

## STAT3 – ukryty czynnik transkrypcyjny celem terapii przeciwnowotworowych

### STAT3 – Latent transcription factor for anti-cancer therapy

Marta Poczęta, Ilona Bednarek

#### STRESZCZENIE

Białka STAT (*signal transducer and activator of transcription* – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji) to rodzina czynników transkrypcyjnych, z których każdy pełni unikalną funkcję w przekazywaniu sygnałów zewnątrzkomórkowych oraz bezpośrednim regulowaniu transkrypcji. Ich funkcja polega na kontroli ekspresji genów, które zaangażowane są w przeżycie komórek, proliferację, chemiooporność oraz angiogenezę.

Ufosforylowany STAT3 obserwuje się w blisko 70% ludzkich nowotworów. Pełniąc rolę białka onkogenne ulega on konstytutywnej aktywacji w wielu pierwotnych nowotworach u ludzi, będąc aktywowanym przez wiele różnych cytokin, takich jak IL-6, IL-7, IL-10, IL-20, leptyna, czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (*granulocyte colony stimulating factor* – G-CSF), epidermalny czynnik wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF), płytkowy czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor* – PDGF), a także białka onkogenne, m.in. Src i Ras.

Ponadto STAT3 może być aktywowany poprzez receptorowe i niereceptorowe kinazy tyrozynowe, takie jak: kinaza receptora epidermalnego czynnika wzrostu (*kinase of epidermal growth factor receptor* – EGFR), aktywowana kinaza Janus (*activated Janus kinase* – JAK), kinazy regulujące sygnały zewnątrzkomórkowe (*kinases regulating extracellular signals* – ERK). Jego istotną funkcją jest regulacja autonomicznych właściwości komórek nowotworowych.

Blokowanie ekspresji STAT3 w ludzkich komórkach nowotworowych hamuje proliferację *in vitro* oraz progresję nowotworów *in vivo*. W celu wyciszenia ekspresji genów STAT3 można wykorzystać oligonukleotydy antysensowe, rybozomy i DNazy.

Samo białko STAT3 można zablokować wykorzystując inhibitory kinazy tyrozynowej, dominanty negatywne wobec białka STAT3, komplementarne wobec leków małe niepeptydowe cząsteczki. Wśród najnowszych metod regulacji ekspresji genów znajduje się metoda wykorzystująca proces interferencji RNA – RNAi.

#### SŁOWA KLUCZOWE

STAT3, białko onkogenne, nowotwór, cytokiny, aktywacja STAT3, ekspresja STAT3, interferencja RNA

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach

#### ADRES DO KORESPONDENCJI:

Mgr Marta Poczęta  
Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Narcyzów 1  
41-206 Sosnowiec  
tel. +48 32 36 41 025  
e-mail: m.poczeta@gmail.com

Ann. Acad. Med. Siles. 2013, 67, 2, 133–141  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
eISSN 1734-025X

## ABSTRACT

STAT proteins belong to the transcriptional factors family, and each of them performs a unique function in extracellular signal transduction and in direct regulation of transcription. Their function is based on controlling genes expression, which is involved in cell survival, proliferation, chemoresistance and angiogenesis.

Phosphorylated STAT3 is observed in 70% of human cancers. STAT3 as an oncogenic protein is constitutively activated in many primary human cancers by different cytokines as: IL-6 IL-7, IL-10, IL-20, leptin, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and oncogenic proteins such as Src and Ras.

Moreover, STAT3 can be activated by receptor and nonreceptor tyrosine kinases such as: epidermal growth factor receptor kinase (EGFR), activated Janus kinase (JAK) or kinase regulating extracellular signals (ERK). An important role of STAT3 is the regulation of cancer cells autonomous properties.

The blocking of STAT3 expression in human cancer cells inhibits proliferation *in vitro* and cancer progression *in vivo*. To inhibit gene expression of STAT3, antisense oligonucleotides, rybozymes and DNazymes can be used.

The STAT3 protein can be blocked by tyrosine kinase inhibitors, negative dominants for the STAT3 protein, complementary to small nonpeptide particle drugs. Among the newest methods of gene expression regulation is the RNA – RNAi method of interference.

## KEY WORDS

STAT3, oncogene protein, cancer, cytokines, activation of STAT3, STAT3 expression, RNA interference

## WSTĘP

## Białka STAT

Białka STAT (*signal transducer and activator of transcription* – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji) to rodzina czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję genów zaangażowanych w prawidłowe i patologiczne procesy komórkowe [1]. Białka STAT są powiązane z zapaleniem, przeżyciem, proliferacją, metastazą, angiogenezą oraz chemioopornością komórek nowotworowych [2].

Rodzina białek STAT składa się z siedmiu przynależnych do niej członków (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6), których wielkość zawiera się w zakresie 750–850 aminokwasów, w rezultacie tworząc białka o masie cząsteczkowej 90–115 kDa [3].

Każde z białek STAT pełni unikalną funkcję w transdukcji sygnałów zewnątrzkomórkowych i bezpośrednim modulowaniu transkrypcji. Początkowo są one obecne w nieaktywnej formie w cytoplazmie i zostają aktywowane po związaniu się z peptydami sygnalizacyjnymi, do których należą cytokiny, czynniki wzrostu i hormony. W przypadku aktywacji przez cytokiny receptor dla cytokin ulega dimeryzacji oraz indukcji, a następnie wiąże się z błoną komórkową, prowadząc do aktywacji kinazy JAK (*Janus-activated kinase* – kinaza tyrozynowa typu Janus) przez szybką fosforylację domen cytoplazmatycznych. Fosforylacja generuje miejsce rozpoznawane przez białka STAT z homologiczną domeną wiążącą Src (SH2 – *Src homology2*), umożliwiając im formowanie homo- lub heterodimerów i szybkie przemieszczanie się do jądra

komórkowego. W jądrze dimery wiązane są do specyficznych sekwencji (często określanych jako sekwencje aktywowane) w regionach promotorów genów w celu pobudzenia ich transkrypcji [4].

Geny kodujące białka STAT zlokalizowano w trzech obszarach chromosomów (tab. I).

Tabela I. Lokalizacja białek STAT w chromosomach [5]  
Table I. STAT chromosomal location [5]

Białka stat	Lokalizacja w chromosomie	
	myszy	człowiek
STAT 1	1	2q32.3
STAT 2	10	12q13.3
STAT 3	11	17q21.2
STAT 4	1	2q32.2
STAT 5a	11	17q21.2
STAT 5b	11	17q21.2
STAT 6	10	12q13.3

W prawidłowych komórkach, po modulacji ekspresji genu, białka STAT mogą ulec defosforylacji przez fosfatazy tyrozyny i w tej formie pozostają wolne do kolejnych rund stymulacji [6].

Białka STAT można podzielić na dwie grupy w zależności od ich specyficznych funkcji:

- 1) STAT2, STAT4 i STAT6, aktywowane przez niewielką liczbę cytokin, odgrywające różnorodne role w rozwoju komórek T i sygnalizacji IFN $\gamma$ ;
- 2) STAT1, STAT3 i STAT5, aktywowane w różnych tkankach przez szereg ligandów i odpowiednio uczestniczące w sygnalizacji IFN, rozwoju gruczołu sutkowego i odpowiedzi na GH (*growth hormone* – hormon wzrostu) i embriogenezę [7].

Czynniki transkrypcyjne STAT3 oraz STAT5 są powiązane z licznymi nowotworami złośliwymi [2].

W porównaniu z normalnymi komórkami i tkankami, konstytutywnie aktywowane białka STAT zostały wykryte w szerokim zakresie ludzkich linii komórkowych związanych z nowotworami obejmującymi białaczkę, chłoniaki, czerniaki, raka prostaty, raka jajnika, płuca, i sutka [8].

Nowe zainteresowanie blokowaniem kaskady sygnalizacyjnej białek STAT w nowotworach złośliwych jest wynikiem różnorodnych funkcji cząsteczek białek STAT w odniesieniu do proliferacji komórek i ich przeżycia, jak również transkrypcji DNA, wszystkich procesów, które mają kluczowe znaczenie dla progresji nowotworów [9].

**Białko STAT3**

Białko STAT3 jest ukrytym cytoplazmatycznym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez różnorodne sygnały, w tym wiele cytokin i czynników wzrostu. Po aktywacji poprzez fosforylację tyrozyny, STAT3 tworzy dimery, które przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie regulują transkrypcję docelowych genów [10]. Ufosforylowany STAT3 obserwuje się w blisko 70% ludzkich nowotworów. Białko STAT3 jest włączone w wiele prawidłowych i patologicznych procesów obejmujących proliferację komórkową, różnicowanie, przeżycie, angiogenezę, metastazę, zapalenie i odpowiedź immunologiczną. Działa jako onkogen w procesie nowotworzenia, przyczyniając się do mechanizmów ucieczki guza spod kontroli układu odpornościowego [11]. W normalnych warunkach fizjologicznych aktywność STAT3 jest ściśle kontrolowana, jednak wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizowania obejmujące STAT3 są często konstytutywnie aktywowane w wielu różnych nowotworach u ludzi, zatem białko to jest zaangażowane w wiele procesów biologicznych, w tym kancerogenezę. Konstytutywną aktywację STAT3 stwierdzono w wielu typach nowotworów, m.in. w czerniaku, raku prostaty, głowy i szyi, raku płaskonabłonkowym. Wykazano, że inhibicja STAT3 może powodować hamowanie różnych nowotworów [10,12]. W uzupełnieniu do komórek nowotworowych STAT3 jest konstytutywnie aktywowany również w wielu typach komórek immunologicznych w mikrośrodowisku guza, w tym komórkach dendrytycznych (*dendritic cells* – DC) i makrofagach [13].

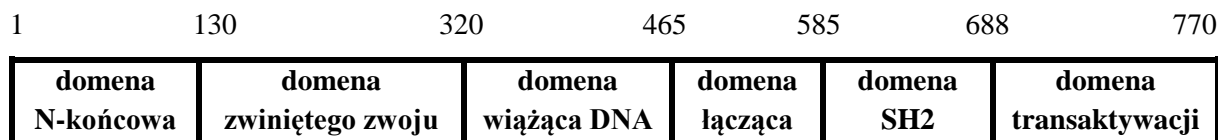
**Gen STAT3**

Gen *STAT3* zbudowany jest z 24 ekzonów i występuje na długim ramieniu chromosomu 17 (17q21.1- q21.2). Chociaż istnieje tylko jeden gen *STAT3*, tak u myszy, jak i u ludzi, zostały zidentyfikowane dwie izoformy białka: STAT3 $\alpha$  (p92) i STAT3 $\beta$  (p83), różniące się strukturą C-końcowej domeny transaktywacji. Informacyjny RNA (mRNA) kodujący STAT3 $\beta$  ma 50-nukleotydową delecję na końcu 3', która prawdopodobnie spowodowana jest przez alternatywne składowanie mRNA, co w konsekwencji powoduje brak 55 reszt aminokwasowych na C-końcu STAT3 $\alpha$  [14]. W STAT3 $\beta$  55 reszt aminokwasowych występujących w STAT3 $\alpha$  jest zastąpionych przez 7 unikalnych reszt aminokwasowych na C-końcu. Pozostałości te są kodowane przez 21 nukleotydów łączonych w 2 ramki odczytu poniżej miejsca delecji; 55 reszt aminokwasowych na C-końcu obejmuje domenę transaktywacji STAT3 $\alpha$  i zawiera serynę 727, której fosforylacja powoduje zwiększoną aktywność transkrypcji. Obniżona aktywność wiązania DNA ze STAT3 $\alpha$  wynika z ograniczonej stabilności homodimerów STAT3 $\alpha$  w porównaniu z homodimerami STAT3 $\beta$ . Stosunek STAT3 $\alpha$  do STAT3 $\beta$  różni się w komórkach i tkankach odpowiednio od 3 : 1 do 10 : 1 na poziomie mRNA oraz 1 : 3 do 10 : 1 na poziomie białka. Różnica ta może wywołać poważne skutki biologiczne, ponieważ funkcje tych dwóch izoform się nie pokrywają. W badaniach analizujących różne funkcje biologiczne izoform STAT3, STAT3 $\alpha$  wzmacnia, natomiast STAT3 $\beta$  hamuje wirusowy protoonkogen mięsaka (*viral-sarcoma* – v-Src), pośrednią transformację fibroblastów. Czynniki regulujące składowanie STAT3 do STAT3 $\alpha$  lub STAT3 $\beta$ , w tym elementy regulacyjne *cis* w genach *STAT3*, nie są znane [14].

**Struktura białka STAT3**

Białko STAT3 ma masę cząsteczkową 89 kDa (770 aminokwasów), charakteryzuje się obecnością następujących domen białek strukturalnych:

- domena N-końcowa,
- domena zwiniętego zwoju (*coiled-coil domain*),
- element wiążący DNA, łącznik (linker),
- domena SH2,
- domena transaktywacji (ryc. 1) [3].



**Ryc. 1.** Struktura białka STAT3. Podobnie jak inni członkowie rodziny STAT, STAT3 składa się z sześciu domen: domeny N-końcowej, domeny zwiniętego zwoju, domeny wiążącej DNA, domeny łączącej, domeny SH2 i domeny transaktywacji [3].  
**Fig. 1.** Structure of STAT3 protein. Similar to other members of STAT family, STAT3 is comprised of six domains: N-terminal domain, coiled coil domain, DNA binding domain, linker domain, SH2 domain and Transactivation domain [3].

### Funkcja STAT3

Białko STAT3 zostało uznane za współczynnik reakcji ostrej fazy, aktywowany przez IL-6. Obecnie uznaje się, że może być również aktywowane przez wiele innych cytokin, takich jak IL-7, IL-10, IL-20, leptyna, czynniki stymulujące wzrost kolonii granulocytów G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*), epidermalny czynnik wzrostu EGF (*epidermal growth factor*) [4].

Ścieżki aktywacji oraz analiza funkcjonalna wykazują, że STAT3 odgrywa ważną rolę w regulowaniu, zarówno konstruktywnie, jak i negatywnie, szerokiego spektrum procesów komórkowych zachodzących w uzupełnieniu do transkrypcji. STAT3 koordynuje ekspresję genów występujących w wielu szlakach metabolicznych i biosyntezy, integrując sygnały prowadzące do globalnych zmian transkrypcji i onkogenezy. Obejmują one geny zaangażowane w adhezję komórkową, przebudowę cytoszkieletu, metabolizm lipidów i białek, a także przewodnictwo sygnałów [10].

Białko STAT3 ulega ekspresji w większości tkanek, może też wykazywać przeciwstawne efekty w stosunku do proliferacji w różnych typach komórek, np. komórki T i hepatocyty z niedoborem STAT3 wykazują słabą odpowiedź na IL-6, podczas gdy niedobór STAT3 w makrofagach i neutrofilach wiąże się z nadmierną produkcją cytokin prawdopodobnie z powodu zaburzenia reakcji IL-10. Gruczoły sutkowe z zerowym poziomem STAT3 wykazują znaczne opóźnienie w programowanej śmierci komórki, która występuje podczas cyklicznych inwolucji gruczołu sutkowego [4].

Wysoki poziom aktywowanego STAT3 w guzach piersi jest w sposób odwrotnie proporcjonalny skorelowany z kompletną patologiczną odpowiedzią na chemioterapię neoadiuwantami. Zahamowanie aktywacji STAT3 w komórkach raka sutka hamuje wzrost i proces neoangiogenezy i potencjalną odpowiedź na chemioterapeutyk – doksorubicynę. Produkcja autokrynnej IL-6, pierwszego mediatora aktywacji STAT3 w guzie piersi, została zaobserwowana na podwyższonym poziomie w ludzkich gruczołach sutkowych. Blokada tego szlaku sygnalizacyjnego zmieniła agresywne cechy charakterystyczne dla podstawowego raka sutka [15].

Ponadto STAT3 odgrywa zasadniczą rolę w transdukcji sygnału wymaganego do migracji, ale nie do proliferacji keratynocytów, a także jest niezbędny do przebudowy skóry oraz włosów i gojenia się ran. W związku z tym może promować proliferację w hepatocytach, komórkach nerwowych, komórkach plazmatycznych i limfocytach T, ale hamuje te reakcje w gruczołach mlekowych i komórkach szpiku [4].

Co ciekawe, za pomocą oligonukleotydów antysensowych i ilościowej reakcji amplifikacji w czasie rze-

czywistym – RT<sup>TM</sup>-PCR (*real-time polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy), w badaniach wykazano zmiany w globalnej ekspresji genów w wyniku ekspresji STAT3 w komórkach nabłonka płuc [4,16]. Wykazano, że STAT3 reguluje geny wspólne zarówno dla procesu gojenia się ran, jak i nowotworu, zapewniając molekularne podstawy do zrozumienia, w jaki sposób rak prowadzi do deregulacji normalnych procesów gojenia się ran [4].

Dodatkowe badania sugerują, że ekspresja aktywowanej postaci STAT3 jest ważnym czynnikiem związanym z inwazją nowotworową i słabym rokowaniem u ludzi z gruczolakiem jelita grubego [4,17,18]. Jak wynika z licznych badań, konstytutywna aktywacja lub deregulacja STAT3 przyczynia się do wielu nowotworów, w tym nowotworów żołądka, szpiczaka mnogiego, białaczki, chłoniaków, ziarniaków grzybiastych, nowotworów mózgu, prostaty, piersi, płuca, głowy i szyi. Skumulowanie dowodów z przeprowadzonych badań z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensowych, interferencyjnego RNA (RNAi – *RNA interference*), peptydów i małowcząsteczkowych inhibitorów wskazuje, że blokowanie STAT3 prowadzi do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych i apoptozy [4]. STAT3 może promować transformację komórek guza poprzez ścieżki sygnalizacji antyapoptotycznej (przez regulację genów, które przeciwdziałają aktywnej śmierci komórki). W nowotworowych liniach komórkowych mózgu, skóry i piersi nadekspresja genów antyapoptotycznych, takich jak Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) i Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*), jest powiązana z manipulacją STAT3, a w konsekwencji z zahamowaniem STAT3 powodującego apoptozę.

W przeciwieństwie do aktywacji monocytów, w komórkach STAT3 prowadzi do zahamowania c-myc i c-myb oraz indukcji junB i IRF-1 (*IFN-gene regulatory factor* – czynnik regulujący gen dla interferonu), regulacji genów związanych z różnicowaniem i zahamowaniem wzrostu [2,19]. Ścisły związek aktywacji STAT3 z transformacją i progresją nowotworu spowodował, że białko STAT3 stało się atrakcyjnym celem dla powodzenia terapii molekularnej raka [4].

### Import STAT3 do jądra komórkowego

Obecność STAT3 w jądrze i cytoplazmie w warunkach podstawowych wskazuje na stały transport STAT3 między dwoma przedziałami komórkowymi. W przeciwieństwie do innych STAT, takich jak STAT1 i STAT2, które gromadzą się w jądrze tylko po ich fosforylacji, STAT3 mogą wejść do jądra komórkowego niezależnie od fosforylacji. Mechanizm leżący u podłoża tych różnic dotyczy zaangażowania różnych importyn przez STAT dla ich jądrowego importu. STAT3 wiąże się konstytutywnie do importyn a-3 i a-6 [20].

**Aktywacja STAT3**

Mimo że białka STAT są zazwyczaj ukryte w cytoplazmie i ich aktywacja jest ściśle kontrolowana przez negatywne regulatory, w tym SOCS (*suppressors of cytokine signaling* – inhibitory przekaźnictwa sygnału od cytokin), białka PIAS (*protein inhibitors of activated STAT* – białkowe inhibitory aktywnych STAT) oraz fosfatazy, w komórkach transformowanych i w różnych komórkach nowotworowych, STAT3 jest aktywowany w istotny sposób [21].

Konstitutywna aktywacja STAT3 w komórkach nowotworowych spowodowana jest tym, że receptory sygnalizacji wielu cytokin i czynników wzrostu, np. interleukiny 6 oraz 10 (IL-6, IL-10), EGF, HGF (*hepatocyte growth factor* – czynnik wzrostu hepatocytów), HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2* – receptor typu 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu), VEGF (*vascular endothelial growth factor* – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu), są nadmiernie aktywne w nowotworach [21].

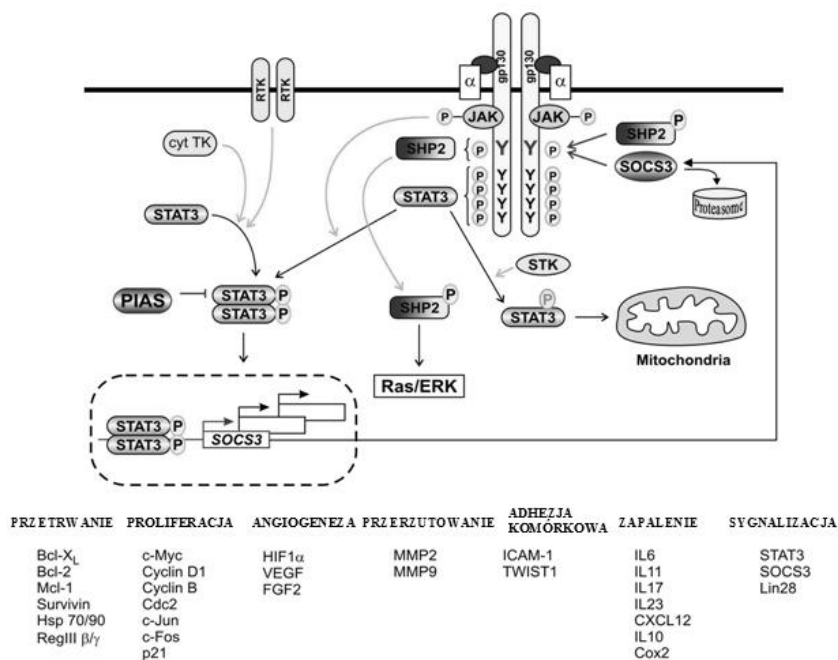
Aktywującą STAT3 konstitutywną fosforylację tyrozyny zaobserwowano w transformacji v-Src, v-EYK, v-Ros oraz v-FPS. Ponadto STAT 3 mogą być aktywowane przez różne kinazy onkogenne, jak v-src, c-src, v-ABL, a v-FPS [22]. Funkcjonalnie najważniejszymi regulatorami STAT3 są IL-6 oraz IL-10 z rodziny cytokin [23].

STAT 3 aktywowane jest przez fosforylację tyrozyny w jednym miejscu blisko C-końca (Y705), a także przez fosforylację seryny w miejscu w domenie trans-

aktywacji (Ser727). W fosforylacji tyrozyny w odpowiedzi na stymulację cytokinami pośredniczy kinaza JANUS, najczęściej JAK1, potrzebna do dimeryzacji STAT3, transportu jądrowego oraz wiązania DNA [24].

Sygnalizacja STAT3 (ryc. 2) jest wywołana przez różne kinazy (JAK, RTK, cyt TK, STK) w sposób zależny od fosforylacji i przeciwdziała wielu białkom regulatorowym (PIAS, SOCS3). Aktywacja STAT3 następuje w odpowiedzi na homodimeryzację gp130 (*glycoprotein 130* – białko transbłonowe, receptor cytokin), wiązania IL-6 lub IL-11 do ich specyficznych receptorów  $\alpha$  podjednostek transbłonowych ( $\alpha$  gp130). Fosforylacja tyrozyny czwartej błony dystalnej (Y) przez konstitutywnie związane JAK rodziny kinaz tyrozynowych (TK – *tyrosine kinase*) jest wystarczająca, aby homologiczna domena wiążąca src (SH-2) pośredniczyła w wiązaniu STAT3. Po fosforylacji tyrozyny STAT1/3 tworzą homi i heterodimery, które przemieszczają się i transaktywują geny, w tym negatywny regulator SOCS3. STAT3 może ulec fosforylacji przez niektóre TKS i TK cytoplazmatycznych receptorów. Tymczasem kinazy seryny treoninowej (STK – *serine-threonine kinase*) pośredniczą w fosforylacji seryny, która powoduje maksymalną aktywność transkrypcyjną STAT3 i umożliwia jego kierowanie do mitochondrium.

Białko transbłonowe gp130 angażuje również szlak Ras/ERK (*low molecular weight GTP-binding protein/extracellular signal-regulated kinases* – niskocząsteczkowe białko wiążące GTP/zewnątrzko-



**Ryc. 2.** Regulacja wewnątrzkomórkowej sygnalizacji STAT3. Na podstawie [23], zgodnie z Creative Commons Attribution License.

**Fig. 2.** Regulation of intracellular STAT3 signalling. On the basis [23], according to Creative Commons Attribution License.

mórkowy sygnał regulacji kinaz) poprzez wiązanie fosfatazy tyrozynowej SHP2 (*domain-containing tyrosine phosphatases* – domena zawierająca fosfatazy tyrozynowe) do bliższej błony sekwencji fosfo-YxxV (V – walina, x – dowolny aminokwas). Fosfataza tyrozynowa SHP2 ma również miejsca wiązania dla SOCS3 do pośredniczenia w degradacji proteasomalnej ligandów zajmowanych kompleksów receptora. Sygnalizację gp130 minimalizuje aktywność Y-fosfatazy SHP2, podczas gdy białka cytoplazmatyczne PIAS3 pochłaniają Y-ufosforylowane STAT3 z homodimeryzacji, transportu jądrowego i aktywacji genów docelowych [23].

Do aktywacji STAT3 dochodzi także za pośrednictwem IL-6. Rodzina IL-6 składa się z kilku białek o podobnej strukturze, takich jak IL-6, OSM (*oncostatin M*), rzęskowy czynnik neurotroficzny (CTNF – *ciliary neurotrophic factor*) i czynnik hamujący białaczkę (LIF – *leukaemia inhibitory factor*) [23]. IL-6 wywołuje szereg odrębnych odpowiedzi w różnych komórkach, w tym indukcję reakcji ostrej fazy w komórkach wątroby, stymulację proliferacji limfocytów B, aktywację końcowego różnicowania i zatrzymania wzrostu liczby monocytów oraz utrzymanie pluripotencji zarodkowych komórek macierzystych [24]. Rodzina IL-6 jest definiowana na podstawie wspólnego oddziaływania z  $\beta$ -podjednostką receptora gp130 [22].

Plejotropowe cytokiny pośredniczą w przekazywaniu sygnałów poprzez ścieżki MAPK (*mitogen-activated protein kinases* – kinazy aktywowane przez mitogeny) oraz JAK/STAT3, a także inicjują te szlaki przez wiązanie się z ich receptorami, co prowadzi do homodimeryzacji gp130 lub heterodimeryzacji gp130 z innymi gp 130 związanymi z podjednostkami receptora, takimi jak receptor OSM. Białka JAK fosforylują następnie podjednostki receptora gp130 na jednej z czterech konkretnych pozostałości tyrozyny, która rekrutuje i aktywuje białko STAT3. Ekspresję IL-6 reguluje wiele bodźców, takich jak niedotlenienie, mediatory prozapalne i cytokin IL-6, w tym IL-6 oraz OSM [19].

Sygnalizacja z udziałem receptora G-CSF podczas granulopoezy prowadzi do aktywacji STAT 3. HGF aktywuje STAT3 w procesie wzrostu kanalików w komórkach nabłonka. IL-10 wymaga aktywacji STAT3 w celu zapewnienia właściwości przeciwzapalnych makrofagów [19].

Z uwagi na rolę zmienionej ekspresji (często nadekspresja) białek STAT w transformacji nowotworowej i metastazie, celowe wydaje się zastosowanie technik molekularnych umożliwiających regulację ekspresji, w tym jej wyciszenie.

### Mechanizmy regulacji aktywności białek STAT3

Liczne badania pokazały, że blokowanie ekspresji STAT3 w ludzkich komórkach nowotworowych ha-

muje proliferację *in vitro* oraz progresję nowotworów *in vivo*. W celu wyciszenia ekspresji genów STAT3 można wykorzystać oligonukleotydy antysensowe, rybozomy i DNAzomy. Samo białko STAT3 można zablokować wykorzystując inhibitory kinazy tyrozynowej, dominanty negatywne wobec białka STAT3, komplementarne wobec leków małe niepeptydowe cząsteczki. Do najnowszych sposobów regulacji ekspresji genów należy metoda wykorzystująca proces interferencji RNA – RNAi [25].

Jedną z możliwych strategii modulacji ekspresji genów jest tzw. wyciszenie potranskrypcyjne, związane m.in. z wyłączeniem z przebiegu informacji genetycznej cząsteczek informacyjnego RNA.

Proces interferencji RNA jest zjawiskiem wyciszenia genu wynikającym ze specyficznej degradacji homologicznej cząsteczki mRNA, w której pośredniczy siRNA utworzone poprzez proces degradacji podwójnej nici RNA (dsRNA). Wyciszenie genu poprzez RNAi wymaga przetworzenia długiej podwójnej nici RNA (dsRNA) w cząsteczki RNA o długości 19 i 21 nukleotydów, nazywane siRNA. Proces ten odbywa się pod kontrolą enzymu zwanego Dicer, który jest typem endonukleazy. Następnie cząsteczki siRNA zostają włączone do indukowanego obecnością RNA kompleksu wyciszającego RISC. Aktywny kompleks rozpoznaje i degraduje mRNA i w ten sposób selektywnie hamuje ekspresję docelowego genu.

Obecnie opracowano szybkie i bardzo efektywne metody techniki RNAi, wykorzystywane w celu powstrzymania ekspresji docelowych genów, są one także szeroko stosowane w badaniach wirusowych chorób genetycznych i nowotworów złośliwych [25].

Huang i wsp. [25], wykorzystując ludzkie linie komórkowe raka trzustki SW1990 i PANC-1, przeprowadzili badania mające ocenić zastosowanie RNAi do wyciszenia ekspresji i aktywacji STAT3, a w konsekwencji wpływu na wzrost ludzkich komórek raka trzustki *in vitro* i *in vivo*. Stwierdzono, że ścieżki sygnalizacji STAT3 odgrywają ważną rolę w rozwoju raka trzustki, a wyciszenie genu STAT3 przy użyciu techniki RNAi może stać się nową terapeutyczną opcją leczenia tego typu nowotworu. Podczas eksperymentu zauważono wyraźne zmiany fenotypowe wzrostu komórek, wynikające z zahamowania ekspresji STAT3, obserwowane zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

Aby ustalić, czy STAT3 i p-STAT3 ulegają nadekspresji w tkankach raka trzustki, porównano poziom ekspresji STAT3 i p-STAT3 w normalnych tkankach trzustki, tkankach raka trzustki oraz liniach komórkowych raka trzustki (SW1990 i PANC-1) poprzez zastosowanie metody immunohistochemii oraz Western-blot analizujących przeciwciała anti-STAT3 oraz anti-p-STAT3. Wykazano, że zarówno STAT3, jak i p-STAT3 ulegają nadekspresji w tkankach raka trzustki oraz w liniach komórkowych raka trzustki.

Aby ustalić, czy zahamowanie STAT3 dotyczy proliferacji komórek i aktywności metabolicznej komórek macierzystych SW1990, komórek SW1990-Con i komórek SW1990-RNAi, wykonano test MTT assay i dokonano obserwacji po 24, 48 i 72 godzinach.

Proliferacja komórek została znacząco zmniejszona po obróbce z pRNAT-STAT3-siRNA-II ( $p < 0,05$ ), w porównaniu z rodzicielskimi komórkami SW1990 lub SW1990-Con. Analiza cytometryczna pozwoliła zbadać mechanizmy poprzez które Ornat-STAT3-siRNA-II hamuje proliferację komórek, cykl komórkowy oraz apoptozę komórek SW1990, a także stabilność komórek transfekowanych SW1990 Con i SW1990-RNAi. Jak stwierdzono, wyciszenie STAT3 prowadzi do zatrzymania komórek w fazie G0/G1 i zwiększenia apoptozy komórek. Okazało się, że STAT3 odgrywa istotną rolę w procesie nowotworzenia, a ekspresja STAT3 została znacząco zmniejszona po obróbce RNAT-STAT3-siRNA-II, co sugeruje, że wyciszenie STAT3 ma potencjał terapeutyczny dla raka trzustki.

Zdaniem Huanga i wsp., aktywacja STAT3 przyczynia się do onkogenezy przez rozporządzenie jego genów docelowych. Aby określić wpływ zahamowania STAT3 na ekspresję genów związanych ze wzrostem docelowych komórek, dokonano analizy ekspresji CyclinD1 i Bcl-xL poprzez RT-PCR, które są bezpośrednio zaangażowane w proliferację komórek nowotworowych oraz proces apoptozy. Wykazano, że ekspresja CyclinD1 i Bcl-xL mRNA w komórkach SW1990 została znacznie obniżona po wyciszeniu STAT3. Wyniki te potwierdziły, że wyciszenie genu STAT3 prowadzi do słumienia ekspresji CyclinD1 i Bcl-xL oraz odgrywa w konsekwencji istotną rolę w rozwoju raka trzustki.

Według Yang i wsp. [26], konstytutywna aktywacja STAT3 skojarzona jest z wieloma ludzkimi nowotworami nablónka. Badania nad STAT3 z wykorzystaniem myszy transgenicznych pokazały, że białko to odgrywa zasadniczą rolę w kancerogenezie w obrębie skóry. Biotesty badające wieloetapowy proces kancerogenezy skóry na myszach transgenicznych wyraźnie wskazują na to, że obecność STAT3 warunkuje wszczęcie guza i jego promocję poprzez wpływ na geny występujące w komórkach, odpowiedzialne za procesy przetrwania i proliferacji. Rola STAT3 w progresji nowotworowej skóry oparta jest również na oddziaływaniu na regulację genów zaangażowanych w angiogenezę i inwazję. Yang i wsp. zastosowali do wyciszenia STAT3 małe interferencyjne RNA (siRNA), następnie tak wyciszone STAT3 były transfekowane do ludzkiej linii komórkowej raka piersi MCF7 w warunkach *in vitro*. Analizie poddano wpływ wyciszonego genu *STAT3* na proliferację i apoptozę ludzkich komórek raka piersi.

Badanie zahamowania ekspresji genu *STAT3* przez STAT3-siRNA wykazało, że po 48 godzinach

w grupie komórek transfekowanych STAT3-siRNA, ekspresja STAT3 mRNA znacznie zmalała w porównaniu z kontrolą i grupą transfekowaną z wykorzystaniem nieswoistych siRNA. Nie wykazano istotnej różnicy między ekspresją STAT3 w grupie transfekowanej nieswoistymi siRNA i grupą kontrolną. Do badania zahamowania ekspresji białka STAT3 przez STAT3-siRNA zastosowano Western-blot. Analiza komórek we wszystkich grupach badawczych nie wykazywała żadnej zmiany w ekspresji na poziomie wewnętrznego standardowego zespołu aktywny, lecz poziom ekspresji STAT3 był wyższy w grupie transfekowanej nieswoistymi siRNA oraz w grupie komórek kontrolnych, natomiast zredukowany w grupie transfekowanej STAT3-siRNA, najbardziej po 72 godzinach.

Wyniki RT-PCR i analizy Western-blot wykazały znaczącą inhibicję białka STAT3 mRNA w komórkach MCF7, szczególnie w przypadku grupy transfekowanej STAT3-siRNA, sugerując, że efekt wyciszenia genu STAT3 za pomocą STAT3-siRNA był wysoce specyficzny.

Yang i wsp. pokazali, że STAT3-siRNA znacznie hamuje proliferację komórek MCF7, co zostało zaobserwowane po 48 i 72 godzinach od transfekcji w porównaniu z grupami kontrolną i transfekowaną nieswoistymi siRNA. W badaniach prowadzonych na myszach w warunkach *in vivo* autorzy stwierdzili, że STAT3-siRNA może znacznie zahamować rozwój komórek raka piersi.

Inne badania wskazują na rolę czynnika STAT3 w takich procesach, jak apoptoza, wzrost czy różnicowanie się komórek [27]. Zdaniem Hai i wsp., w przebiegu nowotworu trzustki aktywacja STAT3 wspiera wzrost komórek nowotworowych, inwazję oraz procesy metastazy, prowadząc w ten sposób do słabej, niestety, przeżywalności pacjentów. Na poziomie molekularnym STAT3 można regulować poprzez ekspresję genów blokujących VEGF oraz MMP-2. Te dwa geny, razem z MMP-7, MMP-9, bFGF, IL-1 $\beta$  oraz IgT7 $\alpha$  są ściśle związane z rozwojem guza przez procesy angiogenezy, inwazji i przerzutowania. Hai i wsp. wykorzystali w swoich badaniach wektor Lentiwirusa z wbudowanym STAT3 shRNA w celu wyciszenia ekspresji STAT3. Wcześniejsze badania tych autorów sugerują, że wyciszenie STAT3 hamuje inwazję ludzkich komórek SW1990 raka trzustki *in vitro*, a także prowadzi do zmniejszenia ekspresji VEGF i MMP-2. W eksperymencie przeprowadzonym na myszach BALB/c badacze sprawdzili, czy wyciszenie STAT3 w komórkach raka trzustki wpływa na wzrost komórek guza i inwazyjność. Jak się okazało, wektor STAT3-shRNA zahamował ekspresję STAT3 mRNA w komórkach linii SW1990 w stosunku do wektorów kontrolnych, również analiza *Western immunoblotting* wykazała wyraźne zahamowanie białka STAT3 w komórkach SW1990 transfekowanych

STAT3-shRNA. Eksperyment ten pozwolił zauważyć, że w komórkach myszy SW1990 transfekowanych STAT3-shRNA nastąpiło zatrzymanie wzrostu i inwazji guza. Ponadto inwazja guza do naczyń i mięśni była częstsza w komórkach kontrolnych niż w komórkach, w których guz został zmniejszony poprzez transfekcję STAT3-shRNA.

Otrzymane wyniki dowodzą ponadto, że ekspresja trzech genów MMP-7, IL-1 $\beta$  oraz IgT7 $\alpha$  uległa redukcji w guzach z wyciszonym STAT3 w porównaniu z kontrolą i rodzicielską linią nowotworową SW1990. Także ekspresja MMP-9 mRNA znacznie spadła w guzach z wyciszonym poziomem STAT3 w porównaniu z obiema kontrolami. Ponadto okazało się, że STAT3 reguluje zdolność inwazji komórek raka trzustki, co jest skojarzone z obniżeniem ekspresji MMP-7. Zastosowany przez Hai i wsp. wektor STAT3-shRNA pomyślnie zredukował ekspresję STAT3 mRNA i białek w komórkach SW1990. Wyniki wyraźnie sugerują, że STAT3 odgrywa zasadniczą rolę w regulacji wzrostu guza, inwazji i angiogenezy.

Oceniając znaczenie białek STAT należy podkreślić, że trwała i nieprawidłowa aktywacja poszczególnych członków tej rodziny czynników transkrypcyjnych jest powtarzającą się i zarazem jednoczącą cechą wielu ludzkich nowotworów. Wykazano, że hiperaktywacja STAT3 przyczynia się do wzrostu guza bezpośrednio przez mechanizmy autonomiczne guza, a także pośrednio przez regulację odpowiedzi przeciwnowotworowej związanej z podścieliskiem guza i układem odpornościowym. Zatem STAT3 odgrywa główną rolę w regulacji transkrypcji procesów, które z kolei mają podstawowe znaczenie dla kancerogenezy, obejmując równocześnie regulację przeżycia komórek, proliferacji naczyń i indukowanych przez nowotwory funkcji immunosupresyjnych [28].

Liczne dowody pokazują, że onkogenowa transformacja komórek prowadzi do aktywacji STAT3, który z kolei dostarcza sygnału do przeżycia komórek. W większości typów nowotworów aktywny STAT3 skutecznie tłumy proces apoptozy. Efekty te pośredniczą w ekspresji różnych produktów genów warunkujących przeżycie komórek, które reguluje STAT3. Należą do nich wspomniane wcześniej Bcl-xl, Bcl-2, surwiwina, Mcl-1 oraz cIAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis 2* – komórkowy inhibitor apoptozy typu 2). Warto zatem podkreślić, że zahamowanie aktywności STAT3 może blokować ekspresję produktów genów odpowiadających za przeżycie komórek i nasilających apoptozę. Ponadto zmniejszona regulacja STAT3 prowadzi do ekspresji białka Fas, który mógłby promować apoptozę. Z licznych publikacji wynika, że aktywacja STAT3 odgrywa istotną rolę w inwazji komórek nowotworowych, a zahamowanie funkcji STAT3 zmniejsza proces inwazji. Aktywny STAT3 reguluje ekspresję metaloproteaz macierzy MMP2 (*matrix metalloproteinases 2*) oraz MMP1, które następnie pośredniczą w inwazji i metastazie guza. Zmniejsza też transkrypcję MMP2 poprzez bezpośrednią współpracę z promotorem MMP2. Ponadto nadmierna ekspresja fosforylacji STAT3 koreluje z inwazją i tworzeniem przerzutów skórnych raka płaskonabłonkowego, związana jest także z opornością komórek nowotworowych na czynniki chemioterapeutyczne. Przykład może stanowić szpiczak mnogi lub komórki raka piersi, w których konstytutywna aktywacja STAT3 może pośredniczyć w chemiooporności [29].

Badania nad oceną zmian fenotypowych i ich mechanizmów w komórkach nowotworowych, w których modulowano ekspresję genu kodującego jeden z istotnych czynników transkrypcyjnych – STAT3, wydają się wysoce pożądane, przyszłe zaś wyniki tych badań mogą posłużyć opracowaniu nowej, skutecznej strategii terapii schorzeń o podłożu nowotworowym.

Praca finansowana ze środków KNW-1-110/P/2/0

## PIŚMIENNICTWO

- Deng J.Y., Sun D., Liu X.Y., Pan Y., Liang H. STAT-3 correlates with lymph node metastasis and cell survival in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16: 5380–5387.
- Badr G., Mohany M., Abu-Tarboush F. Thymoquinone decreases F-actin polymerization and the proliferation of human multiple myeloma cells by suppressing STAT3 phosphorylation and Bcl2/Bcl-XL expression. *Lipids Health Dis.* 2011; 10: 236.
- Egwuagu C.E. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* 2009; 47(3): 149–156.
- Deng J., Grande F., Neamati N. Small molecule inhibitors of STAT3 signaling pathway. *Curr. Cancer Drug Targets* 2007; 7: 91–107.
- Schick N. STAT3 and tumor cell proliferation. *Basel* 2004; 10.
- Walker S.R., Chaudhury M., Frank D.A. STAT3 Inhibition by microtubule-targeted drugs: dual molecular effects of chemotherapeutic agents. *Mol Cell Pharmacol.* 2011; 3: 13–19.
- Calo V., Migliavacca M., Bazan V. i wsp. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* 2003; 197: 157–168.
- Sato T., Neilson L.M., Peck A.R. i wsp. Signal transducer and activator of transcription-3 and breast cancer prognosis. *Am. J. Cancer Res.* 2011; 1: 347–355.
- Lassmann S., Schuster I., Walch A. i wsp. STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-inducible targets linked to cell survival and proliferation. *J. Clin. Pathol.* 2007; 60: 173–179.
- Haviland R., Eschrich S., Bloom G., Ma Y., Minton S. Necdin, a negative growth regulator, is a novel STAT3 target gene down-regulated in human cancer. *PLoS ONE* 2011; 6(10): e24923.
- Zammarchia F., Stanchinab E., Bournazou E. i wsp. Antitumorogenic potential of STAT3 alternative splicing modulation. *PNAS* 2011; 43: 17779–17784.
- Miranda C., Fumagalli T., Anania M.C. i wsp. Role of STAT3 in *in vitro* transformation triggered by TRK oncogenes. *PLoS ONE.* 2010; 5(3): e9446.
- Kortylewski M., Xin H., Kujawski M. i wsp. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by STAT3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2009; 15: 114–123.



14. Shao H., Quintero A.J., Tweardy D.J. Identification and characterization of *cis* elements in the STAT3 gene regulating STAT3 alpha and STAT3 beta messenger RNA splicing. *Blood* 2001; 98: 3853–3856.
15. Azare J., Doane A., Leslie K., Chang Q., Berishaj M. (2011) Stat3 mediates expression of Autotaxin in breast cancer. *PLoS ONE* 6(11): e27851.
16. Chen Y., Deng J., Fujimoto J. i wsp. Gprc5a deletion enhances the transformed phenotype in normal and malignant lung epithelial cells by eliciting persistent Stat3 signaling induced by autocrine leukemia inhibitory factor. *Cancer Res.* 2010; 70: 8917–8926.
17. Kusaba T., Nakayama T., Yamazumi K. i wsp. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2006; 15: 1445–1451.
18. Lin L., Deangelis S., Foust E. i wsp. A novel small molecule inhibits STAT3 phosphorylation and DNA binding activity and exhibits potent growth suppressive activity in human cancer cells. *Mol. Cancer.* 2010; 9: 217.
19. Levy D. E., Lee C. What does STAT3 do? *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 1143–1148.
20. Germain G., Frank D.A. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 5665–5669.
21. Kortylewski M., Yu H. Role of STAT3 in suppressing anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 228–233.
22. Yang J., Chatterjee-Kishore M., Staugaitis S.M. i wsp. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res.* 2005; 65: 939–947.
23. Jarnicki A., Putoczki T., Ernst M. STAT3: linking inflammation to epithelial cancer – more than a "gut" feeling? *Cell Div.* 2010; 5(14): 1–15.
24. Brantley E.C., Benveniste E.N. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol. Cancer Res.* 2008; 6: 675–684.
25. Huang C., Yang G., Jiang T., Cao J., Huang K., Qiu Z. Down-regulation of STAT3 expression by vector-based small interfering RNA inhibits pancreatic cancer growth. *World J. Gastroenterol.* 2011; 17: 2992–3001.
26. Yang Z., Cai J., Xie S. i wsp. Therapeutic effects of signal transducer and activator of transcription 3 siRNA on human breast cancer in xenograft mice. *Chin. Med. J.* 2011; 124: 1854–1861.
27. Hai L., Huang C., Huang Ki., Wu Wd., Jiang T. STAT3 Knockdown reduces pancreatic cancer cell invasiveness and matrix metalloproteinase-7 expression in nude mice. *PLoS ONE* 2011; 6(10): e25941.
28. Bollrath J., Phesse T.J., V. von Burstin A. i wsp. gp130-mediated STAT3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15: 91–102.
29. Aggarwal B.B., Kunnumakkara A.B., Harikumar K.B. i wsp. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer. How intimate is the relationship? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1171: 59–76.