być regulatorem śmierci komórkowej lub ich przeżywania co może mieć znaczący wpływ na efekt terapii przeciwnowotworowej.

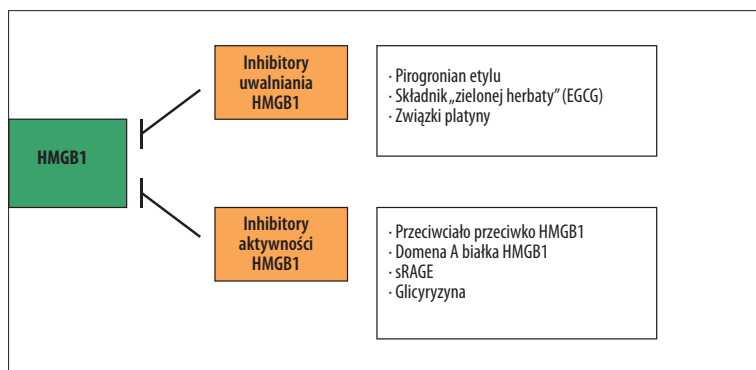
ROLA BIAŁKA HMGB1 W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Poziom białka HMGB1 rośnie w prawie wszystkich typach nowotworów [18]. Podniesiony poziom HMGB1 w surowicy koreluje ze złym rokowaniem u chorych. Lotze i wsp. uważają nawet, że progresja nowotworu wymaga uwolnienia białka HMGB1 z komórek nekrotycznych, gdyż nowotwory są uzależnione od HMGB1 i innych cząsteczek związanych ze śmiercią komórek [18].

W wielu schorzeniach autoimmunologicznych, chorobach wywołanych przez wirusy, urazy, uszkodzeniach niedokrwienno-reperfuzyjnych, posocznicy, nadekspresja prozapalnego białka HMGB1 wydaje się odgrywać główną rolę. Hamowanie aktywności HMGB1, przez różnego rodzaju inhibitory, ma istotny terapeutyczny wpływ na przebieg tych schorzeń [14,20,41]. Wzrost ilości białka HMGB1 w komórkach nowotworowych i jego poziomu w krwiobiegu obserwuje się także u osób chorych na różnego rodzaju nowotwory [37]. W komórkach nowotworowych (rakach jelita grubego, stercza i trzustki, lecz nie w rakach płuc) stwierdzono wyraźny wzrost ilości zarówno białka HMGB1 jak i jego receptora RAGE [37]. Na ogół, u chorych, u których obserwuje się wzrost ilości HMGB1 i RAGE rokowania są niekorzystne.

Zdaniem Tanga i wsp. [37] nadekspresja białka HMGB1 ma wpływ na wiele podstawowych cech fenotypowych komórek nowotworowych. HMGB1 chroni komórki nowotworowe przed apoptozą. Wpływa na stabilność telomerów, stymuluje wiele białek biorących udział w proliferacji komórek nowotworowych, hamuje także sygnały kontrolujące wzrost komórek. HMGB1, jak podano wcześniej, ma właściwości proangiogenne i prozapalne.

HMGB1 może dwojako działać na nowotwory: po pierwsze, wydzielanie HMGB1 np. podczas terapii przeciwnowotworowej (chemio- lub radioterapii) może prowadzić do dojrzewania komórek dendrytycznych przez interakcję z receptorami TLR4 i w konsekwencji ekspansję limfocytów T swoistych dla antygenów nowotworowych. Po drugie, przewlekła hipoksja w rosnących guzach prowadzi do nekrozy komórek i ciągłego uwalniania cytokiny



Ryc. 3. Hamowanie białka HMGB1. Odbywać się to może w dwojaki sposób: przez hamowanie uwalniania białka HMGB1, przez hamowanie aktywności już uwolnionego białka HMGB1, uwzględniono najbardziej znane inhibitory białka HMGB1

HMGB1. Powoduje to wytworzenie warunków promujących angiogenezę, wzrost nowotworów, rekrutację makrofagów swoistych dla nowotworów i komórek prekursorowych śródbłonnków [2,33].

Białko HMGB1 może zatem, w odpowiednich warunkach, stymulować odpowiedź przeciwnowotworową. Jednak obniżenie poziomu białka HMGB1 przez ograniczenie jego wydzielania, czy zahamowanie jego aktywności po uwolnieniu z komórki, może przynieść znaczący efekt terapeutyczny w leczeniu przeciwnowotworowym.

Stymulacja odpowiedzi przeciwnowotworowej przez białko HMGB1

Uwolnione niektóre wewnątrzkomórkowe cząsteczki w odpowiednich warunkach, mogą aktywować limfocyty T i silną odpowiedź przeciwnowotworową. Do takich cząsteczek należy też cytokina HMGB1. Cytokina ta może być cząsteczką stymulującą układ odpornościowy. Komórki nowotworowe przeważnie są komórkami wymykającymi się spod nadzoru układu odpornościowego. W odpowiednich warunkach można jednak wymusić odpowiedź układu odpornościowego przeciwko komórkom nowotworowym. Wydaje się, że radioterapia czy chemioterapia może powodować przejście komórek nowotworowych w stan immunogeny. Naświetlanie guza, czy stosowanie odpowiednich chemioterapeutyków, takich jak taksany, powoduje śmierć komórek nowotworowych i uwalnianie znacznych ilości białka HMGB1. Białko to aktywuje niedojrzałe komórki dendrytyczne co prowadzi do aktywacji limfocytów T, które niszczą komórki nowotworowe [2]. Warto jednak zauważyć, że jest to proces niezmiernie rzadki, opisany jedynie dla mysich modeli nowotworowych.

Hamowanie aktywności białka HMGB1

Wzrost nowotworu powyżej 2–3 mm³ wymaga wytworzenia sieci naczyń krwionośnych w guzie. Sygnałami indukującymi angiogenezę w guzie jest głównie hipoksja i śmierć nekrotyczna. Przewlekła hipoksja jest związana z uwalnianiem różnych cząsteczek, w tym białka HMGB1. Podobnie dzieje się podczas procesu nekrozy. Uwolnione białko HMGB1 jest odpowiedzialne za powstawanie nowych naczyń krwionośnych, migrację komórek i ich proliferację. Prowadzi to do regeneracji uszkodzonej tkanki nowotworowej. Zahamowanie aktywności białka HMGB1 lub jego receptorów stwarza potencjalne możliwości aplikacyjne w terapii przeciwnowotworowej. Wydaje się zatem, że białko to może być celem działania różnych czynników.

INHIBITORY AKTYWNOŚCI BIAŁKA HMGB1

Hamowanie białka może się odbywać dwoma sposobami: przez hamowanie aktywności białka HMGB1 lub przez hamowanie jego uwalniania (ryc. 3).

Inhibitory aktywności białka HMGB1

Pierwszym przykładem inhibitora białka HMGB1 jest swoiste przeciwciało przeciwko HMGB1, znacznie hamujące uwalnianie cytokin prozapalnych TNF- α i IL-6 w guzie. Zastosowanie przeciwciała hamuje wzrost guzów raka okrężnicy z towarzyszącym stanem zapalnym [19,37].

Inhibitorem jest również fragment samego białka HMGB1 – domena A. Domena A jest jednym z motywów wiążących DNA. Jest ona swoistym antagonistą aktywności tego białka. Badania *in vitro* wykazały, że domena A hamuje wiązanie HMGB1 z powierzchnią makrofagów i ogranicza wydzielanie cytokin prozapalnych w linii makrofagów RAW 264.7 [47]. Zablockowanie białka HMGB1 znajdującego się poza komórką po zastosowaniu peptydu domeny A hamuje wzrost komórek ludzkiego raka płuc 95D [44].

Innym przykładem hamowania aktywności białka HMGB1 jest blokowanie wiązania tego białka z jego receptorem RAGE. Zastosowanie rozpuszczalnej pozakomórkowej domeny sRAGE wiąże i hamuje aktywność białka HMGB1. Ligand ten blokuje całkowicie sygnalizację z receptora RAGE. Podanie sRAGE blokuje wzrost guzów nowotworowych np. mysiego brodawczaka (*Murine papillomas*) [34].

Kolejnym inhibitorem aktywności białka HMGB1 jest glicyryzyna, która jest trójterpenowym glikokoniuгатem pochodzącym z korzenia lukrecji (*Glycyrrhiza glabra*). Jest to znany silny związek przeciwzapalny stosowany w stanach zapalnych i sepsie [14]. Związek ten wiąże się z obiema domenami HMGB1 (box A i B) i zmienia strukturę drugorzędową cząsteczki HMGB1 [22]. Glicyryzyna hamuje migrację oraz proliferację komórek warunkowaną białkiem HMGB1, a także hamuje proces angiogenezy stymulowanej HMGB1 [22, 31].

Inhibitory uwalniania białka HMGB1

Inhibitorem uwalniania białka HMGB1 jest pirogronian etylu. Jest to związek, który hamuje uwalnianie HMGB1 i TNF z makrofagów stymulowanych endotoksyną. Podawanie pirogronianu etylu znacznie zmniejsza poziom krążącego białka HMGB1 u myszy z wywołaną sepsą. Podanie



myszom pirogronianiu etylu przed wszczepieniem komórek raka wątroby i kontynuowanie terapii tym związkiem działa hamująco na wzrost guzów nowotworowych [16]. U leczonych myszy obserwowano w wątrobie znaczne zmniejszenie liczby komórek NK, monocytów, limfocytów T i B. Również poziom HMGB1 i IL-6 w surowicy był znacznie obniżony [16]. Pirogronian etylu indukował apoptozę zamiast śmierci nekrotycznej i hamował także uwalnianie HMGB1 w komórkach raka płuca – A549 [17].

Li i wsp. w 2010 r. opublikowali dane wskazujące, że główny składnik zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) galusan epigallokatechiny (EGCG) wnika do cytoplazmy i indukuje agregację cytoplazmatycznego białka HMGB1, białko to w autofagosomach ulegało degradacji [15]. EGCG indukowało proces autofagii w komórkach i hamowało uwalnianie HMGB1 po stymulacji LPS, hamowało również uwalnianie z makrofagów zależnych od HMGB1 białek TNF- α , IL-6 czy NO [38].

Podanie związków platyny powoduje tworzenie charakterystycznych adduktów, naprawianych przez wycinanie

zasady (excision repair system). Domena HMGB1 wiąże się swoiście z adduktami DNA z platyną osłaniając naprawę uszkodzonego miejsca [24]. W ten sposób związki cisplatinowy mogą służyć do wyłapywania (sekwestracji) białka HMGB1 [3,4].

PODSUMOWANIE

Białko HMGB1 jest ewolucyjnie konserwatywnym białkiem o bardzo szerokim działaniu. Wewnątrz komórki znajduje się ono głównie w jądrze komórkowym i bierze udział w replikacji, rekombinacji, transkrypcji i naprawie DNA. Po uwolnieniu do przestrzeni pozakomórkowej staje się cytokiną prozapalną. Cytokina ta stymuluje tworzenie nowych naczyń krwionośnych, zwiększa migrację komórek, aktywuje stan zapalny oraz stymuluje proliferację komórek.

Możliwość zahamowania uwalniania z komórek tego białka czy zahamowanie jego aktywności wydaje się obiecującym podejściem terapeutycznym. Inhibitory białka HMGB1 z innymi lekami mogą się okazać skuteczną strategią terapeutyczną.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bianchi M.E.: HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.*, 2009; 86: 573–576
- [2] Campana L., Bosurgi L., Rovere-Querini P.: HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008; 20: 518–523
- [3] Dong Xda E., Ito N., Lotze M.T., Demarco R.A., Popovic P., Shand S.H., Watkins S., Winikoff S., Brown C.K., Bartlett D.L., Zeh H.J. III.: High mobility group box 1 (HMGB1) release from tumor cells after treatment: implications for development of targeted chemotherapeutic. *J. Immunother.*, 2007; 30: 596–606
- [4] Ellerman J.E., Brown C.K., de Vera M., Zeh H.J., Billiar T., Rubartelli A., Lotze M.T.: Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 2836–2848
- [5] Gardella S., Andrei C., Ferrera D., Lotti L.V., Torrisi M.R., Bianchi M.E., Rubartelli A.: The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.*, 2002; 3: 995–1001
- [6] Garg A.D., Nowis D., Golab J., Vandenabeele P., Krysko D.V., Agostinis P.: Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1805: 53–71
- [7] Gauley J., Pisetsky D.S.: The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death. *Autoimmunity*, 2009; 42: 299–301
- [8] Goodwin G.H., Johns E.W.: Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.*, 1973; 40: 215–219
- [9] Green D.R., Ferguson T., Zitvogel L., Kroemer G.: Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009; 9: 353–363
- [10] Kang R., Livesey K.M., Zeh H.J.3rd, Loze M.T., Tang D.: Metabolic regulation by HMGB1-mediated autophagy and mitophagy. *Autophagy*, 2011; 7: 1256–1258
- [11] Kang R., Livesey K.M., Zeh H.J., Loze M.T., Tang D.: HMGB1: a novel Beclin 1-binding protein active in autophagy. *Autophagy*, 2010; 6: 1209–1211
- [12] Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D.: The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death. Differ.*, 2011; 18: 571–580
- [13] Klune J.R., Dhupar R., Cardinal J., Billiar T.R., Tsung A.: HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol. Med.*, 2008; 14: 476–484
- [14] Lamore S.D., Cabello C.M., Wondrak G.T.: HMGB1-directed drug discovery targeting cutaneous inflammatory dysregulation. *Curr. Drug. Metab.*, 2010; 11: 250–265
- [15] Li W., Zhu S., Li J., Assa A., Jundoria A., Xu J., Fan S., Eissa N.T., Tracey K.J., Sama A.E., Wang H.: EGCG stimulates autophagy and reduces cytoplasmic HMGB1 levels in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 2011; 81: 1152–1163
- [16] Liang X., Chavez A.R., Schapiro N.E., Loughran P., Thorne S.H., Amoscatto A.A., Zeh H.J., Beer-Stolz D., Lotze M.T., de Vera M.E.: Ethyl pyruvate administration inhibits hepatic tumor growth. *J. Leukoc. Biol.*, 2009; 86: 599–607
- [17] Lim S.C., Choi J.E., Kim C.H., Duong H.Q., Jeong G.A., Kang H.S., Han S.I.: Ethyl pyruvate induces necrosis-to-apoptosis switch and inhibits high mobility group box protein 1 release in A549 lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2007; 20: 187–192
- [18] Lotze M.T., Tracey K.J.: High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005; 5: 331–342
- [19] Maeda S., Hikiba Y., Shibata W., Ohmae T., Yanai A., Ogura K., Yamada S., Omata M.: Essential roles of high-mobility group box 1 in the development of murine colitis and colitis-associated cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 360: 394–400
- [20] Mantell L.L., Parrish W.R., Ulloa L.: Hmg-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock*, 2006; 25: 4–11
- [21] Mitola S., Belleri M., Urbinati C., Coltrini D., Sparatore B., Pedrazzi M., Melloni E., Presta M.: Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J. Immunol.*, 2006; 176: 12–15
- [22] Mollica L., De Marchis F., Spitaleri A., Dallacosta C., Pennacchini D., Zamai M., Agresti A., Trisciuglio L., Musco G., Bianchi M.E.: Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem. Biol.*, 2007; 14: 431–441
- [23] Palumbo R., Sampaolesi M., De Marchis F., Tonlorenzi R., Colombetti S., Mondino A., Cossu G., Bianchi M.E.: Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J. Cell Biol.*, 2004; 164: 441–449
- [24] Park S., Lippard S.J.: Redox state-dependent interaction of HMGB1 and cisplatin-modified DNA. *Biochemistry*, 2011; 50: 2567–2574
- [25] Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R.: Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 57–63
- [26] Raucchi A., Palumbo R., Bianchi M.E.: HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity*, 2007; 40: 285–289
- [27] Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E.: Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002; 418: 191–195
- [28] Schiraldi M., Raucchi A., Muñoz L.M., Livoti E., Celona B., Venereau E., Apuzzo T., De Marchis F., Pedotti M., Bachi A., Thelen M., Varani L., Mellado M., Proudfoot A., Bianchi M.E., Ugucioni M.: HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.*, 2012; 209: 551–563

- [29] Schlueter C., Weber H., Meyer B., Rogalla P., Röser K., Hauke S., Bullerdiek J.: Angiogenic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenic switch molecule. *Am. J. Pathol.*, 2005; 166: 1259–1263
- [30] Sims G.P., Rowe D.C., Rietdijk S.T., Herbst R., Coyle A.J.: HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010; 28: 367–388
- [31] Smolarczyk R., Cichon T., Matuszczak S., Mitrus I., Lesiak M., Kobusinska M., Kamysz W., Jarosz M., Sieron A.L., Szala S.: The role of glycyrrhizin, an inhibitor of HMGB1 protein, in anticancer therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2012; 60: 391–399
- [32] Sparvero L.J., Asafu-Adjei D., Kang R., Tang D., Amin N., Im J., Rutledge R., Lin B., Amoscato A.A., Zeh H.J., Lotze M.T.: RAGE (receptor for advanced glycation endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J. Transl. Med.*, 2009; 7: 17
- [33] Srikrishna G., Freeze H.H.: Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia*, 2009; 11: 615–628
- [34] Taguchi A., Blood D.C., del Toro G., Canet A., Lee D.C., Qu W., Tanji N., Lu Y., Lalla E., Fu C., Hofmann M.A., Kislinger T., Ingram M., Lu A., Tanaka H., Hori O., Ogawa S., Stern D.M., Schmidt A.M.: Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*, 2000; 405: 354–360
- [35] Tang D., Kang R., Livesey K.M., Cheh C.W., Farkas A., Loughran P., Hoppe G., Bianchi M.E., Tracey K.J., Zeh H.J. III, Lotze M.T.: Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell. Biol.*, 2010; 190: 881–892
- [36] Tang D., Kang R., Livesey K.M., Zeh H.J.3rd, Lotze M.T.: High mobility group box 1 (HMGB1) activates an autophagic response to oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 15: 2185–2195
- [37] Tang D., Kang R., Zeh H.J. III, Lotze M.T.: High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1799: 131–140
- [38] Tang D., Kang R., Zeh H.J. III, Lotze M.T.: High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, 2011; 14: 1315–1335
- [39] Tesniere A., Apetoh L., Ghiringhelli F., Joza N., Panaretakis T., Kepp O., Schlemmer F., Zitvogel L., Kroemer G.: Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008; 20: 504–511
- [40] Tesniere A., Panaretakis T., Kepp O., Apetoh L., Ghiringhelli F., Zitvogel L., Kroemer G.: Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.*, 2008; 15: 3–12
- [41] Thorburn J., Horita H., Redzic J., Hansen K., Frankel A.E., Thorburn A.: Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 175–183
- [42] Ulloa L., Messmer D.: High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2006; 17: 189–201
- [43] van Beijnum J.R., Buurman W.A., Griffioen A.W.: Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*, 2008; 11: 91–99
- [44] Wang C., Fei G., Liu Z., Li Q., Xu Z., Ren T.: HMGB1 was a pivotal synergistic effector for CpG oligonucleotide to enhance the progression of human lung cancer cells. *Cancer Biol. Ther.*, 2012; 13: 727–736
- [45] Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J.M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue K.R., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U., Molina P.E., Abumrad N.N., Sama A., Tracey K.J.: HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999; 285: 248–251
- [46] Yang H., Hreggvidsdottir H.S., Palmblad K., Wang H., Ochani M., Li J., Lu B., Chavan S., Rosas-Ballina M., Al-Abed Y., Akira S., Bierhaus A., Erlandsson-Harris H., Andersson U., Tracey K.J.: A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 11942–11947
- [47] Yang H., Tracey K.J.: Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1799: 149–156
- [48] Yang H., Wang H., Czura C.J., Tracey K.J.: The cytokine activity of HMGB1. *J. Leukoc. Biol.*, 2005; 78: 1–8
- [49] Zhu S., Li W., Ward M.F., Sama A.E., Wang H.: High mobility group box 1 protein as a potential drug target for infection- and injury-elicited inflammation. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2010; 9: 60–72

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

