

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 20 NR-3'93
(245–352)

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz Polskiej Sieci UNSCO wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty KILARSKI,
Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA,
Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,
Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,
Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa*

Fundacja •Rozwój SGGW-AR•

Ark. wyd. 9,5. Ark. druk. 6,75 Oddano do składu w lipcu 1993 r. Podpisano do druku we wrześniu 1993 r. Druk ukończono w październiku 1993 r.

FUNKCJE BIOLOGICZNE α_2 -MAKROGLOBULINY I JEJ RECEPTORA

BIOLOGICAL FUNCTIONS OF α_2 -MACROGLOBULIN AND ITS RECEPTOR

Ewa KOPIECZNA-GRZEBIENIAK, Rozalia GRABOWSKA-BOCHENEK

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Śląskiej AM w Katowicach

Streszczenie. W pracy przedstawiono budowę ultrastrukturalną, modele natywnej i transformowanych form α_2 -makroglobuliny oraz jej funkcje. Najbardziej interesująca funkcja tej glikoproteiny nie ogranicza się do hamowania różnych proteinaz, jak przypuszczano wcześniej, lecz związana jest z kontrolą aktywności cytokin i metabolizmu lipidów, poprzez wspólny receptor dla α_2 -makroglobuliny i lipoprotein zawierających apolipoproteinę E.

Słowa kluczowe: proteinazy, inhibitory proteinaz, cytokiny, metabolizm lipoprotein, receptor pozostałości chylomikronów.

Summary. The ultrastructure, the models of native and transformed forms of α_2 -macroglobulin and its function were presented in this article. The most interesting function of this glikoprotein is not inhibitory effect of different proteinases, as it was supposed earlier, but it is connected with the control of various cytokines activities and lipid metabolism by a common receptor for α_2 -macroglobulin and lipoproteins, which are containing apolipoprotein E.

Key words: proteinases, inhibitors of proteinases, cytokines, metabolism of lipoproteins, chylomicrons remnant receptor.

Wykaz skrótów: α_2M – α_2 -makroglobulina, α_1M – α_1 -makroglobulina, PZP – białko ciążyowe (ang. *pregnancy zone protein*), $\alpha_2\beta M$ – $\alpha_2\beta$ -makroglobulina, βM – β -makroglobulina, LDL, β VLDL – lipoproteiny, LRP – białko podobne do receptora LDL, α_2MR – receptor α_2M , NGF – nerwowy czynnik wzrostowy, b-FGF – zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów, TGF β – transformujący czynnik wzrostowy β , IL-1, IL-6 – interleukiny, PDGF – płytkowy czynnik wzrostowy, TNF – czynnik martwicy nowotworów, α_2MRAP – białko wiążące się z α_2MR , apo E – apolipoproteina E, C3, C4 – składniki dopełniacza.

α_2 -makroglobulina (α_2M) należy do α -makroglobulin, to jest do dużej rodziny glikoprotein o podobnej sekwencji, strukturze i aktywności biologicznej [8]. Są one obecne w hemolimfie lub osoczu różnych zwierząt, bezkręgowców i kręgowców. W osoczu i białku jaj gadów i ptaków znajdują się podobne, jednak immunologicznie odrębne α_2 -makroglobuliny. W osoczu kręgowców obecne są pokrewne białka do α_2M , m.in. takie jak: α_1M (α_1 -makroglobulina), PZP (ang. *pregnancy zone protein*). W osoczu jeża znajduje się α_2M , $\alpha_2\beta M$ i βM .



U ludzi α_2M jest jedyną α -makroglobuliną (nie licząc PZP, znajdującą się w osoczu kobiet ciężarnych), obecną w osoczu i innych płynach biologicznych w dość stałym stężeniu [19]. Dla człowieka α_2M nie jest białkiem ostrej fazy, w odróżnieniu od takich gatunków, jak króliki, szczury i psy [8]

α_2M jest syntetyzowana przez różne komórki, a szczególnie przez hepatocyty, monocyty, fibroblasty [8]. Białko to jest produkowane także w jajniku, jądrze, łożysku i korze nadnerczy [10, 19]. Nie wiadomo, czy mioocyty gładkie wytwarzają α_2M [29]. Synteza α_2 -makroglobuliny u szczura jest indukowana przez IL-6, natomiast u człowieka IL-6 stymuluje syntezę α_2M w obecności interferonu γ . Sekrecja α_2M w korze nadnerczy jest silnie stymulowana przez TGF- β .

α_2M jest także wytwarzana przez hodowle astrogleju [35] oraz przez hodowle komórek nowotworowych, pochodzących z takich nowotworów, jak astrocytoma i glioblastoma [4]. α_2 -makroglobulina wykrywana jest zarówno w cytoplazmie tych komórek, jak również w medium hodowlanym.

Białko podobne do α_2M jest wytwarzane w hodowlach komórkowych, pochodzących z ludzkiego czerniaka złośliwego oraz mięsaka. Masa cząsteczkowa monomeru białka podobnego do α_2M wynosi 140 kDa, a zatem jest mniejsza od masy cząsteczkowej monomeru α_2M , co jest spowodowane prawdopodobnie różnicą w glikozylacji tych białek.

Przypuszcza się, że inhibitory proteinaz, poprzez regulację aktywności proteinazowej, mogą odgrywać istotną rolę w migracji komórek nowotworowych i powstawaniu przerzutów.

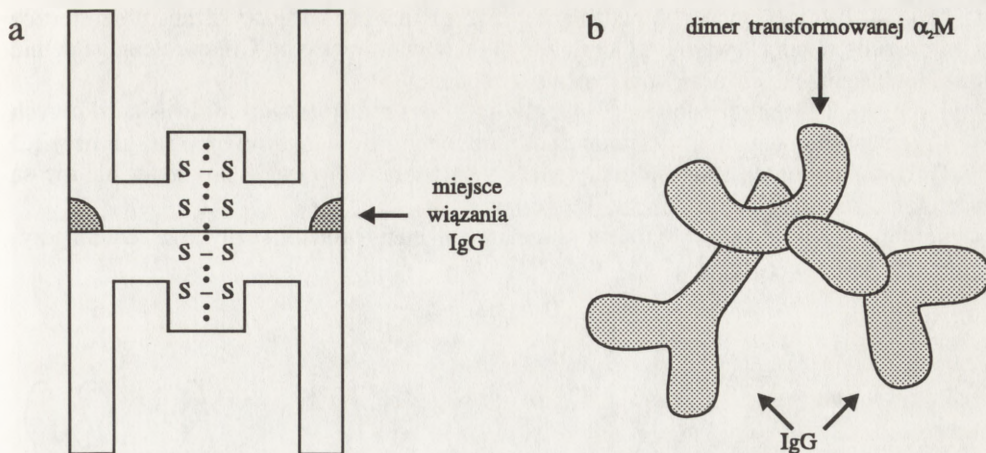
Istnieje też pogląd odmienny, według którego gorsze jest rokowanie dla pacjentów z nowotworami produkującymi α_2M [26]. α_2 -makroglobulina jest przENOŚNIKIEM, uczestniczącym w immunoregulacji, cytokin. Ponadto immunostymulujący mediator, jakim jest IL-2, jako związek niskocząsteczkowy, może być hydrolizowany przez proteiny związane w kompleksie z α_2M . W ten sposób częściowo można wytłumaczyć supresję odpowiedzi immunologicznej, którą powoduje α_2M .

Ludzka α_2M jest tetramerem o masie cząsteczkowej 720 kDa, złożonym z 4 identycznych podjednostek, każda o masie 180 kDa [8]. Monomery w obrębie dimerów połączone są mostkami dwusiarczkowymi, natomiast dimery w obrębie tetramery łączą się wiązaniami niekowalencyjnymi (rys. 1). Nie u wszystkich gatunków glikoproteina ta jest tetramerem, np. u ryb jest dimerem.

Struktura, zmiany konformacyjne i funkcje α_2 -makroglobuliny w polskim piśmiennictwie przedstawione zostały w artykule przeglądowym w 1986 roku [22]. α_2 -makroglobulina może występować w postaci natywnej oraz w postaciach transformowanych przez proteiny lub aminy I-rzędowe (najczęściej metyloaminę). Natywna α_2M nazywana jest czasem formą S (ang. *slow*), ponieważ w polu elektrycznym przemieszcza się wolno, w odróżnieniu od form F (ang. *fast*), które powstają w wyniku transformacji natywnej α_2M . Badaniem elektroforetycznym nie można odróżnić form transformowanych metylaminą i proteinazą. Technika rozproszenia promieni X pod małym kątem oraz za pomocą mikroskopu elektronowego możliwe jest wykazanie różnicy między formami F, w zależności od czynnika użytego do transformacji [2].

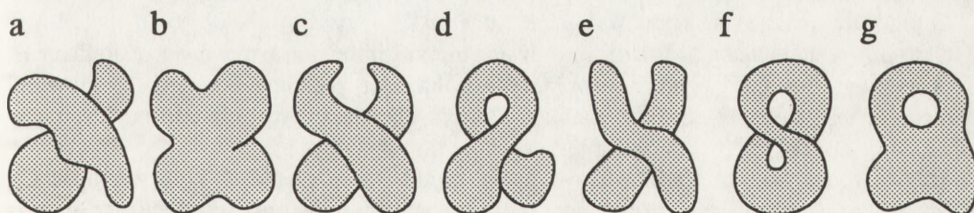
Na podstawie badań z użyciem mikroskopu elektronowego wykazano, że odmiana S występuje w dwóch formach: "skrzyżowanej" oraz "pierścieniowej", z bardziej lub mniej widoczną tetrameryczną organizacją, co przedstawiono na rysunku 2.

Z natywnej, tetramerycznej α_2M można uzyskać dwa rodzaje dimerów [8, 33]. Homogenna populacja dimerów, z zachowaną aktywnością antyproteazową, ma monomery połączone



Rys. 1. Schemat transformowanej chymotrypsyną ludzkiej α₂M (postać ⌘) z zaznaczonymi wiązaniami dwusiarczkowymi i miejscami wiązania IgG w obrębie dimerów (a); miejsce wiązania IgG ustalono na podstawie zdjęcia z mikroskopu elektronowego (b), które posłużyło za zgodą autorów [8] do wykonania rysunku

wiązaniami dwusiarczkowymi (rys. 3a – dimery 1,2 i 3,4). Można je uzyskać poprzez dysocjację postaci tetramerycznej, obniżając pH, stosując niską siłę jonową (połowiczna dysocjacja zachodzi przy pH 6,3 i stężeniu NaCl 50 mM), w roztworach zawierających dwuwartościowe kationy (takie jak Zn²⁺ i Cd²⁺), mocznik lub detergent [8, 27]. W roztworach o pH poniżej 4,5 dysocjacja związana jest z dezorganizacją i utratą aktywności dimerów. Dimery uzyskane z użyciem Zn²⁺ łatwo ulegają polimeryzacji [8]. Pod wpływem jonów cynku w stężeniu 10 mM, w temperaturze 4°C, dimery α₂M ulegają asocjacji, tworząc długie, liniowe i regularnie zorganizowane taśmy. Dimery α₂M powstałe w obecności jonów kadmu nie łączą się w tak regularne struktury, jak dimery otrzymane w obecności jonów cynku. Asocjacja dimerów utworzonych z udziałem Zn²⁺, jak i regularna struktura powstałych z nich polimerów może wynikać ze zdolności wiązania tego metalu przez α₂M. Jeden mol tej glikoproteiny

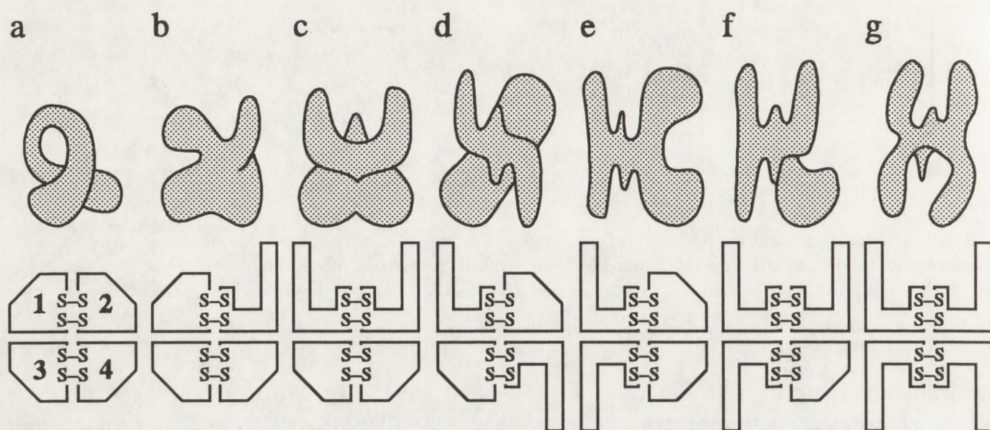


Rys. 2. Natywna, tetrameryczna, ludzka α₂M: a – postać "skrzyżowana", g – postać "pierścieniowa", c do f – postaci pośrednie (rysunki wykonane na podstawie elektronogramów [8] za zgodą autorów)

wiąże 3,9–9,2 atomów cynku. W badaniach z użyciem techniki NMR wykazano w cząsteczce α_2M obecność 2 miejsc wiążących cynk z różnym powinowactwem. Glikoproteina ta pełnić może funkcję przenośnika we krwi cynku oraz kadmu.

Drugim sposobem uzyskiwania dimerów α_2M jest redukcja wiązań dwusiarczkowych łączących dwa monomery, np. za pomocą ditiotretolu lub tioredoksyny (rys. 3a – dimery 1,3 i 2,4). Uzyskane w ten sposób dimery zachowują zdolność wiązania proteinaz, ale nie są morfologicznie homogenne.

Tetrameryczna, ludzka α_2M transformowana enzymami proteolitycznymi kształtem przypomina rosyjską literę ж (rys. 3g).



Rys. 3. Postacie α_2M : natywna (a), w pełni transformowana proteinazą (g) oraz pośrednie (b–f) – na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego [8] za zgodą autorów

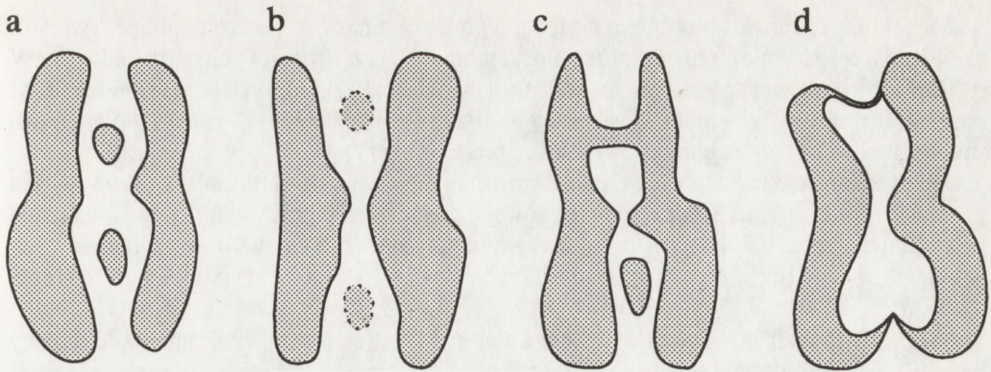
Wytworzone dimery z tetramerycznej, transformowanej, ludzkiej α_2M kształtem przypominają greckie litery epsilon (ϵ) lub omega (ω). Dimeryczne, transformowane postacie α_2M z zachowanymi wiązaniami dwusiarczkowymi pomiędzy monomerami (połówki “przeciętej poziomo postaci w kształcie litery ж”) można uzyskać dwoma sposobami:

- 1/ przez dysocjację, w obecności dwuwartościowych kationów lub w niskim pH, natywnego tetramery do dimerów, które następnie inkubuje się z proteinazami lub
- 2/ przez dysocjację transformowanych tetramery.

Tetrameryczna, ludzka α_2M transformowana metyloaminą porównywana jest do litery H. Częściej uzyskiwane są postacie, w których połączenie poziome pomiędzy pionowymi ramionami jest niekompletne (rys. 4a,b,c). Czasem obecne są dwa cienkie połączenia w kształcie liter V pomiędzy końcami pionowych ramion (rys. 4d).

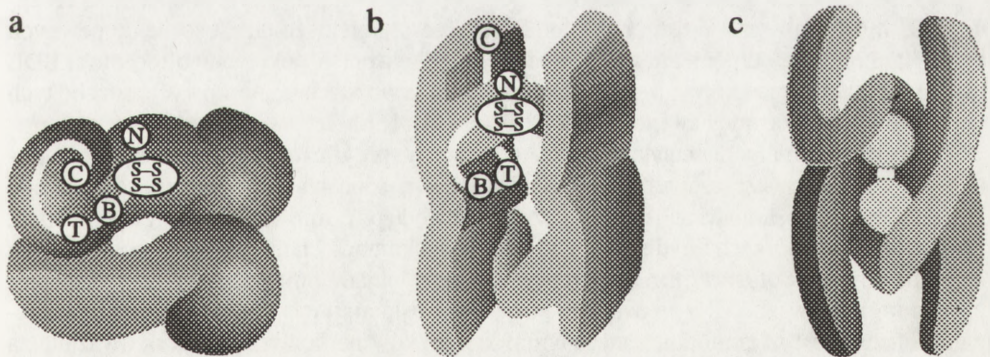
Używając do transformacji plazminy, stosując krótki czas inkubacji (2–5 min w temp. 4°C), można wykazać obecność form natywnych (rys. 3a), w pełni transformowanych (rys. 3g) oraz wiele form pośrednich, zawierających 1, 2 lub 3 ramiona, co upodabnia je do postaci ж.

Wszystkie postacie α_2M , od natywnej do w pełni transformowanej oraz postacie pośrednie, uzyskano również przy pomocy trawienia chymotrypsyną, przez krótki okres, w stechiometrycznym stosunku α_2M :chymotrypsyna 1:1 lub 2:1.



Rys. 4. Transformowana metylaminą tetrameryczna, ludzka α_2 M – na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego [8], za zgodą autorów, opis w tekście

Na podstawie dotychczasowych badań α_2 -makroglobuliny, opracowano modele jej cząsteczki [8]. W najnowszym modelu, natywna α_2 M utworzona jest przez dwa dimery, z których każdy przypomina literę S (rys. 5a). Monomery w obrębie dimeru połączone są dwoma wiązaniami dwusiarczkowymi. Pomiedzy dwoma połączonymi dimerami powstaje pusta przestrzeń. Domena wiążąca się z receptorem znajduje się w C-końcowym fragmencie łańcucha każdego monomeru. W natywnej α_2 -makroglobulinie domena ta jest zwinięta, a zatem jest ona niedostępna dla receptora, jak również nie można wykazać jej obecności w reakcji ze swoistymi przeciwciałami. N-końcowe fragmenty znajdują się w centralnej części cząsteczki, zawierającej wiązania dwusiarczkowe.



Rys. 5. Modele natywnej i transformowanych, tetramerycznych α_2 -makroglobulin: a – postać natywna, b – postać transformowana, c – postać transformowana z obecnością dwóch cząsteczek proteinaz (wg Delain i wsp. [8] za zgodą autorów): B – region “wabikowy” (ang. *bait region*) jest miejscem wiązania proteinazy z α_2 M [40]; w regionie tym znajduje się wewnętrzne wiązanie tioestrowe (T), pomiędzy cysteiną i glutaminianem, które pod wpływem proteinazy lub metyloaminy ulega rozszczepieniu; rezultatem nieodwracalnego pęknięcia wiązania tioestrowego, będącego miejscem ataku dla enzymu i amin, jest zmiana konformacji α_2 M i odsłonięcie nowych miejsc antygenowych

Modele α_2M transformowanej metyloaminą lub proteinazą są bardzo podobne (rys. 5b i c). Różnica między nimi polega na obecności proteinaz, przedstawionych na rysunku 5c. W α_2M transformowanej enzymatycznie w postaci dwóch krążków, których brak w modelu α_2M transformowanej metyloaminą. Dwa mole proteinaz mogą wiązać się z jednym molem α_2M , sugerując obecność dwóch miejsc wiążących proteinazę [11].

Jedną z konsekwencji rozszczepienia wewnętrznego wiązania tioestrowego α_2M jest generacja wolnych grup SH. Z tetrameru powstają 4 mole grup tiolowych. Są one uwalniane w wyniku działania na wiązanie tioestrowe proteinaz, amin lub wody. Rozszczepienie wewnętrznych wiązań tioestrowych przy udziale wody zachodzi w procesie powolnego starzenia się α_2M .

Spośród funkcji biologicznych, jakie pełni α_2M , najwcześniej poznano jej hamujący wpływ na aktywność proteinaz [8]. α_2M jest inhibitorem wszystkich 4 grup proteinaz (serynowych, asparaginianowych, tiolowych i metaloproteinaz). Proteinazy, po rozszczepieniu wiązania tioestrowego α_2M i zmianie jej konformacji, "złapane zostają w pułapkę" i tworzą niedysocjujący kompleks. Jedna cząsteczka α_2M wiąże jedną lub dwie cząsteczki proteinazy. Enzymy związane z α_2M zachowują nie zmienioną aktywność proteolityczną tylko wobec niskocząsteczkowych substratów, takich jak np. interleukina 2 [41]. Wiązanie niektórych proteinaz (np. trombiny) z α_2M nie wymaga udziału jonów metali dwuwartościowych [13]. Jony wapnia stymulują natomiast inhibicję APC (ang. *activated protein C*) z udziałem α_2M i α_2AP (α_2 -antyplazminy). Białko C inaktywuje czynniki krzepnięcia Va i VIIa. Głównym jego inhibitorem są PCI (ang. *protein C inhibitor*) i α_1 -antytrypsyna, które hamują APC w sposób niezależny od jonów metali dwuwartościowych.

Czy jednak funkcja α_2M jako inhibitora proteinaz jest niezbędna, skoro wiadomo, że enzymy te są hamowane przez wiele, niekiedy bardziej swoistych, inhibitorów? Obecność α_2M nawet u prymitywnych organizmów oraz fakt, że nie stwierdzono u człowieka jej braku (prawdopodobnie jest on letalny), przemawia za ważną, chociaż dopiero odkrywaną, biologiczną rolą tego białka.

W monocytach, makrofagach, fibroblastach, hepatocytach, adipocytach obecne są receptory dla transformowanych form α_2M , ale ich ekspresja ograniczona jest ściśle do pewnych typów komórek, w odróżnieniu od "wszędobylskiej" ekspresji pokrewnego receptora LDL [8, 19]. Do zaniku receptorów α_2M może dojść np. w hodowlach komórkowych. Liczbę tych receptorów w adipocytach zwiększa natomiast insulina [6].

Badaniami immunohistochemicznymi, za pomocą specyficznych przeciwciał monoklonalnych wykazano ekspresję receptora α_2MR/LRP w neuronach i astrocytach ośrodkowego układu nerwowego, komórkach nabłonkowych przewodu pokarmowego, miocytach gładkich, fibroblastach, komórkach Leydiga z jąder, ziarnistych komórkach jajników, w pochodzących z monocytów makrofagach, fagocytach wątroby, płuc, układu limfatycznego [29]. Receptor α_2 -makroglobuliny (α_2MR) w nerkach, poza fibroblastami, miocytami gładkimi i makrofagami, obecny jest w komórkach mezangium kłębuszków nerkowych, które są uważane za wyspecjalizowaną odmianę miocytów gładkich, zdolnych do fagocytozy, oraz w, podobnych do fibroblastów, śródmiąższowych komórkach z wypustkami, obecnych w rdzeniu nerki. Rozmieszczenie α_2MR w nerkach jest odmienne od: należących do tej samej rodziny receptorów, receptora LDL i gp 330. Gp 330 obecny w komórkach kanalików proksymalnych jest receptorem także dla 40 kDa glikoproteiny wiązanej przez α_2MR . Przyszłe badania wykażą, czy gp 330 i α_2MR wiążą te same ligandy, ale w różnych przedziałach: α_2MR kontaktuje się z osoczem, podczas gdy gp 330 – z moczem pierwotnym.

Receptor α_2M (α_2MR) jest glikoproteina [30, 38, 39]. U człowieka jego prekursor, o masie cząsteczkowej 600 kDa, przekształcany jest proteolitycznie do łańcucha α , o masie cząsteczkowej ok. 500 kDa, który kowalencyjnie związany jest z 85 kDa łańcuchem β . Prekursor α_2MR jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym, zawierającym 4525 reszt aminokwasowych. Łańcuch α ma 3920, a łańcuch β – 601 reszt aminokwasowych [29]. Część cukrowa prekursora α_2MR jest bogata w mannozę i wrażliwa na działanie endo- β -N-acetyloglukozaminidazy H (Endo H) [19]. W hodowlach komórkowych rozszczepienie prekursora α_2MR do formy dwułańcuchowej pojawia się w tym samym czasie, w którym następuje przemiana części węglowodanowej do formy endo H odpornej. Dojrzały α_2MR zawiera w obydwu łańcuchach kwas sialowy. Węglowodany stanowią ok. 18% masy łańcucha α tego receptora i 25% masy łańcucha β . Także jeden z ligandów receptora α_2M – α_2MRAP (ang. *α_2 -macroglobulin receptor associated protein*) zawiera w swoim składzie węglowodany. Ligand ten jest glikoproteina o masie ok. 40 kDa. Wiąże on heparynę oraz hamuje wiązanie łańcucha α receptora α_2M z kompleksem α_2M :proteinaza, a także moduluje wiązanie lipoprotein przez ten receptor [29]. Funkcja α_2MRAP nie jest znana. Obecność tej glikoproteiny wykazano dotąd w cytozolu i jądrze komórkowym, a nie na powierzchni komórki. Być może białko to funkcjonuje w komórce nie połączone z α_2MR , natomiast ulegać może asocjacji z łańcuchem α receptora α_2M jedynie w procesie oczyszczania α_2MR . α_2MRAP jest białkiem odmiennym genetycznie niż α_2MR [30]. Ten ligand α_2M jest homologiczny z białkiem szczurzym, nazywanym antygenem Heymanna (ang. *Heymann nephritis antigen*) [29].

Ligandami dla α_2MR , oprócz α_2MRAP , są lipoproteiny β VLDL po wzbogaceniu w apo E, remnanty chylomikronów, kompleksy α_2M -proteinazy i α_2M -metyloamina, PZP [8] oraz kompleksy pomiędzy aktywatorami plazminogenu z inhibitorem typu-I aktywatora plasminogenu [29].

α_2M , wiążąc się z różnymi enzymami proteolitycznymi, uczestniczy m.in. w odpowiedzi immunologicznej, wzroście komórki, owulacji i luteinizacji [26, 30], ochronie nabłonka przewodu pokarmowego przed atakiem proteolitycznym [29]. W hodowlach komórek pochodzących z neuroblastoma, egzogenna α_2M lub wydzielona endogennie, przez stymulację za pomocą IL-6 hamuje sekrecję prekursora białkowego amyloidu – $\beta A4$ Alzheimerera. W blaszkach starczych w korze mózgu w chorobie Alzheimerera obecna jest IL-6 i α_2M . Jest prawdopodobne, że w astrocytach α_2MR usuwa kompleksy α_2M -proteinaza, obecne w mózgu. Dotąd nie wiadomo jeszcze, czy receptory α_2M obecne są w tych samych astrocytach, które wytwarzają α_2 -makroglobulinę. W astrocytach produkowana jest apolipoproteina E, a lipoproteiny zawierające tę apolipoproteinę obecne są w płynie mózgowo-rdzeniowym. Jest więc prawdopodobne, że α_2MR pomaga w utrzymaniu normalnej homeostazy cholesterolu przez wiązanie i pobieranie lipoprotein zawierających apo-E. W hodowlach embrionalnych neuronów kory mózgowej szczura, α_2M (lub jej kompleks z proteinazą) jest czynnikiem powodującym wydłużanie neurytów, prawdopodobnie przez wiązanie cytokin, takich jak np. nerwowy czynnik wzrostowy (NGF).

W szpiku kostnym α_2MR jest obecny w monocytach, ich prekursorach oraz erytroblastach. Jednojądrzaste fagocyty razem z fibroblastami poprzez α_2MR usuwają lokalnie nagromadzone proteinazy, np. w regionach zapalnych, w których zwiększona jest aktywność elastazy pochodzącej z granulocytów obojętnochłonnych.

Kompleksy α_2M -proteinaza, po związaniu z łańcuchem α receptora przy udziale Ca^{2+} , podlegają endocytozie i degradacji w lizosomach. Łańcuch α oprócz miejsca wiążącego

ligand, zawiera także miejsce wiążące Ca^{2+} [28, 29]. Wapń jest ważny do uzyskania właściwej konformacji receptora, rozpoznającej ligandy.

Receptory $\alpha_2\text{M}$ rozpoznawane są wyłącznie przez formę F, bez względu na czynnik, który tę transformację wywołał [8]. Szybkie usuwanie transformowanych form $\alpha_2\text{M}$ z krwi nasunęło przypuszczenie, że białko to, poprzez mechanizm receptorowy, "zmiata" proteinazy obecne w osoczu lub na powierzchni komórek [32, 36]. Receptory $\alpha_2\text{M}$ wiążą także PZP, to jest glikoproteinę podobną do $\alpha_2\text{M}$, której stężenie w osoczu wzrasta u kobiet w ciąży [16]. PZP wykazuje właściwości immunosupresyjne, ale jej rola w ciąży nie jest znana.

Wyizolowano dotąd i scharakteryzowano receptory $\alpha_2\text{M}$ z wątroby i łożyska, pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego [1, 17, 18, 27]. Najnowsze badania dostarczyły dowodów, że receptor $\alpha_2\text{M}$ jest identyczny z białkiem podobnym do receptora LDL, które z powodu tego podobieństwa nazwano LRP (ang. *LDL receptor-related protein*) [21, 29, 37, 38]. Ligandem dla LRP są lipoproteiny bogate w apo E, a zatem receptor LRP uczestniczy w oczyszczaniu pozostałości chylomikronów z osocza [14]. $\alpha_2\text{M}$, poprzez swój receptor, uczestniczy więc również w metabolizmie lipoprotein.

Identyczność receptorów LRP i α_2 -makroglobuliny jest jednak kwestionowana przez niektórych autorów [40]. Wysuwają oni argumenty, że białka te różnią się właściwościami. Jednym z argumentów jest stwierdzenie, że laktoferyna blokuje wiązanie remnantów chylomikronów i lipoprotein βVLDL przez komórki parenchymalne wątroby, natomiast nie ma wpływu na wiązanie $\alpha_2\text{M}$. W hodowlach tych komórek obserwowane jest obniżenie aktywności receptora $\alpha_2\text{M}$, natomiast nie zmienione jest wiązanie lipoprotein. Wiązanie lipoprotein βVLDL przez komórki parenchymalne nie wymaga udziału jonów wapnia, natomiast wiązanie wzbogaconej w apolipoproteinę E frakcji βVLDL zachodzi z udziałem Ca^{2+} . Rozwiązanie sporu, czy LRP i $\alpha_2\text{MR}$ są tym samym czy różnymi białkami, wymaga dalszych badań.

Od niedawna wiadomo, że $\alpha_2\text{M}$ wiąże różne cytokiny. Interesująca może okazać się więc jej rola w utylizacji cytokin [25] i/lub ochrona cytokin wywierana przez $\alpha_2\text{M}$ przed proteinazową inaktywacją [8]. Z większości prac wynika, że forma F jest zdolna do wiązania cytokin [3,42], chociaż opisano również ich wiązanie przez postać natywną $\alpha_2\text{M}$ (25). Wykazano, że tylko natywna $\alpha_2\text{M}$ zdolna do zahamowania lizy komórek aktywowanych limfokiną, prawdopodobnie przez zahamowanie proteinaz na powierzchni limfocytów T [31].

Pośród cytokin wiadomo, że z $\alpha_2\text{M}$ wiąże PDGF, NGF, TGF β , IL-1, IL-6, b-FGF, TNF α [8, 15, 20, 24, 25, 39]. Wiadomo, że NGF wiąże się z mysią $\alpha_2\text{M}$ w innym miejscu niż proteinazy, metyloamina F czy jony cynku [20]. Niedawno odkryto, że białko o masie cząsteczkowej 11,5 kDa z wolnymi grupami SH (SH-LyP), którego funkcja nie jest jeszcze znana, a które w dużych ilościach produkowane jest przez aktywowane limfocyty B, wiąże się kowalencyjnie z $\alpha_2\text{M}$ transformowaną metyloaminą [39]. To kowalencyjne wiązanie hamuje N-etylmaleimid (NEM), D penicillamina i złoto.

Również wiązanie IL-1 β z $\alpha_2\text{M}$ jest hamowane przez D-penicillaminę, co może tłumaczyć terapeutyczne działanie tego preparatu u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. IL-1 β wiąże się kowalencyjnie z $\alpha_2\text{M}$ transformowaną metyloaminą. Jest to wiązanie pomiędzy wolnymi grupami SH pochodzącymi z rozbicia wewnętrznego wiązania tioestrowego przez aminy i wolnymi grupami SH IL-1 β , pochodzącymi z niesparowanej cysteiny w pozycji 8. Asocjacja IL-1 β z $\alpha_2\text{M}$ wiąże się z rozbiciem jednego lub więcej spośród jej czterech wiązań tioestrowych. Ani C3, ani C4 w aktywowanej metyloaminą surowicy nie wiąże IL-1 β , pomimo że obydwie te białka mają wewnętrzne wiązanie tioestrowe podobne do $\alpha_2\text{M}$.

Niektóre cytokiny, np. TNF, TGF β 1 i β 2, b-FGF i IL-1 β wiążą się preferencyjnie z transformowaną α_2 M [42], inne, np. PDGF wiążą się preferencyjnie z postacią natywną tego białka [24]. Kompleksy α_2 M z cytokiną nie oddziałują z receptorami dla cytokin, stąd modulacja aktywności cytokin przez α_2 M polega głównie na regulowaniu usuwania ich z krążenia. Wiązanie TGF β 1 z natywną α_2 M nie prowadzi do zmiany konformacji, wymaganej do jej klirensu w kompleksie α_2 M-TGF β 1 [8].

Niektóre cytokiny (PDGF, NGF, IL-6) zachowują biologiczną aktywność w kompleksie z α_2 M w hodowlach komórkowych, podczas gdy inne (IL-1 β , b-FGF, TGF β) wykazują obniżoną aktywność [23]. α_2 M wykazuje większe powinowactwo do TGF β 2 niż TGF β 1 [6]. Interakcję TGF β z kompleksem α_2 M-metyloamina blokuje cynk. Istnieje prawdopodobieństwo, że miejsce wiązania tej cytokiny z α_2 M jest równocześnie miejscem wiązania cynku z niewielkim powinowactwem [34]. Oprócz cytokin, α_2 M wiąże także hormony. Dotychczas wykazano, że wiąże ona insulinę, luteotropinę i hormon wzrostu [5].

α_2 M hamuje steroidogenezę stymulowaną w hodowlach komórek kory nadnerczy przez ACTH i angiotensynę II [19], co ma prawdopodobnie związek z TGF β (α_2 M-TGF β hamuje 17 α -hydroksylazę, tj. przemianę 25OH cholesterolu do pregnenolonu, progesteronu i kortyzolu).

α_2 -makroglobulina u niektórych gatunków zwierząt wykazuje działanie przeciwwirusowe. Surowice niektórych gatunków zwierząt (szczur, świnka morska, koń) hamują aglutynację indukowaną wirusem grypy lub bezpośrednio inaktywując go [8, 34]. Jest to spowodowane wiązaniem hemaglutyniny wirusa grypy przez kwasy sjałowe wchodzące w skład części węglowodanowej α_2 M. α_2 -makroglobuliny innych gatunków (człowiek, wół, kurczę), ze względu na odmienną strukturę węglowodanową, wykazują mniejszą zdolność hamowania infekcji spowodowanej wirusem grypy [12].

α_2 M hamuje wytwarzanie rodników tlenowych przez granulocyty, stąd potencjalna jej rola w zapobieganiu i leczeniu uszkodzeń powstałych w następstwie reperfuzji [9].

W ostatnich latach nastąpił duży postęp wiedzy dotyczącej α_2 M, zwłaszcza w zakresie badań struktury jej cząsteczki oraz jej receptora. Oprócz znanej funkcji hamowania proteinaz przez α_2 M, dopiero poznawana jest jej rola jako regulatora aktywności cytokin, jako regulatora syntezy rodników tlenowych i hormonów oraz metabolizmu lipidów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ASHCOM J, TILLER S, DICKERSON K, CRAVENS J, ARGRAVES W, STRICKLAND D. The human α_2 -macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of α_2 -macroglobulin. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1041–1048.
- [2] BOISSET N, TAVEAU JC, POCHON F, TARDIEU A, BARRAY M, LAMY J, DELAIN E. Image processing of proteinase- and methylamine-transformed human α_2 -macroglobulin. Localization of the proteinases. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12046–12052.
- [3] BONNER J, BADGETT A, OSORNIO VARGAS A, HOFFMAN M, BRODY A. PDGF-stimulated fibroblast proliferation is enhanced synergistically by receptor-recognized α_2 -macroglobulin. *J Cell Physiol* 1990; **145**: 1–8.
- [4] BUSINARRO R, FABRIZI C, FUMAGALLI L, LAURO G. Synthesis and secretion of α_2 -macroglobulin by human glioma established cell lines. *Exp Brain Res* 1992; **88**: 213–218.
- [5] CHU C, PIZZO S. Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin. *Immun Today* 1991; **12**: 249.
- [6] CORVERA S, GRAVER D, SMITH R. Insulin increases the cell surface concentration of α_2 -macroglobulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. Altered transit of the receptor among intracellular endocytic compartments. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10133–10138.

- [7] DANIELPOUR D, SPORN M. Differential inhibition of transforming growth factor β_1 and β_2 activity by α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 6973–6977.
- [8] DELAIN E, POCHON F, BARRAY M, van LEUVEN F. Ultrastructure of α_2 -macroglobulin. *Electron Microsc Rev* 1992; **5**: 231–281.
- [9] DONNELLY P, BOOTH H, WHITE M, SHENTON B. α_2 -macroglobulin and generation of oxygen radicals by granulocytes: potential role in prevention and treatment of reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 1991; **202**: 55–64.
- [10] GADDY-KURTEN D, RICHARDS J. Regulation of α_2 -macroglobulin by luteinizing hormone and prolactin during cell differentiation in the rat ovary. *Molec Endocrinol* 1991; **5**: 1280–1291.
- [11] HALL S, LaMARRE J, MARSHALL L, HAYES M, GONIAS S. Binding of transforming growth factor- β_1 to methylamine-modified α_2 -macroglobulin and to binary and ternary α_2 -macroglobulin-proteinase complexes. *Biochem J* 1992; **281**: 567–575.
- [12] HANAOKA K, PRITCHETT T, TAKASAKI S, KOCHIBE N, SABESAN S, PAULSON J, KOBALTA A. 4-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid in the N-linked carbohydrate structures of equine and guinea pig. α_2 -macroglobulins potent inhibitors of influenza virus infection. *J Biol Chem* 1989; **264**: 9842–9849.
- [13] HEEB M, GRUBER A, GRIFFIN J. Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by α_2 -macroglobulin and α_2 -antiplasmin in blood and comparisons of factor Xa, thrombin and plasmin. *J Biol Chem* 1991; **266**: 17606–17612.
- [14] HUSSAIN M, MAXFIELD F, MASOLIVA J, TABAS I, JI Z, INNEARITY T, MAHLEY R. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13936–13940.
- [15] JAMES K. Alpha $_2$ macroglobulin and its possible importance in immune systems. *Trends Biochem Sci* 1980; **5**: 43–47.
- [16] JENSEN P, MOESTRUP S, SOTTRUP-JENSEN L, PETERSEN C, GLIEMANN J. Receptors for α_2 -macroglobulin and pregnancy zone protein complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* 1988; **9**: 463–477.
- [17] JENSEN P, PIZZO S. Comparison of α_2 -macroglobulin receptors from human, baboon, rat and mouse liver. *Biochem Archs* 1989; **5**: 171–176.
- [18] JENSEN P, MOESTRUP S, GLIEMANN J. Purification of the human placental α_2 -macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 1989; **255**: 275–280.
- [19] JENSEN P, GLIEMANN J, ORNTOFT T. Characterization of carbohydrates in the α_2 -macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 1992; **305**: 129–132.
- [20] KOO P, STACH R. Interaction of nerve growth factor with murine α_2 -macroglobulin. *J Neurosci Res* 1989; **22**: 247–261.
- [21] KRISTENSEN T, MOESTRUP S, GLIEMANN J, BENDTSEN L., SAND O, SOTTRUP-JENSEN L. Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the α_2 -macroglobulin receptor. *FEBS Lett* 1990; **276**: 151–155.
- [22] KURDOWSKA A. Struktura, zmiany konformacyjne i funkcja α_2 -makroglobuliny. *Post Bioch* 1986; **32**: 445–458.
- [23] LaMARRE J, WOLLENBERG G, GONIAS S, HAYES M. Reaction of α_2 -macroglobulin with plasmin increased binding of transforming growth factor- β_1 and β_2 . *Biochim Biophys Acta* 1990; **1091**: 197–204.
- [24] LaMARRE J, HAYES M, WOLLENBERG G, HUSSAINI I, HALL S, GONIAS S. An α_2 -macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor β_1 in mice. *J Clin Invest* 1991; **87**: 39–44.
- [25] LaMARRE J, WOLLENBERG G, GONIAS S, HAYES M. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated α_2 -macroglobulin. *Lab Invest* 1991; **65**: 3–14.
- [26] MARTIN-NIZARD F, HOUSAINI H, LESTAVEL-DELATTRE S, DURIEZ P, FUCHART J. Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS* 1991; **293**: 127–130.
- [27] MOESTRUP S, GLIEMANN J. Purification of the rat hepatic α_2 -macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein. *J Biol Chem* 1989; **264**: 15574–15577.
- [28] MOESTRUP S, KALTOFT K, SOTTRUP-JENSEN L., GLIEMANN J. The human α_2 -macroglobulin receptor contains high affinity calcium binding sites important for receptor conformation and ligand recognition. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12623–12628.
- [29] MOESTRUP S, GLIEMANN J, PALLESEN G. Distribution of the α_2 -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissue. *Cell Tissue Res* 1992; **269**: 375–382.
- [30] MOESTRUP S, HOKLAND P. Surface expression of the α_2 -macroglobulin receptor on human malignant blood cells. *Leukemia Res* 1992; **16**: 227–234.

- [31] PETERSEN C, EJLERSEN E, MOESTRUP S, JENSEN P, SAND O, SOTTRUP-JENSEN L. Immunosuppressive properties of electrophoretically "slow" and "fast" form α_2 -macroglobulin. Effects on the cell-mediated cytotoxicity and (allo) antigen-induced T cell proliferation. *J Immun* 1989; **142**: 629–635.
- [32] PIZZO S. Receptor recognition of the plasma proteinase inhibitor α_2 -macroglobulin. *ISI Atlas of Science: Biochemistry* 1988; **1**: 242–246.
- [33] POCHON F, BARRAY M, DELAIN E. Dissociation of α_2 -macroglobulin into functional half-molecules by mild acid treatment. *Biochim Biophys Acta* 1989; **996**: 132–138.
- [34] PRITCHETT T, PAULSON J. Basis for the potent inhibition of influenza virus infection by equine and guinea pig α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem* 1989; **264**: 9850–9858.
- [35] SAITOH S, IJIMA N, IKEDA M, NAKAJIMA K, KIMURA M, KATSUKI M, MORI T, KOHSAKA S. De novo production of α_2 -macroglobulin in cultured astroglia from rat brain. *Molec Brain Res* 1992; **12**:155–161.
- [36] SOTTRUP-JENSEN L. α_2 -macroglobulin structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem* 1989; **264**:11539–11542.
- [37] STRICKLAND D, ASHCOM J, WILLIAMS S, BURGESS W, MIGLIORINI M, ARGRAVES W. Sequence identity between the α_2 -macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggest that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 1990; **265**: 17401–17404.
- [38] STRICKLAND D, ASHCOM J, WILLIAMS S, BATTEY F, BEHRE E, McTIGUE K, BATTEY J, ARGRAVES W. Primary structure of α_2 -macroglobulin receptor-associated protein. Human homologue of a Heymann nephritis antigen. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13364–13369.
- [39] TEODORESCU M, McAFEE M, SKOSEY J, WALLMAN J, SHAW A, HANLY W. Covalent disulfide binding of human IL-1b to α_2 -macroglobulin: inhibition by D-penicillamine. *Molec Immunol* 1991; **28**: 323–331.
- [40] van DIJK M, ZIERÉ G, BOERS W, LINTHORST C, BIJSTERBOSCH M, van BERKEL T. Recognition of chylomicron remnants and β -migrating very-low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells in distinct from the liver α_2 -macroglobulin-recognition site. *Biochem J* 1991; **279**: 863–870.
- [41] WEBB D, CROOKSTON K, HALL S, GONIAS S. Binding of transforming growth factor- β 1 to immobilized human α_2 -macroglobulin. *Arch Biochem Biophys* 1991; **292**: 487–492.
- [42] WOLLÉNBERG G, LaMARRE J, ROSENDAL S, GONIAS S, HAYES M. Binding of tumor necrosis factor alpha to activated forms of human α_2 macroglobulin. *Am J Path* 1991; **138**: 265–272.

Data otrzymania 26.02.1993 r.

Data przyjęcia: 01.07.1993 r.

Adres autorów: Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Śląskiej Akademii Medycznej
40-752 Katowice, ul. Medyków 14

CZYNNIK POBUDZAJĄCY KOLONIE GRANULOCYTARNO-MAKROFAGALNE (GM-CSF) I JEGO KLINICZNE ZASTOSOWANIE

GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF) AND ITS CLINICAL APPLICATION

Przemysław SZWECH

Zakład Immunologii i IV Klinika Chorób Wewnętrznych Centralnego Szpitala Klinicznego
Wojskowej Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. U ludzi i myszy ważną rolę w regulowaniu proliferacji i różnicowania komórek układu krwiotwórczego odgrywa czynnik pobudzający kolonie granulocytarno-makrofagalne (GM-CSF). W pracy przedstawiono właściwości biologiczne GM-CSF oraz możliwości jego zastosowania w leczeniu niektórych schorzeń układu krwiotwórczego i odpornościowego.

Słowa kluczowe: GM-CSF, CFU-GM, krwiotwórczy czynnik wzrostu, interleukiny, przeszczepianie szpiku, inhibitor krwiotworzenia.

Summary. In man and mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is an important factor in the regulation of proliferation and differentiation of hematopoietic cells. In this paper the biological properties of GM-CSF and the possibilities of its application in the treatment of some diseases of the hematopoietic and immune system are presented.

Key words: GM-CSF, CFU-GM, hematopoietic growth factor, interleukins, bone marrow transplantation, hematopoietic inhibitor.

1. WSTĘP

GM-CSF jest czynnikiem pobudzającym komórki układu granulocytów i makrofagów. Został on zidentyfikowany dzięki zdolności do pobudzania tworzenia kolonii granulocytów i makrofagów przez komórki szpiku hodowane *in vitro*. Stąd jego angielska nazwa (GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). W piśmiennictwie stosowane były następujące synonimy dla GM-CSF: CSF-2, MGI-1GM, CSA-GM, MGI-1G.

W 1964 roku Bradley i Metcalf opisali wzrost kolonii mysich granulocytów/makrofagów *in vitro* w odpowiedzi na obecność nadsączu komórek nerki noworodka myszy lub komórek całego mysiego zarodka. Dwa lata później ukazała się praca tych autorów, dotycząca klonowania normalnych komórek ukierunkowanych granulocyto- i makrofagopoezy. W pracy tej stwierdzono obecność nieznaną bliżej substancji dostarczanej przez komórki dolnej warstwy, pochodzące z nerki noworodka myszy lub całego mysiego zarodka, niezbędnej dla wzrostu tych wczesnych komórek [3].

Do tych samych wniosków niezależnie i nawet trochę wcześniej doszli Dov Pluznik i Leo Sachs z Weizman Institute of Science w Rehovot w Izraelu. Ci badacze pracowali na modelu wirusowej białaczki mysiej Rauschera i obserwowali również podobne kolonie, które początkowo błędnie zidentyfikowali jako komórki tuczne [16].

Mimo 29 lat, które upłynęły od odkrycia tego czynnika, zainteresowanie nim nadal wzrasta. Udało się zarówno biochemicznie zidentyfikować ten i wiele pokrewnych czynników, określić ich rolę fizjologiczną, uzyskać w formie rekombinowanej, jak też zastosować w klinice jako leki w terapii niektórych chorób układu krwiotwórczego i odpornościowego.

2. WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE

GM-CSF jest glikoproteiną [5, 11, 12, 22, 23, 28, 30, 34, 38] o masie cząsteczkowej wynoszącej od 18000 do 24000 daltonów lub 14500 do 35000 daltonów [22], lub 23000 do 29000 daltonów [11], lub 18000 do 30000 daltonów [24] w zależności od stopnia glikozylacji. GM-CSF podobnie jak IL-3 wykazuje dużą heterogenność spowodowaną obecnością złożonych węglowodanów przyłączonych do reszt asparaginy [8]. Stopień glikozylacji zależy od rodzaju źródła, z którego GM-CSF pochodzi [22]. Rdzeń białkowy GM-CSF składa się ze 127 aminokwasów [22, 38] i jest on zbudowany z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, mającego dwa wewnątrzłańcuchowe wiązania dwusiarczkowe między resztami cysteiny [11, 28]. Bez glikozylacji cząsteczka rhGM-CSF (rh-ludzki rekombinowany) ma masę cząsteczkową 14400 daltonów [6]. Funkcja części węglowodanowej cząsteczki GM-CSF nie jest znana. Wydaje się, że glikozylacja zmniejsza swoistą aktywność GM-CSF [11, 23].

Decydującymi o wpływie GM-CSF na komórki układu krwiotwórczego okazały się dwa regiony cząsteczki zawierające reszty aminokwasowe 21–31 i 78–94 [12]. Fragment zawierający reszty 14–96 miał wykrywalną aktywność, jednak dla pełnej aktywności cząsteczki GM-CSF wymagana jest również obecność reszt aminokwasowych 97–121 [12]. Mostek dwusiarczkowy między resztami cysteiny 51 i 93 jest podstawowy dla funkcji GM-CSF, natomiast mostek dwusiarczkowy między resztami cysteiny 85–118 mógł być usunięty bez wpływu na aktywność GM-CSF [12].

Mimo homologii między sekwencją nukleotydów cDNA dla GM-CSF, uzyskanego z ludzkich komórek T, a cDNA dla mysiego GM-CSF, uzyskanego z białka oczyszczonego z nadsączu mysiego płuca, wynoszącej 60% oraz mimo homologii między sekwencją aminokwasów mysiego i ludzkiego GM-CSF, wynoszącej 54%, nie istnieje krzyżowa reaktywność między mysim i ludzkim GM-CSF.

3. GENETYKA MOLEKULARNA

Mysi i ludzki GM-CSF są kodowane przez geny o dużym stopniu homologii zarówno w regionach kodujących, jak i niekodujących [12]. Obydwa geny mają długość ok. 2500 par zasad i składają się z czterech eksonów oddzielonych trzema sekwencjami dzielącymi [8, 12, 33]. mRNA dla GM-CSF ma wielkość 0,78 kb [8]. W większości typów komórek ekspresja genów dla cytokin jest regulowana na poziomie mRNA. Pobudzanie komórek powodujące aktywację genów dla cytokin prowadzi bezpośrednio do czynnej transkrypcji i produkcji właściwych dla cytokin mRNA. Do czynników pobudzających ekspresję genów dla cytokin należą: endotoksyny bakteryjne, przeciwciała anti-CD3 reagujące krzyżowo z receptorem na komórkach T oraz inne cytokiny, np. IL-1, TNF, PDGF. Pobudzanie transkrypcji jest kontrolowane przez sekwencje regulatorowe DNA, zwane promotorami. Przyjmuje się, że pobudzenie komórki powoduje zmiany interakcji białek jądrowych z promotorami cytokin, które aktywują transkrypcję. Te interakcje mogą mieć zarówno pozytywne, jak i negatywne skutki. Poza pobudzeniem transkrypcji ważnym mechanizmem kontroli ekspresji genu dla cytokiny jest stabilność mRNA [8].

U myszy gen dla GM-CSF jest zlokalizowany na chromosomie 11, natomiast gen dla ludzkiego GM-CSF został zmapowany na długim ramieniu chromosomu 5 [10, 11, 13, 28] w obrębie prążków 21–31 [15] lub 23–32 [28].

Na długim ramieniu chromosomu 5 u ludzi są również położone geny dla interleukiny-3 (IL-3), interleukiny-4 (IL-4), interleukiny-5 (IL-5), czynnika pobudzającego komórki prekursorowe makrofagów (M-CSF) oraz gen wczesnej odpowiedzi wzrostowej (EGR-I – *early growth response gene*) [12]. Lokalizacja genu dla GM-CSF jest o tyle interesująca, że znajduje się ona o 9000 par zasad poniżej genu dla ludzkiej IL-3 [12].

Delecje w tym regionie chromosomu 5 są obserwowane przeważnie w zespołach mielodysplastycznych wywołanych leczeniem oraz w ostrych białaczkach, jak również w zespole 5q [12].

4. POCHODZENIE GM-CSF

Źródłem GM-CSF w ustroju człowieka są głównie komórki śródbłonna i fibroblasty, a także limfocyty T (pobudzone fitohemaglutyniną, konkanawaliną A lub lipopolisacharydem), monocyty, makrofagi [5, 13, 16, 22, 28, 34], komórki dendrytyczne oraz inne rodzaje komórek wymienione w tabeli 1 [22]. Produkcja GM-CSF przez komórki śródbłonna i fibroblasty jest indukowana przez takie monokiny, jak interleukina-1 (IL-1) i czynnik martwicy nowotworów (TNF) [12]. Makrofagi produkują GM-CSF pod wpływem produktów bakteryjnych typu LPS, fagocytozy oraz interferonu γ (IFN γ) [38], komórki śródbłonna pod wpływem IL-1, TNF, LPS, fibroblasty pod wpływem IL-1, TNF [38]. Wydajność produkcji krwiotwórczych czynników wzrostu ze źródeł komórkowych i tkankowych wynosi 10–100 pg/10⁶ komórek [5]. Stężenie GM-CSF w osoczu zdrowych ludzi nie jest wykrywalne przy użyciu dostępnych technik [22].

Obecność GM-CSF stwierdzono: w maziówce stawów u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów, w moczu chorych na cykliczną neutropenię lub ciężką postać niedokrwistości

aplastycznej oraz w pierwszych dniach po przeszczepieniu szpiku [28]. GM-CSF jest stale produkowany przez linię komórek raka pęcherza moczowego u ludzi [10].

Produkcję GM-CSF w czasie zakażenia badano u myszy po zainfekowaniu ich bakterią *Listeria monocytogenes*. Po tym zakażeniu wykrywano w surowicy dość duże ilości M-CSF i G-CSF, natomiast GM-CSF występował w stosunkowo małych, ale mierzalnych ilościach [7].

TABELA 1. Komórki wytwarzające GM-CSF [11]

Typ komórki	Czynnik pobudzający
Potencjalne fizjologiczne źródła GM-CSF	
Limfocyty T	antygen, lektyna, CD28, IL-1, HTLV
Limfocyty B	LPS, TPA
Makrofagi	LPS, FCS, fagocytoza, przyleganie
Komórki tłuszczowe	IgE, jonofor wapniowy
Fibroblasty	TNF, IL-1, TPA
Komórki śródbłonna	TNF, IL-1, TPA, modyfikowane LDL
Komórki mezotelialne	EGF+TNF
Osteoblasty	PTH, LPS
Potencjalne patologiczne źródła GM-CSF	
Komórki białaczkowe (AML),	TNF, przyleganie
Komórki błony maziowej w schorzeniach reumatoidalnych, komórki różnych guzów litych	

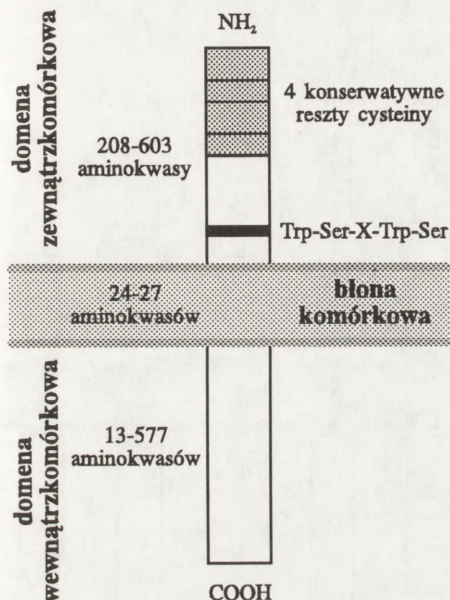
Skróty: LPS – lipopolisacharyd, FCS – płodowa surowica cielęca, EGF – czynnik wzrostu naskórka, LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości, PTH – parathormon, TPA – 12-O-tetradekanoilo-13-acetyloforbol

5. RECEPTORY

Wzrost i rozwój komórek krwiotwórczych są regulowane przez czynniki wzrostu (ligandy), przylączające się do swoistych receptorów na powierzchni komórek docelowych. Receptor dla GM-CSF należy do receptorów cytokinowych (rys. 1), rodziny receptorów krwiotwórczych (rys. 2) i nie ma domeny kinazy tyrozynowej, ale ma kilka ważnych sekwencji aminokwasowych, takich jak regiony w domenie zewnątrzkomórkowej obejmujące konserwatywny motyw tryptofan-seryna-X-tryptofan-seryna oraz cztery reszty cysteiny [8, 24]. Wykryto dwa rodzaje receptorów dla GM-CSF (tab. 2), jeden o wysokim (ok. 20 pmol/l) i drugi o niskim powinowactwie (ok. 1 nmol/l) [11, 38]. Ludzki receptor dla GM-CSF (GM-CSF R) o niskim powinowactwie sklonowano i zsekwencjonowano oraz zlokalizowano geny w pseudoautosomalnym regionie chromosomów płciowych [17]. Allele tego genu są dziedziczone autosomalnie. Sugerowano, że utrata genu dla receptora GM-CSF może mieć znaczenie w zrozumieniu powstawania podklasy M2 ostrej białaczki szpikowej, ponieważ utrata lub unieczynnienie receptora mogłoby powodować tworzenie względnie niedojrzałych komórek, niezdolnych do reagowania na GM-CSF. W związku z tym receptor dla GM-CSF może funkcjonować jako recesywny onkogen. Donoszono, że 25% przypadków podtypu M2 ostrych białaczek szpikowych cechowała utrata chromosomu X lub Y [8].

Sklonowano dwa łańcuchy ludzkiego receptora dla GM-CSF o wysokim powinowactwie oraz łańcuch α o niskim powinowactwie, składający się z 400 aminokwasów. Część cytopla-

zmatyczna receptora o niskim powinowactwie prawdopodobnie nie ma zdolności przekazywania sygnału, gdyż składa się tylko z 54 aminokwasów. Istnieje duża homologia między łańcuchem α a receptorem dla IL-6 [8].



Rys. 1. Struktura receptora dla cytokinin [17]

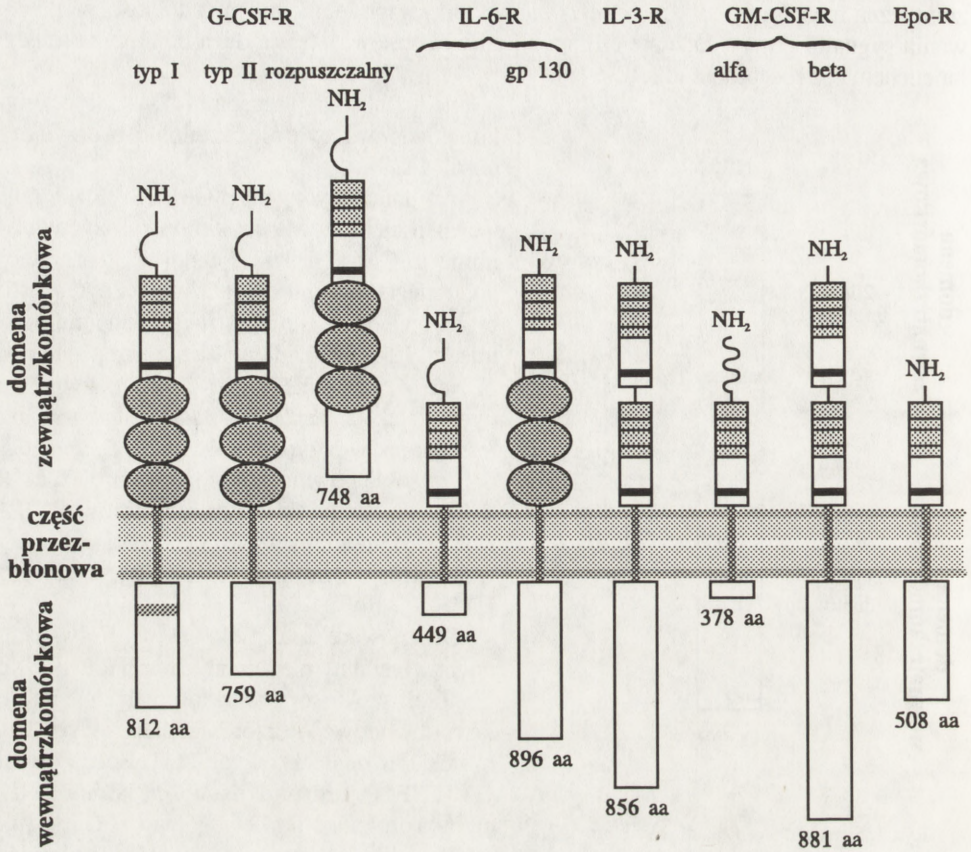
Podjednostka β receptora GM-CSF o wysokim powinowactwie nie ma zdolności przyłączenia GM-CSF.

Ani łańcuchy α , ani β GM-CSF R nie mają wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej, a mimo to GM-CSF i IL-3 indukują fosforylację podobnego zestawu cytoplazmatycznych fosfoprotein. Chociaż istnieje strukturalna homologia między IL-3 R a białkiem, będącym produktem cDNA, zwanego KH97, to drugie z wymienionych białek nie przyłącza IL-3. Jednak możliwe jest, tak jak w przypadku GM-CSF R, że nadaje ono wysokie powinowactwo receptorowi dla IL-3. Wspólna część składowa receptorów dla IL-3 i GM-CSF mogłaby wyjaśniać częściowe pokrywanie się aktywności biologicznych tych cytokin [17].

Obecność receptora dla GM-CSF wykazano na powierzchni niedojrzałych krwiotwórczych komórek prekursorowych, dojrzałych komórek krwi obwodowej, komórek białaczkowych i komórek linii białaczkowych [17]. Receptory dla GM-CSF stwierdzono również na komórkach linii raka drobnokomórkowego płuc [11, 23], mięsaka kościotwórczego, raka sutka [33] i czerniaka złośliwego [12].

TABELA 2. Charakterystyka receptorów dla GM-CSF [17]

Receptor (gatunek)	Lokalizacja chromosomalna	Liczba aminokwasów		Rozmieszczenie receptorów	Inne cechy
		receptor	domena łącząca		
GM-CSF R alfa	region pseudoautosomalny X-Y	378	297	monocyty, neutrofile eozynofile+prekursorzy, komórki białaczkowe i ich linie, komórki raka drobnokomórkowego płuc	receptor o niskim powinowactwie ? wykazuje też powinowactwo do IL-3
GM-CSF R beta	nie znana	nie znana	nie znana		produkt białkowy KH97 cDNA wykazuje homologię z IL-3 R; nie przyłącza ligandu bezpośrednio; wykazuje wysokie powinowactwo przyłączając się do GM-CSF R



Rys. 2. Rodzina receptorów krwiotwórczych [20]: domeny podobne do domen immunoglobulinowych są przedstawione jako duże pętle, domeny fibronektyny jako owale, konserwatywne reszty cysteiny jako kreski ustawione w szeregu, konserwatywna sekwencja Trp-Ser-Trp-Ser jako pogrubione kreski; domeny cytoplazmatyczne różnią się znacznie długością łańcucha; liczba aminokwasów tych domen została również przedstawiona

Okazuje się, że najsilniejsza ekspresja receptorów dla GM-CSF występuje na najbardziej zróżnicowanych komórkach, co odzwierciedla fakt, że GM-CSF działa nie tylko jako czynnik wzrostu i różnicowania, ale także nasila właściwości biologiczne komórek ostatecznie zróżnicowanych [17].

Neutrofile mają pojedynczą klasę receptorów dla GM-CSF o wysokim powinowactwie (ok. 50 pmol/l), wiążących 800 do 1000 cząsteczek GM-CSF na komórkę [11]. Na komórkach linii białaczkowych stwierdzono obecność pojedynczej klasy receptorów o wysokim powinowactwie dla GM-CSF o gęstości 75–200 receptorów na komórkę [33].

Opisano dwie klasy czynnościowe receptora dla GM-CSF. Receptory pierwszej klasy są regulowane przez GM-CSF, ester forbolu i jonofor wapniowy, i nie przyłączają cząsteczek IL-3, podczas gdy receptory drugiej klasy wykazują fenotyp o cechach przeciwstawnych. Neutrofile mają receptory pierwszej klasy, komórki białaczkowe głównie receptory drugiej klasy. Normalne komórki prekursorowe szpiku i monocyty mają receptory obydwu klas [33].

Oznacza to, że dojrzewaniu komórek linii mieloidalnej towarzyszą zmiany czynnościowe receptora dla GM-CSF [33].

Receptor dla GM-CSF występuje również w postaci rozpuszczalnej, której fizjologiczne znaczenie polega prawdopodobnie na eliminowaniu nadmiernych ilości GM-CSF [33].

6. TRANSDUKCJA SYGNAŁU

Zmiany biochemiczne wiążące przyłączenie ligandu do receptora z czynnościowymi zmianami w komórce tworzą drogę transdukcji sygnału (rys. 3). Znanych jest kilka przekazników drugiego rzędu uczestniczących w transdukcji sygnału (Ca^{2+} , cykliczne nukleotydy, kinazy proteinowe, fosfolipaza A, C, D) [33]. Ponieważ GM-CSF zwiększa przepływ jonów wapnia za pośrednictwem takich chemoatraktantów, jak fMLP, ale nie obserwowano bezpośredniego wpływu GM-CSF na depolaryzację błonową, przepływ jonów wapnia, ani na stężenie wewnątrzkomórkowo zjonizowanego wapnia, to jest mało prawdopodobne, aby zmiany błonowych potencjałów elektrycznych czy poziomów wapnia były zaangażowane w transdukcję sygnału GM-CSF w ludzkich neutrofilach [33].

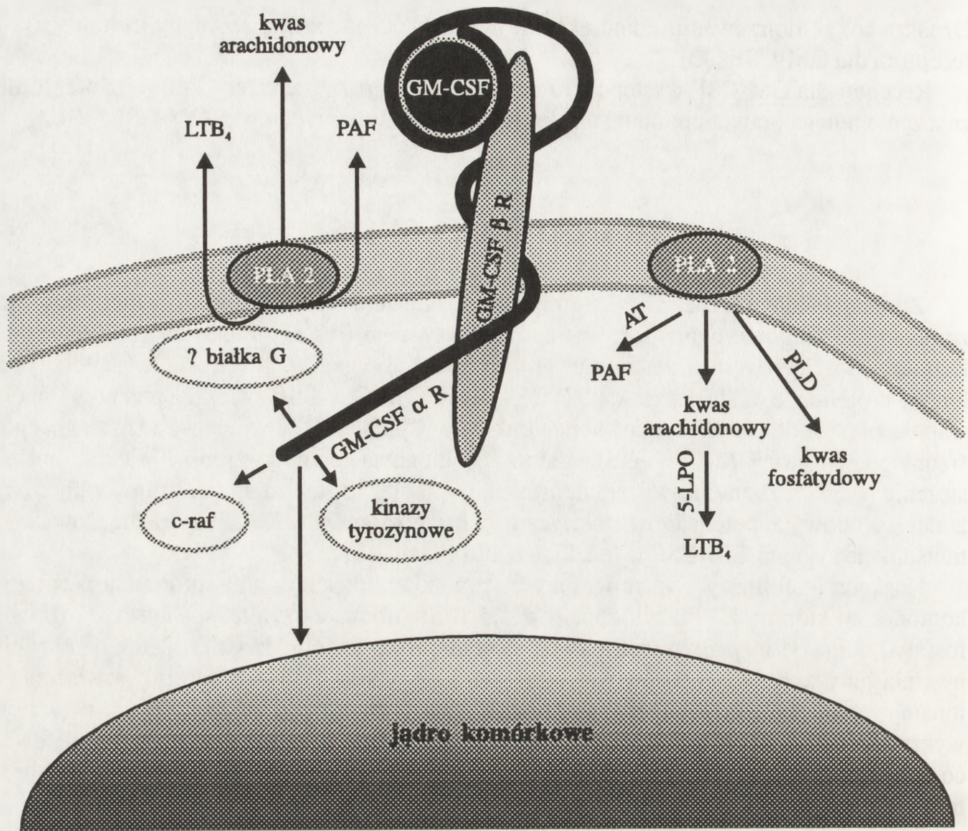
Kaskada fosfolipazy C stanowi inny ważny układ przekazywania informacji wewnątrz komórki, w którym 1,2-diacyloglicerol i 1,4,5-trifosforan inozytoli pochodzą z rozkładu fosfatydyloinozytoli przez związaną z błoną komórkową fosfolipazę C. Trifosforan inozytoli uwalnia jony wapnia z zapasów wewnątrzkomórkowych, a diacyloglicerol w powiązaniu z jonami wapnia i fosfatydyloseryną aktywuje kinazę białkową C. GM-CSF nie powoduje wykrywalnego wzrostu poziomu trifosforanu inozytoli i diacyloglicerolu w neutrofilach, co sprawia, że układ drugiego przekazańnika z udziałem fosfolipazy C nie bierze udziału w transdukcji sygnału GM-CSF [33].

Jest mało prawdopodobne, aby drugim przekazańnikiem dla GM-CSF była sama kinaza białkowa C, ponieważ aktywność cytoplazmatyczna tej kinazy nie ulega zmianie pod wpływem GM-CSF, ani przez produkcję nadtenków indukowaną przez octan mirtystynowy forbolu, która wymaga udziału kinazy białkowej C [33].

Układ cyklazy guanylowej jest przekazańnikiem drugiego rzędu brany pod uwagę w transdukcji sygnału indukowanej przez GM-CSF. Opiera się to na kilku dowodach. Po pierwsze GM-CSF zwiększa aktywność cyklazy guanylowej, poziom cyklicznego guanyzylomonofosforanu (cGMP) w neutrofilach. Po drugie toksyna krztuścowa, która inaktywuje pewne białka G przez ADP-rybozylację, znosi wzmacniający wpływ GM-CSF na niektóre procesy, które nie były zmieniane przez samą toksynę krztuścowa. Poza tym wykazano, że GM-CSF może nasilać skutki wywoływane przez dwa aktywatory białka G (fluorek sodu i $\text{GTP}\gamma\text{S}$, będący niehydrolizowanym analogiem GTP) na metabolizm tlenowy niezależnie od receptora [33].

Dowody te wskazują, że GM-CSF albo aktywuje, albo zwiększa liczbę odpowiednich białek G. Ostatnio wykazano obecność białka G w ziarnistościach neutrofilii, co przemawia za zwiększeniem liczby odpowiednich białek G [33].

Zdolność GM-CSF do bezpośredniego pobudzenia niewielkiego uwalniania kwasu arachidonowego (przez aktywację fosfolipazy A_2) i do bezpośredniego zwiększania syntezy LTB_4 i PAF sugeruje, że substancje te mogą uczestniczyć w transdukcji sygnału [33].



Rys. 3. Model transdukcji sygnału GM-CSF w neutrofilach [33]: GM-CSF przyłącza się do receptora o wysokim powinowactwie złożonego z podjednostek α i β ; połączenie ligand-receptor powoduje aktywację kinazy tyrozynowej, kinazy seryna/treonina c-raf, białek wiążących GTP (białka G); przez nieznanne mechanizmy przyłączenia GM-CSF pobudza również fosfolipazę A_2 (PLA_2) do uwalniania substratów do syntezy czynnika aktywującego krwinki płytkowe (PAF), leukotrienu B_4 (LTB_4) i kwasu fosfotydylowego przez uczynnienie odpowiednich enzymów: acetylotferazy lizo-PAF (AT), 5-lipooksygenazy (5-LPO) i fosfolipazy D (PLD); LTB_4 , kwas arachidonowy i PAF są uwalniane zewnątrz- i wewnątrzkomórkowo i mogą odgrywać rolę przekaźników drugiego rzędu lub autokrynych/parakrynych mediatorów

7. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

GM-CSF przejawia swoje działania w stosunku do następujących komórek: CFU-GM (*colony-forming unit-granulocyte/macrophage*), CFU-Eo (komórka tworząca kolonie granulocytów kwasochłonnych) [25, 32], CFU-GEEMM (komórka tworząca w hodowli kolonie złożone z różnych rodzajów komórek krwiotwórczych, a więc różnych komórek mieloidalnych, w ciągu 10–14 dni), BFU-E (komórka, która po ok. 10 dniach tworzy zgrupowania zawierające wiele tysięcy krwinek czerwonych i często kilka megakariocytów) [11, 22, 32],

CFU-Meg (komórka tworząca kolonie liczące 4–8 megakariocytów) [22, 25, 32] (rys. 4). Spośród komórek dojrzałych, GM-CSF wpływa na monocyty/makrofagi, granulocyty obojętne- i kwasochłonne [11, 25, 27].

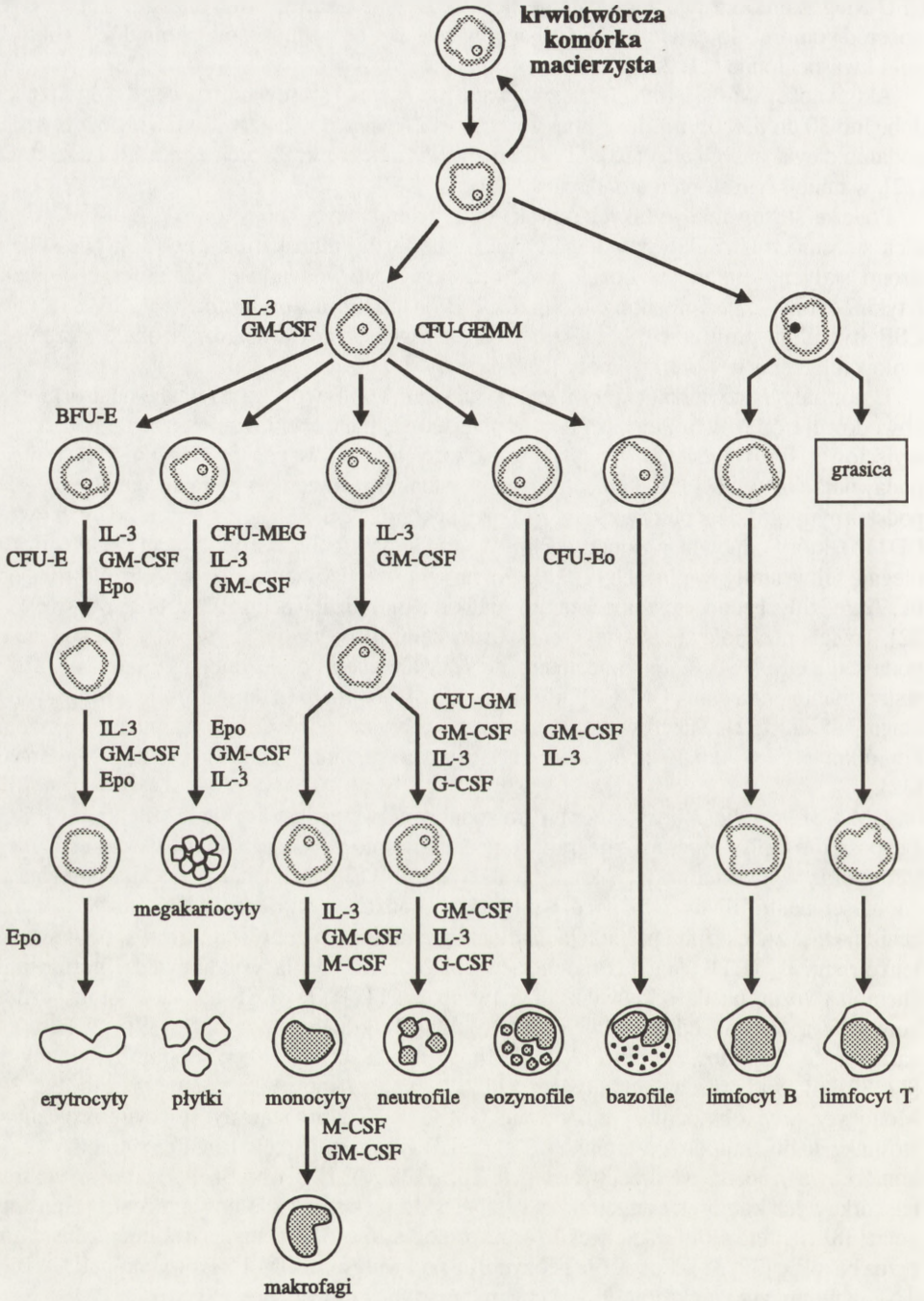
Aktywność GM-CSF (tab. 3) obserwowano *in vivo* przy stosowaniu dawek 0,4 do 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dobę}$ lub 30 do 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{dobę}$ oraz w wyższych dawkach w ciągłym wlewie dożylnym po podaniu dawki nasycającej [28]. GM-CSF zwiększa liczbę krążących neutrofilii i eozynofili [22], w mniejszym stopniu monocytów [27].

Podczas stosowania wyższych dawek dominują monocyty i eozynofile [17, 23]. W wysokich stężeniach GM-CSF powoduje zwiększenie liczby megakariocytów [24]. Nie stwierdzono stałych zmian w liczbie krążących limfocytów, wartości hematokrytu i liczby retykulocytów [27]. Inni autorzy stwierdzali zwiększenie liczby limfocytów [22, 38]. GM-CSF stymuluje proliferację komórek, gdy jest zastosowany w bardzo niskich stężeniach molowych rzędu 10^{-10} – 10^{-12} mol/l [21].

U normalnych zwierząt ciągły wlew dożylny GM-CSF wpływa na liczbę neutrofilii krwi obwodowej trójfazowo. Pierwsza faza to przejściowa neutropenia (zmniejszenie ponad 90% wyjściowej liczby neutrofilii), występująca w ciągu pierwszych 5–120 minut dożylnego podawania GM-CSF [32]. Ta neutropenia występuje zarówno po podaniu dożylnym, jak i podskórnym [25]. Jest ona związana z ekspresją kompleksu białek powierzchniowych (Mo1, CD11b), który odpowiada za przyleganie neutrofilii do komórek śródbłonka [22]. Neutrofile ulegają sekwestracji w płucach [22]. Potem następuje zwiększenie liczby neutrofilii, trwające ok. 72 godziny, będące prawdopodobnie wynikiem mobilizacji neutrofilii z puli zapasowej [22, 32]. Trzecia faza polega na zwiększeniu liczby neutrofilii występującym po 72–96 godzinach podawania GM-CSF. W tej fazie neutrofile są uwalniane z pobudzonego szpiku [22, 32]. Po wstrzymaniu podawania GM-CSF liczba krwinek białych wraca do wartości wyjściowych w ciągu 3–5 dni [32]. Sugerowano, że podczas podawania GM-CSF występuje zwiększenie komórkowości szpiku ze zwiększeniem stosunku granulocytarno-czerwonokrwinkowego [32].

GM-CSF wywiera bezpośredni i pośredni wpływ na ludzkie neutrofile (tab. 4 i 5). Bezpośredni wpływ obejmuje degranulację, hamowanie migracji, zmiany w ekspresji receptorów oraz wpływ na szkielet komórki i jej kształt [12]. Działania pośrednie polegają na zdolności neutrofilii do odpowiedzi na wtórne bodźce wyzwalające. Wśród tych działań znajdują się: zwiększona produkcja nadtlenu, nasilony przepływ jonów wapnia i synteza leukotrienu B_4 (LTB_4) [12]. Produkcja mediatorów zapalenia w odpowiedzi na czynniki chemotaktyczne nasila odpowiedź przeciwzapalną [12]. GM-CSF nasila cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał w stosunku do komórek guza [12, 39], do komórek zakażonych *Trypanosoma cruzi* [39]. GM-CSF nasila aktywność gryzobójczą monocytów [32, 39], ułatwia prezentację antygeny [11, 17], nasila tlenową przemianę materii [32, 39]. Monocyty krwi obwodowej traktowane GM-CSF *in vitro* stawały się cytotoksyczne w stosunku do linii komórek czerniaka A 375 [22]. Wzmocnieniu ulega również cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał [11, 25, 31, 32, 38]. GM-CSF zwiększa żywotność naskórkowych komórek Langerhansa, nasila ich dojrzewanie i zdolność prezentowania antygeny [38], hamuje proliferację prekursorów osteoklastów [38], pobudza uwalnianie histaminy przez bazofile [32, 38]. Neutrofile i eozynofile pod wpływem GM-CSF produkują IL-1, IL-8, TNF, a monocyty i makrofagi IL-1 i czynnik martwicy nowotworów (TNF) [38].

Podanie GM-CSF *in vivo* wywołuje zmiany w obrębie krwiotwórczych komórek ukierunkowanych. Pojedyncza dawka GM-CSF podana myszy zwiększa liczbę komórek ukierunko-



Rys. 4. Udział GM-CSF w procesie krwiotworzenia [1]

TABELA 3. Aktywność biologiczna GM-CSF [11]

In vitro		In vivo
Pobudzanie proliferacji	nasilenie funkcji	
Szpiku		
Komórek ostrej białaczki szpikowej	neutrofilii przeżycie i synteza białka	nasilenie krwiotworzenia eozynofilia
Linii komórek białaczkowych	hamowanie migracji	obniżenie poziomu cholesterolu w surowicy
BFU-E	metabolizm tlenowy	zespół mieloproliferacyjny
Komórek śródbłonna	degranulacja	ślepotą i nacieki mięśni (u zwierząt transgenicznych)
Monocytów/makrofagów	wydzielanie cytokin	
Limfocytów?	rekrutacja	
	fagocytoza za pośrednictwem IgA	
	wychwytywanie pasożytów i bakterii	
	cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał	
	zmiany w obrębie receptorów powierzchni komórki, np. fMLP	
	uwalnianie kwasu arachidonowego	
	synteza leukotrienów i czynnika aktywującego płytki	
	eozynofili	
	przeżycie	
	cytotoksyczność	
	synteza leukotrienów	
	bazofili	
	uwalnianie histaminy	
	makrofagów	
	ekspresja cytokin	
	zabijanie pasożytów	
	ekspresja antygenów receptorów powierzchniowych	
	zabijanie komórek guza	
	przyleganie	
	metabolizm tlenowy	
	komórek Langerhansa	
	dojrzwienie, żywotność i czynność	
	limfocytów ?	

wanych linii mieloidalnej szpiku w 72 godziny po podaniu w sposób zależny od dawki. Obserwowano także zwiększenie liczby komórek ukierunkowanych i macierzystych krwi obwodowej z osiągnięciem przejściowego szczytu po ok. 12 godzinach i powrotem do wartości wyjściowych w ciągu 48 godzin [22].

U pacjentów leczonych GM-CSF następowało znaczne skrócenie czasu cyklu komórkowego z 86 do 26 godzin [22]. Liczba komórek ukierunkowanych linii mieloidalnej wzrastała przeciętnie trzynastokrotnie po 4–7 dniach leczenia GM-CSF [22].

GM-CSF we wzrastających stężeniach zwiększa rozmiary kolonii granulocytów/makrofagów tworzonych przez GM-CFC (*granulocyte/macrophage-colony forming cell*). Przy wzrastających stężeniach GM-CSF w badaniach komórek prekursorowych dominujący typ kolonii rozwijający się z GM-CFC zmienia się z makrofagów na granulocyty. Jeżeli w hodowli komórek tworzących kolonie szpiku zabraknie GM-CSF, to będą one obumierać ze stałą szybkością wynoszącą 5% wyjściowej liczby komórek na godzinę. W obecności GM-CSF krwiotwórcze komórki ukierunkowane proliferują i różnicują się w ciągu 2 do 10 dni [10].

TABELA 4. Bezpośredni wpływ GM-CSF na czynność neutrofilii [33]

Hamowanie przypadkowej migracji	
Zwiększanie przeżywalności	
Degranulacja pierwotnych i wtórnych ziarnistości	
Zdolność biosyntezy	1) zwiększona synteza czynnika aktywującego płytki 2) zwiększona synteza leukotrienu B ₄ 3) zwiększona synteza przeciwdrobnoustrojowych białek kationowych 4) synteza de novo białka wydzielniczego o m. cz. 23 kDa
Fosforylacja reszt tyrozyny wewnątrzkomórkowych substratów	
Ekspresja genów	1) wywoływanie ekspresji genów wczesnej odpowiedzi: c-fos, TIS-8, (Egr-1) 2) wywoływanie ekspresji genu dla interleukiny-1 3) wywoływanie ekspresji genu dla interleukiny-6 4) wywoływanie ekspresji genu dla G-CSF, CSF-1, TNF- α
Fenotyp powierzchni komórek	1) zmiana powinowactwa receptora Fc IgA 2) zmniejszanie ekspresji cząsteczki LAM-1* 3) zmniejszanie ekspresji cząsteczki leukotrienu B ₄ i receptora dla IL-8 4) zwiększanie ekspresji cząsteczki Mo-1 (CD11b) 5) zwiększanie ekspresji antygenów różnicowania CD35 i CD18 6) modulowanie ekspresji i powinowactwa receptora dla fMLP**
Metabolizm cyklicznych nukleotydów	1) pobudzanie aktywności cykazy guanylowej 2) hamowanie aktywności cykazy adenylowej 3) pobudzanie aktywności GTP-azy

* LAM-1 – leukocyte adhesion molecule-1; ** fMLP – formyl-metionyl-leucyl-fenylalanina

Jeżeli GM-CSF nie będzie dodawany do GM-CFC przez ponad 24 godziny, to następne podanie GM-CSF po takim czasie nie będzie w stanie pobudzać tworzenia kolonii.

Neutrofile wykazują ekspresję receptora dla GM-CSF na swej powierzchni. Przyłączenie do niego ligandu prowadzi do bezpośrednich zmian biochemicznych. Dochodzi do uwolnienia kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych, po czym następuje modyfikacja liczby i powinowactwa receptorów dla chemotaktycznego peptydu N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) i zwiększenie ilości glikoprotein powierzchni komórki związanych z kompleksem Mo1 [22, 39] oraz LeuM5 [39]. Te procesy w komórce prowadzą do zmian stanu aktywacji neutrofila. Takie neutrofile wykazują nadwrażliwość na takie wtórne bodźce, jak: czynniki chemotaktyczne (fMLP, rozpuszczalne produkty aktywacji dopełniacza-C5desArg) i metabolity kwasu arachidonowego (LTB₄) [22]. Odpowiedź tak przygotowanych neutrofilów na wtórne bodźce prowadzi do nasilenia depolaryzacji błonowej i fagocytozy [22].

Dootrzewnowe podanie mysiego GM-CSF u myszy wywoływało w jamie otrzewnowej znaczne zwiększenie liczby neutrofilii, monocytów, eozynofili [38], a zmniejszenie liczby limfocytów [25]. Po podaniu GM-CSF myszy obserwowano zwiększenie liczby granulocytów i monocytów w wątrobie oraz granulocytów w płucach [25].

Użycie GM-CSF znakowanego jodem 125 wykazało, że jego biologiczny okres półtrwania wynosi poniżej 6 godzin [6].

GM-CSF syntetyzowany przez bakterie podany dożylnie ma połowiczny czas rozmieszczenia poniżej 5 minut, a połowiczny czas wydalania 85 do 125 minut. GM-CSF podany podskórnym powoduje większy wzrost liczby leukocytów niż podany dożylnie. Podany pod-

TABELA 5. Pośredni wpływ GM-CSF na czynność neutrofilii [33]

Degranulacja pierwotnych i wtórnych ziarnistości	
Działanie przeciw drobnoustrojom	1) nasilenie zabijania <i>T. cruzi</i> 2) nasilenie fagocytozy opsonizowanych bakterii 3) nasilenie fagocytozy <i>C. albicans</i> i drożdży piekarskich 4) nasilenie zabijania opsonizowanych <i>T. glabrata</i>
Działanie przeciwnowotworowe	nasilenie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał w stosunku HL-60 i linii komórek limfoidalnych
Wewnątrzkomórkowe pH	1) przyspieszanie zakwaszania 2) zwalnianie realkalizacji
Zwiększanie przepływu jonów wapnia przez kanały wapniowe Nasilenie metabolizmu tlenowego Hamowanie chemotaksji	
Zdolności biosyntetyczne	1) zwiększanie uwalniania kwasu arachidonowego 2) zwiększanie syntezy produktów 5-lipooksygenazy 3) zwiększanie syntezy czynnika aktywującego płytki 4) zwiększanie uwalniania kwasu fosfatydowego i aktywacja fosfolipazy D 5) zwiększanie wytwarzania diacylglicerolu 6) fosforylacja i aktywacja protoonkogenu <i>c-raf</i>

skórnie w dawce 10 µg/kg i dobę powoduje znaczny wzrost stężenia GM-CSF utrzymujący się przez ponad 12 godzin [23, 25].

Z nadsącza tkanki łożyskowej wyizolowano dwie formy GM-CSF, działające bezpośrednio, określane jako α i β . Obydwie mają masę cząsteczkową ok. 30000 daltonów i działają na różne subpopulacje komórek macierzystych granulocytów i makrofagów.

Jeśli chodzi o zasięg oddziaływania, to GM-CSF działa głównie na krótkich odległościach, nawet międzykomórkowych, a w małym tylko stopniu jako wolno krążący czynnik osiągający krew obwodową. GM-CSF zachowuje się więc zgodnie z modelem parakrynnym [12].

Organizm wytwarza oprócz czynników pobudzających, również substancje hamujące proces krwiotworzenia [34]. Ostatnio opisano różne związki odpowiedzialne za hamowanie tworzenia komórek krwi. Ich obecność zapewnia istnienie mechanizmów kontrolnych o charakterze ujemnych sprzężeń zwrotnych na różnych etapach hemopoezy [34]. Inhibitory te mogą hamować proliferację i różnicowanie krwiotwórczych komórek macierzystych i ukierunkowanych. Inhibitorem hamującym wybiórczo granulocytomonopoezę jest pentapeptyd hamujący hemopoezę. Nie wpływa on na czynność dojrzałych biologicznie granulocytów i monocytów [34].

Substancją egzogenną hamującą tworzenie kolonii przez komórki prekursorowe szeregu granulocytarno-makrofagalnego (CFU-GM) jest 2-chlorodeoksyadenozyna (2-CDA) [38].

8. INTERAKCJE GM-CSF Z INNYMI CYTOKINAMI

Komórki, na które działa GM-CSF, znajdują się in vivo pod wpływem również innych cytokin. Istnieją dowody na to, że synergistyczne reakcje między cytokinami są modulowane

na poziomie receptorów powierzchni komórki. W związku z tym zaproponowano, że pobudzanie receptorów dla multi-CSF i GM-CSF transmoduluje receptory dla M-CSF i G-CSF oraz że jest to interakcja odpowiedzialna za wytwarzanie granulocytów i makrofagów w obecności multi-CSF i GM-CSF [25]. Można przypuszczać, że wytwarzanie eozynofili, megakariocytów i komórek linii erytroidalnej przez multi-CSF i eozynofili przez GM-CSF odbywa się za pośrednictwem transmodulacji receptorów dla białek regulujących wzrost eozynofili, megakariocytów i komórek linii czerwono krwinkowej [25]. Transmodulacja receptorów mogłaby stanowić połączenie między proliferacją i różnicowaniem.

GM-CSF stymuluje jednojądrzaste komórki prekursorowe *in vitro* do produkcji TNF [15, 22, 34], IL-1 (IL-1 α i β) [15, 22, 34], M-CSF [22, 34], G-CSF [22]. Monocyty uzyskane od pacjentów leczonych GM-CSF stymulowane *in vitro* lipopolisacharydem (LPS) wydzielają TNF α i interferon [22]. Naskórkowe komórki Langerhansa w obecności GM-CSF dojrzewają i proces ten może nasilać dodanie IL-1 [22]. GM-CSF nasila proliferację komórek T w obecności IL-2 [22].

GM-CSF stymuluje makrofagi do produkcji nadmiernych ilości IL-1, IFN γ , TNF i czynnika wzrostu fibroblastów [20]. Wpływ GM-CSF na przeżycie i różnicowanie wczesnych komórek prekursorowych może być częściowo modyfikowany przez IL-1 i IL-6 [32, 34]. Należy również zwrócić uwagę na zakres działania IL-3 i GM-CSF, które częściowo pokrywają się [22]. Otóż IL-3 w większym stopniu stymuluje rozwój linii czerwono krwinkowej niż GM-CSF.

Dodanie rhSF (*recombinant human Steel Factor*) zwiększa ok. siedmiokrotnie liczbę kolonii granulocytów/makrofagów w porównaniu z liczbą kolonii uzyskanych tylko przy użyciu GM-CSF [19]. W leczeniu zaburzeń układu krwiotwórczego dodanie *Steel Factor* może być pomocne w obniżaniu dawek innych czynników wzrostu. Redukuje on także objawy uboczne, bez wpływania na skuteczność samych czynników wzrostu [19].

W trakcie wspomagania chemioterapii białaczek podawaniem GM-CSF stwierdzono gwałtowny wzrost poziomu czynnika martwicy nowotworów z maksimum przypadającym 3 i 4 dnia podawania GM-CSF [36].

Monocyty aktywowane *in vitro* interferonem po stymulacji GM-CSF uwalniają czynnik martwicy nowotworów [19].

9. GM-CSF A BIAŁACZKI

Transformacja białaczkowa w kontekście badań następstwa nadmiernych poziomów krwiotwórczych czynników wzrostu oznacza potencjalną zdolność tych czynników do wywoływania postępującego wzrostu guza w przypadku przeszczepienia jego komórek nienapromienionemu syngenicznemu biorcy.

Wykazano, że trzy krwiotwórcze czynniki wzrostu mogą pobudzać proliferację niektórych białaczkowych komórek rodzicielskich. Są to: IL-3, GM-CSF i G-CSF [26, 27].

Cechą charakterystyczną wszystkich przypadków ostrej białaczki szpikowej jest blok w normalnym dojrzewaniu blastów [25]. Blok ten może być związany z zaburzeniami procesów biochemicznych biorących udział w krzyżowym modulowaniu receptorów dla krwiotwórczych czynników wzrostu lub z kontrolą ekspresji genów kodujących czynniki różnicowania. Wyniki badań *in vitro* sugerują, że w momencie rozpoznania większość białaczek szpikowych

wymaga do proliferacji egzogenego czynnika pobudzającego tworzenie kolonii. W niektórych przypadkach komórki białaczkowe mogą produkować czynniki pobudzające tworzenie kolonii (CSF). Stwierdzono również, że krzywa odpowiedzi na CSF w zależności od dawki dla komórek normalnych i białaczkowych jest podobna. Nie wiadomo jeszcze, który czynnik wzrostu stymuluje rozwój białaczki *in vivo*. Nie stwierdzono, aby komórki białaczkowe miały zwiększoną ilość receptorów dla GM-CSF i G-CSF, co może świadczyć o tym, że białaczki te nie były stymulowane autokrynnie [26].

Model do tych badań powstał dzięki możliwości wprowadzenia DNA do komórek szpiku za pomocą retrowirusa i repopulacji tych komórek u nienapromienionych biorców. W wyniku takiego postępowania następuje masywna hiperplazja populacji granulocytów/makrofagów w wątrobie i płucach, wykazująca pewne podobieństwo histologiczne do komórek typowych dla przewlekłej białaczki szpikowej, ale komórki te nie były białaczkotwórcze po transplantacji. Po wstawieniu za pomocą retrowirusa genu dla CSF do zależnej od CSF linii nieśmiertelnych komórek krwiotwórczych, nabywały one zdolność do produkcji czynnika wzrostu, która szybko prowadziła do białaczkowej transformacji. Te nieśmiertelne linie mają cechę typową dla komórek białaczkowych: wyjątkowo wysoką zdolność samoodnawiania, a poza tym zaburzenia w kariotypie [22].

Blasty typowe dla ostrej białaczki szpikowej mogą proliferować pod wpływem GM-CSF [18, 27]. Występuje to częściej, gdy udział blastów w szpiku wynosi ponad 20%, a GM-CSF jest stosowany w większych dawkach [18]. Nie zaleca się stosowania GM-CSF u chorych na ostrą i przewlekłą białaczkę szpikową oraz zespół mielodysplastyczny, u których zawartość blastów w szpiku przekracza 10–15% [18]. Mieloblasty mają receptory dla GM-CSF, dlatego podczas jego stosowania może dochodzić do nasilenia ostrej białaczki [12].

GM-CSF zwiększa poziom białka będącego produktem protoonkogenu *c-myc* w komórkach traktowanych uprzednio dwumetylo-sulfotlenkiem (DMSO) [41]. DMSO moduluje odpowiedź na GM-CSF przez zmienianie liczby jego receptorów lub inny mechanizm nie związany bezpośrednio z modulacją ekspresji protoonkogenu *c-myc* [41].

10. DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE

Przy stosowaniu GM-CSF w dawkach leczniczych występowały takie niepożądane objawy, jak: bóle kostne [13, 18, 23, 26, 30, 34, 36], bóle mięśniowe [12, 13, 36], bóle stawowe [12], bóle głowy [36], duszność [36], wymioty [36], zapalenie żył w miejscu podania [12, 16, 27, 30], erytrodermia [13], stan podgorączkowy lub gorączka [4, 12, 13, 23, 26, 30, 34], uczucie wyczerpania [43], jadłowstręt [12, 18], obrzęk [26], pocenie się i biegunki [18]. W dawkach maksymalnych obserwowano zapalenie osierdzia [23, 26]. Częstość występowania objawów niepożądanych w grupie 106 pacjentów, którzy otrzymywali GM-CSF przez 24 godziny w ciągłym wlewie dożylnym w dawce 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ przedstawia tabela 6 [18].

Wyjątkowo rzadkim działaniem niepożądanym GM-CSF jest zespół przesiąkania włóscinkowego (*capillary leak syndrome*). Zespół ten występuje również jako powikłanie u chorych po przeszczepieniu szpiku niezgodnego tkankowo [35]. Klinicznie cechuje go przyrost masy ciała powyżej 10% wagi należnej, masywne obrzęki na obwodzie, hipoproteinemii, obniżenie osrodkowego ciśnienia żylnego oraz wysięki w jamach ciała. W omawianym przypadku zespół ten rozwinął się u 50-letniego pacjenta hospitalizowanego z powodu

niedokrwistości odpornej na leczenie, po stosowaniu rhGM-CSF w dawce 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ przez 24 godziny w ciągłym wlewie dożylnym przez 7 dni [2]. Doniesiono również o nieoczekiwane korzystnym działaniu GM-CSF, polegającym na zmniejszeniu stężenia cholesterolu przeciętnie o 40% [11].

Objawy przedawkowania badano na transgenicznych myszach, cechujących się wysokim poziomem GM-CSF [30]. U tych myszy występowała ślepotą, spowodowana naciekami

TABELA 6. Działania niepożądane GM-CSF stosowanego w dawce 250 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ przez 24 godziny w ciągłym wlewie dożylnym według częstości występowania ($n = 106$) [18]

Działanie niepożądane	Częstość występowania w %
Bóle kostne	17
Gorączka	12
Ogólne wyczerpanie	12
Pocenie się	12
Brak apetytu, nudności	8
Biegunka	8

makrofagów, które uszkadzają światłoczułą warstwę siatkówki i powodują jej odklejenie [11, 22], rozsiane nacieki złożone z monocytów, głównie w mięśniach poprzecznie prążkowanych [11, 30], liczne ogniska zapalne w szkielecie i w tkance mięśnia sercowego [22], przekrwienie jelita cienkiego z mikroskopowymi krwotokami do jego światła [22], zwłóknienie węzłów chłonnych w jamie otrzewnej, opłucnej i osierdziu [22]. Nadmiernie wysokie poziomy GM-CSF u transgenicznych myszy prowadziły do śmiertelnego wyniszczenia [22, 30].

W makrofagach transgenicznych myszy stwierdzono podwyższoną aktywność aktywatora plazminogenu typu urokinazy (u-PA) i zwiększenie ilości

jego mRNA. Ponieważ ekspresja tego enzymu koreluje z uszkodzeniem tkanek i migracją komórek, a jego podanie wywołuje krwawienia, to postuluje się udział u-PA w uszkodzeniu tkanek u myszy transgenicznych pod względem genu dla GM-CSF [14].

11. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

11. 1. Cytopenia wywołana chemioterapią

Użycie GM-CSF i innych krwiotwórczych czynników wzrostu skraca czas trwania cytopenii wywołanej chemioterapią [13, 18, 34]. Większa liczba pacjentów może otrzymywać chemioterapię według pełnego schematu [18, 25, 34, 36]. GM-CSF stosowany przed rozpoczęciem chemioterapii zwiększa częstość remisji klinicznych, ponieważ komórki nowotworowe zostają zatrzymane w fazie S cyklu komórkowego, co zwiększa ich dostępność dla cytostatyków [13, 18, 34]. Jest to korzystne działanie, zwłaszcza w ostrej białaczkę szpikowej leczonej cytarabiną [34].

Neutropenia i posocznica wywołane chemioterapią zwiększają zachorowalność i śmiertelność wśród chorych oraz koszty ich leczenia. Porównywano wpływ podawania GM-CSF w pierwszym cyklu chemioterapii mięsaka z drugim cyklem bez podawania GM-CSF i stwierdzono, że GM-CSF skraca czas trwania neutropenii z 7,4 dnia do 3,5 dnia. Poza tym trombocytopenia była mniej zaznaczona w cyklach z GM-CSF [34]. U chorych z rakiem jajnika, u których stosowano karboplatynę we wzrastających dawkach z cyklofosfamidem, GM-CSF powodował zwiększenie liczby krwinek płytkowych [40]. GM-CSF skracał czas trwania i głębokość neutropenii u pacjentów, u których stosowano chemioterapię z powodu szpiczaka, chłoniaków lub guzów litych. Liczba zakażeń uległa obniżeniu z 80% do 10%, 90%

cyklów chemioterapii można było prowadzić według schematu w porównaniu do 20%, gdy nie stosowano GM-CSF [25].

GM-CSF może korygować granulocytopenię w zespole Felty'ego. Jednak obserwowana dysfunkcja szpiku nie została usunięta trwale i przerwanie leczenia powodowało nawrót granulocytopenii [15].

11. 2. Popromienna aplazja szpiku

Napromienienie szpiku prowadzi do indukowanej aplazji. Prawdopodobieństwo napromieniowania jest dość wysokie w związku z możliwością awarii w dużej liczbie funkcjonujących elektrowni jądrowych oraz źródeł promieniowania jonizującego stosowanych w przemyśle i medycynie.

Podczas awarii w klinice radioterapii w Goiania w Brazylii w 1987 roku doszło do napromieniowania promieniotwórczym cezem (^{137}Cs) 8 osób, u których w leczeniu zastosowano GM-CSF w dawce $500 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ [36]. U większości osób doszło do zwiększenia liczby leukocytów. Cztery osoby przeżyły to napromieniowanie. Dwie z nich otrzymały GM-CSF wkrótce po napromieniowaniu i u nich nie doszło do zakażenia. W przypadku napromieniowania GM-CSF wpływa wyłącznie na objawy pozwalając na skrócenie krytycznego okresu, dopóki nie zostanie przeprowadzone autologiczne lub allogeniczne przeszczepienie szpiku [20].

W wyniku badań przeprowadzonych na myszach okazało się, że pojedyncze dootrzewnowe wstrzyknięcie GM-CSF w dawce 1 do 5 μg , trwające 1 do 3 godzin po dawce śmiertelnego promieniowania $\text{LD}_{90/30}$ (dawce zabijającej 90% myszy w ciągu 30 dni) nie miało wpływu na przeżycie myszy [27].

GM-CSF w połączeniu z interleukiną-1 wykazuje działanie radioochronne, co wynika z badań nad letalnie napromienionymi myszami [38].

11. 3. Niedokrwistość aplastyczna

GM-CSF znalazł zastosowanie w leczeniu niedokrwistości aplastycznej. W tej jednostce chorobowej krótkotrwały wlew dożylny GM-CSF w dawce 2–64 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ powodował wzrost liczby neutrofilów i eozynofili u większości pacjentów. Towarzystwo temu niewielkie zwiększenie liczby krwinek płytkowych i retikulocytów, jednak bez większego wpływu na wymagania przetoczeniowe. Poprawa czynności krwiotwórczej szpiku podczas stosowania GM-CSF była ograniczona do pacjentów z wyjściową liczbą neutrofilów powyżej 100/ μl . Korzystne było zmniejszenie stężenia cholesterolu podczas leczenia GM-CSF [12]. Leczeniem alternatywnym do przeszczepienia szpiku w niedokrwistości aplastycznej jest podawanie globuliny antylimfocytarnej (ALG). Powrót do prawidłowej czynności układu krwiotwórczego po użyciu ALG trwa 1–4 miesiące. Dla skrócenia tego okresu nadaje się GM-CSF dzięki możliwości zwiększania liczby granulocytów [17]. W jednej z prac przedstawiono przypadek ciężkiej niedokrwistości aplastycznej z brakiem neutrofilów na obwodzie u 4-letniego chłopca, u którego wczesne leczenie GM-CSF i ALG spowodowało stałe zwiększenie liczby neutrofilów, aż do osiągnięcia wartości prawidłowych. Podawano rhGM-CSF (Sandoz-Schering-Plough) w ciągłym wlewie do żyły centralnej w dawce 8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ przez 14 dni. Odpowiedź na leczenie, wyrażająca się zwiększeniem liczby neutrofilów utrzymywała się przez 3 miesiące [17]. Inni autorzy wykazali większą skuteczność G-CSF w leczeniu tego schorzenia [9].

11. 4. Niedobory odporności

GM-CSF znalazł zastosowanie w leczeniu wrodzonych i nabytych niedoborów odporności. W leczeniu ciężkiej przewlekłej neutropenii dawka GM-CSF wynosząca 4–26 $\mu\text{g/kg/d}$ (150–1000 $\mu\text{g/m}^2/\text{d}$) przez 12–14 kolejnych dni wywoływała zwiększenie liczby neutrofilów o mniej niż $0,25 \times 10^9$ do $3\text{--}19 \times 10^9/\text{l}$ [32].

Na podstawie wielu prób okazało się, że najbardziej skutecznym sposobem stymulowania krwiotworzenia *in vivo* jest stosowanie kombinacji różnych czynników pobudzających tworzenie kolonii. Połączenie GM-CSF z IL-3 lub z IL-4 prowadziło do klinicznej poprawy we wrodzonych defektach odporności humoralnej i komórkowej.

Leczenie GM-CSF pacjentów chorych na AIDS powodowało znaczne zwiększenie liczby neutrofilów, eozynofili i monocytów krwi obwodowej. W czasie leczenia GM-CSF nie obserwowano zmiany stosunku limfocytów T pomocniczych do cytotoksycznych [22]. W AIDS w wyniku stosowania GM-CSF dochodziło do wyrównania leukopenii po leczeniu przeciwwirusowym. Problem w tym przypadku stanowi modulacja aktywności wirusa. Badania *in vitro* wykazały, że osoczowe stężenie antygeny p24 (białka otoczki HIV) zwiększa się po inkubacji z GM-CSF. Leczenie środkami wirowstatycznymi wywołuje często neutropenię, np. gancyklowir stosowany w leczeniu zakażenia cytomegalowirusem u chorych na AIDS indukuje neutropenię. Podskórne stosowanie GM-CSF w czasie leczenia gancyklowirem zwiększało komórkowość szpiku, liczbę krwinek we krwi obwodowej i skuteczność leczenia [22]. GM-CSF w zależności od dawki zwiększa liczbę leukocytów. Nie wiadomo jeszcze, czy GM-CSF wpływa na przebieg zakażenia HIV. Podczas stosowania zydowudyny i GM-CSF nie stwierdzono klinicznego pogorszenia, jak również zwiększenia stężenia antygeny p24 (27). Możliwe, że przez stymulację proliferacji makrofagów zwiększa się również liczba potencjalnie zakażonych komórek [17]. 14-dniowy wlew GM-CSF u chorych na AIDS powoduje zależne od dawki zwiększenie całkowitej liczby leukocytów, w tym neutrofilów i eozynofili. Czynność neutrofilów badana w testach *in vitro* po podaniu GM-CSF nie wykazała zaburzeń. Stosowanie GM-CSF u chorych na AIDS może zwiększać tolerancję na leczenie Azatiopryną, gancyklowirem, kotrimoksazolem i chemioterapią mięsaka Kaposiego.

11. 5. GM-CSF w przeszczepianiu szpiku

Zastosowanie krwiotwórczych czynników wzrostu, w tym GM-CSF w przeszczepianiu szpiku daje następujące możliwości [13]:

- 1) skrócenie czasu trwania neutropenii spowodowanej leczeniem cytotoksycznym;
- 2) mobilizacja komórek macierzystych do krwi obwodowej w celu przeprowadzenia autologicznej transplantacji szpiku;
- 3) pobudzanie komórek białaczkowych do wejścia w cykl komórkowy przed rozpoczęciem chemioterapii;
- 4) nasilenie fagocytozy;
- 5) nasilenie przeciwnowotworowej odpowiedzi gospodarza.

Zanim przeszczepiony szpik podejmie funkcję upływa zwykle 2 do 4 tygodni. GM-CSF przyspiesza odnowę granulocytów i innych komórek linii mieloidalnej po autologicznym przeszczepieniu szpiku (ABMT), obniża liczbę zakażeń bakteryjnych, wirusowych i epizodów septycznych [12, 32, 34]. Powrót do wydolności układu krwiotwórczego po przeszczepieniu szpiku wiąże się z liczbą przeszczepionych komórek macierzystych. Socinski i wsp. sugerują, że GM-CSF podany po chemioterapii może zwiększać pulę krążących komórek ma-

cierzystych (*Peripheral Blood Stem Cells* – PBSC), dowodząc, że samo podanie GM-CSF mogłoby dostarczyć wystarczającą ilość PBSC dla celów transplantacji. Pacjenci otrzymujący komórki macierzyste uzyskane po podaniu GM-CSF wykazywali szybki powrót do fizjologicznych ilości krwinek białych, w tym granulocytów obojętnochłonnych, w porównaniu z grupą kontrolną.

Jednym z poważniejszych powikłań allogenicznego przeszczepienia szpiku jest rozwój choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (*Graft versus Host Disease* – GvHD), w której immunokompetentne komórki T przeszczepu reagują z antygenami zgodności tkankowej komórek gospodarza. Ryzyko wystąpienia GvHD może zostać znacznie zmniejszone przez usunięcie komórek T ze szpiku dawcy. Jednak usunięcie komórek T samo przez się zwiększa ryzyko wystąpienia niewydolności szpiku. Może to odzwierciedlać defekt endogennej produkcji GM-CSF przez komórki T, ponieważ komórki T uzyskane do 18 miesięcy po przeszczepieniu szpiku (z lub bez usuwania komórek T) wykazują niewielką ekspresję cząsteczek GM-CSF na swej powierzchni lub jej brak [32].

W badanej grupie 15 pacjentów po ABMT z powodu chłoniaków, którym podawano GM-CSF w dawce 15–240 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ przez 14 dni stwierdzono, że pacjenci otrzymujący GM-CSF w dawce przekraczającej 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ wykazali przyspieszenie odnowy neutrofilii do wartości $0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$, które nastąpiło w 14 dniu leczenia w porównaniu z 25 dniem w grupie pacjentów nie otrzymujących GM-CSF. Pacjenci otrzymujący GM-CSF szybciej uniezależniali się od przetaczania preparatów krwinek płytkowych (z 9% na 30%), gorączka i hospitalizacja po ABMT trwała krócej, stwierdzono mniejszą liczbę pozytywnych posiewów krwi i wyraźnych działań niepożądanych ze strony GM-CSF [13]. W innej grupie 12 pacjentów, którzy otrzymywali chemioterapię w wysokich dawkach i u których przeprowadzono ABMT podając jednocześnie GM-CSF w dawce 100–400 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$, średni czas upływający do osiągnięcia liczby neutrofilii $0,5 \times 10^9/\text{l}$ wynosił 16,3 dnia, podczas gdy w grupie bez stosowania GM-CSF wynosił 25 dni. Nie obserwowano wpływu GM-CSF na liczbę krwinek płytkowych [13].

GM-CSF może znaleźć zastosowanie w leczeniu opóźnionego przyjęcia się autologicznego przeszczepu szpiku. Badania 6 pacjentów z opóźnionym przyjęciem przeszczepu wynoszącym powyżej 55 dni, po stosowaniu wysokich dawek cytostatyków i ABMT wykazały reakcję u 3 pacjentów na 14-dniowy kurs leczenia GM-CSF w dawce 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ przynajmniej siedmiokrotnym wzrostem liczby krążących granulocytów z równoczesnym zwiększeniem aktywności granulopoetycznej szpiku. U dwóch z trzech pacjentów liczba granulocytów powróciła do wartości z okresu sprzed rozpoczęcia leczenia, odpowiednio, w czwartym i siódmym tygodniu od zakończenia podawania GM-CSF. Wyniki te wskazują, że leczenie przy użyciu GM-CSF u pacjentów ze znacznie opóźnionym przyjmowaniem przeszczepu po ABMT może stymulować granulopoezę, ale u części pacjentów jest to tylko przemijający efekt [4]. Użycie GM-CSF po ABMT powinno być traktowane jako leczenie wspomagające, skracające czas trwania neutropenii, czas izolacji chorego i zmniejszające koszty leczenia, ale nie wpływające znacząco na długość przeżycia.

11. 6. Zespół mielodysplastyczny (MDS)

Zakażenia w przebiegu tego zespołu stanowią jedno z głównych powikłań, co jest uwarunkowane małą liczbą leukocytów. U tych pacjentów GM-CSF może zwiększać liczbę neutrofilii, jednak efekt ten utrzymuje się tylko w okresie jego podawania. Pacjenci z MDS

odpowiadali na leczenia GM-CSF zwiększeniem liczby neutrofilii, monocytów i eozynofili, w niektórych przypadkach również krwinek płytkowych [22]. U części pacjentów zwiększeniu ulegała liczba krwinek płytkowych i retikulocytów [12, 17, 28]. Krótkotrwałe wlewy GM-CSF w dawkach od 15 do 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ powodowały zwiększenie liczby leukocytów, w tym neutrofilii i eozynofili, u większości pacjentów. U części pacjentów obserwowano wzrost liczby krążących blastów [22], ponieważ mieloblasty mają receptory dla GM-CSF i powoduje to przyspieszenie progresji ostrej białaczki (u 5 z 26 pacjentów z MDS) [12].

Inna grupa badała 133 pacjentów z MDS, u których stosowano GM-CSF podskórnie w dawce dobowej 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ oraz grupę kontrolną przez 90 dni [32]. Liczba neutrofilii w grupie kontrolnej pozostała w granicach wyjściowych ok. $0,6 \times 10^9/\text{l}$, podczas gdy pacjenci otrzymujący GM-CSF wykazywali znaczący wzrost ($p < 0,01$) do ok. $3,8 \times 10^9/\text{l}$ pod koniec 90-dniowego okresu. Zwiększeniu uległa również liczba monocytów, eozynofili i limfocytów oraz występowało mniej rozległych zakażeń (15% w stosunku do 33% w grupie kontrolnej, $p < 0,02$) [32]. Inni autorzy stwierdzili większą skuteczność G-CSF w leczeniu tego zespołu [9].

12. ZAKOŃCZENIE

GM-CSF odgrywa istotną rolę w regulowaniu proliferacji i różnicowania prawidłowych komórek szpiku. Nieprawidłowe wytwarzanie GM-CSF lub defekt jego receptorów może mieć znaczenie w patogenezie różnych schorzeń układu krwiotwórczego.

Badania dotyczące właściwości GM-CSF i wyniki prób klinicznych uwidaczniają możliwość jego stosowania w leczeniu takich chorób, jak: niedokrwistość aplastyczna, zespół mielodysplastyczny, wrodzone i nabyte niedobory odporności. Może również przyspieszać odnowę układu krwiotwórczego po radio- i/lub chemioterapii oraz po przeszczepieniu szpiku.

LITERATURA

- [1] APPELBAUM FR. The clinical use of hematopoietic growth factors. *Semin Hematol* 1989; **26**: 7–14.
- [2] ARNING M, KLICHE KO, SCHNEIDER W. GM-CSF therapy and capillary-leak syndrome. *Ann Hematol* 1991; **62**: 83.
- [3] BRADLEY TR, METCALF D. The growth of bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966; **44**: 287–300.
- [4] BRANDWEIN JM, NAYAR R, BAKER MA, SUTTON DMC, SCOTT JG, SCETCLIFFE SB, KEATING A. Therapy for Delayed Engraftment after Autologous Bone Marrow Transplantation. *Exp Hematol* 1991; **19**: 191–195.
- [5] BURGESS AW. Hematopoietic growth factors. W: Ford RJ, Maizel A. Mediator in cell growth and differentiation. New York: Anderson MD. Symposium on Fundamental Cancer Research. 1985; **37**: 159–169.
- [6] BURGESS AW, NICOLA N. Growth Factors and Stem Cells. New York, Sydney, Academic Press, 1983, 68–72, 99–105.
- [7] CHEERS C, HAIGH AM, KELSO A, METCALF D, STANLEY ER, YOUNG AM. Production of Colony-Stimulating Factors (CSFs) during Infection: Separate Determinations of Macrophage-, Granulocyte-, Granulocyte-Macrophage- and Multi-CSFs. *Infect Immun* 1988; **56**: 247–251.
- [8] CROSIER PS, CLARC SC. Basic biology of the hematopoietic growth factors. *Semin Oncol* 1992; **19**: 349–361.
- [9] DUNLOP DJ, STEWARD WP. Recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor: current status of clinical trials and potential future applications. *Anti-Cancer Drugs* 1991; **4**: 327–337.
- [10] FAGG B. Haematopoietic growth factors. *Triangle* 1989; **28**: 97–108.

- [11] GASSON JC. Molecular Physiology of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1991; **77**: 1131–1145.
- [12] GLASPY JA, GOLDE DW. Clinical trials of myeloid growth factors. *Exp Hematol* 1990; **18**: 1137–1141.
- [13] GOLDSTONE AH, KHWAJA A. The Role of haemopoietic growth factors in bone marrow transplantation. *Leuk Res* 1990; **14**: 721–729.
- [14] HAMILTON JA. Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages-some controversies. *Immunol Today* 1993; **14**: 18–23.
- [15] HAZENBERG BPC, VAN LEEUWEN MA, VAN RIJSWIJK MH, STERN AC, VELLENGA E. Correction of granulocytopenia in Felty's syndrome by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Simultaneous induction of interleukin-6 release and flare up of the arthritis. *Blood* 1989; **74**: 2769–2770.
- [16] JEŃDRZEJCZAK WW. Zagadka tworzenia krwi, Warszawa, Wiedza 1987; 163, 165.
- [17] KACZMARSKI RS, MUFTI GJ. The Cytokine Receptor Superfamily. *Blood Reviews* 1991; **5**: 193–203.
- [18] KLINGEMANN HG. Rekombinante Wachstumsfaktoren: Klinischer Einsatz von GM-CSF. *Die gelben Hefte* 1989; **3**: 118–126.
- [19] LANG RA, METCALF D, CUTHBERTSON RA, LYONS J, STANLEY E, KELSO A, KANNOURAKIS G, WILLIAMSON DJ, KLINWORTH GK, GONDA TJ, DUNN AR. Transgenic Mice Expressing a Hemopoietic Growth Factor Gene (GM-CSF). Develop Accumulations of Macrophages, Blindness, and a Fatal Syndrome of Tissue Damage. *Cell* 1987; **51**: 675–686.
- [20] MC NIECE IK, LANGLEY KE, ZSEBO KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol* 1991; **19**: 213–220.
- [21] METCALF D. The application of haematopoietic and differentiation factors. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1984, 12–17, 144.
- [22] METCALF D. The consequences of excess levels of haemopoietic growth factors. *Brit J Haematol* 1990; **75**: 1–3.
- [23] METCALF D. Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular and clinical aspects. *Science* 1991; **254**: 529–533.
- [24] MONROY RL, DAVIS TA, MAC VITTIE TJ. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: More than a hemopoietin. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; **54**: 333–346.
- [25] MORSTYN G. The Impact of colony-stimulating factors on cancer chemotherapy. *Brit J Haematol* 1990; **75**: 303–307.
- [26] NATHAN DG, BURGESS AN. Hemopoietic Growth Factors. *Cancer Res* 1988; **48**: 5624–5637.
- [27] NATHAN DG. Hope for Hematopoietic hormones. *N Eng J Med* 1987; **317**: 626–628.
- [28] NETA R, OPPENHEIM JJ. Cytokines in therapy of radiation injury. *Blood* 1988; **72**: 1093–1095.
- [29] OLSSON I, GULLBERG U, LANTZ M, RICHTER J. The receptors for regulatory molecules of hematoipoiesis. *Eur J Haematol* 1992; **48**: 1–9.
- [30] PLATZER E. Human hemopoietic growth factors. *Eur J Haematol* 1984; **42**: 1–15.
- [31] POJDA Z, MOLINEUX G, DEXTER TM. Effects of Long-term in vivo Treatment of Mice with Purified Murine Recombinant GM-CSF. *Exp Hematol* 1989; **17**: 1100–1104.
- [32] POTTER MN, MOTT MG, OAKHILL A. The successful treatment in the case of very severe aplastic anaemia using GM-CSF and Antilymphocyte globuline. *Brit J Haematol* 1990; **75**: 618–619.
- [33] RAPAPORT AP, ABOUD CN, DIPERSIO JF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): receptor biology, signal transduction, and neutrofil activation. *Blood Rev* 1992; **6**: 43–57.
- [34] RATAJCZAK MZ, SZCZYLIK C. Wewnątrzustrojowe inhibitory układu krwiotwórczego. *Pol Tyg Lek* 1992; XLVII, 5–6: 115–119.
- [35] RATAJCZAK MZ, KARWACKI M. Powikłania kardiologiczne i endokrynologiczne po przeszczepieniach szpiku. *Pol Tyg Lek* 1992; XLVII, 22–23: 505–508.
- [36] ROBAK T. Krwiotwórcze czynniki wzrostowe. *Post Hig Med Dośw* 1991; **45**, 6, 461–496.
- [37] ROBAK T. Kliniczne zastosowanie krwiotwórczych czynników wzrostowych. *Pol Tyg Lek* 1992; XLVII, 16–17: 365–368.
- [38] ROBAK T, GRIEB P. 2-chlorodeoksyadenozyna (2-CDA)-nowy lek przeciwnowotworowy i immunosupresyjny. *Act Haematol Pol* 1992; **23**, 3: 141–148.
- [39] ROSE RM. The role of colony-stimulating factors in infectious disease: current status, future challenges. *Semin Oncol* 1992; **19**: 415–421.
- [40] RUSTHOVEN J, LEVIN L, EISENHAUER E, CORMICHAEL J, KOSKI B, O'CONNEL G, BRYSON P, MAZURKA J, HIRTE H. A phase I study of GM-CSF, cyclophosphamide and escalating doses of carboplatin

- with and without cyclophosphamide in chemotherapy-naive patients with carcinoma of the ovary. *Anti-Cancer Drugs* 1991; **2**: 356–357.
- [41] SCARFFE JH. Emerging Clinical Uses for GM-CSF. *Eur J Cancer* 1991; **27**: 1493–1504.
- [42] SCHULZ G. Abwehrstörungen: Neue Möglichkeiten der Therapie und Prophylaxe. *Die gelben Hefte* 1990; **2**: 57–69.
- [43] SERKE, HULM D. Effects of various recombinant human hemopoietic growth factors (rhEPO, rhG-CSF, rhGM-CSF, rhIL-3) on the growth of peripheral blood progenitor cells (BFU-E, CFU-GM). *Blut* 1990; **61**: 25–29.
- [44] STEHLE B, WEISS C, HO AD, HUNSTEIN W. Serum Levels of Tumor Necrosis Factor alfa in patients treated with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1990; **75**: 1895.
- [45] TAETLE R, OVAL J, SMEDSRUD M, DAVIS C, GANSBACHER B. Analysis of GM-CSF action in Differentiating Myeloid Leukemia Cells: Treatment with DMSO May Reveal a Common Pathway of Growth Factor Gene Regulation. *Exp Hematol* 1991; **19**: 213–220.
- [46] WHETTON AD, DEXTER TM. Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim Biophys Acta* 1989; **989**: 111–132.

Otrzymano: 17.02.1993 r.

Przyjęto: 01.07. 1993 r.

Adres autora: 00-423 Warszawa, ul. Okrąg 3 D m 15.

ROLA RECEPTORÓW OBDARZONYCH WEWNĘTRZNĄ AKTYWNOŚCIĄ KINAZY TYROZYNOWEJ W REGULACJI KRWIOTWORZENIA U CZŁOWIEKA*

THE ROLE OF THE RECEPTORS WITH INTRINSIC TYROSINE KINASE ACTIVITY IN THE REGULATION OF HUMAN HAEMATOPOIESIS

Mariusz RATAJCZAK, Alan M. GEWIRTZ

Pracownia Hematologii Molekularnej Zakładu Patologii Uniwersytetu Pensylwania,
Filadelfia, USA

Streszczenie. W pracy na podstawie danych z piśmiennictwa, jak i wyników badań własnych autorzy przedstawili pogląd na rolę receptorów mających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej w regulacji krwiotworzenia u człowieka. Opisane do tej pory receptory tej grupy podzielono na trzy grupy. Grupa pierwsza to receptory bezpośrednio regulujące m.in. proliferację i różnicowanie najwcześniejszych komórek hemopoetycznych. Zaliczono do niej STK-1 R i *c-kit* R. Na zaburzenie w ekspresji STK-1 R najbardziej wrażliwe okazały się komórki inicjujące hodowlę długoterminowe szpiku. Natomiast na zaburzenia w ekspresji *c-kit* R komórki ukierunkowane układu czerwono-krwinkowego. W drugiej grupie umieszczono CSF-1 R, który ulega ekspresji na komórkach linii hemopoetycznej dającej początek monocytom i makrofagom. W trzeciej grupie receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej zamieszczono z kolei: IGF-1 R, PDGF R oraz bFGF R, których udział w regulacji hemopoezy jest wg autorów prawdopodobnie pośredni. Receptory trzeciej grupy występują bowiem na komórkach dodatkowych szpiku kostnego, które pobudzane swoistymi ligandami mogą w sprzyjających warunkach wydzielać różne czynniki hemopoetyczne stymulujące krwiotworzenie. Na obecnym etapie nie można jednak wykluczyć, że zarówno IGF-1 i bFGF jako mezodermalne czynniki wzrostowe odgrywają ważną rolę w ontogenezie układu krwiotwórczego, regulując proliferację płodowych komórek krwiotwórczych.

Summary. Based on the literature review as on the results of their own experiments the authors present their point of view on the role of receptors with intrinsic receptor tyrosinase activity in the regulation of human haematopoiesis. According to the physiological role and importance, these receptors were divided into three subgroups. The first contained *c-kit* as STK-1 receptors – involved in the proliferation and the differentiation of early hemopoietic cells. The second contained CSF-1 R expressed on cells of macrophagic - monocytic lineage. The receptors belonging to the third group – IGF-1 R, bFGF R and PDGF R according to the authors were not expressed – on the assayed in the

*Wykład wygłoszony na V Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki. Wrocław: 2–4 lipiec 1993 r.

in vitro assays – clonogenic progenitors and thus are not directly involved in the regulation of proliferation of these cells. Because the receptors belonging to the last group are expressed on bone marrow accessory cells – these cells when stimulated with appropriate growth factors secrete other cytokines which could influence the development of early hemopoietic cells. Nevertheless, the role which the receptors from the third group are playing in fetal haematopoiesis, as in the proliferation of the most primitive haematopoietic stem cells needs further studies.

Wykaz skrótów: bFGF (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor*) – zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów; bFGFR (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor Receptor*) – receptor dla zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów; FLT3/FLK2 (ang. *Fetal Liver Tyrosine Kinase 3 or 2*) – odkryty ostatnio receptor o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej występujący m.in. na mysich komórkach krwiotwórczych w wątrobie płodowej, ludzkim homologiem jest STK-1 R; FACS (ang. *Fluorescein Activated Cell Sorting*) – technika izolacji komórek specjalnym urządzeniem mogącym izolować komórki mające interesujący antygen; BFU-E (ang. *Burst Forming Units of Erythrocytes*) – wczesna komórka układu czerwono krwinkowego tworząca in vitro 14 dnia hodowli duże kolonie erytroidalne; CFU-E (ang. *Colony Forming Units of Erythrocytes*) – bardziej zróżnicowana od BFU-E komórka układu czerwono krwinkowego tworząca in vitro 7 dnia hodowli małe kolonie erytroidalne; GM-CFU (ang. *Colony Forming Units of Granulocytes and Macrophages*) – wczesna komórka układu granulocytowo-makrofagowego tworząca in vitro 11 dnia hodowli kolonie granulocytowo-makrofagowe; CFU-Meg (ang. *Colony Forming Units of Megacaryocytes*) – wczesna komórka układu megakariocytowego tworząca 11 dnia hodowli in vitro kolonie megakariocytów; CFU-Mix (ang. *Colony Forming Units of Mixed Lineages*) – jedna z wcześniejszych komórek układu krwiotwórczego tworząca 15 dnia hodowli in vitro kolonie składające się z krwinek czerwonych, granulocytów, makrofagów i megakariocytów; *c-kit* R – receptor c-kit; CSF-1 (ang. *Colony Stimulating Factor-1*) – czynnik wzrostowy układu monocytowo-makrofagowego, inaczej M-CSF; CSF-1R (*Colony Stimulating Factor-1 Receptor*) – receptor dla CSF-1; EpO – erytropoetyna; GM-CSF (ang. *Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostowy stymulujący wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych; IGF-1 (ang. *Insuline Like Growth Factor-1*) – czynnik wzrostowy insulinopodobny - 1; IGF-1R (ang. *Insuline Like Growth Factor-1 receptor*) – receptor dla IGF-1; IL-3 – interleukina-3; komórki A T – komórki jednojądrowe szpiku pozbawione komórek adherentnych i limfocytów T; KKM – Krwiotwórcze Komórki Macierzyste – najwcześniejsze komórki hemopoetyczne mające zdolność samoodnawiania; KKU – Krwiotwórcze Komórki Ukierunkowane – bardziej dojrzałe od komórek macierzystych, tracąc zdolność do samoodnawiania, w hodowlach in vitro tworzą klony komórek potomnych; KL (ang. *kit ligand*) – ligand receptora *c-kit*; PDGF (ang. *Platelet Derived Growth Factor*) – czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego; PDGF-R (ang. *Platelet Derived Growth Factor Receptor*) – receptor dla PDGF; RT-PCR (ang. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) – czuła technika badania ekspresji mRNA w komórce, składa się z dwóch etapów, w pierwszym mRNA, którego ekspresję chcemy ocenić, "przepisywany" jest za pomocą enzymu, tzw. odwrotnej transkryptazy, na komplementarny odcinek cDNA, w drugim otrzymane cDNA jest amplifikowane za pomocą termocyklicznej reakcji PCR. Amplifikowany wiele miliardów razy produkt może zostać uwidoczony na żelu agarozowym; SH-2 domena (ang. *src homology domain*) – domena białkowa o homologii białka *src*; STK-1 R (ang. *Stem Cell Tyrosine Kinase - 1 Receptor*) – nowo opisany receptor o aktywności kinazy tyrozynowej występujący na ludzkich komórkach krwiotwórczych

WSTĘP

Wytwarzanie komórek krwi w szpiku kostnym podlega precyzyjnym mechanizmom autoregulacyjnym. Na samoodnawianie krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) oraz różnicowanie i proliferację bardziej dojrzałych już krwiotwórczych komórek ukierunkowanych (KKU) oddziałują przez swoje receptory powierzchniowe rozmaite czynniki działające stymulująco bądź hamująco [32, 35, 43]. Najlepiej poznane są receptory tych czynników, które stymulują krwiotworzenie [34]. Do najważniejszych z nich należy grupa receptorów powierzchniowych, które obdarzone są wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej [1]. Interakcja swojego ligandu z receptorem tej grupy powoduje jego pobudzenie, a następnie autofosforylację reszt tyrozynowych występujących w domenie wewnątrzcytoplazmatycznej receptora. Autofosforylacja reszt tyrozynowych zapoczątkowuje z kolei szereg wzajemnych interakcji

pomiędzy receptorem a białkami biorącymi udział w procesie transdukcji sygnału z powierzchni do wnętrza komórki i jej jądra. Interakcje te są możliwe dzięki temu, że ufosforylowane tyrozyny białka receptorowego stanowią miejsca akceptorowe, do których przyłączają się przez tzw. domeny SH-2 proteiny biorące udział w generowaniu drugich przekaźników informacji [36, 37]. Ostatecznie pobudzony receptor ulega internalizacji i zostaje zdegradowany w układzie lizosomalnym komórki. Jego miejsce na powierzchni zajmuje nowosyntetyzowane białko receptorowe.

Jak wiadomo, nie opisano do tej pory takiego receptora o aktywności kinazy tyrozynowej, który byłby swoisty dla komórek krwiotwórczych i nie występowałby w organizmie na innych komórkach. Jednocześnie należy również podkreślić, że lista poznanych receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej, które występują na komórkach krwiotwórczych, nie jest jeszcze zamknięta i wkrótce może się znacznie rozszerzyć.

Niemniej jednak na obecnym etapie badań wiadomo, że udział niektórych z poznanych już receptorów tej grupy ma kluczowe znaczenie w regulacji krwiotworzenia. Powszechnie uważa się, że w hemopoizie biorą udział następujące receptory obdarzone wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej: *c-kit* R, IGF-1 R, STK-1 R, CSF-1 R, bFGF R, PDGF R [11, 39, 40, 48, 53, 54, 60].

W prezentowanej pracy omówiony zostanie pokrótce udział powyższych receptorów w procesie regulacji ludzkiej hemopozy. Posłużę się danymi z piśmiennictwa, jak i wynikami badań własnych, przedstawiając nasz własny pogląd na ich rolę w krwiotworzeniu.

RECEPTOR *c-kit*

Receptor ten występuje na najwcześniejszych ludzkich komórkach układu krwiotwórczego [39, 40]. Opisano go m.in. na komórkach mających wzór antygenów powierzchniowych: CD34⁺, CD38⁻, CD33⁻ [58]. Wiąże on ligand znany w piśmiennictwie pod nazwą: czynnika komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*) lub czynnika wzrostowego komórek tucznych (ang. *mast cell growth factor*) [61]. Ponieważ receptor *c-kit* występuje również na niektórych dojrzałych już komórkach, np. granulocytach zasadochłonnych czy komórkach tucznych, uważamy, że najbardziej stosownym określeniem jego ligandu jest nazwa – ligand receptora *c-kit* (ang. *kit ligand*). Nazwą tą będziemy się posługiwać w prezentowanej pracy.

Ligand receptora *c-kit* (KL) produkowany jest w szpiku kostnym przez komórki fibroblastoidalne podścieliska i komórki endotelialne naczyń krwionośnych [3]. Komórki stromalne podścieliska szpiku kostnego produkują KL w dwóch postaciach. Pierwsza z nich jest trwale związana z powierzchnią błony komórkowej. Druga natomiast tzw. sekrecyjna po umieszczeniu na powierzchni komórki zostaje uwolniona w wyniku trawienia enzymatycznego do środowiska [27]. Obie formy KL wykazują podobną aktywność w hodowlach *in vitro*. *In vivo* w szpiku kostnym oddziałują m.in. na wczesne komórki krwiotwórcze znajdujące się w niszach krwiotwórczych. Przyjmuje się, że forma związana z powierzchnią komórek fibroblastoidalnych szpiku pełni rolę nie tylko hemopoetycznego czynnika wzrostowego, lecz również swoistej molekuly adhezyjnej dla tych wczesnych komórek krwiotwórczych, które mają na swojej powierzchni receptor *c-kit* [26]. Jest to o tyle istotne, gdyż jak wiadomo bezpośredni kontakt wczesnych komórek hemopoetycznych (KKM i K KU) z komórkami

fibroblastoidalnymi podścieliska, które wyścielają nisze krwiotwórcze, pełni kluczową rolę w utrzymaniu zarówno ich żywotności, jak i prawidłowym różnicowaniu i proliferacji [26].

Opublikowane dane świadczące o tym, że KL zwiększa proliferację najwcześniejszych komórek krwiotwórczych, tzw. pre-CFU (ang. *pre-Colony Forming Units*) [4]. Wiadomo również, że KL dodany do hodowli komórek ludzkiego szpiku, pomimo że sam nie stymuluje wzrostu bardziej dojrzałych już krwiotwórczych komórek ukierunkowanych, tzw. CFU (ang. *Colony Forming Units*), to w obecności innych czynników wzrostowych wywiera efekt kostymulacyjny zwiększając znacznie ich klonogenność [5, 47].

W tabeli 1 przedstawiono własne dane oceniające wpływ KL jako kostymulatora innych czynników wzrostowych na klonogenność komórek ludzkiego szpiku kostnego w hodowlach *in vitro*. W badaniach tych oceniano wpływ KL na wzrost KKU: erytropoezy (BFU-E), granulocyto-monopoezy (GM-CFU) i megakariopoezy (CFU-Meg). Jak przedstawiono, KL najsilniej kostymulował powstawanie kolonii erytroidalnych – zwiększając ponad czterokrotnie ich liczbę. Należy nadmienić, że kolonie erytroidalne tworzone po stymulacji KL były duże, widoczne makroskopowo nie uzbrojonym okiem. KL zwiększał również blisko dwukrotnie wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych i megakariocytowych.

TABELA 1. Wpływ KL na wzrost ludzkich kolonii hemopoetycznych *in vitro**

Utworzone kolonie	Bez kostymulacji KL	W obecności KL w dawce 100 ng/ml
BFU-E**	98± 28	426± 144
GM-CFU**	179± 52	319± 73
CFU-Meg***	45± 12	63± 21

*Kolonie stymulowano odpowiednio: BFU-E: EpO 5 j/ml, GM-CFU: GM-CSF 5 ng/ml i CFU-Meg: IL-3 20 j/ml + GM-CSF 5 ng/ml bez lub w obecności KL (dane z hodowli komórek szpiku od 4 niezależnych dawców). ** Liczba kolonii w przeliczeniu na 2×10^4 komórek CD34⁺ szpiku hodowanych w pożywce z metylocelulozą. *** Liczba kolonii

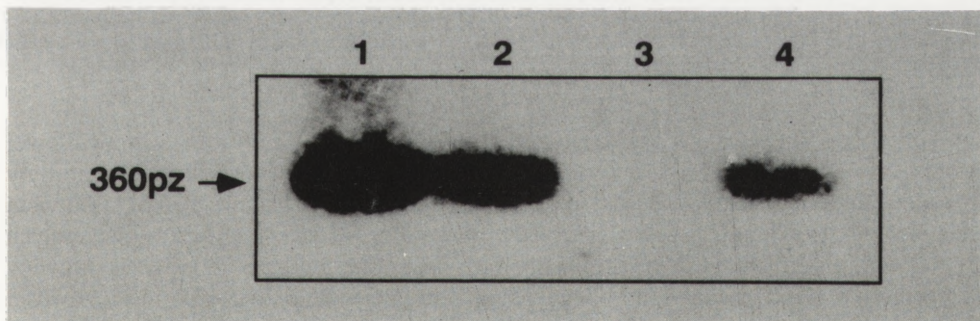
Jak wiadomo, u myszy opisano mutacje dotyczące zarówno ekspresji receptora *c-kit* (mutacje locus *w*), jak i jego ligandu (mutacje locus *sl*) [12]. Myszy dotknięte najcięższymi postaciami mutacji w loci *w* i *sl* wykazują fenotypowo białe zabarwienie sierści, będące wynikiem zaburzeń migracji melanocytów, są bezpłodne oraz cierpią na anemię makrocytową i niedobór komórek tucznych. Przez długi czas poszukiwano odpowiedników mysich mutacji receptora *c-kit* i KL w patologii człowieka. Ostatnio okazało się, że niektóre z postaci tzw. piebaldyzmu – postaci bielactwa skórno – są właśnie wynikiem mutacji w obrębie receptora *c-kit* [16, 20]. Opisani osobnicy cierpiący na piebaldyzm nie wykazują jednak w przeciwieństwie do gryzoni zmian w parametrach hematologicznych. Może to wynikać stąd, że zdiagnozowani do tej pory chorzy na piebaldyzm są genotypowo heterozygotami i obok zmutowanej mają drugą prawidłową kopię genu kodującego receptor. Można również przyjąć, że opisane zmiany genetyczne w obrębie receptora *c-kit* u pacjentów cierpiących na piebaldyzm są prawdopodobnie łagodnymi postaciami mutacji, które przejawiają się jedynie pod postacią zaburzeń pigmentacji skóry. Formy najcięższe mutacji występujące pod postacią homozygotyczną mogą być letalne. Z tego być może powodu osobnicy dotknięci nimi nie zostali jeszcze do tej pory zidentyfikowani. Pewnym potwierdzeniem tej tezy może być fakt, że u myszy tylko najcięższe formy mutacji receptora *c-kit* bądź jego ligandu powodują fenotypowo uchwytnie zaburzenia hematologiczne. Postaci lżejsze powodują jedynie zaburze-

nia pigmentacji skóry – fenotypowo bardzo podobne do zmian amelanotycznych spotykanych w ludzkim piebaldyzmie.

Badając rolę receptora *c-kit* w regulacji ludzkiej hemopoezy postanowiliśmy na podstawie dostępnych metod biologii molekularnej otrzymać ludzkie komórki hemopoetyczne pozbawione ekspresji receptora *c-kit* [41]. W tym celu wykorzystaliśmy strategię antysensów [10, 19, 42, 46, 49]. Zgodnie z powyższym komórki ludzkiego szpiku inkubowano w medium hodowlanym z otrzymanymi syntetycznie oligodeoksynukleotydami (oligomerami) mającymi sekwencje antysensu do fragmentu cząsteczki mRNA kodującego receptor *c-kit*. W badaniach stosowaliśmy antysensy będące lustrzanym odbiciem pierwszych, ulegających translacji 18 nukleotydów nici mRNA receptora *c-kit*. Jak wiadomo, działanie oligomerów antysensowych polega na tym, że wnikając do komórki mogą one swoiście hybrydyzować z mRNA, przeciwko któremu są skierowane [10, 42]. Skutkiem takiego działania jest "zablokowanie metaboliczne", a następnie destrukcja cząsteczki mRNA. Pod wpływem działania oligomerów antysensowych dochodzi więc do zahamowania rybosomalnego procesu translacji mRNA na kodowane przez gen białko. Ekspresja genu zostaje tym samym swoiście zahamowana.

Na rysunku 1 przedstawiono dowód biochemiczny swoistego działania oligomerów antysensowych do receptora *c-kit*. Jak widać w komórkach, które inkubowano z oligomerami o sekwencji antysensu, doszło do ekspresji mRNA dla tego receptora. Potwierdzeniem biologicznym ich swoistego działania był też fakt, że powyższe oligomery antysensowe dodane do hodowli komórek CD34⁺ ludzkiego szpiku hamowały całkowicie tworzenie kolonii erytroidalnych rosnących w hodowlach, które stymulowano za pomocą erytropoetyny (EpO) i KL.

Dysponując powyższym dogodnym modelem doświadczalnym przeprowadziliśmy serię badań, w których komórki ludzkiego szpiku ekspozowano do oligomerów mających sekwencje antysensu do mRNA kodującego receptor *c-kit*. W równoległych doświadczeniach kontrolnych komórki szpiku inkubowano z oligomerami mającymi sekwencję sensu bądź sekwencję nieswoistą mRNA receptora *c-kit*. Ostatnie z wymienionych oligodeoksynukleotydów nie powinny więc hybrydyzować z mRNA kodującym receptor i tym samym zaburzać



Rys. 1. Komórki jednojądrowe A^T ludzkiego szpiku kostnego inkubowano z oligodeoksynukleotydami o sekwencji sensu (pozycja 2), antysensu (pozycja 3) lub o sekwencji nieswoistej (pozycja 3) do mRNA kodującego receptor *c-kit* (pozycja 1 – komórki kontrolne nieinkubowane z oligomerami); po 36 godzinach inkubacji z komórek tych izolowano RNA i w uzyskanych próbkach za pomocą techniki RT-PCR (ang. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) badano ekspresję mRNA receptora *c-kit*; produkty reakcji RT-PCR oceniano za pomocą techniki *Southern Blot*; amplifikowany swoistymi primerami fragment cDNA receptora *c-kit* powinien mieć wielkość 360 par zasad; jak widać, w komórkach inkubowanych ze swoistymi oligomerami antysensowymi doszło do zaniku ekspresji mRNA dla receptora *c-kit*

jego ekspresji. Z komórek tych następnie zakładano hodowle in vitro w metylocelulozie stymulując tworzenie kolonii swoistymi czynnikami wzrostowymi w obecności KL jako kostymulatora wzrostu. Jak należało przypuszczać, zniesienie ekspresji receptora *c-kit* na ludzkich krwiotwórczych komórkach klonogennych upośledzało zdolność tworzenia kolonii hemopoetycznych wszystkich linii krwiotwórczych.

Wynik zasługujący na szczególną uwagę otrzymaliśmy wtedy, gdy komórki ze zniesioną ekspresją receptora *c-kit* stymulowano do tworzenia kolonii za pomocą różnych czynników wzrostowych bez obecności KL jako kostymulatora wzrostu. Powyższe dane przedstawiono w tabeli 2. W doświadczeniach tych komórki szpiku ludzkiego podobnie jak poprzednio, ekspozowano na oligodeoksynukleotydy mające sekwencje: antysensu, sensu i nieswoistą do mRNA kodującego receptor *c-kit* [41, 45]. Następnie stymulowano je do tworzenia in vitro kolonii hemopoetycznych. Okazało się, że zniesienie ekspresji receptora *c-kit* w komórkach ludzkiego szpiku, które nie były kostymulowane KL, prowadziło do wybiórczego zahamowania wzrostu kolonii erytroidalnych. Jak wynika z tabeli 2, liczba kolonii czerwonekrwinkowych zmniejszała się o ponad 70%, podczas gdy liczba kolonii granulocytowo-makrofagowych i megakariocytowych nie ulegała zmianie.

TABELA 2. Wpływ zniesienia ekspresji receptora *c-kit* w ludzkich komórkach hemopoetycznych za pomocą swoistych oligodeoksynukleotydów antysensowych skierowanych przeciwko mRNA kodującego receptor *c-kit* na ich zdolność tworzenia kolonii w hodowlach in vitro (dane z hodowli komórek szpiku od 3 zdrowych dawców)*

Rodzaj kolonii	Hodowle kontrolne	Komórki ekspozowane na oligodeoksynukleotydy (150 ng/ml) o sekwencji		
		sensu <i>c-kit</i> mRNA	nieswoistej <i>c-kit</i> mRNA	antysensu <i>c-kit</i> mRNA
BFU-E**	281±37	268±50	272±24	81±11
GM-CFU-**	213±37	240±44	244±48	248±49
CFU-Meg***	104± 5	90±20	90±27	85±20

*Wzrost kolonii stymulowano odpowiednio: BFU-E: EpO 5 j/ml + IL-3 20 j/ml, GM-CFU: IL-3 20 j/ml + GM-CSF 5 ng/ml, CFU-Meg: IL-3 20 j/ml + IL-6 20 j/ml + EpO 5 j/ml; **Liczba kolonii w przeliczeniu na 2×10^4 komórek CD34⁺ szpiku hodowanych w pożywce z metylocelulozą; ***Liczba kolonii w przeliczeniu na 2×10^5 hodowanych komórek szpiku pozbawionych komórek adherentnych i limfocytów T.

Zaobserwowana przez nas nadwrażliwość komórek BFU-E na zaburzenia w prawidłowej ekspresji receptora *c-kit*, widoczna nawet wtedy, gdy zakładane hodowle szpiku nie były stymulowane KL, zainspirowała nas do dalszych badań. Spostrzeżenie to mogło bowiem przemawiać z jednej strony za zwiększoną wrażliwością ludzkich komórek klonogennych erytropoezy w porównaniu z innymi na śladowe ilości KL, który jest obecny w surowicy wchodzącej w skład środowiska hodowlanego. Z drugiej mogło świadczyć o możliwości autokrynej produkcji KL przez wczesne komórki klonogenne erytropoezy i autokrynej stymulacji wzrostu wczesnych komórek ukierunkowanych układu czerwonekrwinkowego. Ponieważ stężenie KL w surowicy wchodzącej w skład medium hodowlanego jest niewielkie [25], postanowiliśmy zbadać drugą z wymienionych możliwości. W tym celu posługując się techniką FACS wyizolowaliśmy z ludzkiego szpiku komórki o wzorze antygenowym CD34⁺, *c-kit* R⁺. Frakcja ta, jak wiadomo, jest wzbogacona m.in. we wczesne komórki klonogenne erytropoezy, jakimi są BFU-E. Wykorzystując czułą technikę, jaką jest RT-PCR, wykazaliśmy, że komórki te rzeczywiście wykazują ekspresję mRNA kodującego KL.

Dodatkowy powód przemawiający za autokrynnym wzrostem KKU erytropoezy uzyskaliśmy wykorzystując ponownie strategię oligomerów antysensowych – skierowanych tym razem przeciwko mRNA dla KL. Za pomocą powyższych oligomerów udało się nam bowiem zahamować wybiórczo *in vitro* klonalny wzrost BFU-E [38]. Nukleotydy antysensowe skierowane przeciwko KL nie hamowały natomiast proliferacji komórek klonogennych innych linii krwiotwórczych jak GM-CFU czy CFU-Meg.

Podsumowując uzyskane dane, wykazaliśmy, że ludzkie komórki klonogenne układu czerwonokrwinkowego (BFU-E) w porównaniu z innymi (GM-CFU, CFU-Meg) są najbardziej wrażliwe na zaburzenia w prawidłowej funkcji tego receptora. Można również przyjąć, że na wczesnych etapach erytropoezy – we wroście kolonii erytropoetycznych – istotną rolę odgrywa mechanizm autokrynnnej interakcji receptora *c-kit* z KL. Komórki erytropoetyczne w trakcie dojrzewania tracą zdolność do syntezy KL i "uzależniają się" od jego produkcji przez komórki mikrośrodowiska w szpiku kostnym.

RECEPTOR DLA IGF-1

Opisano, że IGF-1 R występuje na limfocytach T i B, monocytach, komórkach stromalnych szpiku oraz hemopoetycznych komórkach klonogennych, jakimi są m.in. CFU-E [9, 24, 55]. Na receptor ten oddziałuje insulinopodobny czynnik wzrostowy – 1 (IGF-1) znany również w piśmiennictwie jako somatomedyna-C. IGF-1 produkowany jest przez hepatocyty i komórki podścieliska szpiku kostnego [24]. Synteza jest kontrolowana przez wydzielany przez przysadkę mózgową hormon wzrostu [21, 57]. Opisano, że IGF-1 dodany do hodowli komórek ludzkiego szpiku *in vitro* kostymuluje współdziałając z klasycznymi czynnikami hemopoetycznymi tworzenie kolonii mieloidalnych. Zgodnie z powyższym stwierdzono, że IGF-1 zwiększa klonogenność ludzkich komórek ukierunkowanych: erytropoezy (CFU-E i BFU-E) [7, 8, 31, 52], granulocyto-monopoezy (GM-CFU) [30] i megakariopoezy (CFU-Meg) [21]. Opisano również, że przeciwciała swoiście blokujące ten receptor upośledzają tworzenie kolonii hemopoetycznych *in vitro* [31]. IGF-1 wg niektórych autorów stymuluje również wzrost komórek nowotworowych linii hemopoetycznych [15]. Zniesienie ekspresji IGF-1 R za pomocą swoistych oligomerów antysensowych skierowanych przeciwko jego mRNA hamowało bowiem proliferację komórek linii promielocytowej HL-60 [48].

Chcąc uzyskać własne dane oceniające udział IGF-1 R i jego ligandu w regulacji ludzkiej hemopoezy przeprowadziliśmy serię doświadczeń bezpośrednio oceniających wpływ IGF-1 na wzrost klonalny komórek ludzkiego szpiku. W badaniach wykorzystywaliśmy komórki szpiku, które wzbogacone były w hemopoetyczne KKU i tym samym w dużym stopniu pozbawione komórek dodatkowych. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 3. Mimo wielokrotnie powtarzanych doświadczeń z próbkami IGF-1 uzyskanymi z różnych źródeł nie potwierdziliśmy, aby powyższy czynnik wzrostowy kostymulował tworzenie kolonii hemopoetycznych w hodowlach komórek A^T lub CD34⁺ ludzkiego szpiku kostnego.

Uzyskane wyniki można było interpretować różnie. Po pierwsze, że ilość IGF-1 wystarczająca do stymulacji wzrostu kolonii zawarta już była w surowicy będącej składnikiem używanego przez nas medium hodowlanego, co powodowało, że efekt egzogenego, dodatkowo dodawanego do hodowli IGF-1 był niezauważalny [21]. Po drugie, że hemopoetyczne komórki klonogenne wbrew temu, co się powszechnie przypuszcza, wcale nie odpowiadają

zwiększoną proliferacją na stymulację tym czynnikiem. Można było wreszcie przyjąć, że IGF-1 R nie występuje na powierzchni hemopoetycznych komórek klonogennych, czyli tych, które ocenialiśmy w wykonywanych testach proliferacyjnych *in vitro*.

TABELA 3. Wpływ IGF-1 na wzrost klonalny ludzkich komórek hemopoetycznych (dane uzyskane z hodowli komórek szpiku od 5 zdrowych dawców)*

Rodzaj kolonii	Ilość IGF-1 w ng/ml			
	0	10	50	100
CFU-E**	330±199	334±202	348±175	351±214
BFU-E***	238± 90	233±119	252±116	236±110
CFU-Meg**	79± 10	84± 22	88± 13	83± 10
GM-CFU***	474±216	–	–	458±216

*Wzrost kolonii stymulowano odpowiednio: CFU-E: EpO 5 j/ml, BFU-E: EpO 5 j/ml + IL-3 20 j/ml, GM-CFU: IL-3 20 j/ml + GM-CSF 5 ng/ml, CFU-Meg: IL-3 20 j/ml + IL-6 20 j/ml + EpO 5 j/ml; **Liczba kolonii w przeliczeniu na 2×10^5 hodowanych komórek szpiku pozbawionych komórek adherentnych i limfocytów T hodowanych w skrzepie osocza; ***Liczba kolonii w przeliczeniu na 2×10^4 komórek CD34⁺ szpiku hodowanych w pożywce z metylcelulozą

Chcąc uzyskać odpowiedź na powyższe pytania wykorzystaliśmy nie stosowaną do tej pory przez innych badaczy strategię doświadczalną [44]. Postanowiliśmy bowiem wyizolować ze szpiku kostnego komórki IGF-1 R⁺. Można było przypuszczać, iż w przypadku, gdyby IGF-1 R znajdowałyby się rzeczywiście na powierzchni komórek klonogennych, wyseparowane komórki powinny tworzyć w hodowlach *in vitro* kolonie hemopoetyczne. W badaniach naszych porównywaliśmy wzrost wyizolowanych ze szpiku kostnego komórek IGF-1 R⁺ ze wzrostem klonalnym wyselekcjonowanych komórek, które miały antygen CD34⁺. Antygen CD34⁺ jest, jak wiadomo, jednym z markerów komórek macierzystych i klonogennych w układzie krwiotwórczym [2, 32].

Postępując się zarówno metodami immunomagnetycznymi separacji komórek, jak i techniką FACS stwierdziliśmy, że pośród komórek jednojądrowych A⁺T⁻ szpiku kostnego ok. 2,5% komórek ma fenotyp CD34⁺ i ok. 5,5% komórek jest komórkami IGF-1 R⁺. Wyniki hodowli *in vitro* powyższych frakcji komórkowych przedstawiono w tabeli 4. Jak widać komórki IGF-1 R⁺ w przeciwieństwie do komórek CD34⁺ lub komórek jednojądrowych szpiku pozbawionych komórek adherentnych i limfocytów T (A⁺T⁻) okazały się nieklonogenne. Był to dowód przemawiający za tym, że obydwie izolowane ze szpiku kostnego frakcje: komórki CD34⁺ i IGF-1 R⁺ są prawdopodobnie dwiema odrębnymi populacjami. Aby uzyskać dodatkowy dowód popierający to założenie, postanowiliśmy wykorzystać całą technikę RT-PCR. Za pomocą powyższej metody poszukiwaliśmy ekspresji dla mRNA kodującego IGF-1 R w komórkach o fenotypie CD34⁺. W wielokrotnie przeprowadzanych, niezależnych badaniach okazało się, że świeżo wyizolowane ze szpiku kostnego komórki CD34⁺, jak i komórki CD34⁺ stymulowane czynnikami wzrostowymi nie wykazywały obecności mRNA dla IGF-1 receptora. Był to kolejny dowód na to, że we frakcji komórek CD34⁺, które zawierają KKU tworzące kolonie w testach *in vitro*, nie występują komórki mające IFG-1 R.

W celu uzyskania ostatecznego dowodu, że IGF-1 R nie występuje na ludzkich KKU postanowiliśmy zastosować strategię antysensów [10, 42, 44]. Zgodnie z powyższym komórki CD34⁺ lub A⁺T⁻ inkubowano z oligodeoksynukleotydami antysensowymi skierowanymi

przeciwko mRNA dla IGF-1 R. Oligonukleotydy te, jak wykazano we wstępnych badaniach, skutecznie hamowały ekspresję IGF-1 R w komórkach IGF-1 R⁺ oraz w komórkach hemopoetycznych linii nowotworowych, które mają ten receptor. W kilkakrotnie powtórzonych doświadczeniach okazało się, że powyższe oligomery antysensowe skierowane przeciwko mRNA kodującemu IGF-1 R nie hamowały natomiast wzrostu *in vitro* kolonii hemopoetycznych w hodowlach komórek CD34⁺ lub A^T.

TABELA 4. Klonogenność różnych frakcji komórek izolowanych ze szpiku kostnego* (dane z hodowli komórek szpiku od 5 zdrowych dawców)

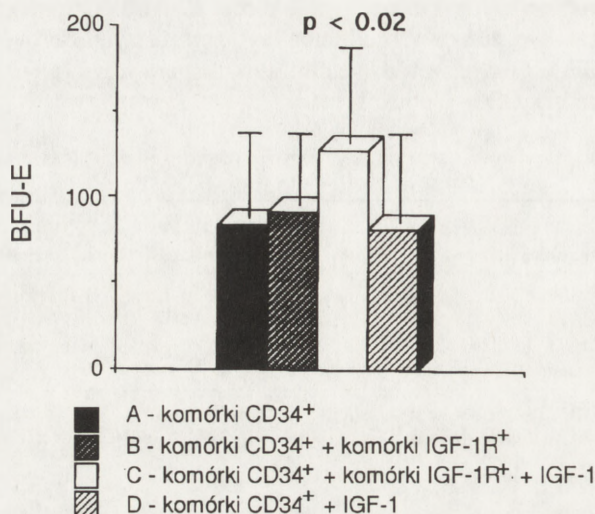
Rodzaj kolonii	10 ⁵ A ^T jednojądrowych komórek szpiku	2x10 ⁴ CD34 ⁺ komórek szpiku	2x10 ⁴ IGF-1 R ⁺ komórek szpiku
CFU-E	325±164	nie badano	brak wzrostu
BFU-E	213± 75	191± 62	brak wzrostu
GM-CFU	392± 93	375±113	brak wzrostu
CFU-Mix	nie badano	21± 3	brak wzrostu

*Wzrost kolonii rosnących w pożywce z metylocelulozą stymulowano odpowiednio za pomocą: CFU-E: EpO 5 j/ml, BFU-E: EpO 5 j/ml +IL-3 20 j/ml, GM-CFU: IL-3 20 j/ml + GM-CSF 5 ng/ml, CFU-Mix: EpO 5 j/ml + IL-3 20 j/ml + GM-CSF 5 ng/ml + KL 100 ng/ml

Uwzględniając fakt, że w szpiku kostnym występują komórki mające IGF-1 R oraz to, że wielu badaczy wykazało, że IGF-1 stymuluje hemopoezę szczególnie w warunkach hodowli bez surowicy (ang. *serum free cultures*) [2, 8, 51], postanowiliśmy sprawdzić, czy rola IGF-1 w hemopoezie ludzkiej nie jest pośrednia, tzn. czy IGF-1 nie stymuluje komórek IGF-1 R⁺ do wydzielania innych czynników wzrostowych, które z kolei wtórnie stymulują tworzenie kolonii. Biorąc pod uwagę dystrybucję receptora IGF-1 na komórkach hemopoetycznych, można przypuszczać, że źródłem szpikowym komórek IGF-1 R⁺ są zarówno limfocyty T i B, jak i komórki monocytarne [55]. Komórki te, jak wiadomo, mogą wydzielać różne hemopoetyczne czynniki wzrostowe.

Doświadczenia mające udzielić odpowiedzi na powyższe pytanie przeprowadziliśmy w hodowlach o niskim stężeniu surowicy (2%). Wyniki doświadczenia przedstawiono na rysunku 2. Jak jest to widoczne, ani sam IGF-1 ani same komórki IGF-1 R⁺ dodane do hodowli komórek CD34⁺ nie zwiększały liczby rosnących kolonii. Znamienny statystycznie efekt zwiększenia klonogenności komórek CD34⁺ ($p < 0,02$) obserwowaliśmy dopiero wtedy, gdy do hodowli w medium ubogosurowicznym dodaliśmy jednocześnie komórki IGF-1 R⁺, jak i egzogeny IGF-1. Doświadczenie to przemawia za pośrednią rolą IGF-1 w regulacji ludzkiej hemopoezy poprzez komórki IGF-1 R⁺.

Podsumowując uważamy, że rola IGF-1 w stymulacji wzrostu ludzkich hemopoetycznych komórek klonogennych jest pośrednia. Efekt stymulujący IGF-1 jest szczególnie widoczny w hodowlach ubogosurowicznych, uwolnionych od wpływu innych zawartych w surowicy czynników wzrostowych. Zgodnie z powyższym IGF-1 oddziałuje na komórki mające IGF-1 R i stymuluje je do wydzielania różnych czynników wzrostowych lub cytokin, które pobudzają wzrost komórek klonogennych. Oczywiście na obecnym etapie badań nie możemy wykluczyć, że czynnik ten odgrywa ważną, bezpośrednią rolę w proliferacji najwcześniejszych KKM, których przedziału nie byliśmy w stanie ocenić za pomocą stosowanych przez nas w pracy testów opartych na proliferacji komórek szpiku *in vitro*. IGF-1 jako ważny czynnik wzrostowy



Rys. 2. Komórki CD34⁺ szpiku kostnego w hodowlach ubogosurowiczych stymulowano do wzrostu kolonii erytroidalnych za pomocą Epo (5 j/ml) i IL-3 (20 j/ml); przedstawiono wyniki hodowli komórek szpiku od 5 zdrowych dawców: A – hodowle samych komórek CD34⁺, B – hodowle komórek CD34⁺, do których dodano komórki IGF-1R⁺, C – hodowle komórek CD34⁺, do których dodano komórki IGF-1R⁺ oraz IGF-1 (50 ng/ml), D – hodowle komórek CD34⁺, które kostymulowano za pomocą IGF-1 (50 ng/ml)

dla komórek mezodermalnych może bowiem odgrywać ważną rolę w trakcie ontogenezy układu krwiotwórczego, regulując wytwarzanie płodowych komórek hemopoetycznych [22].

RECEPTOR STK-1

Receptor STK-1 jest ludzkim homologiem receptora FLT3/FLK2, który opisano ostatnio na najwcześniejszych komórkach hemopoetycznych u myszy [28, 29]. Receptor STK-1 występuje na komórkach CD34⁺ i zanika stopniowo podczas ich różnicowania i dojrzewania [54]. Ligand receptora STK-1 nie został jeszcze do tej pory opisany. Biorąc pod uwagę dystrybucję STK-1R można przypuszczać, że ligand ten okaże się ważnym czynnikiem wzrostowym oddziałującym na najwcześniejsze komórki układu krwiotwórczego.

Oceniając udział STK-1R w regulacji ludzkiej hemopoetyki wykorzystaliśmy ponownie strategię antysensów. W tym celu komórki ludzkiego szpiku ekspozycją na swoiste oligodeoksynukleotydy antysensowe skierowane przeciwko mRNA kodującemu receptor. Komórki takie po ekspozycji do oligomerów wysiewano następnie do naczyń hodowlanych zawierających pożywkę z metylocelulozą. Okazało się, że zniesienie ekspresji STK-1R za

pomocą swoistych oligomerów antysensowych powodowało zahamowanie wzrostu kolonii tworzonych przez KКУ szpiku ludzkiego. Większe zahamowanie widzieliśmy na poziomie wcześniejszych komórek ukierunkowanych, jakimi są CFU-Mix, niż na poziomie bardziej dojrzałych już GM-CFU czy BFU-E. Największy wpływ hamujący obserwowaliśmy natomiast wobec komórek inicjujących hodowle długoterminowe szpiku. Jak się powszechnie przyjmuje, komórki te są najbardziej zbliżone do KKM spośród wszystkich komórek ocenianych w dostępnych obecnie testach hodowlanych *in vitro* [14]. Wyniki powyższego doświadczenia przedstawiono na rysunku 2. W badaniu tym ludzkie komórki CD34⁺ inkubowano z oligomerem o sekwencji antysensu bądź kontrolnym oligomerem o sekwencji sensu do mRNA dla STK-1 R. Następnie komórki takie nawarstwiano na hodowane *in vitro*, napromienione ludzkie komórki fibroblastoidalne podścieliska krwiotwórczego. Fibroblasty podścieliska są w powyższym modelu źródłem zarówno czynników wzrostowych, jak i molekuł adhezyjnych.

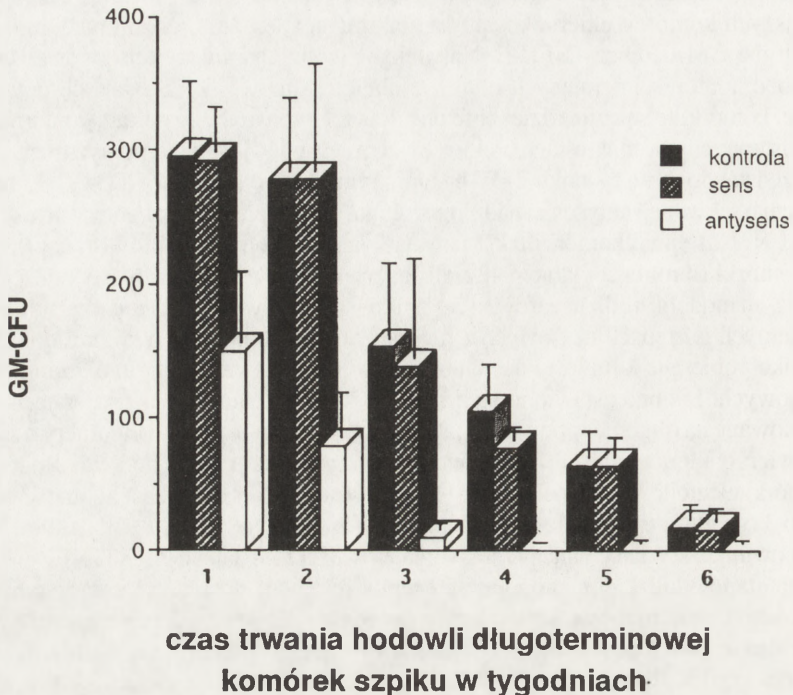
W kolejnych odstępach czasowych z prowadzonych w ten sposób kolonii długoterminowych szpiku pobierano komórki i oceniano ich zdolność do wzrostu kolonii granulocytowo-makrofagowych. Jak przedstawiono na rysunku 3, hodowle kontrolne, zawierające komórki nieeksponowane na oligomery podobnie jak hodowle eksponowane na oligomery o sekwencji sensu, zawierały klonogenne GM-CFU jeszcze w 6 tygodniu trwania hodowli długoterminowej. Komórki eksponowane na oligomery antysensowe traciły natomiast zdolność tworzenia kolonii po 3 tygodniu trwania doświadczenia.

Posumowując, uzyskane dane przemawiają za ważną rolę, jaką pełni STK-1 R w regulacji wczesnych etapów ludzkiej hemopoetyzy. Receptor ten może dostarczać komórkom inicjującym hodowle długoterminowe szpiku bodźca zwiększającego proliferację, hamującego apoptozę lub służyć jako molekula adhezyjna, która "wiąże" je do komórek fibroblastoidalnych podścieliska szpiku. Receptor ten jest również ważny w proliferacji bardziej dojrzałych już hemopoetycznych komórek ukierunkowanych, jakimi są CFU-Mix, a także dojrzałych od tych ostatnich: GM-CFU i BFU-E.

RECEPTOR DLA CSF-1

Receptor dla makrofagopoetyny, czyli M-CSF (ang. *Macrophage Colony Stimulating Factor*), znanej również pod nazwą CSF-1 (ang. *Colony Stimulating Factor-1*) odgrywa ważną rolę w proliferacji komórek linii monocytowo-makrofagowej [34, 53]. Receptor ten ulega ekspresji na powierzchni wymienionych komórek. W płynach pozaustrojowych stwierdza się natomiast tzw. formę rozpuszczalną białka receptorowego (ang. *soluble receptor*), która jest uwalniana do środowiska w wyniku enzymatycznego odłączenia domeny wiążącej ligand z powierzchni błony komórkowej [53]. Rola, jaką pełni białko receptorowe w postaci wolnej, w ustroju jest mało poznana. Przypuszcza się, że może ono odgrywać pewną rolę w regulacji poziomu wolnego ligandu w płynach ustrojowych i tym samym jego dostępności dla postaci receptora trwale związanej z powierzchnią błony komórkowej.

Ligand receptora CSF-1 jest produkowany przez komórki podścieliska szpiku oraz pobudzone monocyty. Opisano dwie formy tego czynnika wzrostowego, które są wynikiem odmiennego "splajcingu" cząsteczki mRNA [53]. Pierwsza z nich jest trwale związana z powierzchnią komórek, a druga tzw. rozpuszczalna występuje w postaci wolnej w płynach ustrojowych. Jak wiadomo, pod wpływem stymulacji CSF-1 komórki ukierunkowane makro-



Rys. 3. Liczby klonogennych GM-CFU w poszczególnych hodowlach zawierających komórki CD34⁺; komórki CD34⁺ inkubowano przez 48 godzin z oligodeoksynukleotydami antysensowymi o sekwencji sensu lub antysensu przeciwko mRNA kodującemu STK-1 R, następnie komórki te nawarstwiano w hodowlach płynnych na napromienione fibroblasty starając się uzyskać hodowle długoterminowe szpiku; w odstępach tygodniowych odzyskiwano komórki wolno pływające w medium i badano zdolność do tworzenia przez nie w metylocelulozie kolonii granulocytowo-makrofagowych

fagopoezy, czyli CFU-M (ang. *Colony Forming Units of Macrophages*) tworzą w hodowlach *in vitro* kolonie zbudowane z monocytów i makrofagów. Uważa się, że stopień i wzór glikozylacji CSF-1 odgrywa kluczową rolę w jego powinowactwie do substancji międzykomórkowej, tzw. matrix [33, 56]. Fakt ten decyduje w dużym stopniu o dystrybucji narządowej, jak i tropizmie tkankowym CSF-1.

Gen kodujący CSF-1 R przypomina pod względem budowy gen dla receptora *c-kit* i przypuszcza się, że ewolucyjnie powstał on w wyniku duplikacji genu kodującego *c-kit* R [53]. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że transkrypcja genu kodującego CSF-1 R na komplementarny mRNA regulowana jest przez dwa różne promotory odległe od siebie o blisko 26 kb [50]. Proksymalny promotor reguluje ekspresję genu w monocytach, dystalny zaś w komórkach trofoblastu łożyska. Czy podobna sytuacja ma miejsce w regulacji ekspresji pokrewnego mu strukturalnie receptora *c-kit*, np. w komórkach hemopoetycznych i melanocytach, pokażą prowadzone obecnie przez nas badania.

Sygnal CSF-1 R jest również niezbędny w powstawaniu, a także prawidłowym funkcjonowaniu komórek kościogubnych (osteoklastów). U myszy z mutacją locus *op* (*osteopetrotic*) stwierdzono zaburzenia w syntezie ligandu CSF-1 R [59, 62]. Przypuszcza się, że defekt w prawidłowej ekspresji CSF-1 może być również odpowiedzialny za niektóre przypadki ludzkiej osteopetrozy. W patomechanizmie tego schorzenia rozważa się możliwość zarówno defektu syntezy formy wolnej ligandu, co prowadzi do zmniejszenia jego stężenia w płynach ustrojowych, jak i zmiany dotyczące potranslacyjnej glikozylacji rdzenia białkowego CSF-1 mogące wpływać na jego dystrybucję tkankową [33].

RECEPTOR DLA bFGF

Zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*) produkowany jest w szpiku kostnym przez komórki podścieliska [6]. Jego obecność stwierdzono także w megakariocytach, płytkach krwi, makrofagach i komórkach linii granulocytopoetycznej [6]. Uważa się, że sam bFGF nie stymuluje wzrostu komórek krwiotwórczych. Pojawiły się jednak prace przemawiające za jego udziałem jako kostymulatora wzrostu kolonii hemopoetycznych. Według niektórych badaczy bFGF szczególnie w niskich dawkach kostymuluje komórki szpiku i krwi obwodowej do wzrostu kolonii granulocytowo-makrofagowych, erytropoetycznych i megakariocytowych [18]. W jednym z doniesień opisano wpływ stymulujący bFGF na wzrost wczesnych kolonii hemopoetycznych tzw. CFU-Blast, tworzonych przez frakcje komórek o wzorze antygenowym: CD34⁺, CD33⁻, HLA DR⁺, a więc znacznie wzbogaconej w KKM [17]. Stwierdzono również, że bFGF jest odpowiedzialny za inicjowanie i kontynuację hemopoetyzy w hodowlach długoterminowych szpiku [60]. Ostatnio opisano z kolei, że najwcześniejsze, wielopotencjalne komórki ludzkiego szpiku płodowego o wzorze antygenowym: CD34⁺, CD38⁻, HLA DR⁻ wymagają do optymalnego wzrostu obecności bFGF w medium hodowlanym [22].

Rola receptora dla bFGF w regulacji ludzkiej hemopoetyzy wymaga jednak dalszych wnikliwych badań. Do tej pory nie przedstawiono bowiem dowodu świadczącego o tym, że receptor dla tego czynnika wzrostowego jest rzeczywiście obecny na wczesnych komórkach krwiotwórczych. Z wstępnych badań przeprowadzonych w naszym ośrodku wynika, że wyizolowane ze szpiku ludzkie komórki mające receptor dla bFGF nie są klonogenne. Może się więc okazać, że analogicznie jak w przypadku IGF-1, działanie bFGF stymulujące krwiotworzenie może być pośrednie, poprzez wpływ na dodatkowe komórki hemopoetyczne (ang. *accessory cells*). Dalszych badań wymaga również ocena roli, jaką pełni bFGF w regulacji hemopoetyzy płodowej.

RECEPTOR DLA PDGF

Opublikowane kilka lat temu wstępne dane przemawiające za bezpośrednim udziałem PDGF A i PDGF B w stymulowaniu ludzkich klonogennych komórek hemopoetycznych, a szczególnie komórek linii erytroidalnej [11] nie zostały potwierdzone [13]. Jak wiadomo, obydwa wymienione czynniki wzrostowe produkowane są przez komórki stromalne i endo-

telialne naczyń krwionośnych w szpiku kostnym. Obecność ich stwierdzono również w megakariocytach i płytkach krwi [23]. Jak się jednak uważa, komórki krwiotwórcze nie mają receptora dla żadnej z form PDGF. Obserwowany efekt hemopoetyczny w hodowlach, do których dodano PDGF, zależy prawdopodobnie od pośredniej stymulacji i aktywacji komórek podścieliska szpiku kostnego.

Podumowując przedstawione dane, opisane do tej pory receptory hemopoetyczne mające wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej możemy podzielić na trzy grupy. Grupa pierwsza to receptory bezpośrednio regulujące m.in. proliferację i różnicowanie najwcześniejszych komórek układu krwiotwórczego. Zalicza się do niej STK-1 R i *c-kit* R. W drugiej grupie należy umieścić CSF-1 R, który jest ograniczony do linii hemopoetycznej dającej początek komórkom linii monocytowo-makrofagowej. W trzeciej grupie receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej należy z kolei zamieścić: IGF-1 R, PDGF R oraz prawdopodobnie bFGF R, których udział w regulacji krwiotworzenia jest pośredni. Jak wiadomo, receptory te występują na komórkach dodatkowych szpiku kostnego (ang. *accessory cells*). Komórki te po pobudzeniu swoistymi ligandami mogą w sprzyjających warunkach wydzielać różne czynniki hemopoetyczne stymulujące krwiotworzenie. Jednocześnie nie można wykluczyć, że zarówno IGF-1 i bFGF jako mezodermalne czynniki wzrostowe odgrywają ważną rolę w ontogenezie układu krwiotwórczego, regulując proliferację płodowych komórek hemopoetycznych.

Należy również pamiętać o tym, że do tej pory nie opisano receptora mającego wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej, który byłby swoisty dla komórek układu krwiotwórczego. Można również przypuszczać, że dzięki postępom biologii molekularnej lista odkrytych receptorów kinazy tyrozynowej, szczególnie tych które występują na najmłodszych komórkach hemopoetycznych, wkrótce się powiększy. Badania nad receptorami tej grupy mają również ważne znaczenie praktyczne w hematologii klinicznej. Nie trudno się bowiem domyślić, że poznanie mechanizmów regulujących najwcześniejsze etapy krwiotworzenia będzie stanowić podstawę do opracowania nowych skutecznych strategii leczenia schorzeń układu krwiotwórczego.

LITERATURA

- [1] AARONSON AA. Growth factors and cancer. *Science* 1991; **254**: 1146–1153.
- [2] AKAHANE K, TOJO A, URABE A, TAKAKU F. Pure erythropoietic colony and burst formation in serum-free culture and their enhancement by insulin-like growth factor 1. *Exp Hematol* 1987; **15**: 797–802.
- [3] AYE MT, HASHEMI S, LECLAIR B, ZEIBDAWI A, TRUDEL E, HALPENNY M, FULLER V, CHENG G. Expression of stem cell factor and *c-kit* mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). *Exp Hematol* 1992; **20**: 523–527.
- [4] BRANDT J, BRIDDELL RA, SROUR EF, LEEMHUIS TB, HOFFMAN R. Role of *c-kit* ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1992; **79**: 634–641.
- [5] BROXMEYER HE, COOPER S, LU L, HAGVE G, ANDERSON D, COSMAN D, LYMAN SD, WILLIAMS DE. Effect of murine mast cell growth factor (*c-kit* protooncogene ligand) on colony formation by human marrow hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1991; **77**: 2142–2149.
- [6] BRUNNER G, NGUYEN H, GABRILOVE J, RIFKIN DB, WILSON EL. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. *Blood* 1993; **81**: 631–638.
- [7] CLAUSTERS M, CHATELAIN P, SULTAN Ch. Insuline-like growth factor stimulates human erythroid colony formation in vitro. *J Clin Endocrinol Met* 1987; **65**: 78–82.

- [8] CORREA PN, AXELRAD AA. Production of erythropoietic bursts by progenitor cells from adult human peripheral blood in an improved serum-free medium: role of insulinlike growth factor-1. *Blood* 1991; **78**: 2823–2833.
- [9] COTTON EW, MEANS RT, CLINE SM, KRANTZ SB. Quantitation of insuline like growth factor-1 binding to highly purified human erythroid colony-forming units. *Exp Hematol* 1991; **19**: 278–281.
- [10] CROOKE RM. In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Design* 1991; **6**: 609–646.
- [11] DAINIAK N, DAVIES G, KALMANTI M, LAWLER J, KULKORNI V. Platelet-derived growth factor promotes proliferation of erythroid cells in vitro. *J Clin Invest* 1983; **71**: 1206–1241.
- [12] DEBREUIL P, ROTTAPPEL R, REITH AD, FORRESTER L, BERNSTEIN A. The mouse W/c-kit locus. *Ann NY Acad Sci* 1990; **599**: 58–65.
- [13] DELWICHE F, RAINES E, POWELL J, ROSS R, ADAMSON J. Platelet derived growth factor enhances in vitro erythropoiesis via stimulation of mesenchymal cells. *J Clin Invest* 1985; **76**: 137–142.
- [14] DEXTER TM, ALLEN TD, LAJTHA LG. Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977; **91**: 335–339.
- [15] ESTROV Z, MEIR R, BARAK Y, ZAIZOV R, ZADIK Z. Human growth hormone and insuline-like growth factor-1 enhance the proliferation of human leukemic blasts. *J Clin Oncol* 1991; **9**: 394–399.
- [16] FLEISCHMAN RA, SALTMAN DL, STASTNY V, ZNEIMER S. Deletion of the c-kit proto-oncogene in the human developmental defect piebald trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10885–10889.
- [17] GABBIANELLI M, SARGIACOMO M, PELOSI E, TESTA U, ISACCHI G, PESCHLE C. “Pure” human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1990; **249**: 1561–1564.
- [18] GALLICCHIO VS, HUGHES NK, HULETTE BC, DELLAPUCA R, NOBLITT L. Basic fibroblast growth factor (b-PGF) induces early- (CFU-S) and late-stage hematopoietic progenitor cell colony formation (CFU-gm, CFU-meg, and BFU-e) by synergizing with GM-CSF, MEG-CSF, and erythropoietin, and is radioprotective agent in vitro. *Int J Cell Cloning* 1991; **9**: 220–232.
- [19] GEWIRTZ AM. Therapeutic applications of antisense DNA in the treatment of human leukemia. *Ann NY Acad Sci* 1992; **660**: 178–187.
- [20] GIEBEL LB, SPRITZ RA. Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8696–8699.
- [21] HOOGHE R, DELHASE M, VERGANI P, MALUR A, HIIGHE-PETERS EL. Growth hormone and prolactin are paracrine growth and differentiation factors in the haematopoietic system. *Immunol Today* 1993; **14**: 212–214.
- [22] HUANG S, TERSTAPPEN WMM. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1993; **360**: 745–749.
- [23] KATOH O, KIMURA A, ITOH T, KURAMOTO A. Platelet derived growth factor messenger RNA is increased in bone marrow megakaryocytes in patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 1990; **35**: 145–150.
- [24] LANDRETH KS, NARAYANAN R, DORSHKIND K. Insuline-like growth factor-1 regulates pro-B cell differentiation. *Blood* 1992; **80**: 1207–1212.
- [25] LANGLEY KE, BENNETT LG, WYPYCH J, YANCIK SA, LIU XD, WESTCOTT KR, CHANG DG, SMITH KA, ZSEBO KM. Soluble stem cell factor in human serum. *Blood* 1993; **81**: 656–660.
- [26] LOWRY PH, DEACON D, WHITEFIELD P, MCGRATH HE, QUESENBERRY PJ. Stem cell factor induction of in vitro murine hematopoietic colony formation by “subliminal” cytokine combinations: The role of “anchor factors”. *Blood* 1992; **80**: 663–669.
- [27] LYMAN SD, WILLIAMS DE. Biological control of mast cell growth factor c-kit interactions may be mediated through alternative splicing of mRNAs. W: Murphy MJ jr. (red.) *Blood Cell Growth Factors: their Present and Future use in Hematology and Oncology*. Dayton. OH: AlphaMed Press 1991; 183–193.
- [28] MAROC N, ROTTAPPEL R, ROSNET O, MARCHETTO S, LAVEZZI CH, MANNONI P, BIRNBAUM D, DUBREUIL P. Biochemical characterization of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1993; **8**: 909–918.
- [29] MATTHEWS W, JORDAN CT, WIEGAND GW, PARDOLL D, LEMISCHKA IR. A receptor tyrosine specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* 1991; **65**: 1143–1152.
- [30] MERCHAV S, TATARSKY L, HOCHBERG Z. Enhancement of human granulopoiesis in vitro by biosynthetic insuline-like growth factor 1/Somatomedin C and human growth hormone. *J Clin Invest* 1988; **81**: 791–797.
- [31] MERCHAV S, TATARSKY I, HOCHBERG Z. Enhancement of erythropoiesis in vitro by human growth hormone is mediated by insuline-like growth factor 1. *Brit J Haematol* 1988; **70**: 267–271.
- [32] MOORE MAS. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991; **78**: 1–19.

- [33] NAFFAKHN, LEGALL S, DANOSO, HEARD JM, COURNOT G, MOTOYOSHI K, VILMER E. Macrophage colony-stimulating factor: serum levels and cDNA structure in malignant osteopetrosis. *Blood* 1993; **81**: 2817–2818.
- [34] NICOLA NA. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 45–77.
- [35] OLSSON I, GULLBERG U, LANTZ M, RICHTER J. The receptors for regulatory molecules of hematopoiesis. *Eur J Haematol* 1992; **48**: 1–9.
- [36] PAWSON T. Tyrosine kinases and their interactions with signalling proteins. *Current Opinion in Genetics and Development* 1992; **2**: 4–12.
- [37] PAWSON T, GISH GD. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 1992; **71**: 359–362.
- [38] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Regulation and function of the c-kit protooncogene in normal human hematopoiesis. *Blood* 1991; **78** (suppl.): 161a.
- [39] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, GEWIRTZ AM. The c-kit protooncogene in normal and malignant hematopoiesis. *Int J Cell Cloning* 1992; **10**: 205–214.
- [40] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, GEWIRTZ AM. Rola receptora c-kit i jego ligandu w regulacji procesów krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 187–204.
- [41] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, DERIEL K, ABRAHM J, CALABRETTA B, GEWIRTZ AM. Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1710–1714.
- [42] RATAJCZAK MZ, SKORSKI T. Potencjalne możliwości i perspektywy wykorzystania oligonukleotydów w onkologii klinicznej. *Pol Tyg Lek* 1992; **46**: 913–917.
- [43] RATAJCZAK MZ, SZCZYLIK C. Wewnątrzustrojowe inhibitory układu krwiotwórczego. *Pol Tyg Lek* 1992; **47**: 4–6.
- [44] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, MOORE J, RATAJCZAK J, GEWIRTZ AM. A reappraisal of the function of insuline like growth factor-1 (IGF-1) in the regulation of normal human erythropoiesis. *Blood* 1992; **80** (suppl 1): 151a.
- [45] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Role of the c-kit Proto-oncogene in normal and malignant haematopoiesis. W: *Molecular Biology of Haematopoiesis* Abraham N. (red.) vol 2. Andover, Great Britain, Intercept 1992; 449–456.
- [46] RATAJCZAK MZ, HIJIYA N, CATANIL, DERIEL K, LUGER S, MCGLAIVE PH, GEWIRTZ AM. Acute and chronic phase chronic myelogenous leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* 1992; **79**: 1956–1961.
- [47] RATAJCZAK MZ, LIGHT BL, RATAJCZAK J, KUCZYŃSKI WI, GEWIRTZ AM. Human erythropoiesis in vitro: definition and clinical implications, of “optimal” stimulatory conditions. *Cancer Res Ther Contr* 1993; **3**: (w druku).
- [48] REISS K, PORCU P, SELL C, PIETRZKOWSKI Z, BASERGA R. The insulin-like growth factor I receptor is required for the proliferation of hemopoietic cells. *Oncogene* 1992; **7**: 2243–2248.
- [49] RIORDAN ML, MARTIN JC. Oligonucleotide-based therapeutics. *Nature* 1991; **350**: 442–443.
- [50] ROBERTS WM, SHAPIRO LH, ASHMUN RA, LOOK AT. Transcription of the human colony stimulating-1 receptor gene is regulated by separate tissue-specific promoters. *Blood* 1992; **79**: 586–593.
- [51] SANDERS M, SORBA S, DAINIAK N. Insuline-like growth factors stimulate erythropoiesis in serum-substituted umbilical cord blood cultures. *Exp Hematol* 1993; **21**: 25–30.
- [52] SAWADA K, KRANTZ SB, DESSYPRIS EN, KOURY ST, SAWYER ST. Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insuline-like growth factor 1 and/or insulin for erythroid development. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1701–1709.
- [53] SHERR ChJ. Colony-Stimulating Factor-1 Receptor. *Blood* 1990; **75**: 1–12.
- [54] SMALL D, LEVENSTEIN M, KIME, BURROW S, AMIN S, CIVIN C. STK-1 is expressed in a subpopulation of human bone marrow enriched for CD34⁺ progenitor/stem cells and in a number of leukemic cell lines. *Blood* 1992; **80**: Suppl 1:1175.
- [55] STUART CHA, MEEHAN RT, NEALE LS, CINTRON NM, FURLANETTO RW. Insuline-like growth factor-1 binds selectively to human peripheral blood monocytes and B lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; **72**: 1117–1122.
- [56] SUZU S, OHTSUKI T, MAKISHIMA M, YANAI N, KAWASHIMA T, NAGATA N, MOTOYOSHI K. Biological activity of a proteoglycan form of macrophage colony-stimulating factor and its binding to type V collagen. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16812–16819.
- [57] THORNER MO, VANCE ML. Growth hormon. *J Clin Invest* 1988; **82**: 745–747.
- [58] WEISS M, YETZ-ALDAPE J, CROSIER PS, NATHAN DG, SIEFF CA. Committed hematopoietic progenitors of human bone marrow are restricted to the CD38⁺34⁺ fraction whereas c-kit expression is greatest in CD38⁺34⁺ cells. *Blood* 1991; **78** (suppl.): 161 a.

- [59] WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W, BARTOCCI A, FERRANTE AW, AHMEDANSARI A, SELL K, POLLARD JW, STANLEY ER. Total absence of colony stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4828–4831.
- [60] WILSON EL, RIFKIN DB, KELLY F, HANNOCKS MJ, GABRILOVE JL. Basic fibroblast growth factor stimulates myelopoiesis in long-term human bone marrow cultures. *Blood* 1991; **77**: 954–960.
- [61] WITTE ON. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell* 1990; **63**: 5–6.
- [62] YOSHIDA H, HAYASHI SI, KUNISADA T, OGAWA M, NISHIKAWA S, OKAMURA H, SUDO T, SCHULTZ LD, NISHIKAWA SI. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; **345**: 442–444.

Otrzymano: 04.07.1993 r.

Przyjęto: 20.08.1993 r.

Adres autorów: Uniwersytet Pensylwania, Filadelfia, USA

ORGANIZACJA STRUKTURALNA ANTEN ENERGETYCZNYCH FOTOSYSTEMU II*

THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE ENERGETIC ANTENNAE OF PHOTOSYSTEM II

Grzegorz JACKOWSKI

Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie. Absorpcja światła słonecznego w widzialnym zakresie widma przez cząsteczki barwników fotosyntetycznych wchodzące w skład kompleksów barwnikowo-białkowych pełniących rolę anten energetycznych PS II prowadzi do przejścia absorbujących cząsteczek w stan wzbudzenia elektronowego. Cząsteczka znajdująca się w stanie wzbudzenia elektronowego może przekazać, dzięki migracji ekscytonów, swoją energię sąsiadującej z nią w obrębie tego samego kompleksu barwnikowo-białkowego cząsteczce barwnika. Przekazywanie energii wzbudzenia na większe odległości, tzn. pomiędzy poszczególnymi kompleksami barwnikowo-białkowymi odbywa się z wykorzystaniem mechanizmu indukowanego rezonansu i ostatecznie prowadzi do dotarcia stanu wzbudzenia do centrów reakcji PS II. W centrach reakcji PS II energia wzbudzenia ulega konwersji inicjując stan rozdziału ładunków i transport elektronów przez przenośniki oksydoredukcyjne PS II, co z kolei umożliwia realizację dwóch podstawowych zadań PS II – fotoredukcji plastochinonu i utleniania wody. Stworzenie precyzyjnego modelu przechwytywania energii światła i migracji stanu wzbudzenia elektronowego w PS II jest uzależnione od opracowania modelu topologii holokompleksu PS II, a w szczególności topologii systemu, jaki tworzą kompleksy barwnikowo-białkowe pełniące rolę anten energetycznych. Model topologii systemu antenowego PS II może zostać opracowany z kolei dopiero po wyczerpującym scharakteryzowaniu anten energetycznych na poziomie submolekularnym i molekularnym. Przegląd stanu wiedzy odnośnie organizacji strukturalnej kompleksów antenowych PS II oraz topologii systemu antenowego PS II jest przedmiotem niniejszego opracowania.

Słowa kluczowe: PS II, LHC II, CP 29, CP 26, CP 24, antena energetyczna, struktura oligomeryczna, struktura subpopulacyjna

Summary. The interception of visible light energy by the molecules of photosynthetic antenna pigments of PS II creates an excited state of the molecules. The excitation can be delocalized along pigment molecules neighbouring in a single pigment-protein complex due to strong excitonic interactions. The transfer of excitation energy over long distances i.e. between pigment-protein complexes and to PS II reaction center occurs via Forster inductive-resonance. When the excitation energy reaches PS II reaction center it is converted into charge separation and a series of redox reactions mediated by electron transfer components of PS II. This enables the realization of two major functions of PS II i.e. a plastoquinone photoreduction and a water oxidation. Modeling for light trapping and excitation energy diffusion within PS II is strongly dependent on the better modeling of PS II holocomplex structural organization including the

*Niniejsze opracowanie zostało sfinansowane z funduszu Projektu Badawczego KBN nr 6 6296 92 03.

topology of antenna pigment-protein complexes. The description of the topology of pigment-protein complexes, in its turn, must await and exhaustive characterization of organization of antenna complexes at submolecular and molecular level. The current state of knowledge concerning the structural organization of single PS II antenna complexes and the supramolecular system built-up by them will be outlined below.

Key words: PS II, LHC II, CP 29, CP 26, CP 24, energetic antenna, oligomeric structure, subpopulational structure

Wykaz skrótów. chl – chlorofil, LHC II – zbierający światło kompleks chlorofil a/b-białko, współpracujący z PS II, LHCP II – białko kompleksu LHC II, PS II – fotosystem II

WSTĘP

Fotosystem II (PS II) jest supramolekularnym kompleksem realizującym dwa podstawowe zadania: utlenianie wody oraz redukcję plastochinonu, obecnym w błonach tylakoidowych wszystkich organizmów zdolnych do oksygenicznej fotosyntezy (cyjanobakterie, glony, rośliny wyższe).

Sekwencję reakcji zachodzących w obrębie PS II zapoczątkowuje utlenianie fotochemicznie aktywnej cząsteczki chl *a* (P680) z wykorzystaniem feofityny *a* jako pierwotnego akceptora elektronu [31, 44]. Powstanie pary (P680⁺ Feofityna⁻) oznacza zakończenie procesu nazywanego rozdziałem ładunku (*charge-separation*). Szybkie (250–550 ps) utlenianie feofityny *a*⁻, do którego dochodzi w rezultacie przeniesienia elektronu na specyficznie związane cząsteczki plastochinonu (w miejscach Q_A i Q_B), prowadzi do stabilizacji rozdziału ładunków niezbędnej dla fotosyntetycznego utleniania wody. Elektrony przeniesione przez plastochinon przejmują odrębny supramolekularny kompleks funkcjonalny błony tylakoidowej – cytochrom b6-f, którego zadaniem jest redukcja plastocyaniny [44]. Mechanizm utleniania wody pozostaje nieznany [20], jednak według powszechnie akceptowanej hipotezy, do uwolnienia jednej cząsteczki tlenu niezbędne jest zajście sekwencji czterech reakcji oksydoredukcyjnych w zawierającym mangan miejscu katalitycznym PS II [65]. Elektrony pochodzące z utlenionej wody uzupełniają dziury w P680⁺.

Przyjmuje się, że wszystkie przenośniki oksydoredukcyjne PS II operujące po redukującej stronie PS II, tzn. P680, feofityna i plastochinon oraz aktywne redukcyjnie reszty tyrozyny operujące po utleniającej stronie PS II są zasocjowane z heterodimerem transmembranowych białek D1 i D2 [44]. Białka te wraz z wymienionymi przenośnikami, kilkoma dodatkowymi grupami prostetycznymi (nieaktywny fotochemicznie chl *a*, β-karoten i żelazo niehemowe), heterodimerem transmembranowych polipeptydów α i β, koordynujących cytochrom b-559 oraz niskocząsteczkowym polipeptydem o masie 4,8 kDa (także transmembranowym) stanowią najmniejszy zdolny do realizacji rozdziału ładunków kompleks funkcjonalny PS II – centrum reakcji PS II [1, 35]. Dalszy efektywny transport elektronów i redukcję plastochinonu związanego z miejscem Q_A wymaga jednak udziału dodatkowych 2 lub 3 niskocząsteczkowych białek zapewne pełniących funkcje strukturalne [4, 48]. Zdolność do fotoredukcji plastochinonu oraz utleniania wody wykazują *in vitro* większe fragmenty PS II nazywane rdzeniem centrum reakcji PS II [27], kompleksem rdzeniowym [31] lub rdzeniem PS II [43]. Zawierają one, poza składnikami niezbędnymi dla redukcji plastochinonu dwa transmembranowe polipeptydy związane z chl *a* (apo CP 47 i apo CP 43) oraz luźno związane z błoną tylakoidową białko o masie cząsteczkowej 33 kDa [27, 28, 31, 43]. apo CP 47 i apo CP 43 przypisuje się funkcję wewnętrznych anten energetycznych PS II [11], podczas gdy białko 33

kDa stabilizuje część puli manganu zaangażowanego w utlenianie wody [45]. Cząstki rdzenia centrum reakcji PS II ujawniają zdolność do utleniania wody tylko w obecności нефизjologicznie wysokich stężeń Ca^{2+} i Cl^- , co jest przyczyną, dla której uważa się, iż *in vivo* utlenianie wody wymaga zaangażowania jeszcze większych fragmentów PS II. Fragmenty PS II zdolne do uwalniania tlenu w obecności niskich stężeń Ca^{2+} i Cl^- izolowano i nazwano kompleksem centrum reakcji PS II [27], uwalniającym tlen PS II [51] lub kompleksem PS II [23]. Poza składnikami charakterystycznymi dla rdzenia centrum reakcji, zawierają one przynajmniej dwa luźno związane z błoną tylakoidową polipeptydy (23 i 16 kDa), którym przypisuje się funkcję "koncentratów" nieorganicznych kofaktorów utleniania wody oraz funkcję strukturalną [38].

Energia niezbędna do redukcji plastochinonu i utleniania wody jest dostarczana do fragmentów PS II zaangażowanych w realizację tych procesów w formie energii wzbudzenia elektronów transportowanej przez system anten energetycznych PS II [8]. Do wzbudzenia dochodzi w rezultacie absorpcji energii światła w zakresie widzialnym widma słonecznego. Anteny energetyczne PS II reprezentują zespół kompleksów barwnikowo-białkowych o zróżnicowanym położeniu maksimów absorpcji, zawierających chl *a*, chl *b* i ksantofile związane z silnie hydrofobowymi polipeptydami transmembranowymi [29]. Kompleksy te tworzą system ukierunkowanego w stronę centrum reakcji PS II transferu energii. Transfer energii wzbudzenia pomiędzy sąsiadującymi w obrębie pojedynczego kompleksu barwnikowo-białkowego cząsteczkami barwników odbywa się z wykorzystaniem mechanizmu migracji ekscytonów i trwa 1 ps [61], jest więc znacznie krótszy niż czas utraty energii wzbudzenia, tzn. czas powrotu cząsteczki barwnika do najniższego stanu oscylacyjnego elektronowego stanu S1, który wynosi 100 ps [63]. Dzięki temu straty transferowanej energii zostają zminimalizowane. Badania symulacyjne jednoznacznie wskazują, że przyczyn zdolności anten energetycznych fotosyntezy do transferu energii z bardzo niewielkimi stratami należy szukać nie tylko na poziomie interakcji cząsteczek barwników w obrębie pojedynczego kompleksu barwnikowo-białkowego, lecz również na poziomie oddziaływań poszczególnych anten w obrębie tworzonego przez nie supramolekularnego systemu antenowego [26]. Powszecnie uważa się, że przenoszenie energii wzbudzenia pomiędzy kompleksami antenowymi oraz do kompleksu centrum reakcji PS II odbywa się z udziałem mechanizmu indukowanego rezonansu (forsterowskiego) [26].

Pełne wyjaśnienie przyczyn, dla których energia wzbudzenia przemieszcza się w obrębie PS II z bardzo wysoką wydajnością (straty związane z fluorescencją stanowią z reguły nie więcej niż 2% energii [8]), wymaga dysponowania szczegółowym modelem topologii holokompleksu PS II obejmującym organizację na poziomie supramolekularnym, molekularnym i submolekularnym systemu antenowego oraz kompleksu centrum reakcji PS II. Dzięki badaniom ostatniego dziesięciolecia udało się wniknąć dość głęboko w molekularną strukturę komponentów kompleksu centrum reakcji PS II oraz uzyskać pierwsze dane dotyczące wzajemnej organizacji przestrzennej białek tego fragmentu PS II [12, 15, 25]. Natomiast dopiero w ciągu ostatnich 3 lat wykonano prace nad organizacją systemu anten energetycznych [6, 59], co umożliwiło powstanie pierwszych schematów topologii holokompleksu PS II. Przedmiotem niniejszego opracowania jest przegląd stanu badań nad organizacją struktury systemu anten energetycznych z uwzględnieniem poziomu submolekularnego, molekularnego i supramolekularnego.

Od czasu opublikowania wcześniejszego polskojęzycznego opracowania przeglądowego [36] poświęconego antenom energetycznym PS II nastąpił bardzo znaczny postęp, zwłaszcza w badaniach dotyczących struktury supramolekularnej systemu antenowego PS II.

ORGANIZACJA STRUKTURALNA LHC II

Zbierający światło kompleks chlorofil *a/b*-białko współpracujący z fotosystemem II – określane jako LHC II przez zdecydowaną większość autorów lub jako LHC II_b przez grupę Thornbera [49] – jest najważniejszym kompleksem antenowym organizmów prowadzących oksygeniczną fotosyntezę. Kompleks ten cechuje się znacznym stopniem komplikacji wewnętrznej struktury – heterogeniczność stwierdzono na wszystkich poziomach organizacji LHC II, tj. sekwencji DNA kodującego polipeptydy tego kompleksu, samych polipeptydów (LHCP II), stanów oligomerycznych oraz na poziomie subpopulacji LHC II.

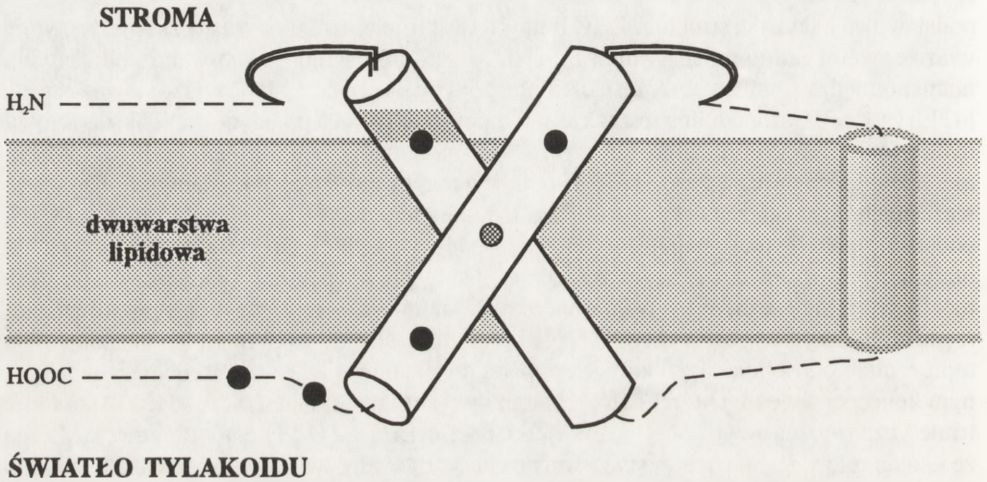
LHCP II są kodowane przez jądrowe sekwencje należące do wielogenowej rodziny o liczbie genów mieszczącej się w przedziale 5–15 [15]. W obrębie wspomnianej rodziny wyróżnia się dwa typy genów, a kryterium przynależności do określonego typu jest obecność lub brak intronu, a także długość sekwencji kodującej [15]. LHCP II są syntetyzowane na rybosomach cytoplazmatycznych jako hydrofilne formy prekursorowe (pLHCP II) cięższe o ok. 5 kDa od dojrzałych polipeptydów. Dzięki występowaniu na jej N-końcu tzw. peptydu tranzytowego, cząsteczka pLHCP II jest zdolna do wiązania się z otoczką chloroplastową, przeniesienia przez otoczkę i transportu przez stromę. Do odcięcia peptydu tranzytowego dochodzi najprawdopodobniej w czasie transportu pLHCP II przez stromę [16, 17], a LHCP II – po asocjacji z cząsteczkami chl *a*, chl *b* oraz ksantofili – włącza się w strukturę błony tylakoidowej. Odcinaniu peptydu tranzytowego towarzyszyć może (w doświadczeniach prowadzonych *in vitro*) proteolityczna obróbka pLHCP II do dwóch lub nawet większej liczby dojrzałych LHCP II, różniących się masą cząsteczkową [64]. Heterogeniczność mas cząsteczkowych LHCP II stwierdzana *in vivo* może zatem być uwarunkowana, oprócz heterogeniczności sekwencji kodujących, także procesami posttranslacyjnej proteolizy. LHCP II mogą być – *in vivo* i *in vitro* – fosforylowane (reszty fosforanowe dołączane są do reszt treoninowych w pobliżu N-końca hydrofilnego fragmentu cząsteczki polipeptydu), a ponieważ dotyczyć to może tylko części populacji określonego LHCP II, fosforylacja stanowi kolejne źródło heterogeniczności LHCP II.

Działanie wszystkich czynników determinujących heterogeniczność LHCP II prowadzi do sytuacji, w której, jak to stwierdzono dla wielu gatunków roślinnych, LHC II obejmuje 1–5 (najczęściej 2 lub 3) polipeptydów o masie cząsteczkowej mieszczącej się w przedziale 23–30 kDa [29]. Liczba polipeptydów jest *in vivo* zapewne jeszcze wyższa (6–8), na co wskazują doniesienia, w których rozdziału LHCP II dokonano z użyciem ogniskowania izoelektrycznego [58] lub wysokorozdzielczej techniki elektroforetycznej opartej na systemie buforowym ammediolu [56]. Nie uzyskano dotąd danych, które szczegółowo określałyby, w jakim stopniu stwierdzana *in vivo* heterogeniczność polipeptydów LHC II wynika ze zróżnicowania sekwencji kodujących, a w jakim stopniu z posttranslacyjnych modyfikacji (obróbka proteolityczna, fosforylacja). Istniejące, bardzo nieliczne dane sugerują, iż poszczególne LHCP II są produktami odrębnych genów. Dane te pochodzą z prac, w których sekwencjonowano fragmenty poszczególnych LHCP II uzyskane drogą trawienia endoproteolitycznego. Sekwencje amino-

kwasowe fragmentów różnych LHCP II okazały się identyczne z sekwencjami wydedukowanymi ze struktury pierwszorzędowej odrębnych genów kodujących LHCP II [37, 46]. Już kilkanaście lat temu zauważono [3], że LHC II można rozdzielić za pomocą łagodnie denaturujących technik elektroforetycznych (w trakcie tego typu elektroforez nazywanych "zielonymi żelami" kompleksy barwnikowo-białkowe nie dysocjują na składniki polipeptydowe i barwniki) na dwie frakcje różniące się znacznie tempem elektroforetycznej migracji. Zapoczątkowano w ten sposób intensywnie rozwijane w następnych latach badania nad heterogenicznością struktury holokompleksu LHC II. W rezultacie zastosowania do badań nad strukturą wewnętrzną kompleksu krystalografii elektronowej dwu- i trójwymiarowych kryształów LHC II [40], a także widm dichroizmu kołowego [43] i ultrawirowania analitycznego [13] detergentowych roztworów LHC II, wysunięto powszechnie dziś akceptowaną tezę, iż podstawową jednostką struktury LHC II *in vivo* jest trimer, tzn. trzy cząsteczki polipeptydów wraz ze swoim garniturem barwnikowym, związane – jak ostatnio sugerowano – oddziaływaniami pomiędzy fragmentami cząsteczek położonymi na granicy: błona tylakoidowa – stroma [41] (rys.1). Prawdopodobne jest także występowanie *in vivo* pojedynczych, niezasocjowanych z innymi cząsteczek polipeptydów, a więc monomerycznej formy LHC II [34]. Monomeryczna i trimeryczna forma LHC II odpowiadają dwóm frakcjom zidentyfikowanym we wczesnych doświadczeniach z zastosowaniem łagodnie denaturującej elektroforezy [3]. Na podstawie precyzyjnej analizy produktów solubilizacji PS II lub oczyszczonego LHC II, otrzymanych po użyciu różnych mieszanin detergentów, niektórzy badacze wskazują na możliwość istnienia *in vivo* – poza trimerelem i monomerem – również wyższego (niż trimer) rzędu oligomerycznych form LHC II [2, 49], natomiast włoski zespół Bassiego/Giacomettiego reprezentuje odosobnioną, jakkolwiek popartą dość interesującym materiałem doświadczalnym koncepcję, według której LHC II jest *in vivo* strukturą nonameryczną [10, 18], a formę trimeryczną można przypisać tylko niewielkiej części LHC II [18]. Niektórzy autorzy uważają, że istotną rolę w stabilizacji *in vivo* formy trimerycznej odgrywa kwas Δ^3 -transheksadecenowy, wchodzący w skład fosfatyloglicerolu [37, 59]. Sądzi się, że fosfatydyloglicerol jest, podobnie jak kilka innych fosfolipidów, integralnym składnikiem LHC II.

W dość skomplikowanej relacji wobec struktury oligomerycznej LHC II pozostaje tzw. struktura subpopulacyjna tego kompleksu. Subpopulacjami nazwano, na wczesnym etapie badań nad strukturą wewnętrzną LHC II, podjednostki LHC II różniące się kinetyką fosforylacji polipeptydów oraz siłą asocjacji z kompleksem centrum reakcji PS II [42, 60]. Na podstawie danych pośrednich przewidziano istnienie tzw. subpopulacji wewnętrznej, tj. podjednostki LHC II silnie związanej z kompleksem centrum reakcji PS II, charakteryzującej się wolną kinetyką fosforylacji polipeptydów oraz tzw. subpopulacji peryferycznej, podjednostki luźniej związanej z kompleksem centrum reakcji PS II. Związek subpopulacji peryferycznej z kompleksem centrum reakcji PS II jest na tyle słaby, że podjednostka ta może ulegać odwracalnej dysocjacji, po fosforylacji polipeptydów (co stanowi element regulacji dystrybucji energii wzbudzenia elektronowego pomiędzy PS I i PS II), przy czym fosforylacja zachodzi z większą prędkością niż w przypadku subpopulacji wewnętrznej [42]. Opierając się na koncepcji trimera jako podstawowej jednostki strukturalnej LHC II oraz na analizie porównawczej składu polipeptydowego LHC II serii mutantów chlorofilowych *soi* Morrissey i wsp. [47] stworzyli model architektury LHC II, według którego subpopulację wewnętrzną stanowią dwa nieidentyczne trimery, a subpopulację peryferyczną zmienna ilość identycznych trimarów. W tym samym czasie, dzięki zastosowaniu preparatywnego ogniskowania izoelektrycznego udało się rozfrakcjonować LHC II szpinaku na dwie podjednostki odpowiadające

właściami hipotetycznym dotąd subpopulacjom. Subpopulacje okazały się trimerami [58] o nieidentycznym składzie polipeptydowym. Z kolei Bassi i wsp. [10], nawiązując do wspomnianej powyżej hipotezy nonameru jako ważnego elementu struktury LHC II, przypisują subpopulacji peryferycznej LHC II kukurydzy strukturę trimery, podczas gdy subpopulacja wewnętrzna miałaby mieć organizację nonameryczną. Wydaje się zatem, że obydwie subpopulacje mogą być mozaiką różnej ilości nieidentycznych trimerów, część spośród których może tworzyć u niektórych gatunków (kukurydza) agregaty wyższego rzędu, np. nonamery.



Rys. 1. Model topografii pojedynczego łańcucha polipeptydowego – LHCP II wewnątrz błony tylakoidowej (wg [41], uproszczone): przez błonę przenikają trzy α -helikalne, hydrofobowe fragmenty cząsteczki, której N-koniec skierowany jest do stromy, a C-koniec do światła tylakoidu; czarne kropki oznaczają prawdopodobne miejsca ligacji cząsteczek chl; w oddziaływania międzycząsteczkowe, warunkujące istnienie in vivo struktury trimerycznej LHC II, zaangażowany jest prawdopodobnie region cząsteczki LHCP II zaznaczony na rysunku kreskami, stanowi on górny koniec jednej z transmembranowych α -helis, położony na styku: błona tylakoidowa – stroma

ORGANIZACJA STRUKTURALNA POZOSTAŁYCH KOMPLEKSÓW ANTENOWYCH PS II

Główną anteną energetyczną PS II jest LHC II, jednak PS II zasocjowany jest z co najmniej trzema innymi kompleksami antenowymi, które określano skrótami CP 29, CP 26 i CP 24 w związku z ich migracją w trakcie łagodnie denaturującej elektroforezy PS II [8]. Struktura tych kompleksów wykazuje znacznie mniejszy, w porównaniu z LHC II, stopień heterogeniczności.

a) **CP 29.** Według najnowszych doniesień polipeptydy CP 29 kodowane są przez jądrowe geny (występujące w genomie w pojedynczych kopiach) należące do dwóch typów nie

różniących się liczbą intronów [30, 52]. Z nielicznych badań, wykonywanych z zastosowaniem systemu transkrypcji/translacji *in vitro* wynika, że polipeptydy CP 29 syntetyzowane są jako hydrofilne prekursor o ok. 5 kDa cięższe od formy dojrzałej. Sposób wnikania form prekursorowych do chloroplastów oraz włączania w strukturę tylakoidów nie został, jak dotąd, poznany. Nie znaleziono dowodów na możliwość zróżnicowanej obróbki prekursorów, która prowadziłaby do powstawania różnych polipeptydów dojrzałych z jednej formy prekursorowej [52]. Stwierdzana u niektórych gatunków heterogeniczność polipeptydów CP 29 [14, 52] wydaje się być zatem wyłącznie odzwierciedleniem heterogeniczności odpowiednich sekwencji kodujących. CP 29 większości zbadanych gatunków roślin zawiera jednak tylko jeden polipeptyd o masie cząsteczkowej mieszczącej się w przedziale 26–31 kDa [19, 33, 49]. Problem struktury oligomerycznej CP 29 nie został jednoznacznie rozstrzygnięty – większość badaczy skłania się ku pogładowi, iż jedyną formą tego kompleksu *in vivo* jest monomer [49], ale koncepcja ta jest podważana przez zespół Bassiego/Giacomettiego przypisujący temu kompleksowi strukturę trimeryczną [5, 18].

b) **CP 26.** Brak jakichkolwiek danych odnośnie sekwencji kodujących polipeptydy tego kompleksu ani losów ewentualnych form prekursorowych. Zdaniem większości badaczy kompleks ten, w którego skład wchodzi z reguły dwa polipeptydy o masach cząsteczkowych mieszczących się w przedziale 26–30 kDa [19, 22, 49], jest *in vivo* monomerem [49]. Zespół Bassiego i Giacomettiego przypisuje mu natomiast strukturę trimeryczną [5, 18].

c) **CP 24.** Polipeptydy tego kompleksu są kodowane przez jeden typ jądrowych genów (występujących w genomie w dwóch kopiach) zawierających dwa introny [54], a syntetyzowane jako hydrofilne prekursor cięższe o ok. 5 kDa od formy dojrzałej [59]. Narazie nie można wskazać źródła stwierdzonej u szpinaku [19] heterogeniczności polipeptydów CP 24 (3 lub 4 polipeptydy) o masach cząsteczkowych 20–23 kDa. U pozostałych zbadanych gatunków roślinnych stwierdza się obecność tylko jednego polipeptydu [19, 49] i przypisuje kompleksowi organizację monomeryczną [49] lub trimeryczną [18].

SUPRAMOLEKULARNA ORGANIZACJA SYSTEMU ANTEN ENERGETYCZNYCH PS II

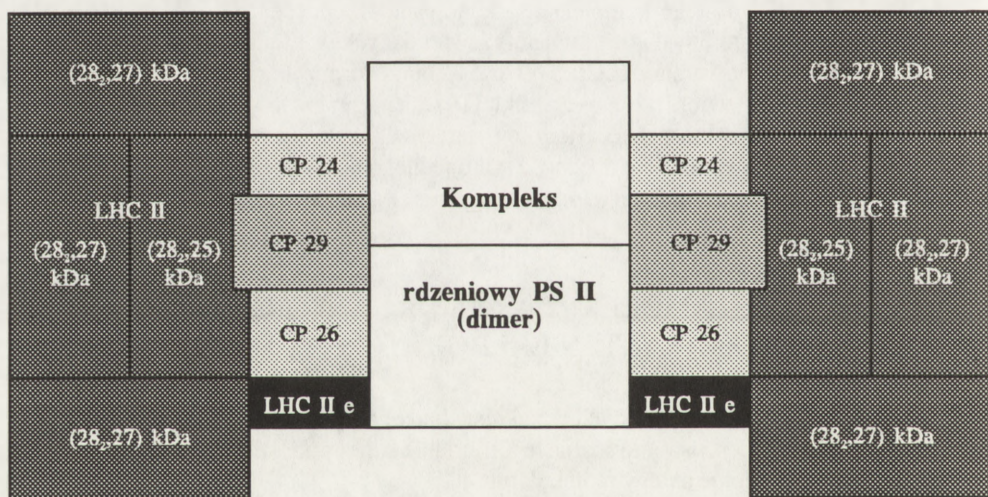
W dwóch laboratoriach wiodących w zakresie badań nad organizacją anten energetycznych PS II stworzono dość istotnie różniące się modele supramolekularnej struktury, w jaką powiązane są poszczególne anteny molekularne.

A. Model opracowany w pracowni Thornbera [49] (Uniwersytet Kalifornijski, Los Angeles, USA).

Model opracowany dla PS II jęczmienia [49], a przedstawiony w nieco zmienionej postaci na rysunku 2, opiera się na bardzo istotnym założeniu, że wszystkie anteny energetyczne PS II związane są z dimeryczną formą kompleksu rdzeniowego PS II, która jest – zdaniem autorów – natywną formą tego kompleksu [50]. Wśród anten sąsiadujących z kompleksem rdzeniowym znajduje się kompleks barwnikowo-białkowy oznaczony jako LHC IIe, nie opisany wcześniej w żadnym innym laboratorium, zawierający polipeptyd 12 kDa związany z chl *a*, chl *b* i znaczną ilością (w porównaniu z innymi antenami PS II) ksantofili. Pozostałe anteny to omówione poprzednio: LHC II, CP 29, CP 26 i CP 24. CP 29, CP 26, CP 24 i LHC IIe są zorganizowane jako monomery, podczas gdy LHC II zbudowany jest z dwóch rodzajów

struktur trimerycznych (subpopulacji) zawierających poszczególne LHCP II (28, 27 i 25 kDa) w różnych proporcjach. Na jeden kompleks rdzeniowy przypadają cztery subpopulacje. Sposób powiązania anten z kompleksem rdzeniowym nie został dokładnie określony, lecz na podstawie analizy składu fragmentów PS II uzyskiwanych drogą solubilizacji mieszaninami różnych detergentów autorzy uważają, że najbliższemu kompleksu rdzeniowego położony jest CP 29 (co wcześniej sugerowano w innych doniesieniach [11, 22]), a następnie, według wzrastającej odległości, CP 26, CP 24, LHC II (przy czym subpopulacja zawierająca polipeptyd 25 kDa ma być położona najbliżej). Stwierdzono, że jedna z subpopulacji LHC II (zawierająca polipeptyd 25 kDa) tworzy z CP 29 i CP 24 pentametryczną strukturę supramolekularną, która może stanowić łącznik między grupą drugiego rodzaju subpopulacji a kompleksem rdzeniowym. Drugi rodzaj subpopulacji (nie zawierający polipeptydu 25 kDa) tworzy agregat trzech trimerów, który może być izolowany w formie nienaruszonej przy zastosowaniu odpowiednio łagodnej preparatyki.

W trakcie przygotowywania niniejszej pracy przeglądowej do druku autorzy omawianego modelu opublikowali udoskonaloną jego wersję [62] różniącą się istotnymi szczegółami od pierwotnego modelu. Jak wynika z zamieszczonego schematu, Thornber i wsp. [62] uważają aktualnie, że LHC II jęczmienia obejmuje trzy rodzaje trimerów, tzn. (28₂, 25) kDa, (28₂, 27) kDa i (28₃) kDa, a nie dwa, tj. (28₂, 25) kDa i (28₂, 27) kDa, jak to sugerowano w pierwotnej wersji modelu (rys. 2).



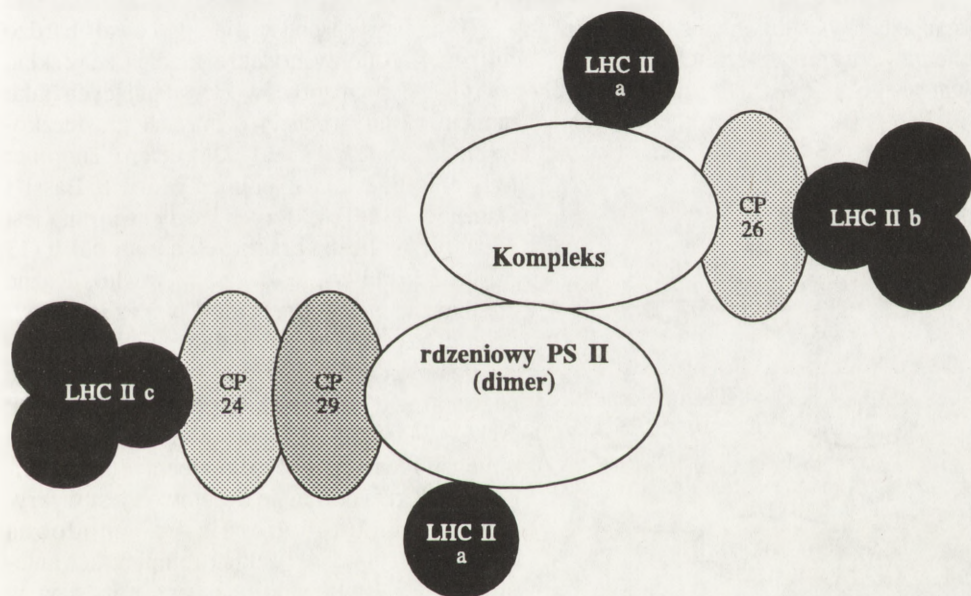
Rys. 2. Model organizacji systemu anten energetycznych PS II jęczmienia (wg [49], zmienione): LHC II składa się z czterech trimerycznych subpopulacji; podano masy cząsteczkowe polipeptydów wchodzących w skład poszczególnych trimerów

Przedstawiony model w jego pierwotnej postaci został wydedukowany na podstawie analizy składu fragmentów PS II – powstających w trakcie solubilizacji PS II kilkoma mieszaninami detergentów – rozdzielonych za pomocą łagodnie denaturujących technik elektroforetycznych. PS II solubilizowano mieszaninami słabych detergentów niejonowych (solubilizacja łagodna) lub mieszaninami zawierającymi silne detergenty niejonowe oraz detergenty jonowe (solubilizacja silnie dysocjująca). Supramolekularna struktura PS II ulegała w trakcie solubilizacji dysocjacji do mniejszych lub większych podjednostek. Jeśli wśród

powstałych podjednostek znajdowały się takie, które zawierały określoną parę anten energetycznych nawet w warunkach solubilizacji silnie dysocjującej, to można było sądzić, że anteny te związane są znacznymi (trudnymi do zerwania) siłami, a więc zapewne znajdują się blisko siebie wewnątrz PS II.

B. Model opracowany w pracowni Bassiego i Giacomettiego [6] (Uniwersytet w Padwie, Włochy)

Model, opracowany dla PS II kukurydzy [6], przedstawiony w nieco zmienionej postaci na rysunku 3, opiera się (podobnie jak poprzednio omówiony model) na założeniu, że wszystkie anteny energetyczne PS II związane są z dimeryczną formą kompleksu rdzeniowego, którą autorzy traktują jako natywną opierając się na własnych badaniach z wykorzystaniem krystalografii elektronowej dwuwymiarowych kryształów kompleksu rdzeniowego [7] (dimeryczna natura kompleksu rdzeniowego PS II wydaje się być udowodniona – jej istnienie sugerowali także inni autorzy na podstawie badań nad PS II termofilnej sinicy *Synechococcus* sp. [53]). Zestaw anten energetycznych rozmieszczonych wokół dwóch cząstek, składników dimeru kompleksu rdzeniowego, jest niejednakowy, co stanowi bardzo istotną cechę omawianego modelu, zasadniczo różniącą go od modelu omówionego powyżej. Zdaniem autorów



Rys. 3. Model organizacji systemu anten energetycznych PS II kukurydzy (wg [6], zmienione): LHC IIb i LHC IIc są nonamerycznymi subpopulacjami, każda z nich zasocjowana jest (za pośrednictwem różnych elementów systemu antenowego) z inną cząstką dimeru kompleksu rdzeniowego PS II, a każdy z trimerów wchodzących w skład LHC IIb i LHC IIc ma inny skład polipeptydowy; LHC IIa jest trimeryczną subpopulacją, zasocjowaną bezpośrednio z kompleksem rdzeniowym PS II

tylko taka organizacja PS II może tłumaczyć ułamkowe (1.5:1) molowe stosunki stechiometryczne pomiędzy polipeptydami CP 29, CP 26 i CP 24 a polipeptydami kompleksu rdzeniowego PS II. Jedna z cząstek kompleksu rdzeniowego pozostaje zasocjowana z CP 26, druga zaś z CP 29, które to anteny – podobnie jak CP 24 – cechuje organizacja trimeryczna. LHC II jest

reprezentowany przez dwa rodzaje nonamerów (75% całości) i jeden rodzaj trimery (25%), przy czym jeden z nonamerów wiąże się z CP 29 (poprzez CP 24), a drugi z CP 26, podczas gdy trimer wiąże się bezpośrednio z kompleksem rdzeniowym PS II. Każdy z nonamerów zbudowany jest z trzech różnych trimerów, a żaden z nich nie jest tożsamy z trimerym zasocjowanym bezpośrednio z kompleksem rdzeniowym PS II. Model zakłada zatem istnienie aż siedmiu różnych trimerycznych form LHC II, nie precyzując jednak, jaki mógłby być ich skład polipeptydowy. Taka mnogość trimerów LHC II kukurydzy jest zupełnie wyobrażalna, zważywszy, że LHC II tej rośliny zawiera aż pięć polipeptydów [9]. Jeden z nonamerów LHC II tworzy z CP 29 i CP 24 pentadekameryczną strukturę supramolekularną (strukturę o takim składzie, lecz o innym stanie oligomerycznym proponują autorzy poprzednio omówionego modelu), która jest zaangażowana w regulację dystrybucji energii ekscytacji pomiędzy PS I i PS II, odpowiada zatem definicji subpopulacji peryferycznej PS II.

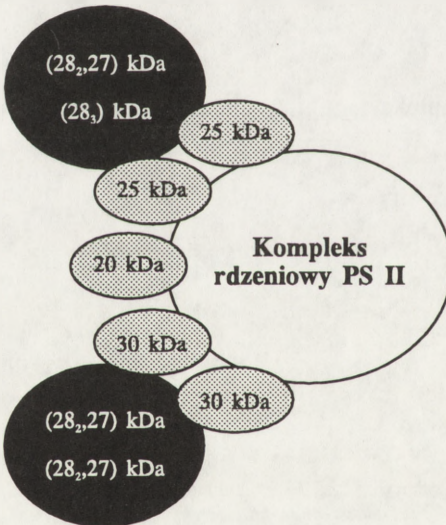
Przedstawiony model został wydedukowany na podstawie porównawczej analizy składu fragmentów powstających w trakcie solubilizacji PS II w obecności niskiego stężenia niejonowego detergentu, β -dodecylo maltozydu (solubilizacja łagodna) lub wysokiego stężenia β -dodecylo maltozydu (solubilizacja silnie dysocjująca).

Ostatnio Harrison i Melis [32] opublikowali wyniki prac (dotyczących jęczmienia) nad organizacją systemu anten energetycznych PS II, na których podstawie opracowali bardzo schematyczny model architektury tego systemu (rys. 4). Autorzy modelu zakładają, że w skład związanego z PS II systemu anten wchodzi tylko 5 polipeptydów (występujących jako monomery lub trimery) o masach cząsteczkowych 20, 25, 27, 28 i 30 kDa (Peter i Thormber [49] opisali 8 takich polipeptydów, a Bassi i Dainese – 9 [19]), z których każdy związany jest z identyczną liczbą cząsteczek chl *a* i chl *b* (13 cząsteczek chl/cząsteczka polipeptydu). Różne kombinacje tych polipeptydów wraz z ich barwnikami (uzyskane drogą solubilizacji PS II różnymi detergentami) stanowią to, co określa się nazwami LHC II, CP 29, CP 26 i CP 24, np. CP 26 i CP 24 mają – zdaniem autorów tego modelu – niemal identyczny skład polipeptydowy. Poli-

peptyd 28 kDa dominuje ilościowo i jest wykrywany immunologicznie z podobną efektywnością we wszystkich kompleksach antenowych PS II. Przytoczone dane pozostają w sprzeczności z:

(1) faktem, iż każda z anten energetycznych PS II zawiera unikalne polipeptydy [19, 49], jakkolwiek polipeptydy niektórych kompleksów mają bardzo podobną masę cząsteczkową (np. LHC II i CP 26 kukurydzy [19]),

(2) bardzo słabym pokrewieństwem immunologicznym pomiędzy LHCP II a polipeptydami innych anten PS II [21],



Rys. 4. Model organizacji systemu anten energetycznych PS II jęczmienia (wg [32], zmienione): (28₂, 27) kDa i (28₃) kDa są strukturami trimerycznymi, a oznaczenia 20, 25 i 30 kDa odnoszą się do mas cząsteczkowych pozostałych polipeptydów tworzących system anten energetycznych PS II jęczmienia

(3) faktem, iż polipeptydy antenowe wiążą się z niejednakowymi liczbami cząsteczek chl – od 5 cząsteczek chl/polipeptyd dla CP 24 do 13 cząsteczek chl/polipeptyd dla LHC II [18, 51, 54].

Przyjęcie modelu Harrisona i Melisa [32] wymagałoby zasadniczej rewizji powszechnie przyjętych poglądów w powyższych kwestiach.

LITERATURA

- [1] AKABORI K, TSUKAMOTO H, TSUKIHARA J, NAGATSUKA T, MOTOKAWA O, TOYOSHIMA Y. Disintegration and reconstruction of photosystem II reaction center core complex. I. Preparation and characterization of three different types of subcomplex. *Biochim Biophys Acta* 1988; **932**: 345–357.
- [2] ALLEN KD, STAEHELIN LA. Resolution of 16 to 20 chlorophyll-protein complexes using a low ionic strength native green gel system. *Anal Biochem* 1991; **194**: 214–222.
- [3] ANDERSON JM, WALDRON JC, THORNE SW. Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Spectral characteristics of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure. *FEBS Lett* 1978; **92**: 227–233.
- [4] ARAGA C, AKABORI K, SASAKI J, MAEDA A, SHIINA T, TOYOSHIMA Y. Functional reconstitution of the primary quinone acceptor, Q_A , in the photosystem II core complex. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1142**: 36–42.
- [5] BARBATO R, RIGONI F, GIARDI MT, GIACOMETTI GM. The minor antenna complexes of an oxygen evolving photosystem II preparation: purification and stoichiometry. *FEBS Lett* 1989; **251**: 147–154.
- [6] BASSI R, DAINESE P. A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem II membranes. *Eur J Biochem* 1992; **204**: 317–326.
- [7] BASSI R, GHIRETTI MAGALDI A, TOGNON G, GIACOMETTI GM, MILLER K. Two dimensional crystals from the photosystem II reaction centre from higher plants. *Eur J Cell Biol* 1989; **50**: 84–93.
- [8] BASSI R, RIGONI F, GIACOMETTI GM. Chlorophyll binding proteins with antenna functions in higher plants and green algae. *Photochem Photobiol* 1990; **52**: 1187–1206.
- [9] BASSI R, RIGONI F, BARBATO R, GIACOMETTI GM. Light-harvesting chlorophyll a/b proteins (LHC II) populations in phosphorylated membranes. *Biochim Biophys Acta* 1988; **936**: 29–38.
- [10] BASSI R, SILVESTRI M, DAINESE P, MOYA I, GIACOMETTI GM. Effects of non-ionic detergent on the spectral properties and aggregation state of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complexes (LHC II). *J Photochem Photobiol B: Biol* 1991; **9**: 335–354.
- [11] BRICKER TM. The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynth Res* 1990; **24**: 1–13.
- [12] BRICKER TM, ODOM WR, QUEIROLO CB. Close association of the 33 kDa extrinsic protein with the apoprotein of CPa 1 in photosystem II. *FEBS Lett* 1988; **231**: 111–117.
- [13] BUTLER JPG, KUHLEBRANDT W. Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3797–3801.
- [14] CAMM EL, GREEN BR. The chlorophyll a/b complex CP 29 is associated with the photosystem II reaction centre core. *Biochim Biophys Acta* 1989; **974**: 180–184.
- [15] CHITNIS PR, THORNBER JP. The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. *Photosynth Res* 1988; **16**: 41–63.
- [16] CLARK SE, ABAD MS, LAMPPA GK. Mutations at the transit peptide-mature protein junction separate two cleavage events during chloroplast import of the chlorophyll a/b-binding protein. *J Biol Chem* 1989; **264**: 17544–17550.
- [17] CLINE K, FULSOM DR, VIITANEN PV. An imported thylakoid protein accumulates in the stroma when insertion into thylakoids is inhibited. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14225–14232.
- [18] DAINESE P, BASSI R. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll a/b binding proteins. *J Biol Chem* 1991; **266**: 8136–8142.
- [19] DAINESE P, HOYER-HANSEN G, BASSI R. The resolution of chlorophyll a/b binding proteins by a preparative method based on flat bed isoelectric focusing. *Photochem Photobiol* 1990; **51**: 693–703.
- [20] DEBUS RJ. The manganese and calcium ions photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1102**: 269–352.

- [21] Di PAOLO ML, DAL BELIN PERUFFO A, BASSI JR. Immunological studies on chlorophyll-a/b proteins and their distribution in thylakoid membrane domains. *Planta* 1990; **181**: 275–286.
- [22] DUNAHAY TG, STAHELIN LA. Isolation and characterization of a new minor chlorophyll a/b protein complex from spinach. *Plant Physiol* 1986; **80**: 429–434.
- [23] ENAMI I, KAMINO K, SHEN JR, SATOH K, KATOH S. Isolation and characterization of photosystem II complexes which lack light-harvesting chlorophyll a/b proteins but retain three extrinsic proteins related to oxygen evolution from spinach. *Biochim Biophys Acta* 1989; **977**: 33–39.
- [24] ENAMI I, MIYAOKA T, MOCHIZUKI Y, SHEN JR, SATOH K, KATOH S. Nearest neighbour relationships among constituent proteins of oxygen-evolving photosystem II membranes: binding and function of the extrinsic 33 kDa protein. *Biochim Biophys Acta* 1989; **973**: 35–40.
- [25] ENAMI I, OHTA S, MITSUHASHI, TAKAHASHI S, IKEUHI M, KATOH S. Evidence from crosslinking for a close association of the extrinsic 33 kDa protein with the 9,4 kDa subunit of cytochrome b 559 and the 4,8 kDa product of the psb I gene in oxygen-evolving photosystem II complexes from spinach. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 291–297.
- [26] FETISOVA ZG, SHIBAVEA LV, FOK MV. Biological expedience of oligomerization of chlorophyllous pigments in natural photosynthetic systems. *J Theor Biol* 1989; **140**: 167–184.
- [27] GHANOTAKIS DF, DEMETRIOU DM, YOCUM CF. Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center core preparation and a 28 kDa chl-a-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1987; **891**: 15–21.
- [28] GLEITER HM, HAAG E, INOUE Y, RENGER G. Functional characterization of a purified photosystem II core complex with high evolution capacity from spinach. *Photosynth Res* 1993; **35**: 41–53.
- [29] GREEN BR. The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes. *Photosynth Res* 1988; **15**: 3–32.
- [30] GREEN BR, PICHERSKY E, KLOPPSTECH K. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. *Trends in Biochem Sci* 1991; **16**: 181–186.
- [31] HAAG E, IRRGANG K-D, BOECKEMA E, RENGER G. Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity. *Eur J Biochem* 1990; **189**: 47–53.
- [32] HARRISON M, MELIS A. Organization and stability of polypeptides associated with the chlorophyll a-b light-harvesting complex of photosystem – II. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 627–637.
- [33] HENRYSSON T, SCHRODER WP, SPANGFORT M, ANDERSSON B. Isolation and characterization of the chlorophyll a/b protein complex CP 29 from spinach. *Biochim Biophys Acta* 1989; **977**: 301–308.
- [34] IDE JP, KLUG DR, KUHLBRANDT W, GIORGI LB, PORTER G. The state of detergent solubilised light-harvesting chlorophyll-a/b protein complex as monitored by picosecond time-resolved fluorescence and circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1987; **893**: 349–364.
- [35] IKEUCHI M, INOUE Y. A new 4.8-kDa polypeptide intrinsic to the PS II reaction center, as revealed by modified SDS-PAGE with improved resolution of low-molecular-weight proteins. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 1233–1239.
- [36] JACKOWSKI G, SCHNEIDER J. Kompleksy anten energetycznych tylakoidów. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 289–299.
- [37] JANSSON S, SELSTAM E, GUSTAFSSON P. The rapidly phosphorylated 25 kDa polypeptide of the light-harvesting complex of photosystem II is encoded by the type 2 cab-II genes. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1019**: 110–114.
- [38] KAVELAKI K, GHANOTAKIS D. Effect of the manganese complex on the binding of the extrinsic proteins (17, 23 and 33 kDa) of photosystem II. *Photosynth Res* 1991; **29**: 149–155.
- [39] KRUPA Z. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in radish cotyledons. *Physiol Plant* 1988; **73**: 518–524.
- [40] KUHLBRANDT W, DOWNING KM. Two-dimensional structure of plant light-harvesting complex at 3.7 Å resolution by electron crystallography. *J Mol Biol* 1989; **207**: 823–828.
- [41] KUHLBRANDT W, WANG DN. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature* 1991; **350**: 130–134.
- [42] LARSSON UK, SUNDBY C, ANDERSSON B. Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHCII): polypeptide composition, phosphorylation pattern and association with photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1989; **849**: 59–68.
- [43] VAN LEEUVEN PJ, NIEVEEN MC, van DE MEENT EJ, DEKKER JP, van GORKOM HJ. Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction center particles from spinach. *Photosynth Res* 1991; **28**: 149–153.
- [44] MARDER JB, BARBER J. The molecular anatomy and function of thylakoid proteins. *Plant Cell Environment* 1989; **12**: 595–614.

- [45] MIYAO M, MURATA N. Effect of urea on photosystem II particles: evidence for an essential role of the 33 kDa polypeptide in photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* 1984; **765**: 253–257.
- [46] MORISHIGE DT, THORNER JP. Correlation of apoproteins with genes of the major chlorophyll a/b binding protein of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. Confirmation for the presence of a third member of the LHC IIb gene family. *FEBS Lett* 1991; **293**: 183–187.
- [47] MORRISEY PJ, GLICK RE, MELIS A. Supramolecular assembly and functions of subunits associated with the chlorophyll a-b light-harvesting complex II (LHC II) in soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 335–334.
- [48] NAGATSUKA T, FUKAHARA S, AKABORI K, TOYOSHIMA Y. Disintegration and reconstitution of photosystem II reaction center core complex. II. Possible involvement of low – molecular – mass proteins in the functioning of Q_y in the PS II reaction center. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1057**: 223–231.
- [49] PETER GF, THORNER JP. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J Biol Chem* 1991; **266**: 16745–16754.
- [50] PETER GF, THORNER JP. Biochemical evidence that the higher plant photosystem II core complex is organized as a dimer. *Plant Cell Physiol* 1991; **32**: 237–250.
- [51] PICHERSKY E, GREEN BR. The extended family of chlorophyll a/b-binding proteins of PS I and PS II. *Curr Res Photosynth* 1990; **3**: 553–556.
- [52] PICHERSKY E, SUBRAMANIAN R, WHITE MJ, REID J, AEBERSOLD R, GREEN BR. Chlorophyll a/b binding (CAB) polypeptides of CP 29, the internal chlorophyll a/b complex of photosystem II: characterization of the tomato gene encoding the 26 kDa (type I) polypeptide and evidence for a second CP 29 polypeptide. *Mol Gen Genet* 1991; **227**: 277–284.
- [53] ROGNER G, NIXON P, DINER B. Purification and characterization of photosystem I and photosystem II core complexes from wild type and phycocyanin deficient strains of *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* 1990; **265**: 6189–6196.
- [54] SCHWARTZ E, PICHERSKY E. Sequence of two tomato nuclear genes encoding chlorophyll a/b binding proteins of CP 24, a PS II antenna component. *Plant Mol Biol* 1990; **15**: 157–160.
- [55] SHEN J-R, SATOH K, KATOH S. Isolation of an oxygen-evolving photosystem II preparation containing only one tightly bound calcium atom from a chlorophyll b-deficient mutant of rice. *Biochim Biophys Acta* 1988; **936**: 386–394.
- [56] SIGRIST M, STAEHELIN LA. Identification of type 1 and type 2 light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins using monospecific antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1098**: 191–200.
- [57] SIGRIST M, ZWILLENBERG C, GORPID C, EICHENBERGER W, BOSCHETTI A. Sulfolipid associated with the light-harvesting complex and associated with photosystem II apoproteins of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci* 1988; **58**: 15–23.
- [58] SPANGFORT M, ANDERSSON B. Subpopulations of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of photosystem II – isolation and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1989; **977**: 163–170.
- [59] SPANGFORT M, LARRSON UK, LJUMGBERG U, RYBERG M, ANDERSSON B, BARTHING N, WEDEL N, HERRMANN RG. The 20 kDa apo-polypeptide of the chlorophyll a/b protein complex CP 24. Characterization and complete primary amino acid sequence. [w] Baltschewsky M. [red.] Current Research in Photosynthesis, volume II. The Hague: Kluwer 1990; 253–256.
- [60] STAEHELIN LA, ARNTZEN CJ. Regulation of chloroplast membrane function. Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. *J Cell Biol* 1983; **97**: 1327–1337.
- [61] SUNDSTROM V, van GRONDELLE R. Ultrafast dynamics of excitation energy transfer and trapping in Bchl_a and Bchl_b-containing photosynthetic bacteria. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1992; **15**: 141–150.
- [62] THORNER JP, PETER GF, MORISHIGE DT, GOMEZ S, ANADAN S, WELTY BA, LEE A, KERFELD C, TAKEUCHI T, PREISS S. Light harvesting in photosystem I and II. *Biochem Soc Transaction* 1993; **21**: 15–18.
- [63] VALKUNAS L, van MOURIK F, van GRONDELLE R. On the role of spectral and spatial antenna inhomogeneity in the process of excitation energy trapping in photosynthesis. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1992; **15**: 159–170.
- [64] VIITANEN PV, DORAN ER, DUNSMUIR P. What is the role of the transit peptide in thylakoid integration of the light-harvesting chlorophyll a/b protein? *J Biol Chem* 1988; **263**: 15000–15007.
- [65] YOCUM CF. Calcium activation of photosynthetic water oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1059**: 1–15.

Otrzymano: 23.05.1993 r.

Przyjęto: 30.07.1993 r.

Adres autora: Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań

DZIAŁANIE PRODUKTÓW GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH W ASPEKTCIE CYKLU KOMÓRKOWEGO

THE ACTION OF CANCER REPRESSOR GENES PRODUCTS WITHIN THE CELL CYCLE

Antoni HORST

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie. Przedstawiono współczesne poglądy na istotę cyklu komórkowego: mechanizm napędowy cyklu komórkowego, jego mechanizmy regulacyjne oraz patologię. Podstawowym mechanizmem napędowym cyklu jest produkt genu *cdc2* w postaci kinazy białkowej $p34^{cdc2}$, która wespół z inną fosfoproteiną (cykliną) stanowi MPF (*maturation promoting factor*). Kontrola cyklu komórkowego odbywa się na trzech poziomach: przez aktywację i ekspresję genów, których produkty wpływają na przebieg cyklu; przez mechanizm sprzężenia zwrotnego, nie pozwalający na dalszy przebieg cyklu, zanim poszczególne jego etapy nie zostaną ukończone oraz przez czynniki spoza cyklu, do których należą tzw. białka przeciwnowotworowe, np. p105Rb, p53. Cykl komórkowy, podobnie jak każdy inny proces życiowy, ma również swoją patologię, obecnie najlepiej widoczną w procesach nowotworowych, kiedy wskutek zaburzeń kontrolnych (ubytek punktów kontrolnych G1-S lub G2-M) dochodzi do utraty kontroli podziałów komórkowych prowadzącej do procesu nowotworowego.

Summary. Present-day views on the essence of the cell cycle are discussed: the driving gear based on the *cdc2* gene product in the form of protein kinase $p34^{cdc2}$ which together with another phosphoprotein named cyclin forms the maturation promoting MPF. The control of the cell cycle is executed on three levels: the activation and expression of several genes which products influence the course of the cell cycle; the second control mechanism is based on feedback within the cell cycle which do not allow progress of the cycle prior the preceding stage is terminated; the last control mechanism is executed by factors outside the cycle (p105Rb, p53 and other products of suppressor genes). The cell cycle, as other vital processes has its pathology, at this time the best visualized in carcinogenic processes in which lack of checkpoints (G1-S, G2-M) causes uncontrolled cell proliferation.

Wykaz skrótów: AT – *Ataxia teleangiectasia*, CAK – *cdc2 activating kinase*, *cdc2* – *gen cell division cycle*, *cdc25* – fosfataza – produkt genu *cdc25*; *cdk2*, *CDK* – *cyclin dependent kinases*, *chk1* – *checkpoint kinase*, *CLN 1,2,3* – białka cyklino-podobne, *CSF-1* – *colony stimulating factor - 1*, *Dsc* – czynnik wiążący DNA, *EGF* – *epidermal growth factor*, *MPF* – *maturation promoting factor*, *MTOC* – *microtubule organizing center*, *MDM2* – produkt mysiego genu *mdm2* – powoduje nowotwory u "nagiej" myszy, $p34^{cdc2}$ – kinaza białkowa – produkt genu *cdc2*, $p56^{cdc13}$ – homolog produktu genu *cdc25*, *PDGF* – *platelet derived growth factor*, *P105Rb* – produkt genu *Rb* (retinoblastoma), *p107* – antagonist *p105Rb*, *p53* – białko hamujące proliferację – strażnik genomu, *rad 9, 17, 24* – różne mutanty spowodowane

wane promieniowaniem jonizującym pączkujących komórek drożdży, RCC1 – *repressor of chromosome condensation*, TGFbeta-2 – *transforming growth factor beta-2*

WSTĘP

Proliferacja komórek należy do procesów życiowych wszystkich żywych organizmów. Dość uzmysłwić sobie, że całkowite zahamowanie proliferacji komórek macierzystych prowadzących do powstania erytrocytów w ciągu niecałych 3 miesięcy musiałyby doprowadzić do śmierci całego organizmu. Z kolei nadmierna proliferacja prowadzi do procesów nowotworowych. Tak więc jedynie zrównoważone działanie czynników pobudzających proliferację (czynniki wzrostowe, onkogeny itp.) i hamujących proliferację (produkty genów przeciwnowotworowych [40]) umożliwia harmonijny przebieg proliferacji uniemożliwiając brak proliferacji prowadzący do śmierci, jak i nadmiar proliferacji prowadzący do procesu nowotworowego. Zasadniczy zwrot w poglądach na cykl komórkowy nastąpił w kilku ostatnich latach, głównie dzięki poznaniu jego biochemicznych podstaw. Wprawdzie ostatnio ukazało się kilka prac przeglądowych z tej dziedziny, jednak postęp jest tak szybki i tak wielki [13, 31, 32, 33, 40, 43, 47, 51, 63, 76, 83, 114], że skłoniło mnie to do napisania niniejszego przeglądu.

MECHANIZMY NAPĘDOWE CYKLU KOMÓRKOWEGO

Właściwy rozwój badań cyklu komórkowego umożliwiło odkrycie w 1971 roku przez Masui i Smitha tzw. czynnika dojrzewania MPF (*maturation promoting factor*). Istota tego odkrycia polegała na wykryciu czynnika powodującego dojrzewanie do zapłodnienia komórek jajowych, których mejoza ulega zatrzymaniu we wczesnych okresach życia płodowego, a jej ukończenie następuje dopiero pod wpływem czynników hormonalnych [51]. W 1980 r. Kirschner i wsp. [35] wykazali, że jaja *Xenopus* mimo usunięcia jądra ulegają rytmicznemu pogrubieniu w fazie mitozy i spłaszczeniu w interfazie. Stąd wniosek, że w cytoplazmie znajduje się "biochemiczny oscylator", regulujący cykl komórkowy, gdyż usunięcie jądra i innych organeli komórkowych (centriole, mikrotubule) nie powodowało zakłócenia cyklu komórkowego [35]. Rychło jednak okazało się, że MPF w czasie cyklu ulega bardzo znacznym zmianom aktywacji pod wpływem dodatkowych czynników [51].

W 1982 r. wykryto produkt genu *cdc2* (*cell division cycle*) w jajach żab i CDC28 w komórkach drożdży [51]. Produkty te nie spełniały jednak kryterium oscylatora cyklu komórkowego, gdyż ich poziom w różnych fazach cyklu komórkowego nie ulegał zmianie. Białko $p34^{cdc2}$, jako produkt genu *cdc2*, w 1987 r. zostało zidentyfikowane jako kinaza białkowa przenosząca grupy fosforanowe z ATP na różne białka.

Drugi składnik MPF został wykryty dość przypadkowo jako białko ulegające rytmicznej syntezie i akumulacji w interfazie, zaś degradacji w fazie mitozy – stąd zostało nazwane cyklina [51]. Okazało się, że cyklina stanowi drugi składnik MPF [51]. Podając kompletny MPF do niezapłodnionego jaja żab udało się w 1989 r. całkowicie zrekonstruować cykl komórkowy *in vitro* [84]. Pod wpływem cykliny wystąpiły wszystkie elementy cyklu komór-

kowego, tj. pojawienie się i zanik MPF, rozpad otoczki jądrowej, kondensacja chromosomów, pojawienie się i zanik wrzeciona kariokinetycznego, synteza DNA oraz degradacja cykliny [84]. Zastosowanie zmutowanej cykliny (nie ulegającej degradacji) spowodowało zatrzymanie cyklu w mitozie [86].

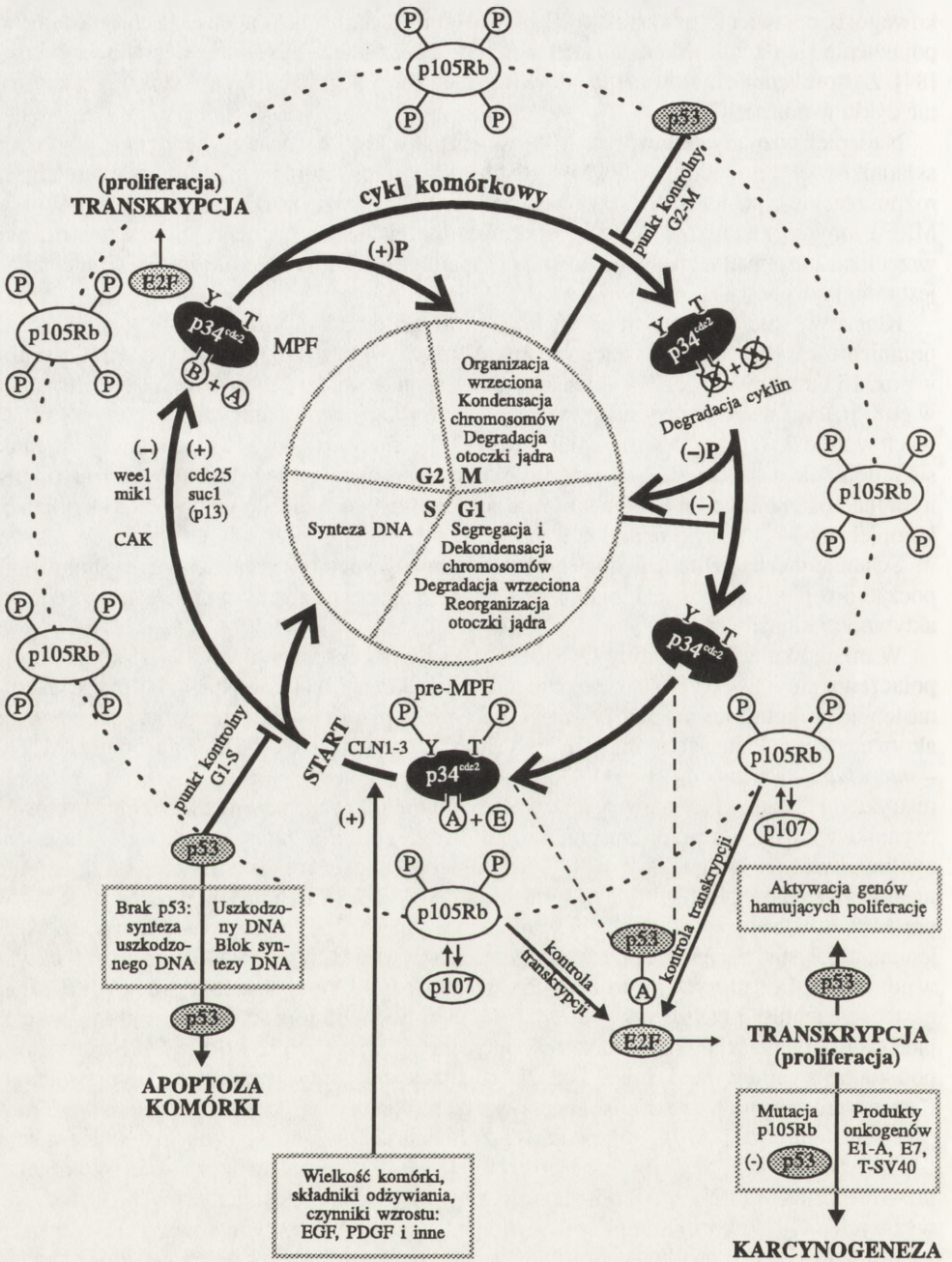
Najlepiej poznany jest wpływ MPF na rozpad otoczki jądrowej. Jednym z głównych składników otoczki jądrowej są włókniste białka – laminy, które po ufosforylowaniu stają się rozpuszczalne, a po defosforylacji łącząc się ponownie tworzą otoczkę jądrową [109]. Wpływ MPF i innych składników cyklu komórkowego na pozostałe elementy mitozy (utworzenie wrzeciona kariokinetycznego, rekonstrukcja aparatu Golgiego i siateczki endoplazmatycznej) jest mniej poznany.

Kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego odgrywa kinaza $p34^{cdc2}$, ulegająca u organizmów wyższych fosforylacji w różnych fazach cyklu w 4 różnych pozycjach (tyrozynie w poz. 15 i treoninie w poz. 14 w fazach S i G2, serynie w poz. 277 w fazie G1 oraz treoninie w poz. 161 w fazie G2) przy maksymalnej defosforylacji wymienionych reszt aminokwasowych w mitozie (za wyjątkiem treoniny 161) [31]. Reszty tyrozyny 15 i treoniny 14 znajdują się w domenie wiążącej ATP, co sugeruje okolicę miejsca aktywnego enzymu ATP, natomiast treonina 161 znajduje się w domenie wiążącej cykliny, co zdaje się wpływać na stabilizację kompleksu $p34^{cdc2}$ z cyklinami [4, 31].

Schemat mechanizmu napędowego cyklu komórkowego przedstawiono na rysunku 1. W początkowej fazie cyklu G1 białko $p34^{cdc2}$ jest nie związane z cykliną i nie wykazuje aktywności kinazowej.

W miarę akumulacji cykliny G1 (E i A u wyższych eukaryontów, CLN1-3 u drożdży) i połączenia się ich z $p34^{cdc2}$ następuje aktywacja kinazy białkowej $p34^{cdc2}$, dzięki czemu następuje w komórkach drożdży start cyklu, czyli przejście ze stanu spoczynkowego do aktywnego, indukującego replikację DNA (faza S) i organizację centrum mikrotubul (MTOC – *microtubule organizing centre*). Odpowiednikiem punktu startowego u ssaków jest punkt restrykcyjny, stanowiący najważniejszą fazę cyklu regulowaną przez składniki pokarmowe i czynniki wzrostu. Po przejściu punktu startowego komórki zaczynają produkować różne cykliny, tworzące kompleksy z $p34^{cdc2}$. Kompleks ten jest określany również jako pre-MPF nieaktywny z powodu fosforylacji tyrozyny w pozycji 15 i treoniny w poz. 14 $p34^{cdc2}$. W pre-MPF ufosforylowana jest również treonina w pozycji 161, potrzebna do aktywacji MPF, jednak niewystarczająca dla przezwyciężenia inaktywującego wpływu fosforylacji tyrozyny w pozycji 15. Defosforylacja tyrozyny 15 w późnej fazie G2 umożliwia aktywację MPF, czego następstwem jest przejście do mitozy z kondensacją chromosomów, degradacją otoczki jądrowej i organizacją wrzeciona kariokinetycznego. Przejście pre-MPF w MPF odbywa się pod kontrolą genów *wee 1*, *mik 1* i *cdc25*, kodujących enzymy o przeciwnym działaniu. Kinazy tyrozynowe *wee 1* i *mik 1* wpływające na fosforylację tyrozyny 15 są inhibitorami przejścia do mitozy [25, 75, 96], podczas gdy fosfataza tyrozynowa, będąca produktem genu *cdc25* i powodująca defosforylację tyrozyny 15 $p34^{cdc2}$, umożliwia aktywację kompleksu pre-MPF na MPF [18, 19, 96]. Zakłada się, że w cyklu komórek somatycznych organizmów wyższych $p34^{cdc2}$ tworzy kompleksy z cyklinami z grupy A typowymi dla fazy G1 (u drożdży z cyklinami CLN). Ponadto sugeruje się, że w skład kompleksu pre-MPF wchodzi odrębna postać $p34^{cdc2}$. Stąd kompleks ten określa się również mianem SPF (od *S-phase promoting factor*).

Kinazy zależne od cyklin (CDK od *cyclin-dependent kinases*) należą do kluczowych regulatorów synchronizacji w czasie i koordynacji różnych reakcji cyklu komórkowego



Rys. 1. (opis obok): A, B, E – cykliny A, B, E; P – grupy fosforanowe ; Y – tyrozyna; T – treonina

eukaryontów. Aktywacja CDK ulega indukcji przez kompleks mechanizmów obejmujących wiązanie do pozytywnie reagujących podjednostek cyklu komórkowego oraz fosforylacji wpływającej pozytywnie lub negatywnie w zależności od miejsca wiązania. Po związaniu cykliny oddzielna kinaza, znana jako kinaza aktywująca CDK, powoduje fosforylację treoniny w podjednostce CDK (w poz. 160 ludzkiej CDK2 lub w poz. 161 ludzkiej CDC2 [13A]).

Cyklina w aktywnym MPF ulega sprzężeniu z ubikwityną, czego następstwem jest jej degradacja w późnej fazie M. Z kolei degradacja cykliny prowadzi do inaktywacji MPF, czego następstwem jest przejście komórki w interfazę z jednoczesną segregacją i dekondensacją chromosomów, reorganizacją otoczki jądrowej i cytokinezą [83].

Cykle komórek somatycznych i embrionalnych różnią się głównie w zakresie syntezy DNA i duplikacji MTOC. W embrionalnych komórkach procesy te przebiegają z prądem cyklu, co oznacza, że w komórkach tych brak jest punktu startowego [83].

Wpływ fosfatazy cdc25 na cykl komórkowy jest wieloraki. O ile fosforylacja tyrozyny 15 p34^{cdc2} wpływa hamująco na cykl komórkowy [30], to fosfataza cdc25, powodując defosforylację tyrozyny 15, aktywuje MPF, czego następstwem jest przejście cyklu w fazę mitozy [78, 79]. W komórkach zwierzęcych sama defosforylacja tyrozyny 15 p34^{cdc2} nie wystarcza, gdyż dopiero defosforylacja sąsiadujących reszt aminokwasowych, przede wszystkim treoniny 14, prowadzi do mitozy [78, 79]. Szczególnie skomplikowana jest funkcja cdc25 w komórkach wyższych organizmów, w tym również człowieka. Przyjmuje się, że cdc25 wpływa specyficznie na różne kompleksy p34^{cdc2}-kinazy cyklinowe odpowiedzialne za poszczególne fazy cyklu komórkowego, a nawet na komórki o różnej lokalizacji i zróżnicowaniu [97]. Cechą odróżniającą fosfatazę cdc25 od innych fosfataz (np. ATPaz) jest jej wybiórcze działanie na kompleks p34^{cdc2}-cyklina, co ma znaczenie dla mechanizmu kontrolnego cyklu komórkowego [79]. Wreszcie sugeruje się związek fosfatazy cdc25 z onkogenem.

Rys. 1. Schemat działania cyklu komórkowego – **Mechanizm napędowy cyklu** (przedstawiony w postaci koła grubych strzałek): w fazie G1 pod wpływem syntezy cyklina A i E oraz ich asocjacji z p34^{cdc2} powstaje nieaktywny pre-MPF (tyrozyna w poz. 15 i treonina w poz. 14 uległy fosforylacji); pod wpływem różnych czynników (składniki odżywiania, czynniki wzrostu itp.) oraz niektórych cyklina (np. CLN1–3 u drożdży) występuje "start" inicjujący replikację DNA; czynniki fosforylujące (produkty genów wee1 i mik1) hamują postępowanie cyklu, umożliwiając syntezę DNA, natomiast pod wpływem czynników defosforylujących (fosfataza cdc25) i asocjacji cyklina B do p34^{cdc2} następuje przejście pre-MPF w aktywny MPF, powodujący przejście cyklu z fazy G2 do fazy M, w której pod wpływem fosforylacji następuje wytworzenie wrzeciona mitotycznego, kondensacja chromosomów i degradacja otoczki jądrowej; z kolei następuje pod koniec fazy M rozpad cykliny B, powodujący inaktywację MPF, a w następstwie wyjście cyklu z fazy M do fazy G1 z jednoczesną defosforylacją wywołującą segregację i dekondensację chromosomów, degradację wrzeciona oraz reorganizację otoczki jądrowej, po czym może wystąpić następny cykl komórkowy. **Wewnętrzny mechanizm kontrolny cyklu** (wpisany do koła w środku schematu) na zasadzie sprzężenia zwrotnego w fazie G1/S zmutowany DNA powoduje zatrzymanie cyklu (przy współdziałaniu p53), również na przejściu z fazy G2/M nieukończona synteza DNA powoduje zatrzymanie cyklu (także przy współdziałaniu p53); zaburzenia organizacji wrzeciona mitotycznego, kondensacji chromosomów i degradacji otoczki jądrowej powodują zatrzymanie cyklu na zasadzie sprzężenia zwrotnego w fazie M, podobnie jak na tej samej zasadzie zaburzenia segregacji i dekondensacji chromosomów, degradacji wrzeciona mitotycznego i reorganizacji otoczki jądrowej powodują zatrzymanie cyklu w początkowej fazie G1. **Czynniki kontrolne spoza cyklu** (na rysunku na zewnątrz koła grubych strzałek): p105Rb – aktywne w postaci hipofosforylowanej w fazie G1 hamuje proliferację komórek, po czym hiperfosforylowane, nieaktywne aż do końca cyklu umożliwia proliferację komórek; p53 – strażnik prawidłowego genomu, hamuje cykl komórkowy w fazie G1/S w przypadku zmutowanego DNA lub w fazie G2/M w przypadku niezreplikowanego DNA, aktywuje geny hamujące proliferację komórek, w przypadku zmutowanego DNA może spowodować apoptozę komórki; zmutowany p53 może prowadzić do karcynogenezy. Czynniki transkrypcji E2F jest silnie związany z cyklem, działając w kompleksie z p53, cykliną A i p105Rb.

Wykazano bowiem, że poziom tej fosfatazy zwiększa się w fibroblastach ulegających transformacji nowotworowej pod wpływem wirusów SV40 lub papilloma typ 16 lub 18 [79]. Ostatnio sugeruje się, że kinaza p34^{cdc2} może występować w dwóch formach podlegających interkonwersji: S powodującej rozpoczęcie fazy S i M niezbędnej do przejścia w mitozę M [8].

Oprócz kinazy p34^{cdc2}, również cykliny, stanowią rozbudowaną rodzinę fosfoprotein. Cyklinami typowymi dla fazy G1 są u drożdży białka kodowane przez geny CLN i odpowiadające im w komórkach wyższych organizmów cykliny C, D i E [28, 80, 88]. Liczba wykrywanych cyklin stale rośnie, przy czym każda faza cyklu komórkowego wydaje się być regulowana przez swoistą cyklinę.

Procesem zapoczątkowującym cykl komórkowy jest faza G1/S, poprzedzona w niektórych przypadkach przez fazę G0. Już w 1989 roku [92] wykazano, że w fazie G1 i M gen cdc2 odgrywa rolę w asocjacji z cykliną B. Cykliną typową dla przejścia z fazy G1 do S jest jednakże cyklina E, która ulegając skompleksowaniu z kinazą p34^{cdc2} powoduje start cyklu komórkowego [18].

Przejście do fazy S, czyli replikacji DNA, wymaga kompleksu p34^{cdc2} z cykliną A, syntetyzowaną w cytoplazmie i przemieszczoną do jądra komórkowego. Badania z inaktywacją różnych cyklin, przede wszystkim cykliny B wykazały, że główną rolę w regulacji replikacji DNA w komórkach ssaków odgrywa kompleks z cykliną A [28].

Ważną rolę w prawidłowym przebiegu cyklu odgrywają: p34^{cdc2} jako podjednostka katalityczna oraz cykliny A, B i E, jako podjednostki regulacyjne. Najlepiej poznana jest czynność kompleksu p34^{cdc2}-cyklina B polegająca na regulacji podjednostki katalitycznej. W kompleksie tym występuje ponadto wykryty u drożdży i ludzi produkt genu *suc1* w postaci białka p13^{suc1}, którego rola polega na hamowaniu fosfatazy cdc25, zwłaszcza na inaktywacji kompleksu p34^{cdc2}-cyklina B w końcowej fazie mitozy [31, 32, 91]. Fosforylacja tyrozyny 15 działa na ten kompleks hamująco, natomiast defosforylacja aktywująco [26]. Start cyklu występuje pod wpływem akumulacji cyklin: u drożdży CLN, natomiast u wyższych organizmów cyklin A oraz C, D i E, czego następstwem jest wytworzenie nieaktywnego kompleksu p34^{cdc2}-cyklina A, zwanego pre-MPF lub SPF, w którym tyrozyna 15 jest ufosforylowana przez kinazę tyrozynową cdc2. Wspomniane cykliny kodowane przez dwa geny *wee1* i *mik1*, wykryte początkowo w dzielących się komórkach drożdży [26]. Produkty tych genów działają hamująco na przebieg cyklu komórkowego aż do jego zatrzymania w fazie G2 w przypadku nadmiernej ekspresji [68]. Niezależnie w badaniach na komórkach HeLa wykazano, że cykliny B1 lub B2 aktywując fosfatazę tyrozynową cdc25 powodują przejście pre-MPF w aktywny MPF, w wyniku czego następuje organizacja wrzeciona kariokinetycznego, kondensacja chromosomów i degradacja otoczki jądrowej, czyli przejście w fazę M. Właściwości tych nie mają cykliny A i D [68].

W badaniach przeprowadzonych na ludzkim mRNA oprócz cyklin A, B1 i B2 wykazano trzy dalsze klasy cyklin: C, D i E. Z tego mRNA cyklin C i E okresowo gromadził się w fazie G1 cyklu komórkowego [64, 115]. Ponadto wykazano, że cyklina C obok występowania w fazie G1 ma powinowactwo do onkogenu *ras* [62]. Cyklina E w komórkach ludzkich osiąga szczyt w fazie G1, zanim pojawia się cyklina A i zanika podczas wyjścia komórki z cyklu. Cyklina E ulegając asocjacji z białkiem regulatorowym – kinazą białkową E-cdk2 (*cyclin dependent kinase 2*) stanowi ważny czynnik kontroli proliferacji w fazie G1 [55, 61]. W cyklu komórkowym bliżej nieznaną rolę odgrywają również białka cyklinopodobne CLN1, CLN2 i CLN3, wykryte w komórkach drożdży [98]. Białka te wpływają na aktywację kinazy

białkowej CDC28 u drożdży *S. cerevisiae*, odgrywającej taką samą rolę, jak p34^{cdc2} w komórkach wyższych organizmów, tj. powodującej przejście z fazy G1 do S cyklu komórkowego [98].

Istotne znaczenie dla cyklu komórkowego ma degradacja cykliny wskutek jej ubikwitynacji w mitozie (anafazie). Brak ubikwitynacji, wskutek mutacji znajdującej się blisko N-terminalnego końca cykliny w obrębie sekwencji aminokwasów RAALGNISN (pojedynczy literowy kod aminokwasów), powoduje, że degradacja cykliny nie występuje, powodując zatrzymanie cyklu komórkowego w metafazie [29].

MECHANIZMY KONTROLNE CYKLU KOMÓRKOWEGO

Złożony mechanizm cyklu komórkowego, prowadzący do podziału pojedynczej komórki w dwie identyczne komórki potomne, wymaga niezwykle precyzyjnych mechanizmów kontrolnych: polegających na transkrypcji i syntezie czynników biorących udział w cyklu komórkowym, sprzężeniu zwrotnym czynników biorących udział w tym procesie i czynnikach ogólnoustrojowych, koordynujących cykl komórkowy z całością organizmu.

A. Transkrypcyjna regulacja cyklu komórkowego. Kluczowym elementem cyklu komórkowego jest kodowana przez gen *cdc2* kinaza p34^{cdc2}, odpowiedzialna za rozpoczęcie syntezy DNA w fazie G1/S oraz mitozy w fazie G2/M [76]. W każdej z tych faz p34^{cdc2} występuje w asocjacji z fazowo-specyficzną cyklina, regulującą jej aktywność katalityczną. Aktywność p34^{cdc2} jest regulowana przez fosforylację (produkty genów *wee1* i *mik1*) oraz defosforylację (produkt genu *cdc25*) [68].

Większość genów jest aktywna podczas całego cyklu komórkowego, jednak część ich ulega okresowej aktywacji, np. geny histonów są aktywne tylko w fazie S, podobnie geny mitotyczne cyklina A i B podlegają ekspresji w określonych fazach cyklu [76]. Poniżej podaję tylko najważniejsze ze zbadanych w komórkach drożdży czynników ulegających ekspresji:

- w późnej fazie G1: geny *CLN1* i *CLN2* dla cyklina G1, *DBF* dla kinazy białkowej, *HO* dla przełącznika kojarzeniowej endonukleazy (*matting type*),
- w fazie G1 tuż przed locus *HO*: gen *Sw 14* dla czynnika transkrypcji *HO*,
- w fazie G1/S geny: *CDC6* i *DBF4* dla syntezy DNA, *CDC8* dla kinazy tymidynowej, *CDC9* dla ligazy DNA, *CDC21* dla kinazy tymidylanowej, *POL 1* dla polimerazy DNA I, *POL 3* dla polimerazy DNA III, *PRI* dla dużej podjednostki prymazy DNA, *PRI2* dla małej podjednostki prymazy DNA, *PNR1* dla reduktazy rybonukleotydowej,
- w fazie S geny *HTA*, *HTB*, *HHT* i *HHF* dla histonów H2A, H2B, H3 i H4,
- w fazie G2 dla *CLB1/SCB1* i *CLB2* dla cyklina, *RAD6* dla ubikwitynacji, *Swi5* dla czynnika transkrypcji *HO*.

W komórkach ssaków ekspresji ulegają:

- ◆ w fazie G1/S geny *DHFT* dla reduktazy dihydrofolianowej, *TK* dla kinazy tymidylanowej, *TS* dla syntazy tymidylanowej, *c-myc* dla białka proto-onkogenu wiążącego DNA,
- ◆ w fazie S geny dla histonów: H1, H2A, H2B, H3 i H4,
- ◆ w późnej fazie S-G2 geny: cyklina A dla cykliny mitotycznej, *cdc25* dla fosfatazy aktywującej p34^{cdc2}, *HSP70* dla białka szoku cieplnego 70 kDa,

♦ w fazie G2/M geny GSKHs1 i GSKHs2 dla białek wiążących p34^{cdc2} (powyższe dane dotyczące ekspresji genów w fazach cyklu wraz z piśmiennictwem według pozycji 76 piśmiennictwa).

W wielu przypadkach potranskrypcyjne mechanizmy zdają się odgrywać rolę w transaktywacji poszczególnych czynników. Takim przykładem jest Dsc1, czynnik wiążący DNA, którego ekspresja ulega zmianom w cyklu komórkowym [67]. Występuje w przypadku białka Rb, które w fazie G1, kiedy Rb jest defosforylowane, łączy się z czynnikiem transkrypcji E2F, zaś po jego ufosforylowaniu w pozostałych fazach cyklu nie łączy się z nim [13]. W niektórych przypadkach pojedynczy mechanizm regulacyjny kontroluje szereg następujących po sobie reakcji, umożliwiając ich wzajemną koordynację. Takim przykładem jest aktywacja MPF w późnej fazie G2, pobudzająca w drodze fosforylacji organizację wrzeciona mitotycznego, kondensację chromosomów oraz degradację otoczki jądrowej. Potem wskutek inaktywacji MPF spowodowanej degradacją cyklin i następczej defosforylacji po wyjściu z mitozy dochodzi do dekondensacji chromosomów, degradacji wrzeciona i reorganizacji otoczki jądrowej [76, 91]. Kontrola przejścia jednej fazy w następną odbywa się raczej w drodze sprzężenia zwrotnego niż poprzez transkrypcję. W końcu warto odnotować, że regulacja cyklów komórkowych we wczesnym etapie embriogenezy zachodzi bez udziału transkrypcji i dopiero w późniejszym okresie rozwoju występuje regulacja cyklu poprzez transkrypcję [76].

B. Kontrola cyklu komórkowego przez sprzężenie zwrotne. Sprzężenie zwrotne musi mieć co najmniej trzy składowe:

- sensor (inaczej punkt kontrolny) monitorujący ukończenie reakcji z biegiem prądu cyklu,
- sygnał wyprodukowany przez sensor i
- element cyklu reagujący na sygnał zahamowaniem lub zatrzymaniem cyklu komórkowego [84, 85].

Pierwszym punktem kontrolnym cyklu komórkowego jest start z następującą potem syntezą cyklin mitotycznych i duplikacją MTOC, powiększeniem komórki, dostawą czynników odżywczych i działaniem czynników wzrostu.

Drugim punktem kontrolnym jest inicjacja syntezy DNA, synteza cyklin A i E, które dzięki asocjacji z p34^{cdc2} tworzą pre-MPF.

Trzecim punktem kontrolnym jest synteza cykliny mitotycznej B, która dzięki asocjacji z p34^{cdc2} powoduje przejście pre-MPF w MPF, z przejściem cyklu w fazę M, po czym następuje organizacja wrzeciona kariokinetycznego, kondensacja chromosomów i rozkład otoczki jądrowej.

Czwartym punktem kontrolnym jest wyjście komórki z mitozy z następującą potem segregacją chromosomów i ich dekondensacją, reorganizacją otoczki jądrowej, demontażem wrzeciona i cytokinezą [16, 37, 83, 91].

W większości cykli komórkowych zatrzymanie jakiegokolwiek reakcji zgodnej z prądem cyklu powoduje zatrzymanie dalszego postępowania cyklu. Na przykład zatrzymanie replikacji DNA powoduje zahamowanie przejścia cyklu z fazy S do fazy M (mitozy). Podobnie zresztą działa zahamowanie organizacji wrzeciona kariokinetycznego lub rozpadu otoczki jądrowej. Wskutek braku powstawania wrzeciona kariokinetycznego następuje zatrzymanie mitozy w metafazie bez możliwości przejścia w anafazę (z tego korzysta się w badaniach cytogenetycznych dla zwiększenia liczby metafaz). W komórkach zarodków *Drosophila* we wczesnych stadiach rozwoju brak jest punktu kontrolnego dla mitozy, dzięki czemu mimo aberracji cykl komórkowy może być zachowany z tym jednak, że komórki z aberracjami chromosomów lub centrosomów ulegają eliminacji [37, 85]. W miarę jak zwiększa się liczba

komórek pojawia się punkt kontrolny i tym samym w razie aberracji chromosomów następuje zatrzymanie cyklu. Niezreplikowany DNA stanowi również sygnał do zatrzymania cyklu komórkowego.

Faza G1 cyklu obejmuje okres od ukończenia mitozy do rozpoczęcia syntezy DNA. Jest to okres wrażliwy na działanie czynników spoza cyklu [95]. Faza G1 może trwać wiele godzin, ale może być również bardzo krótka. Normalnie fazy G1/S i G2/M są ze sobą sprzężone, jednak pod wpływem mutacji mogą ulec rozdzieleniu [37]. Niektóre komórki (np. wątroby lub neurony) mogą pozostawać przez długi okres w stanie spoczynkowym, określanym jako faza Go [95]. Pod wpływem czynników aktywujących komórki z fazy Go mogą przejść do fazy G1.

Inicjacja fazy S następuje dzięki aktywacji p34^{cdc2} przez dołączenie cykliny A typowej dla tej fazy [107]. Badania mutantów np. wywołanych promieniowaniem jonizującym rad9, rad17 i rad24 wykazały, że zahamowanie cyklu występuje raczej wskutek uszkodzenia DNA niż jego reparacji [37]. Z kolei mutanty mec1 i mec2 mimo braku uszkodzenia DNA, a jedynie wskutek braku replikacji powodowały zatrzymanie cyklu komórkowego – stąd wniosek, że brak replikacji, podobnie jak uszkodzenie DNA, jest sensorem mechanizmu sprzężenia zwrotnego powodującego zatrzymanie cyklu [83]. Mutanty, w których wystąpiła częściowa utrata genów dla mechanizmów sprzężenia zwrotnego, mimo to rosną powodując częstszą aniżeli normalnie śmierć komórki [83]. Komórki ssaków z mutacją RCC1 (represor kondensacji chromosomów) [7] są wrażliwe na temperaturę. W odpowiednich temperaturach hodowli mutacja jest nieaktywna, natomiast w nieodpowiedniej temperaturze komórki chomika przestają w fazie S syntetyzować DNA i przedwcześnie wchodzą w mitozę [20, 60, 72]. Z kolei te komórki umieszczone w nieodpowiedniej temperaturze hodowli w fazie G1 w ogóle nie syntetyzują DNA, a po umieszczeniu w odpowiedniej temperaturze nie wchodzą w mitozę. Dane te dowodzą, że mutacja RCC1 wpływa na sprzężenie zwrotne i koordynację czasową cyklu (*timing*) [83].

Przejście do fazy M jest uzależnione od aktywacji kinazy p34^{cdc2} oraz występujących pod jej wpływem zmian typowych dla tej fazy (kondensacja chromosomów, reorganizacja cytoszkieletu, degradacja otoczki jądrowej oraz zmiana kształtu komórki). Jednocześnie występuje aktywacja (fosforylacja) następujących białek: polimerazy RNA II, histonu H1, p60^{src}, antygeny T, czynnika elongacji, cykliny, laminy [91]. Sugeruje się, że fosforylacja p60^{src} jest odpowiedzialna za zmiany cytoszkieletu, a histonu H1 za konsensację chromosomów. Przyjmuje się, że p34^{cdc2} współdziała również w organizacji centrosomów [91]. Pod koniec fazy M występuje degradacja cykliny i tym samym inaktywacja p34^{cdc2}. Z kolei w fazie G1 po inaktywacji układu degradującego cyklinę [51] występuje synteza nowych cyklin powodując rozpoczęcie nowego cyklu komórkowego lub może wystąpić przejście w fazę Go, w której komórki znajdują się w stanie spoczynkowym.

Do czynników powodujących zakłócenia cyklu komórkowego należą:

- zaburzenia replikacji DNA [20, 72],
- brak mitozy [57],
- uszkodzenie lub brak centrosomów,
- zaburzenia mikrotubul [41, 69] oraz
- zaburzenia fosforylacji p34^{cdc2} [3, 104].

Zaburzenia te najczęściej powodują blok cyklu, chociaż znane są również przypadki omięcia bloku, który zresztą najczęściej prowadzi do śmierci komórki [110]. Dane te dowodzą, że niezależnie od sprzężenia zwrotnego w komórce musi istnieć mechanizm

pozwalający na przejście do następnej fazy cyklu [99]. Swoiste działanie na cykl ma kofeina, która w przypadkach z uszkodzonym i niezreplikowanym DNA, omijając mechanizm zatrzymania cyklu, pozwala na przejście w mitozę działając prawdopodobnie analogicznie do inhibitora kinazy p34^{cdc2} [61, 65, 83]. Aktywność kinazy p34^{cdc2} obok produktów genu cdc25, tj. białek p52 i p55 kDa, [78] podlega również aktywacji przez inne czynniki, takie jak p56^{cdc13} [82].

C. Kontrola cyklu komórkowego przez czynniki spoza cyklu. Każda komórka otrzymuje dwa rodzaje bodźców:

- mitogenne, jak EGF, PDGF, TGF β oraz
- hamujące proliferację komórek, takie jak białka: p105Rb lub p53.

Od stanu równowagi tych czynników zależy, czy komórki proliferują normalnie, czy też wskutek nadmiaru mitogenów lub niedoboru anti-mitogenów proliferują nadmiernie aż do powstania nowotworu [70, 111].

BIĄŁKO p105Rb JAKO REGULATOR CYKLU KOMÓRKOWEGO

Do epokowych odkryć w regulacji cyklu komórkowego przyczyniło się wykrycie dziedzicznie uwarunkowanych nowotworów [70, 111], głównie genu siatkówczaka (retinoblastoma). Nowotwór ten rozwija się u dzieci w wieku 1–5 lat. Pogląd o dominującym dziedziczeniu obalił Knudson [53] zakładając, że dziedziczy się jeden gen patologiczny i dopiero utrata drugiego, prawidłowego genu powoduje chorobę. Zjawisko to zwane utratą "heterozygotyczności" uważane jest obecnie za jedno z najważniejszych w powstawaniu procesu nowotworowego. Oprócz siatkówczaka u osób tych występują również inne nowotwory (mięśaki, drobnokomórkowy rak płuc, raki sutka, pęcherza moczowego). Nowotworzeniu ulegają tylko niezróżnicowane retinoblasty, które po przejściu w retinocyty nowotworzeniu już nie podlegają, co dowodzi, że w procesie różnicowania (normalnej proliferacji) zaszły nieodwracalne zmiany, nie pozwalające na podjęcie na nowo podziałów komórki. Stąd wniosek, że prawidłowy produkt genu Rb hamuje normalną proliferację komórek i tym samym proces nowotworowy [70, 67, 111].

Gen Rb znajduje się na ramieniu długim 13-go chromosomu (13q14). Produktem tego genu jest fosfoproteina Rb, o m.c. 105 kDa. W postaci hiperfosforylowanej p105Rb występuje w późnej fazie G1 oraz w fazach S, G2 i M cyklu komórkowego, a jedynie we wczesnej fazie G1 w postaci hipofosforylowanej [2, 81]. Wykazano, że p105Rb łączy się w kompleksy z wirusowymi onkoproteinami (adenowirusa E1A, dużymi antygenami T wirusów SV40 i polyoma, onkoproteiną ludzkiego wirusa polyoma) [13, 105]. Cechami charakterystycznymi niefunkcjonalnego p105Rb są zaburzenia fosforylacji, sprzężenie z onkoproteinami i związanie p105Rb z jądrem komórkowym [105]. Wymienione onkowirusy łączą się z p105Rb wyłącznie w stanie hipofosforylowanym, czego następstwem jest jego inaktywacja [13, 105]. To dowodzi, że białko p105Rb spełnia funkcję hamującą proliferację we wczesnej fazie G1 w stanie hipofosforylowanym, a ulegając fosforylacji w następnych fazach aż do końca fazy M umożliwia proliferację komórki. Połączenie p105Rb z onkoproteinami podobnie jak jego hiperfosforylacja umożliwia proliferację nowotworową komórek [89].

Fosforylacja białka p105Rb odbywa się pod wpływem kinaz zależnych od cyklin (CDK – *cyclin dependent kinases*), z których każda jest aktywowana tylko w określonej fazie cyklu komórkowego [13]. Białko to ma 10 miejsc fosforylacji reszt seryny i treoniny [13]. Inicjacja fosforylacji p105Rb następuje pod wpływem cykliny E, pojawiającej się w punkcie startu

przed końcem fazy G1 [54, 64]. Badania te wymagają potwierdzenia. Synteza odpowiednich cyklin pod wpływem bodźców zewnętrznych może utrzymywać p105Rb w stanie hipofosforylacji z zahamowaniem proliferacji komórek lub hiperfosforylacji pozwalającej na proliferację komórek. W ten sposób synteza cyklin może być źródłem bodźców wpływających na cykl komórkowy poprzez białko p105Rb [6, 13]. Spośród czynników wpływających na cykl komórkowy można wymienić konstytutywną syntezę cyklin A i E wpływających poprzez fosforylację p105Rb na regulację cyklu w fazach G1 i S [39]. Do czynników wpływających na syntezę nowych cyklin należą: czynnik CSF-1 [73] oraz indukcja syntezy fosfatazy tyrozynowej pod wpływem stresu oksydacyjnego lub szoku termicznego regulujących cykl komórkowy w procesach zapalnych z wydzielaniem reaktywnych bakterioobójczych oksydantów [49]. Wreszcie istnieją cykliny wiążące się z miejscem wiązania p105Rb, które tworzą odrębną klasę cyklin D o bliżej nieznannej funkcji [64].

Cykl komórkowy dostarcza również bodźców eferentnych regulujących proliferację komórek. Okazało się, że zmutowane p105Rb (często tylko z pojedynczą mutacją w miejscu wiązania onkoprotein) ekstrahowane z niewirusowych nowotworów nie wiąże się z onkoproteinami, jak w przypadku prawidłowego p105Rb. Stąd wniosek, że onkoproteiny wiążąc się z miejscem wiązania prawidłowych białek powodują jego blokadę znosząc tym samym regulujący wpływ p105Rb na cykl komórkowy [81]. Dane te dowodzą, że p105Rb wiąże się z bliżej nieokreślonym białkiem jądrowym (określanym prowizorycznie zakotwicającym) trudno oddzielającym się podczas frakcjonowania białek jądrowych od cytosolowych. Zmutowane p105Rb nie łączy się z jądrowym białkiem zakotwicającym [81]. W podobny sposób wpływa hiperfosforylacja na wiązanie się p105Rb z jądrowym białkiem zakotwicającym. W rezultacie połączenia się p105Rb z onkoproteinami, p105Rb zmutowane oraz hiperfosforylowane stają się nieaktywne z powodu niemożności wiązania zakotwicającego białka jądrowego, czego następstwem jest brak hamowania proliferacji komórek [13, 103].

Do najlepiej scharakteryzowanych białek wiążących się z p105Rb należy komórkowy czynnik transkrypcji E2F, który w prawidłowej komórce pośredniczy w ekspresji genów służących wzrostowi komórki w fazie G1 lub S [94]. E2F tworzy kompleksy również z innymi białkami cyklu, co sugeruje, że białka te w wyniku sygnałów cyklu komórkowego powodują transaktywację E2F [89]. Kompleks p105Rb-E2F występuje tylko w fazie G1, kiedy p105Rb jest hipofosforylowane [102], co wynika również z wiązania onkoprotein inaktywujących p105Rb. Łączenie się E2F z p105Rb budzi szereg wątpliwości w tłumaczeniu roli tego kompleksu w hamowaniu proliferacji, zwłaszcza że białka tworzące kompleksy z p105Rb wykazują duże podobieństwo do poprzednio wymienionych onkoprotein oraz proto-onkogenu c-myc [14, 44, 112]. Z kolei p105Rb może też aktywować ekspresję TGF- β 2, którego izoforma hamuje proliferację [50]. Ważnym ogniwem w tworzeniu kompleksów z czynnikiem transkrypcji jest cyklina A, czego rezultatem jest wpływ tych kompleksów na transkrypcję w fazie S cyklu [5, 12, 15]. Złożoności tego zjawiska dowodzi pojawienie się doniesień o czynnikach E2F-podobnych, których rola jest całkowicie niejasna [38, 50].

BIAŁKO p107

Ostatnio wykryto białko p107 tworzące kompleksy z onkoproteinami E1A, antygenami T SV40 albo polyoma [13, 22]. Białko to wiąże się również z E2F, a ponadto w jego obrębie występuje domena wiążąca cyklinę A [21], całkowicie niezależna od miejsc wiązania E2F i E1A [9, 15, 22]. Tym samym p107 może stanowić podstawę do tworzenia tetrameru cdc2-cy-

klina A-p107-E2F [13]. Ten kompleks tworzący się w fazie S z jednoczesną ekspresją cykliny A, wiąże się z miejscem wiązania E2F z DNA i wykazuje aktywność kinazy histonu H1. Stąd sugeruje się, że kompleks ten wiążący i aktywujący promotory zależne od E2F w początkowej fazie S wpływa regulująco na transkrypcję. W ten sposób p107 współdziałając z E2F pobudza transkrypcję, będąc w tym przypadku antagonistą p105Rb, hamującym proliferację komórek [13, 33].

BIAŁKO p53

Białko p53 zostało wykryte w 1979 roku skompleksowane z antygenem T SV40 i uznane jako onkogen. Dopiero w 1989 r. Levine wykazał, że niezmutowane p53 jest czynnikiem przeciwnowotworowym, a dopiero zmutowane jest onkogenem [63]. Delecje lub mutacje p53 wykryto w licznych nowotworach ludzkich i zwierzęcych (raki płuc, jelit, przełyku oraz w zespole Li-Fraumeni z obecnością raków, mięsaków i białaczki). Heterozygotyczny gen p53 znajduje się na ludzkim chromosomie 17p. Do zaburzeń w postaci nowotworzenia dochodzi podobnie jak w przypadku białka p105Rb, tj. z powodu utraty heterozygotyczności. Najczęściej występują mutacje spowodowane delecjami genu lub mutacje punktowe, powodujące wskutek przesunięcia ramy odczytu mutacje typu "nonsense", kiedy dochodzi do syntezy nieprawidłowego białka lub skróconego łańcucha białka [63, 74].

Molekularny mechanizm działania p53. Wprowadzenie p53 typu dzikiego lub jego cDNA do hodowli komórek nowotworowych powoduje zahamowanie wzrostu w fazie G1 lub M cyklu komórkowego [10, 113]. Fibroblasty szczurze transformowane przez wrażliwe na temperaturę mutanty p53 lub ras przestają rosnąć (nie dochodząc do fazy S cyklu). W temperaturze 37–39,5°C wymienione mutanty p53 znajdują się w cytoplazmie, natomiast w temperaturze 32°C w jądrze komórkowym, gdzie zachowują się jak typ dziki, powodując zatrzymanie wzrostu komórek nowotworowych z przywróceniem ich normalnej morfologii [71]. Obniżenie temperatury hodowli wywołuje prawdopodobnie przewagę transkrypcji allelu dzikiego nad zmutowanym [42].

Przyjmując, że inaktywację przeciwnowotworowej czynności p53 obserwuje się niemal we wszystkich nowotworach, odpowiedź na pytanie, na czym polega jego działanie, urasta do podstawowych problemów onkologicznych. Z pewnością odgrywa tu rolę związane z różnymi onkoproteinami (antygen T SV40, adenowirus E1b, papilloma E6) inaktywujące p53 [63]. Jednak bezpośredniego dowodu dostarczyły dopiero badania ludzkiego homologu mysiego białka MDM2 (dominujący transformujący onkogen) zmapowanego na ramieniu długim ludzkiego chromosomu 12 [23, 93]. Okazało się, że na 47 badanych mięsaków w 17 wystąpiła jego amplifikacja. Jednocześnie wykazano, że produkt tego genu łączy się z p53, powodując jego inaktywację. Funkcję przeciwnowotworową p53 może spełniać dzięki wiązaniu do swoistych sekwencji DNA [48, 117]. Punktowe mutacje p53 w nowotworach dotyczyły właśnie miejsc wiążących się z DNA [58]. W konsekwencji zmutowane formy p53 uniemożliwiają regulację ekspresji genów przez p53 [48]. Tym samym wykazano, że p53 jest ważnym czynnikiem regulującym transkrypcję [24]. Miejscem działania p53 w cyklu komórkowym jest faza G1, w której następuje zatrzymanie cyklu przez prawidłowy p53 w przypadku zmutowanego DNA [45], umożliwiając jego reparację [116]. W konkluzji, jak stwierdza Lane, p53 jest swoistym strażnikiem prawidłowego genomu [58, 117].

Przyjmuje się, że tetramer p53 aktywuje znajdujące się w jego sąsiedztwie geny, produkujące czynniki transkrypcji genów hamujących proliferację i inwazyjność komórek [106].

Delecje jednego lub obu alleli p53 lub mutacje nonsensowe, wywołujące skrócenie łańcucha p53, powodują zmniejszoną transkrypcję czynników hamujących proliferację i występują w różnych nowotworach [106]. Wreszcie mutacje z przesunięciem ramy odczytu powodującym całkowity brak białka p53 (opisane w rakach jelit, mózgu, płuc, piersi, skóry, pęcherza moczowego), w przypadkach zakażenia wirusami z powodu inaktywacji p53 wskutek związania z onko-proteinami opryszczki (pospolite w rakach szyjki macicy) oraz amplifikacja genu MDM2 (w mięsach) – powodują całkowity brak transkrypcji białek hamujących proliferację komórek stając się przyczyną raka [106]. Potwierdzeniem, że p53 jest generalnym czynnikiem regulującym transkrypcję, jest hamowanie transkrypcji genu Rb przez cis-element (GGAAGTGA) wrażliwy na p53, występujący w promotorze genu Rb [101].

Ostatnio wysunięto sugestie, że białko p53 może wpływać na regulację transkrypcji przez interakcję białko-białko ze specyficznym czynnikiem transkrypcji [1, 100].

Za pośrednictwem p53 występuje nie tylko zatrzymanie cyklu dla dokonania naprawy DNA, lecz może nawet wystąpić zaprogramowana śmierć komórki, czyli apoptoza [11, 59, 66]. Badania prowadzono na hodowlach izolowanych tymocytów z myszy homozygotycznych mutantów genu p53, ich heterozygot oraz zwierząt typu dzikiego. Hodowle typu dzikiego pod wpływem zadziałania promieniami jonizującymi lub preparatami glukokortykoidów (metylo-prednizolon) ulegały łatwo apoptozie, podczas gdy tymocyty pozbawione prawidłowego genu p53 wykazywały znaczną oporność na występowanie apoptozy, pozostając nadal opornymi na działanie glukokortykoidów. I tak tymocyty typu dzikiego ulegały apoptozie już pod wpływem dawki 1 graya, natomiast tymocyty pozbawione p53 ulegały apoptozie dopiero pod wpływem 20 i wielu grayów. Tak więc działanie p53 na wystąpienie apoptozy ma charakter swoisty, gdyż mimo zwiększonych oporności na apoptozę pod wpływem promieni jonizujących, wrażliwość na apoptozę pod wpływem glukokortykoidów pozostaje niezmienną.

PATOLOGIA CYKLU KOMÓRKOWEGO

Do najczęstszych i najważniejszych zaburzeń cyklu komórkowego prowadzą białka regulacyjne wirusów [13, 90, 106] wchodzące w interakcję z białkami regulacyjnymi cyklu (p105Rb, p53, E2F i innymi). Do najważniejszych z nich należą:

- białko E1B – produkt adenowirusa E1A,
- E6 – produkt ludzkiego wirusa papilloma,
- duży antygen T wirusa SV40,
- EVP16 – produkt wirusa opryszczki (*virus simplex*) i innych.

Białka te wiążą się z p105Rb, p53, E2F, białkami biorącymi udział w regulacji cyklu komórkowego, które w ten sposób ulegając inaktywacji powodują niekontrolowany przebieg cyklu komórkowego, prowadzący często do powstania procesu nowotworowego.

Mutanty ts41 chemicznych komórek V79 rosną prawidłowo na pożywkach we właściwej temperaturze, natomiast w niewłaściwej temperaturze po pewnym czasie komórki te obumierają z jednoczesnym nagromadzeniem DNA (niekiedy do 16-krotnej ilości DNA zawartego w komórce – ilość DNA mierzona w przepływowym mikrofluorymetrze pozwalającym na jego lokalizację w odpowiedniej fazie cyklu komórkowego) [34]. Komórki ts41 po fuzji z normalnymi komórkami wykazują przedwczesną kondensację chromosomów, charakterystyczną dla endoreduplikacji. W niewłaściwej temperaturze komórki ts41 wykazują normalną

fazę S cyklu komórkowego, po czym jednakże od razu przechodzą ponownie w fazę S z ominięciem faz G2, M i G1 [34]. Ponowne wejście w fazę S nie wymaga obecności surowicy ani też nie ulega zahamowaniu przez inhibitory punktu kontrolnego G2 lub mitozy, które w warunkach prawidłowych uniemożliwiają powtórna mitozę bez terminacji syntezy DNA [37]. Można sądzić, że produkt genu *ts41* umożliwia wejście komórki w fazę S tylko raz w cyklu komórkowym, a jego mutacja pozwala na ominięcie punktów kontrolnych cyklu komórkowego i bezpośrednie ponowne wejście w fazę S po ukończeniu poprzedniej fazy S [34].

Zespoły chorobowe, takie jak: niedokrwiistość Fanconiego, zespół Wernera, *ataxia teleangiectasia* (AT), wykazują niestabilność genomową z predyspozycją do powstawania raka [36, 46]. Klasycznym przykładem są komórki AT wykazujące wysoką częstotliwość występowania złamań chromosomów w hodowlach *in vitro* oraz ok. 10-krotnie zwiększoną utratę heterozygotyczności w locus glikoforyny [36, 44]. Osoby z *ataxia teleangiectasia* rzadko przeżywają 30 rok życia, w ok. 40% przypadków występuje u nich rak.

Komórki *ataxia teleangiectasia* (AT) wykazują zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące w porównaniu z komórkami prawidłowymi. W prawidłowych komórkach pod wpływem promieniowania jonizującego występuje indukcja syntezy p53, czego nie ma w komórkach AT. Stąd sugeruje się, że w komórkach AT brak jest produktu wpływającego na syntezę p53 [13, 15]. Z kolei wykazano, że zwiększony poziom p53 powoduje transkrypcję genów GADD45, które współdziałają w zatrzymaniu cyklu w fazie G1. Gen GADD45, występujący w komórkach ludzkich, chomiczych i mysich, ulega indukcji na skutek zadziałania promieniami jonizującymi lub czynnikami uszkadzającymi DNA (np. MMS – sulfonian metylometanowy), przy czym reakcja na promieniowanie jonizujące wydaje się być różna od reakcji na MMS. Na podstawie indukcji genów GADD45 pod wpływem promieniowania jonizującego, występującej tylko w obecności p53 typu dzikiego, wykazano, że w obrębie genu GADD45 znajduje się sekwencja wiążąca się z p53, która prawdopodobnie uczestniczy w reakcji zatrzymania cyklu w G1 pod wpływem p53 [46].

Komórki homozygotyczne o zmutowanym p53 są genetycznie niestabilne [116] i często wykazują amplifikację locus CAD (jest to gen kodujący trójfunkcyjny polipeptyd zawierający syntetazę karbamoylu, transkarbamylazę asparagianianu i dihydroorotazę). Zarówno ludzkie, jak i mysie komórki homozygotyczne dla zmutowanego genu p53 amplifikują locus CAD z wysoką częstotliwością, a heterozygotyczne i typu dzikiego nie amplifikują CAD [36].

Przedstawione dane dowodzą, że p53 reguluje dwie fazy cyklu komórkowego w punktach kontrolnych przejścia G1-S i G2-M. Punkt kontrolny G1-S, powodując opóźnienie przebiegu cyklu, umożliwia reparację uszkodzonego DNA, zanim dojdzie do fazy S, w której uszkodzony DNA ulegałby powielaniu. Zatrzymanie cyklu w punkcie kontrolnym G2-M zapobiega utracie materiału genetycznego, do którego musiałoby dojść wskutek złamań chromosomów [36]. Wymienione punkty kontrolne wykrywając uszkodzony DNA i zapobiegając jego replikacji oraz segregacji chromosomów umożliwiają reparację i zachowanie ich dotychczasowej funkcji [36, 37].

Obydwa punkty kontrolne G1-S i G2-M znajdują się pod kontrolą genetyczną, czego dowodem jest to, że zatrzymanie cyklu komórkowego występujące w komórkach typu dzikiego pod wpływem mutacji nie następuje [36]. Punkt kontrolny G2-M może ulec zniesieniu pod wpływem kofeiny w komórkach zwierzęcych. W komórkach pozbawionych punktu kontrolnego G2-M, występujące złamania dwuniciowego DNA, powodują utratę fragmentów chromosomów i w następstwie śmierć komórki [36]. Komórki zawierające p53 typu dzikiego lub jego zmutowane heterozygoty powodują zatrzymanie cyklu w punkcie kontrolnym G1-S,

natomiast homozygotyczne mutanty wchodzi w fazę S i obumierają z wyjątkiem komórek, których gen uległ amplifikacji [36, 116].

p53 jest niezbędne w punkcie kontrolnym G1-S [45]. Wysoki poziom p53 hamuje progresję cyklu w G1-S. Komórki, pozbawione p53 typu dzikiego, na skutek napromieniowania promieniami jonizującymi nie wykazują opóźnień cyklu w punkcie kontrolnym G1-S [45].

W celu zbadania roli białka p53 w procesie rozwojowym i nowotworowym ssaków do genomu myszy wprowadzono w drodze homologicznej rekombinacji komórki macierzyste pozbawione genu p53. Okazało się, że takie myszy rozwijały się prawidłowo, wykazywały natomiast w znacznym odsetku występowanie spontanicznych nowotworów [17].

Złamania DNA obecne w G1 ulegają reparacji, zanim jeszcze dojdzie do jego replikacji w wyniku działania punktu kontrolnego G1-S. W komórkach nie mających punktu kontrolnego G1-S (np. w komórkach AT) złamania dwuniciowe z powodu replikacji powodują powstanie dwóch chromatyd siostrzanych z dwuniciowymi złamaniami prowadzącymi w konsekwencji do powstania cyklów "złamanie-fuzja-mostek" (*breakage-fusion-bridge cycle*), co przez długą serię złamań chromosomów i ich rearanzację umożliwia proliferację takich komórek [36]. Przywrócenie p53 typu dzikiego przywraca opóźnienie replikacji w punkcie kontrolnym G1-S.

Utrata punktu kontrolnego G2-M stanowi dodatkowe źródło niestabilności genomowej w rozwoju guza nowotworowego. Widać to najlepiej na przykładzie linii komórkowej ludzkiego chłoniaka (*lymphoma*) z niezwykłą wrażliwością na iperyt azotowy, spowodowaną defektem punktu kontrolnego G2-M [36].

Mechanizm rozpoznawania uszkodzeń DNA i związane z tym zatrzymanie cyklu komórkowego budzi zrozumiałe zainteresowanie. Ostatnio również w tej dziedzinie zanotowano pewien postęp. Badania prowadzono na dzielących się mutantach drożdży *S. pombe* wyselekcjonowanych na podstawie wrażliwości na uszkodzony DNA pod wpływem promieniowania jonizującego (mutanty rad) lub z zahamowaną syntezą DNA pod wpływem hydroksymocznika (mutanty hus). Punktem wyjścia było zbadanie, czy w punkcie kontrolnym tych mutantów (G1-S) następowało zatrzymanie cyklu, czy nie [87, 108]. Autorzy zidentyfikowali w mutantach rad, ale nie hus homolog kinazy wchodzący w interakcję z kinazą regulującą cykl komórkowy p34^{cdc2}, powodujący jej inaktywację i tym samym zatrzymanie cyklu. Gen kodujący homolog kinazy p34^{cdc2} nazwali chk1 (od *checkpoint kinase*). Zidentyfikowany produkt genu chk1 wiążąc się z jednej strony z aktywną kinazą p34^{cdc2}, z drugiej zaś strony z uszkodzonym DNA powoduje w drodze interakcji zatrzymanie cyklu przez inaktywację kinazy p34^{cdc2}. Dowodem wskazującym na podstawową rolę produktu genu chk1 jest to, że liczne kopie tego białka są w stanie skorygować uszkodzone pod wpływem promieni ultrafioletowych mutanty rad1-1, których charakterystyczną cechą jest zniesienie punktu kontrolnego wrażliwego na uszkodzony DNA.

PODZIĘKOWANIE

Pani Elżbiecie Wojtasiewicz za pomoc w wyszukiwaniu pozycji literaturowych oraz pani Aleksandrze Jakubowskiej za trud przepisywania niniejszej pracy składam serdeczne podziękowania.

LITERATURA

- [1] AGOFF SN, LOU J, HINZER DI, WU B. Regulation of the human hsp 70 promoter by p53. *Science* 1993; **259**: 84-87.

- [2] AKIYAMA T, OHUCHI T, SUMIDA S, MATSUMOTO K, TOYOSHIMA K. Phosphorylation of the retinoblastoma protein by cdk2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7900-7904.
- [3] AMON A, SURANA U, MUROFF I, NASMYTH K. Regulation of p34^{cdc28} tyrosine is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*. *Nature* 1992; **355**: 368-371.
- [4] ANDREWS BJ. Dialogue with the cell cycle. *Nature* 1992; **355**: 393-394.
- [5] BANDARA LR, ADAMCZEWSKI JP, HUNT T, LA THANGUE NB. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* 1991; **352**: 249-251.
- [6] BANDARA L, LA THANGUE N. Adenovirus E1A prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 1991; **351**: 494-497.
- [7] BISCHOFF RF, PONSTINGL H. Catalysis of guanine exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 1991; **354**: 80-82.
- [8] BROEK D, BARTLETT R, CRAWFORD K, NURSE P. Involvement of p34^{cdc2} in establishing the dependency of S phase on mitosis. *Nature* 1991; **349**: 388-393.
- [9] CAO L, FAHA B, DEMBSKI M, TSAI LH, HARLOW E, DYSON M. Independent binding of the retinoblastoma protein p107 to the transcription factor E2F. *Nature* 1992; **355**: 176-179.
- [10] CHEN PL, CHEN Y, BOOKSTEIN R, LEE WH. Genetic mechanism of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; **250**: 1576-1579.
- [11] CLARKE AR, PURDIE CA, HARRISON DJ, MORRIS RG, BIRD CC, HOOPER ML, WILLIE AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; **362**: 849-852.
- [12] CLARKE PR, LEISS D, PAGANO M, KARSENTI E. Cyclin A- and cyclin B-dependent protein kinase are regulated by different mechanisms in *Xenopus* egg extract. *EMBO J* 1992; **11**: 1751-1761.
- [13] COBRINK K, DOWDY SF, HINDS PW, MITTNACHT S, WEINBERG R. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *TIBS* 1992; **17**: 312-315.
- [13A] DEBONDT HL, ROSENBLATT J, JANCARIK J, JONES HD, MORGAN DO, KIM S-H. Crystal structure of cyclin dependent-kinase 2. *Nature* 1993; **368**: 595-602.
- [14] DEFOE-JONES D, HUANG P, JONES RE, HASKELL K, VUOKOLO G, HANOBİK M, HUBER A, OLIFF A. Cloning of cDNA for cellular proteins that bind the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; **352**: 251-254.
- [15] DEVOTO SH, MUDRYJ M, PINES J, HUNTER T, NEVINS JR. Cyclin A protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity, p33^{cdc2} is a component of the E2F-cyclin complex. *Cell* 1992; **68**: 167-176.
- [16] DIRICK L, NASMYTH K. Positive feedback in the activation of G1 cyclins in yeast. *Nature* 1991; **351**: 754-757.
- [17] DONNEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, McARTHUR MJ, MONTGOMERY Jr CA, BUTEL JS, BRADLEY A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992; **356**: 215-221.
- [18] DULIĆ V, LEES E, REED SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 1992; **257**: 1958-1960.
- [19] DUNPHY WG, KUMAGAI A. The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* 1991; **67**: 189-196.
- [20] d'URSO G, MARRACINO RL, MARSHAK DR, ROBERTS JM. Cell cycle control of DNA replicating by a homologue from human cells of the p34^{cdc2} protein kinase. *Science* 1990; **250**: 786-791.
- [21] EWEN ME, FAHA B, HARLOW E, LIVINGSTON DM. Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* 1992; **255**: 85-87.
- [21a] EWEN ME, XING Y, LAWRENCE JB, LIVINGSTON DM. Molecular cloning and expression of the p107, a retinoblastoma gene product related protein. *Cell* 1991; **66**: 1155-1164.
- [22] FAHA B, EWEN ME, TSAI LH, LIVINGSTON DM, HARLOW E. Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science* 1992; **255**: 87-90.
- [23] FAKHARZADEH SS, TRUSKO SP, GEORGE DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 1991; **10**: 1565-1569.
- [24] FARMER G, BARGONETTI J, ZHU H, FRIEDMAN P, PRYWES R, PRIVES C. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 1992; **358**: 83-86.
- [25] FEATHERSTONE C, RUSSELL P. Fission yeast p107^{wcc1} mitotic inhibitor is a tyrosine/serine kinase. *Nature* 1991; **349**: 808-811.
- [26] GALACTIONOV K, BEACH D. Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* 1991; **67**: 1181-1194.
- [27] GAUTHIER J, SOLOMON MJ, BOOHER RN, BAZAN JF, KIRSCHNER MW. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34^{cdc2}. *Cell* 1991; **67**: 197-211.

- [28] GIRARD F, STRAUSFELD U, FERNANDEZ A, LAMB NJC. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* 1991; **67**: 1169–1179.
- [29] GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [30] GOULD KL, NURSE P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 1989; **342**: 39–45.
- [31] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Regulacja cyklu komórkowego – historii i komplikacji ciąg dalszy. *Post Biochem* 1992; **38**: 98–107.
- [32] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego. *Post Biochem* 1993; **39**: 16–25.
- [33] HAMEL PA, GALLIE SL, PHILLIPS RA. The retinoblastoma protein and cell cycle regulation. *TIG* 1992; **8**: 180–185.
- [34] HANDELI S, WEINTRAUB H. The ts41 mutation in chinese hamster cells leads to successive phases in the absence of intervening G2, M and G1. *Cell* 1992; **71**: 599–611.
- [35] HARA K, TYDEMAN P, KIRSCHNER M. A cytoplasmic clock with same period as the division cycle in *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 462–466.
- [36] HARTWELL L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992; **71**: 543–546.
- [37] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [38] HELIN K, LEES JA, VIDAL M, DYSON N, HARLOW E, FATTAEY A. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of transcription factor E2F. *Cell* 1992; **70**: 337–350.
- [39] HINDS PW, MITTNACHT S, DULIĆ V, ARNOLD A, REED SI, WEINBERG RA. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclin. *Cell* 1992; **70**: 993–1006.
- [40] HORST A. Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 3–21.
- [41] HOYT MA, TOTIS L, ROBERTS RT. *S. cerevisiae* genes required for cell arrest in response to low microtubule function. *Cell* 1991; **66**: 507–517.
- [42] HUPP TR, MEEK DW, MIDFLEY CA, LANE DP. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 1992; **71**: 875–886.
- [43] JAKUBOWICZ T. Udział kinaz fosfobiałkowych w regulacji cyklu komórkowego niższych i wyższych organizmów eukariotycznych. *Post Biochem* 1991; **37**: 9–18.
- [44] KAELIN Jr WG, KREK W, SELLERS WR, DeCAPRIO JA, AJCHENBAUM F, FUCHS CS, CHITTENDEN T, LI Y, FARNHAM PJ, BLANA MA, LIVINGSTON DM, FLEMINGTON EK. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma product. *Cell* 1992; **70**: 351–364.
- [45] KASTAN MB, OYNEKWERE O, SIDRANSKY D, VOGELSTEIN B, CRAIG RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; **51**: 6304–6311.
- [46] KASTAN BM, ZHAN O, EL-DEIRY WS, CARRIER F, JACKS T, WALSH W, PLUNKETT BS, VOGELSTEIN B, FORNACE Jr AJ. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing 53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia. *Cell* 1992; **71**: 587–597.
- [47] KAWIAK J. Regulacja cyklu mitotycznego. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 325–333.
- [48] KERN SE, PIETENPOL JA, THIAGALINGAM S, SEYMOUR A, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 1992; **256**: 827–829.
- [49] KEYSE SM, EMSLIE ES. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* 1992; **359**: 644–646.
- [50] KIM SJ, WAGNER S, LIU F, O'REILLY, ROBBINS PD, GREEN MR. Retinoblastoma gene product activates expression of the human TGF- β 2 gene through transcription factor ATF-2. *Nature* 1992; **358**: 331–334.
- [51] KIRSCHNER M. The cell cycle then and now. *TIBS* 1992; **17**: 281–285.
- [52] KNÖBLICH JA, LEHNER CF. Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition. *EMBO J* 1993; **12**: 65–74.
- [53] KNUDSON AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 820–823.
- [54] KOFF A, CROSS F, FISHER A, SCHUHMACHER J, LEGUELLECK K, PHILIPPE M, ROBERTS JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 1991; **66**: 1217–1228.

- [55] KOFF A, GIORDANO A, DESSAID, YAMASHITA K, HARPER J, ELLEDGES, NISHIMOTO T, MORGAN DO, FRANZA BR, ROBERTS JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 1992; **257**: 1689–1694.
- [56] KUMAGAI A, DUNPHY WG. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 1991; **64**: 903–914.
- [57] KUNG AL, SHERWOOD SW, SCHIMKE RT. Cell line-specific differences in the control of cell progression in the absence of mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 9553–9557.
- [58] LANE DP. P53, the guardian of the genome. *Nature* 1992; **358**: 15–16.
- [59] LANE DP. A death in the life of p53. *Nature* 1993; **362**: 786–787.
- [60] LASKEY RA, FAIRMAN MP, BLOW JJ. S phase of the cell cycle. *Science* 1989; **246**: 609–614.
- [61] LEE TH, SOLOMON MJ, MUMBY MC, KIRSCHNER MW. INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. *Cell* 1991; **64**: 415–423.
- [62] LEOPOLD P, O'FARELL PH. An evolutionary conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficit in G1 cyclins. *Cell* 1991; **66**: 1207–1216.
- [63] LEVINE AJ, MOMAND J, FINLAY CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; **351**: 453–456.
- [64] LEW DJ, DULIC V, REED SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 1991; **66**: 1197–1206.
- [65] LI R, MURRAY WA. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 1991; **66**: 519–531.
- [66] LOWE SW, SCHMITT EM, SMITH SW, OSBORNE BAA, JACKS T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; **362**: 847–849.
- [67] LOWNDES NF, JOHANSON AF, JOHNSTON LH. Coordination of expression of DNA synthesis genes in budding yeast by a cell-cycle regulated trans factor. *Nature* 1991; **350**: 247–250.
- [68] LUNDGREN K, WAL WORTH N, BOOHER R, DEMBSKI M, KIRSCHNER M. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory phosphorylation of cdc2. *Cell* 1991; **64**: 1111–1122.
- [69] MANIOTIS A, SCHLIWA M. Microsurgical removal of centrosomes blocks cell production and centriole generation in BSC-1 cells. *Cell* 1991; **67**: 494–504.
- [70] MARSHALL CJ Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; **64**: 613–626.
- [71] MARTINEZ J, GEORGOFF J, MARTINEZ J, LEVINE AJ. Cellular localization and a cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes-Development* 1991; **5**: 151–159.
- [72] MATSUMOTO T, BEACH D. Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. *Cell* 1991; **66**: 347–360.
- [73] MATSUSHIME H, ROUSSEL MF, ASHMUN RA, SHERR CJ. Colony-stimulating factor regulates novel cyclins during G1 phase of the cell cycle. *Cell* 1991; **65**: 701–713.
- [74] MARX J. The cell cycle: spinning further afield. *Science* 1991; **252**: 1490–1492.
- [75] McGOWAN CH, RUSSEL P. Human wee 1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p53^{cdc2} on Tyr 15. *EMBO J* 1993; **12**: 75–85.
- [76] McKINNEY JD, HEINTZ N. Transcriptional regulation in the eukaryotic cell cycle. *TIBS* 1991; **16**: 430–435.
- [77] MENDENHALL MD. An inhibitor of p34^{cdc28} protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1993; **259**: 216–219.
- [78] MILLAR BA, BLEVITT J, GERACE L, SADHU K, FEATHERSTONE C, RUSSELL P. p53^{cdc25} is a nuclear protein required for the initiation of mitosis in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10500–10504.
- [79] MILLAR BA, RUSSEL P. The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 1992; **68**: 407–410.
- [80] MINSHULL J, BLOW JJ, HUNT T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell* 1989; **56**: 947–956.
- [81] MITTNACHT S, WEINBERG RA. G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* 1991; **65**: 381–393.
- [82] MORENO S, HAYLES J, NURSE P. Regulation of p34^{cdc2} protein kinase during mitosis. *Cell* 1989; **58**: 361–372.
- [83] MURRAY AW. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 1992; **359**: 599–604.
- [84] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 1989; **264**: 614–621.
- [85] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989; **339**: 275–280.
- [86] MURRAY AW, SOLOMON MJ, KIRSCHNER MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor. *Nature* 1989; **339**: 280–286.
- [87] MURRAY AW. Sunburnt fission yeast. *Nature* 1993; **363**: 302.

- [88] NASMYTH K, DIRICK L. The role of sw 14 and sw 16 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* 1991; **66**: 995–1013.
- [89] NEVINS JR. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992; **258**: 424–429.
- [90] NEVINS JR. Transcriptional activation by viral regulatory proteins. *TIBS* 1991; **16**: 435–439.
- [91] NURSE P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; **344**: 503–507.
- [92] NURSE P, BISSETT V. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* 1989; **292**: 558–560.
- [93] OLINER JD, KINZLER KW, MELTZER PS, GEORGE DL, VOGELSTEIN B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; **358**: 80–83.
- [94] PAGANO M, DRAETTA, JANSEN-DÜRR P. Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science* 1992; **255**: 1144–1147.
- [95] PARDEE AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; **246**: 603–608.
- [96] PARKER LL, PIWNICA-WORMS H. Inactivation of the p34^{cdc2}-cyclin complex by the human WEE 1 tyrosine kinase. *Science* 1992; **257**: 1955–1958.
- [97] RIABOWOL K, DRAETTA G, BRIZUELA L, VENDRE D, BEACH D. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell* 1989; **57**: 393–401.
- [98] RICHARDSON HE, WITTENBERG C, CROSS F, REED SI. An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast. *Cell* 1989; **59**: 1127–1133.
- [99] SCHLEGEL R, PARDEE AB. Periodic mitotic events induced in the absence of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 9025–9029.
- [100] SETO E, USHEVA A, ZAMBETTI GP, MOMAND J, HORIKOSHI N, WEINMANN R, LEVINE AJ, SHENK T. Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 12028–12032.
- [101] SHIIO Y, YAMAMOTO T, YAMAGUCHI N. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5206–5210.
- [102] SHIRODKAR S, EWEN M, De CAPRIO JA, MORGAN J, LIVINGSTON DM, CHITTENDEN T. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 1992; **68**: 157–158.
- [103] SKALLIO, CHOU YH, GOLDMAN RD. Cell cycle-dependent changes in the organization of an intermediate filament-associated protein: Correlation with phosphorylation by p34^{cdc2}. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11959–11963.
- [104] SORGER PK, MURRAY AW. S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2}. *Nature* 1992; **355**: 365–368.
- [105] TEMPLETON DJ, PARK SH, LANIER L, WEINBERG RA. Nonfunctional mutants of the retinoblastoma protein by defects in phosphorylating viral oncoprotein association, and nuclear tethering. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3033–3037.
- [106] VOGELSTEIN B, KINZLER KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; **70**: 523–526.
- [107] WALKER DH, MALLER JL. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 1991; **354**: 314–317.
- [108] WALWORTH N, DAVEY S, BEACH D. Fission yeast chk1 protein kinase links the rad checkpoint pathway to cdc2. *Nature* 1993; **363**: 368–371.
- [109] WARD GE, KIRSCHNER MW. Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* 1990; **61**: 561–577.
- [110] WEINERT TA, HARTWELL LH. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 1988; **241**: 317–322.
- [111] WEINBERG RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; **254**: 1138–1145.
- [112] WEINTRAUB SJ, PRATER CA, DEAN DC. Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 1992; **358**: 259–261.
- [113] WOLF D, HARRIS N, ROTTER V. Reconstitution of p53 expression in a non-producer Ab-Mulv transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 1984; **38**: 119–126.
- [114] WÓJCIK C. Współczesne poglądy na temat regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 153–157.
- [115] XIONG Y, CONNOLLY T, FUTCHER B, BEACH D. Human D-type cyclin. *Cell* 1991; **65**: 691–699.

Otrzymano: 02.07.1993 r.

Przyjęto: 31.08.1993 r.

Adres autora: 60-615 Poznań, ul. Podhalańska 14

MECHANIZMY REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

MECHANISMS OF THE CELL CYCLE REGULATION

Cezary WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie. Ostatnie lata przyniosły dalsze poznanie czynników uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego eukariontów. Oprócz odgrywającej czołową rolę na przejściu G_2/M kinazy $p34^{cdc2}$ odkryto całą rodzinę pokrewnych kinaz CDK (*cyclin dependent kinases*). Odkryto również wiele pokrewnych cyklinom A i B białek, nazwanych cyklinami C, D i E. Związane są one prawdopodobnie z regulacją przejścia G_1/S oraz innych procesów w trakcie faz G_1 i S.

Słowa kluczowe: cykl komórkowy, *cdc2*, CDK, cykliny, MPF

Summary. The last few years brought many discoveries concerning the factors involved in the cell cycle regulation. The most important was the discovery of the CDKs (*cyclin dependent kinases*) family of kinases (among them the *cdc2* is the first one and the most important) as well as the enlargement of the cyclin family of proteins. The latter includes the well known mitotic cyclins A and B, and new ones, such as C-, D- and E-type cyclins. They are involved in the passage through G_1 and S phases of the cell cycle.

Key words: cell cycle, *cdc2*, CDK, cyclins, MPF

Wykaz niektórych skrótów: CAK (*cdc2 activating kinase*) – kinaza aktywująca *cdc2*; CDK (*cyclin dependent kinase*) – kinaza zależna od cyklina; CLB (*cyclin B*) – cyklina B (u drożdży); CLN (*cyclin like protein*) – białko podobne do cyklina; MPF (*M-phase promoting factor, maturation promoting factor*) – czynnik wywołujący fazę S, bądź w węższym ujęciu embriologicznym czynnik wywołujący dojrzewanie (oocytów); NTS (*nuclear transfer signal*) – sygnał transportu do jądra komórkowego; PCR (*polymerase chain reaction*) – polimerazowa reakcja łańcuchowa; RCC (*repressor of chromosome condensation*) – represor kondensacji chromosomów; RPA (*replication protein A*) – białko replikacyjne A; SPF (*S-phase promoting factor*) – czynnik wywołujący fazę S.

1. WPROWADZENIE

Wiedza na temat mechanizmów kontrolujących regulację cyklu komórkowego rozwija się obecnie tak szybko, że publikacje, które ukazały się ostatnio na tych łamach [37, 48, 104], są już w większości niekompletne i przestarzałe.

Zostały w nich przedstawione wiadomości dotyczące aktywności MPF (*M-phase promoting factor*), który jak wykazano składa się z podjednostki katalitycznej ($p34^{cdc2}$) oraz

podjednostki regulacyjnej (cyklina B). MPF jest czynnikiem uniwersalnym, występującym u wszystkich eukariontów, a drogi do określenia jego składu i działania wiodły przez badania nad wczesnym cyklem zarodkowym żab i jeżowców z jednej strony, a przez genetyczną analizę mutantów *cdc-ts* (*cell division cycle-temperature sensitive*) drożdży z drugiej [49].

Obecnie poznany został gruntownie mechanizm regulacji wejścia w fazę M zależny od MPF oraz nieco mniej dokładnie mechanizm regulacji wejścia w fazę S, zależny od czynnika zwanego SPF (*S-phase promoting factor*). Pierwotnie przejrzysty obraz regulacji cyklu ostatnio został zawikłany przez odkrycie u ssaków całej rodziny kinaz podobnych do produktu genu *cdc2* oraz wielu różnych cyklin. Dokładne wyjaśnienie ich roli spowoduje, że w momencie ukazania się tego artykułu będzie on znowu wymagał uzupełnienia [33, 39].

2. REGULACJA AKTYWNOŚCI KINAZY p34^{cdc2}

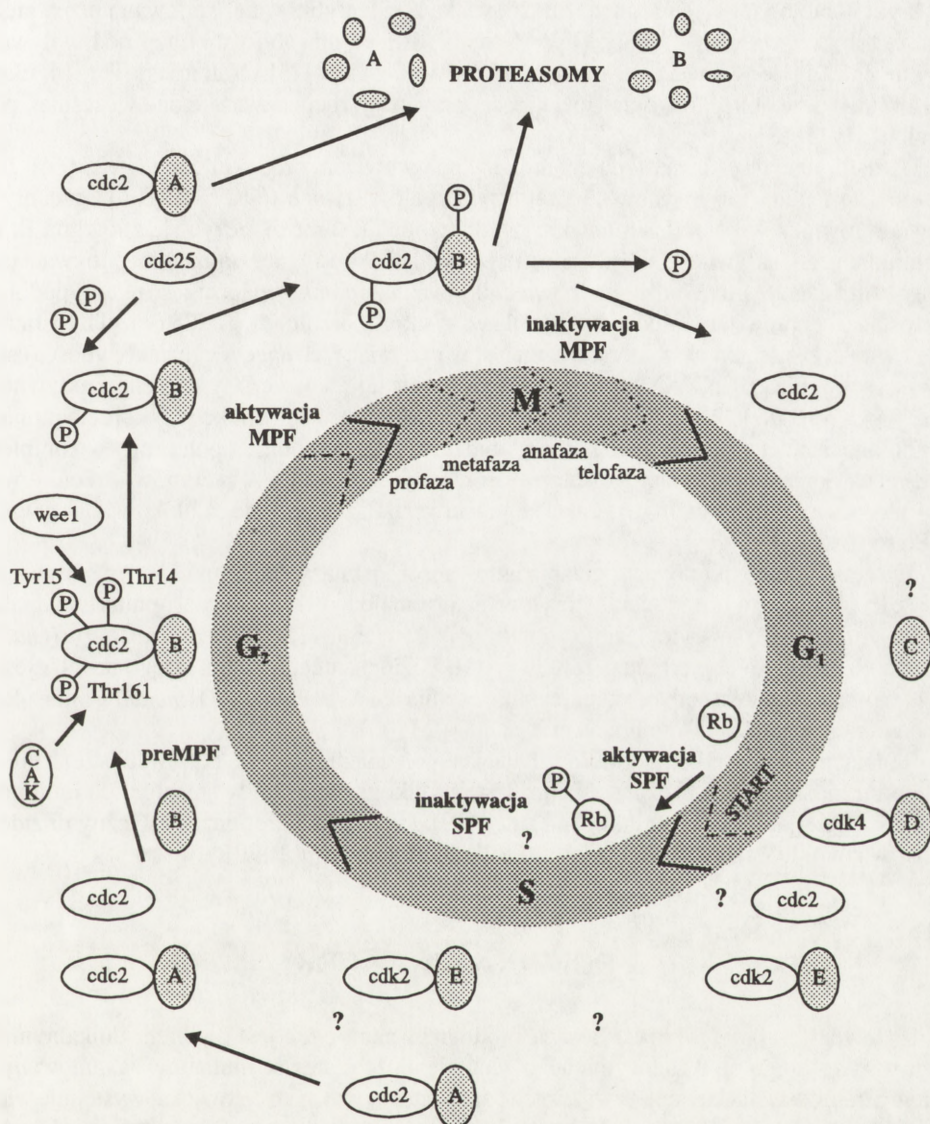
Regulacja cyklu komórkowego uzależniona jest od szeregu procesów fosforylacji i defosforylacji. Ze względu na kluczowe i nadrzędne znaczenie kinazy p34^{cdc2} M. Kirschner nie bez kozery nazwał ją "królową wszystkich kinaz" [49]. Wykryto jej obecność we wszystkich zbadanych do tej pory organizmach, a odpowiednie geny wykazują znaczną zachowawczość w przebiegu ewolucji, co wyraża się homologią rzędu 63% pomiędzy ludzką i drożdżową kinazą *cdc2*. Na cykl komórkowy można by w zasadzie patrzeć jako na cykl przemian tego białka (rys. 1).

Podlega ono złożonej regulacji na poziomie posttranslacyjnym [75]. Podczas fazy G₁ p34^{cdc2} ulega fosforylacji na Ser 277 (nie uwzględnionej na rys. 1). Nieznana jest jej rola ani białka ją kontrolujące, chociaż wiadomo, że ta reszta serynowa znajduje się w regionie konsensusu dla kinazy białkowej C. Większość komórkowego p34^{cdc2} jest w fazie G₁ ufosforylowana na tej reszcie serynowej, podczas gdy w pozostałych fazach jedynie znikoma frakcja [2, 52].

Kolejną resztą aminoacylową ulegającą fosforylacji jest Thr 161 (w przypadku produktu genu *cdc2* drożdży Thr 167). Jej fosforylacja uzależnia wystąpienie aktywności kinazowej związanej z MPF, co na poziomie molekularnym znajduje wytłumaczenie umożliwianiem tworzenia kompleksów z cyklinami mitotycznymi. Zmutowanie tej reszty treoninowej na resztę fenyloalaninową, nie podlegającą fosforylacji, powoduje osłabienie ich wiązania w przypadku jaj *X.laevis*, a całkowicie uniemożliwia je w przypadku komórek ludzkich [8, 20]. Monomeryczna p34^{cdc2} przy braku cyklin, nie ulega fosforylacji na tej reszcie treoninowej [74].

Istnieją poszlaki, że defosforylacja Thr 161 może mieć znaczenie w czasie inaktywacji MPF. Proces ten być może uzależniony jest od fosfatazy 2A, która skutecznie ją defosforyluje *in vitro* [105]. Za fosforylację tego miejsca być może jest odpowiedzialna sama p34^{cdc2}, chociaż nie odpowiada ono sekwencji konsensusu dla tego enzymu. Możliwość taką bierze się pod uwagę, ze względu na jej lokalizację w pętli wiążącej substrat [74] oraz na homologię do miejsc autofosforylacyjnych innych kinaz, zwłaszcza Thr 197 kinazy białkowej A. Postuluje się udział w tej fosforylacji tzw. kinazy aktywującej *cdc2*, czyli CAK (*cdc2 activating kinase*) [49]. Fosforylacja Thr 161 zwiększa się w ciągu fazy G₂, równoległe do syntezy cyklin i zmniejsza do poziomu zerowego po ukończeniu mitozy [52].

Najlepiej poznanym miejscem fosforylacji $p34^{cdc2}$ jest Tyr 15 występująca zarówno u drożdży, jak i u wyższych kręgowców oraz Thr 14, charakterystyczna tylko dla tych ostatnich.



Rys. 1. Uproszczony schemat obrazujący najważniejsze przemiany zachodzące w cyklu komórkowym z uwzględnieniem głównych dróg fosforylacji białka $p34^{cdc2}$ (w pełni zrozumiały dopiero po przeczytaniu całego artykułu)

Miejsce to położone jest w obrębie kieszonki wiążącej ATP, a stosowna fosforylacja uniemożliwia to wiązanie, co się równa inaktywacji własności enzymatycznych $p34^{cdc2}$. Kompleks tak zinktywowanej kinazy z cyklinami mitotycznymi określany jest mianem pre-MPF, gdyż

defosforylacja Tyr 15 i Thr 14 wyzwala aktywność kinazową p34^{cdc2}. Fosforylacja Tyr 15 odbywa się od początku fazy G₂, jednocześnie z tworzeniem się kompleksów pre-MPF, pod wpływem specyficznej kinazy białkowej, kodowanej u drożdży przez gen *wee1*. Ostatnio wykryto homolog tego genu również u człowieka i zidentyfikowano kodowaną przez niego kinazę tyrozynową p50^{wee1} [63]. Tyr 15 może również ulegać fosforylacji pod wpływem białka pp80^{src}, lecz znaczenie tego faktu nie jest znane [25]. Natomiast Thr 14 ulega fosforylacji przez bliżej nie określoną kinazę, przy czym rozpoczyna się ona wcześniej, pod koniec fazy G₁ [8].

Defosforylacja Tyr 15 następuje u drożdży pod wpływem produktu genu *cdc25* [66]. Jest on swoistą fosfatazą tyrozynową, której trzy homologi, zwane CDC25 A, B i C, zidentyfikowano również w komórkach ludzkich. Jeden z nich (A) może łączyć się z cykliną B, co stymuluje jego aktywność [39]. Defosforylacja Thr 14 również może się odbywać pod wpływem CDC25, gdyż ludzkie odpowiedniki *cdc25* *S. pombe* wykazują strukturę podobną do fosfataz serynowo/treoninowych [6]. Dla wszystkich homologów *cdc25* oraz dla fosfatazy VH1 wirusa krowianki charakterystyczna jest warunkująca ich specyficzną aktywność fosfatazową sekwencja HCXXXXXR. Mutacja zawartej w tej sekwencji Cys480 znosi aktywność *cdc25* [45, 66]. Dodatkową fosfatazą aktywującą MPF może być białko p65 koprecypitujące w homogenizatach mitotycznych komórek ludzkich jako homodimer połączony w kompleks z MPF. Wykazuje on działanie fosfatazy zarówno tyrozynowej, jak i serynowo-treoninowej. Za jego znaczeniem przemawia fakt, że przeciwciała anti-p65 mogą blokować aktywację MPF [64].

Ostatnio udowodniono, że regulacja aktywności fosfatazy *cdc25* u *X. laevis* odbywa się przez fosforylację, a forma nieufosforylowana jest mało aktywna. W czasie interfazy białko *cdc25* znajduje się w cytoplazmie, pomimo iż zawiera NTS (*nuclear transfer signal*) i przechodzi do jądra dopiero na przejściu G₂/M. Poziom samego białka i jego mRNA jest u *X. laevis* i u człowieka stały w ciągu cyklu, natomiast u *S. pombe* i u *D. melanogaster* ulega wahaniom, osiągając maksimum na przejściu G₂/M [43].

Regulacja rozmiaru komórki i koordynacja z podziałem może się odbywać przez zmianę proporcji induktora mitotycznego, jakim jest produkt genu *cdc25*, w stosunku do inhibitora mitotycznego, jakim jest produkt genu *wee1* [69]. Innymi induktorami mitotycznymi zidentyfikowanymi u *S. pombe* są np. *wis1* i *nim1*, a inhibitorem *mik1* [99].

3. RODZINA KINAZ CDK

U drożdży *S. pombe* kinaza będąca produktem genu *cdc2* jest białkiem unikalnym, w związku z czym produkt żadnego innego genu nie może uratować mutantów zahamowanych w temperaturze restrykcyjnej. U wyższych eukariontów, w tym i u człowieka, występuje wiele kinaz pokrewnych p34^{cdc2}, które mogą po ekspresji u drożdży w formie wprowadzonego plazmidu uratować mutanty *cdc2*-.

Zgodnie z ustaleniami konferencji w Cold Spring Harbor postanowiono nazwać całą tę rodzinę kinaz kinazami zależnymi od cyklin, czyli CDK (*cyclin dependent kinases*, choć też: *cell division kinases*), gdyż ich aktywność podobnie jak aktywność p34^{cdc2} uzależniona jest od powiązania się w kompleksy z różnymi cyklinami. Ustalono, iż kinazy te mogą być nazywane na dwa sposoby: te, które są najbardziej podobne do p34^{cdc2}, są określane jako cdk

z numerem wg kolejności odkrycia, pozostałe biorą swoją nazwę od sekwencji aminokwasów wyrażonej w kodzie jednoliterowym z regionu charakterystycznego dla cdk, oznaczanego jako PSTAIRE, prawdopodobnie odpowiadającego domenie wiążącej cykliny [106]. Dopuszcza się jednak również stosowanie wcześniej nadanych nazw (np. cdc2, GTA itp.).

Obecnie znamy 11 kinaz z tej rodziny, które zostały wyizolowane z biblioteki cDNA uzyskanej z komórek HeLa za pomocą sond komplementarnych do konserwatywnych regionów cdc2 i wykonania polimerazowej reakcji łańcuchowej PCR. Kinazy te zachowują między sobą homologię rzędu 44–67% i dzieli się je na 3 podrodziny. Do pierwszej z nich należą najlepiej poznane: p34^{cdc2(cdk1)}, p33^{cdk2} i p36^{cdk3}, do drugiej PCTAIRE-1, -2 i -3, a do trzeciej PLSTAIRE i PSK-J3. Ta ostatnia kinaza została ostatnio określona jako cdk4 i zawiera sekwencję PV/ISTRVRE [62]. Poza tą klasyfikacją pozostają mniej homologiczne KKIALRE, PSSALRE i p58^{GTA}. O funkcji większości z tych białek nie wiemy właściwie jeszcze nic, można tylko spekulować, iż ich różnorodność uwarunkowana jest złożonością organizmów wielokomórkowych i może mieć znaczenie w czasie rozwoju zarodkowego i różnicowania się poszczególnych tkanek [65].

Inne rodzaje kinaz występujące u eukariontów wykazują mniej niż 30% homologii z CDK. Najbardziej spośród nich zbliżone kinazy to kinazy MAP (*mitogen activated proteins kinases*) uczestniczące w przekazywaniu sygnałów do komórki oraz kinaza kazeinowa II [65].

Wszystkie CDK wykazują konserwatywność sekwencji, jeżeli chodzi o miejsca ulegające fosforylacji. Większość spośród nich reaguje z przeciwciałami uzyskanymi przeciwko epitopowi warunkowanemu sekwencją PSTAIRE, dlatego w celu ich odróżnienia używa się specyficznych przeciwciał przeciw domenie karboksyterminalnej. Za ich pomocą wykazano, że białka te wykazują tkankowo specyficzne wahania poziomu ekspresji, np. cdk2 i cdc2 mają wysoki poziom w łożysku, a bardzo niski w mózgu, podczas gdy PSSALRE bardzo wysoki poziom w mózgu, a niewykrywalny w łożysku [65].

4. DZIAŁANIE KINAZY p34^{cdc2}

Kinaza p34^{cdc2} jak również spokrewnione z nią CDK fosforylują szereg białek w komórce, wywierając swoje działanie zarówno pośrednio, poprzez fosforylację innych kinaz lub fosfataz i co za tym idzie poprzez zmianę ich aktywności, jak i bezpośrednio, poprzez fosforylację różnorodnych białek strukturalnych i czynników transkrypcyjnych, będących końcowymi efektorami jej działania biologicznego.

p34^{cdc2} jest kinazą serynowo/treoninową o stosunkowo niskiej specyficzności. Jej najczęstsza sekwencja konsensusu jest następująca: Thr/Ser-Pro-X-Lys/Arg (X oznacza jakikolwiek aminokwas) [40]. W niektórych przypadkach fosforyluje ona jednak także w sekwencji Thr/Ser-Pro-X-Pro-Lys lub nawet Thr/Ser-Pro [46].

Wśród wielu substratów p34^{cdc2} należy wymienić: laminy jądrowe, histon H1, białka przeciwnowotworowe (antyonkogeny) p53 i Rb, produkty onkogenów *c-src*, *c-abl* i *c-fos*, środkowy antygen T ludzkiego wirusa polyoma, receptor dla EGF, inhibitor fosfatazy 1, białko tau w mózgu, lekkie łańcuchy miozyny, nukleolinę, polimerazę RNA II, białko MAP-X, czynnik replikacyjny EF-1 γ , czynnik transkrypcyjny SW15, białko RPA, p85^{gag-mos} itd. Należy przy tym pamiętać, że niektóre z tych substratów ulegają fosforylacji także lub wyłącznie w czasie przejścia G₁/S, a nie tylko G/M [40, 46, 71, 104].

Znaczenia wielu z tych fosforylacji jeszcze nie znamy, niektóre jednak już zostały określone.

I tak, fosforylacja białka MAP-X i ewentualnie innych białek związanych z mikrotubulami wiąże się z modulacją ich właściwości dynamicznych i reorganizacją cytoszkieletu na przejściu G_2/M . Wbrew wcześniejszym przypuszczeniom, wykazano jednak, że wzrost dynamiki mikrotubul w czasie mitozy jest spowodowany zależną od $p34^{cdc2}$ aktywacją nieznanego czynnika, niezależnie od obecności aktywnych czynników stabilizujących, takich jak MAP [19].

Fosforylacja antygeny T, SWI5 oraz polimerazy RNA II zachodząca w okolicach punktu Start, regulowałaby transkrypcję odpowiednich genów. Fosforylacja ogona C-terminalnego większej podjednostki polimerazy II wiąże się z przekształceniem kompleksu inicjacyjnego w elongacyjny [40]. Fosforylacja SWI5 odbywa się na trzech resztach serynowych położonych w pobliżu tzw. NTS (*nuclear transfer signal*). W postaci nieufosforylowanej SWI5 występuje w cytoplazmie, natomiast fosforylacja wymienionych reszt serynowych powoduje jego przechodzenie do jądra, gdzie aktywuje on transkrypcję odpowiednich genów. Mutacja tych reszt serynowych do alaninowych powoduje stałą obecność SWI5 w jądrze [40].

Fosforylacja inhibitora 2 fosfatazy białkowej 1 typu pociąga za sobą dysocjację kompleksu tego inhibitora z fosfatazą białkową 1 typu, a co za tym idzie jej aktywację. Fosfataza ta jest jedną z najliczniejszych fosfataz serynowo/treoninowych w komórce, i być może przeciwstawia się niektórym innym fosforylacjom wywołanym przez $p34^{cdc2}$. Również jej podjednostka katalityczna ulega fosforylacji mediowanej przez $p34^{cdc2}$, jednak nie wydaje się to w jakichś sposób zmieniać aktywności tego enzymu [96].

Fosforylacja Thr 669 receptora dla EGF wiąże się z regulacją jego internalizacji i z modulacją aktywności kinazy tyrozynowej [87]. Fosforylacja lamin i występującego razem z nimi białka p54 koreluje z rozpadem otoczki jądrowej w czasie profazy [95]. Fosforylacja onkogenów jądrowych *c-fos* i *c-jun* moduluje ich własności wiązania się z DNA [1].

Fosforylacja produktu *c-abl*, który sam jest kinazą tyrozynową, zmniejsza jego zdolność do wiązania się z DNA, co być może wpływa na obniżenie fosforylacji tyrozynowej sąsiadujących z nim czynników transkrypcyjnych i modulację ich aktywności [40].

Bardzo interesująco przedstawia się regulacja aktywności kinazy tyrozynowej, jaką jest białko $pp60^{c-src}$. Otóż, w czasie mitozy ulega ono fosforylacji na trzech N-terminalnych resztach serynowo-treoninowych bezpośrednio zależnej od $p34^{cdc2}$ oraz defosforylacji na Tyr 527, co powoduje dwukrotny wzrost właściwości enzymatycznych $pp60^{c-src}$ oraz piętnastokrotny wzrost zdolności wiązania się z czynnikami regulującymi poprzez domenę SH2. $pp60^{c-src}$ pośredniczy prawdopodobnie w wywieraniu działania przez MPF, gdyż komórki transformowane *v-src* wykazują stale fenotyp zbliżony do mitotycznego (rozpad cytoszkieletu, zaokrąglenie komórki i utrata właściwości adhezyjnych). Z drugiej strony, wstrzyknięcie aktywnego $pp60^{c-src}$ do dojrzewających oocytów *X. laevis* przyspiesza aktywację MPF [89, 90]. Jest to bardzo intrygujące, jeżeli weźmie się pod uwagę, że $pp60^{c-src}$ oraz inne kinazy z tej rodziny wykazują wysoką aktywność w fosforylowaniu Tyr15 syntetycznego peptydu zawierającego region N-końcowy $p34^{cdc2}$, co sugerowałoby ich rolę inhibującą, a nie aktywującą względem MPF [10].

Również onkogenny homolog *c-mos*, $p85^{gag-mos}$ ulega fosforylacji pod wpływem $p34^{cdc2}$, która powoduje wzrost jego aktywności kinazowej. Produkt *c-mos* jest natomiast podstawowym składnikiem tzw. CSF (*cytostatic factor*), czyli czynnika cytostatycznego, występującego w oocytach zahamowanych w metafazie II podziału mejotycznego, odpowiedzialnego za blok

komórki w fazie M i bezpośrednio aktywującego MPF [89, 93]. Co ciekawsze, *c-mos* w transformowanych *c-mos^{xe}* komórkach NIH 3T3 występuje w bezpośredniej asocjacji z $p34^{cdc2}$, a konkretnie z jego wolną frakcją, nie związaną z cyklinami. Przeciwciała anty-*c-mos* koprecypitują oprócz $p34^{cdc2}$ także tubulinę [106].

5. ZNACZENIE $p34^{cdc2}$ POZA CYKLEM KOMÓRKOWYM

Wydawać by się mogło, że $p34^{cdc2}$ jest białkiem par excellence charakterystycznym dla procesów związanych z regulacją cyklu komórkowego, tymczasem okazało się, iż występuje ono także w komórkach nie ulegających dalszemu podziałowi, gdzie spełnia prawdopodobnie zupełnie inne funkcje. Jest to wspaniały przykład oszczędności natury w wykorzystaniu zasobów będących w jej dyspozycji.

Występujące w komórkach nerwowych białko tau znajduje się w postaci hiperfosforylowanej w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera, toteż przypisuje się temu faktowi znaczenie w tej patologii. Okazało się, że białko tau jest doskonałym substratem dla izolowanej $p34^{cdc2}$, gdyż zawiera liczne regiony konsensusu dla CDK. W wyciągach z neuronów zidentyfikowano obecność bliżej nie określonej kinazy z rodziny CDK, wiążącej się na kolumnach z $p13^{suc1}$ (to białko *S. pombe* wykorzystuje się często do izolacji $p34^{cdc2}$ i innych pokrewnych kinaz ze względu na ich duże powinowactwo) oraz fosforylującej białko tau [35, 89].

Ostatnio wykazano, że poziom transkryptu *cdc2* jest wyższy w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera w porównaniu z kontrolą. Nie udało się jak dotychczas ustalić cykliny występującej w tkance nerwowej [54].

Niespodziewanie, wykryto również obecność kompleksu $p34^{cdk2}$ z cykliną A w płytkach krwi, ulegającego aktywacji pod wpływem trombiny lub PAF [87]. Równoczesne zablokowanie fosfataz występujących w płytkach wywołuje fosforylację różnych białek w regionach konsensusu dla CDK, co zapobiega egzocytozie ziarnistości i obniża wrażliwość na trombinę. Znaczenie tych faktów w regulacji hemostazy i metabolizmu płytek nie jest na razie dokładnie znane [56].

6. CYKLINY MITOTYCZNE

Regulacja tych wszystkich funkcji zależnych od $p34^{cdc2}$ oraz pokrewnych CDK odbywa się nie tylko poprzez zmianę ich stanu fosforylacji, lecz także przez łączenie się w kompleksy ze specyficznymi białkami regulatorowymi, zwanymi cyklinami. Co więcej, cecha ta jest tak charakterystyczna dla CDK, że dała nazwę całej tej rodzinie kinaz (*cyclin dependent kinases*).

W niniejszym podrozdziale omówię regulację zależną od cyklin mitotycznych, zgrupowanych w dwie klasy A i B, zostawiając kwestię cyklin aktywnych w G_1/S do omówienia później na dalszym miejscu.

Podział na klasę A i B uwarunkowany jest zarówno różnicami w sekwencji, jak i w funkcji tych białek, przy czym cykliny B dodatkowo dzieli się na podklasy B1 i B2.

Cykliny B występują u wszystkich badanych do tej pory eukariontów, natomiast nie zdołano wyizolować cyklin A z roślin, choć wyizolowano z biblioteki cDNA marchwi gen o zbliżonej do nich sekwencji [34]. U drożdży *Schizosaccharomyces pombe* cyklinie B odpo-

wiada produkt genu *suc1*, choć wykazuje on mniejszą homologię z cyklinami zwierzęcymi niż zachodziło to w przypadku produktu genu *cdc2*. Według części autorów dalekim homologiem cykliny A jest natomiast produkt genu *cdc13*. U niektórych gatunków występują różne cykliny tej samej klasy, np. cyklina B1 i B2 u człowieka [58].

W genomie myszy zidentyfikowano tylko jedną kopię genu cykliny A, zlokalizowaną na chromosomie 3, przy występowaniu 10 kopii genu dla cykliny B1 (odpowiednio na chromosomach 4,5,7,8,13,14 i 15).

Zróznicowana ekspresja różnych loci cykliny B1 w czasie rozwoju oraz identyfikacja mutacji cyklin B1, w których współwystępują wady rozwojowe sugeruje znaczenie różnych form cykliny B1 w czasie embriogenezy i różnicowania [58].

Ogólna liczba aminokwasów tworzących łańcuch polipeptydowy cyklin waha się z reguły w granicach 390–410 przy dużych wahanach względnej masy cząsteczkowej w granicach 44–62 kDa (nie licząc $p13^{suc1}$). Zarówno cyklina A, jak i B zawiera sekwencję konsensusu dla $p34^{cdc2}$ i ulega zależnej od tej kinazy fosforylacji, jednak zmutowanie odpowiednich reszt serynowych zdaje się nie wywoływać żadnych zaburzeń w aktywacji lub inaktywacji MPF [42].

Jeżeli nie weźmiemy pod uwagę cyklin drożdży, to homologia pomiędzy cyklinami różnych gatunków wynosi 60% w środkowym odcinku długości 148 aminokwasów. Bardzo zmienne są natomiast regiony flankujące. Cykliny typu A od typu B różnią się obecnością u tych pierwszych dwóch specjalnych sekwencji, z których jedna jest miejscem konsensusu dla fosforylacji zależnej od cAMP, druga zaś nie ma ściśle zdefiniowanej funkcji.

W regionie N-terminalnym wszystkich cyklin mitotycznych znajduje się natomiast tzw. sekwencja niszcząca (*cyclin destruction box*) warunkująca ich degradację odbywającą się przy pomocy proteasomów, po uprzedniej ubikwitynacji [30]. Po konserwatywnej ewolucyjnie sekwencji niszczącej (RXXLXXXXN) występuje zakończenie łańcucha bogate w lizynę [26].

Proteasomy, nowo odkryte organelle degradujące ubikwitynowane białka [31, 44], odgrywają zapewne niepoślednią rolę w regulacji cyklu komórkowego. Wykazano zmienność ich dystrybucji w czasie rozwoju zarodkowego zachwy *Halocynthia roretzi*. We wczesnej metafazie proteasomy występują związane z chromosomami, choć także wykrywa się je w okolicy biegunów wrzeciona. W anafazie proteasomy znikają z aparatu mitotycznego, aby od telofazy przez całą interfazę lokalizować się głównie w jądrze, a w mniejszej ilości w cytoplazmie [47].

Proteoliza cykliny B na przejściu metafaza/anafaza jest równoznaczna z inaktywacją MPF (prawdopodobnie defosforylacja Thr 161 jest zjawiskiem wtórnym) i warunkiem sine qua non wyjścia z mitozy. Obecność w komórce zmutowanej formy cykliny B, pozbawionej sekwencji niszczącej, powoduje blok cyklu w mitozie [73]. Jedynym wyjątkiem jest wczesny cykl zarodkowy *Drosophila melanogaster* oraz przejście od I do II podziału mejotycznego w jajach *Xenopus laevis*, kiedy to nie cała cyklina B ulega degradacji [74].

Wprowadzenie zarówno cykliny A, jak i cykliny B do dojrzewających oocytów *Xenopus laevis* wywołuje aktywację MPF, jednak najefektywniej działają one, gdy są wprowadzone razem. Niemniej jednak usunięcie endogennej cykliny A nie zaburza aktywacji MPF, podczas gdy usunięcie cykliny B uniemożliwia ją. Natomiast w przebiegu rozwoju zarodkowego *Drosophila melanogaster* brak endogennej cykliny A powoduje blok w G_2 pomimo obfitości cykliny B [11].

Cyklina B ulega syntezie w czasie fazy G_2 i stopniowej akumulacji w komórce, przy czym większość tego białka gromadzi się pod postacią nie dającą się usunąć za pomocą detergent-

tów, czyli ulega związaniu przez struktury błoniaste i cytoszkielet oraz od początku gromadzi się w okolicy centrosomu [4]. Za pomocą immunofluorescencji wykazano, że cytoplazmatyczna cyklina B występuje w formie ziarnistych skupień [79]. Natomiast metoda frakcjonowania składników jaj *Xenopus laevis* wykazała silne związanie cykliny B z jednostką 60 S rybosomów powiązanych z mikrotubulami oraz z frakcją błonową bogatą w części aparatu Golgiego [55]. Jednocześnie z ufosforylowanym (na Thr 161) białkiem p34^{cdc2} cyklina B tworzy kompleks pre-MPF. W momencie jej asocjacji z p34^{cdc2}, białko to ulega dodatkowej fosforylacji na Thr 14 i Tyr 15 (patrz wyżej). Na początku profazy cykliny B1 i B2 ulegają translokacji do jądra [26].

W odróżnieniu od cykliny B cyklina A nie jest wcale sensu stricto cykliną mitotyczną, gdyż odgrywa także rolę w czasie fazy S, będąc prawdopodobnie niezbędną w zapoczątkowywaniu replikacji DNA [27]. Jej synteza rozpoczyna się wcześniej, a białko to gromadzi się w większości w jądrze, a częściowo w postaci rozpuszczalnej w cytoplazmie [79]. W okolicy centrosomów obecność cykliny A można wykazać dopiero w okresie profazy [4]. Cyklina A ma zdolność tworzenia kompleksów nie tylko z p34^{cdc2}, lecz także z p33^{cdk2} [41]. W komórkach somatycznych ssaków większość cykliny A występuje w formie związanej z p33^{cdk2}, podczas gdy w komórkach zarodkowych *X. laevis* większość wiąże się z p34^{cdc2} [11].

Badania przeprowadzone na bezkomórkowych ekstraktach cytoplazmatycznych z wprowadzoną chromatyną plemników, otrzymanych z lizatów jaj *Xenopus laevis* wykazały, że połączenie cykliny B z p34^{cdc2} wywołuje wzrost aktywności kinazowej dopiero po pewnym czasie latencji, co uwarunkowane jest omówionymi wcześniej zmianami w ufosforylowaniu tego ostatniego białka. Natomiast cyklina A wywołuje natychmiastową aktywację kinazy histonu H1, przy braku znaczących zmian w stopniu ufosforylowania tyrozyny p34^{cdc2}.

Zarówno u zarodków *X. laevis*, jak i w komórkach ludzkich aktywność kinazowa związana z cykliną A wzrasta stopniowo w miarę jej akumulacji w cytoplazmie, natomiast aktywność kinazowa związana z cykliną B jest niska nawet pomimo jej wysokiego poziomu do momentu zadziałania produktu genu *cdc25*. Szczyt aktywności kompleksu p34^{cdc2}/cyklina A występuje wtedy, gdy aktywność kompleksu p34^{cdc2}/cyklina B dopiero zaczyna rosnąć [32]. Również degradacja cykliny A następuje o wiele wcześniej niż cykliny B, mianowicie w momencie rozpadu otoczki jądrowej, a nie na przejściu metafaza/anafaza [11]. Kolejność tych zmian została stwierdzona zarówno u *X. laevis*, jak i w komórkach ludzkich oraz u *Drosophila melanogaster* [67, 102].

W świetle powyższych danych za klasyczny MPF uważa się kompleks p34^{cdc2} z cykliną B, choć niektórzy badacze dopuszczają możliwość rozszerzenia tej definicji także na cyklinę A i ewentualnie na inne dodatkowe komponenty [64]. W każdym razie, kompleks p34^{cdc2}/cyklina A na przejściu G₂/M działa synergistycznie z kompleksem p34^{cdc2}/cyklina B [51]. Sytuację tę komplikuje jeszcze fakt, że w oocytach *X. laevis* przed aktywacją kompleksu p34^{cdc2}/cyklina B2 występuje aktywacja kompleksu p34^{cdc2}/cyklina B1, przy czym znaczenie tego faktu jest zupełnie nie znane [60].

U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykryto 5 homologów cykliny B oznaczonych jako CLB1, 2, 3, 4 i 5. CLB1 i 2 odgrywają rolę na przejściu G₂/M, natomiast pozostałe trzy CLB zachowują się odmiennie [84]. CLB3 i 4, a zwłaszcza CLB5, ulegają ekspresji w czasie G₁ i odgrywają rolę na przejściu G₁/S i w czasie fazy S. Stąd pomimo że strukturalnie należy je zaliczyć do cyklin B, funkcjonalnie przypominają opisane u ssaków cykliny A i E [18].

Zmutowane CLB wywoływały blok cyklu w mitozie, natomiast ich całkowity brak ekspresji blok w fazie S, po replikacji ok. 1/3 DNA [84].

7. REGULACJA FAZY G₁

Chociaż opisany do tej pory mechanizm aktywacji i inaktywacji MPF kontrolujący wejście w fazę M oraz wyjście z tejże zawiera wciąż wiele niejasności, o wiele mniej wiemy na temat mechanizmów kontrolujących wejście w fazę S, doprowadzających do przekroczenia punktu Start (zwanego także punktem restrykcyjnym lub punktem R). Osiągnięcie, tj. przekroczenie tego punktu jest równoznaczne z wejściem komórki w cykl (*commitment to cycle*) i nigdy nie następuje w komórkach zahamowanych w G₀ [12].

Dopiero zadziałanie na zahamowane w G₀ komórki różnorodnymi czynnikami wzrostu wyizolowanymi z surowicy powoduje ich "wejście w cykl". Badania przeprowadzone nad zahamowanymi w G₀, diploidalnymi fibroblastami mysimi wykazały istnienie szeregu etapów, przez które muszą przejść te komórki, ażeby dojść do fazy S. Każdy z takich etapów rozdzielony jest swoistymi punktami kontrolnymi, zwrotnymi czy też restrykcyjnymi (w szerokim tego słowa pojęciu) i na każdym z nich komórki mogą ulec zablokowaniu przy braku określonego czynnika. Jest kwestią sporną czy analogiczne etapy i punkty (poza Start) występują również w przebiegu fazy G₁ komórek, które cały czas znajdują się w cyklu. Wyróżnia się z reguły następujące etapy przy przejściu G₀/G₁ /S: kompetencja, punkt C (*control*), wejście (G_{1a}), punkt V (*verification*), progresja (G_{1b}), punkt R (*Start*) i montaż [104].

Po przejściu punktu R (co jest dokładnie omówione w następnym podrozdziale) występuje krótki okres montażu bądź montowania. Zachodzi wówczas przegrupowanie różnych enzymów z cytoplazmy do jądra, ich modyfikacja i tworzenie odpowiednich kompleksów (np. replikazy). Występuje wówczas wzrost aktywności enzymów odpowiedzialnych za syntezę substratów syntezy DNA (np. kinaza tymidynowa, reduktaza rybonukleotydowa). Co jest znamienne, to niezależność montowania od wpływu czynników zewnętrznych, czym okres ten różni się od poprzednich podokresów G₁, a upodabnia się do okresu pomiędzy aktywacją MPF a początkiem profazy [104].

Wykazano ostatnio, iż w okresie montażu zachodzi unikalna w cyklu transkrypcja zależna od pewnych specyficznych sekwencji DNA zlokalizowanych w obrębie promotorów niektórych genów, np. dla syntetazy tymidynowej i polimerazy DNA I. Najlepiej poznaną sekwencją tego typu jest ACGCGTNA zawierająca w swoim obrębie miejsce działania enzymu restrykcyjnego *Mlu* I i w związku z tym zwana MCB (*Mlu* I cell-cycle box). W obrębie MCB tworzy się kompleks inicjujący transkrypcję tylko w późnym G₁, po przejściu punktu Start, zawierający m.in. białko SW16, pokrewne ulegającemu fosforylacji przez p34^{cdc2} białku SW15 i zawierające sekwencję konsensusu dla tej kinazy. Inną podobną sekwencją tego typu jest CCB (*cell cycle box*), zawierająca wiele powtórzeń CACGAAAA wiążących czynniki SW14 i SW16 [13, 61].

Za pomocą różnych specyficznych inhibitorów kinaz (np. kinazy A, C lub G) można zahamować komórki zmierzające w kierunku fazy S na różnych etapach. Tłumaczy się to interferowaniem z przekazywaniem sygnałów przechodzących z zewnątrz poprzez system wtórnych przekazników. Co jest godne podkreślenia, to fakt, iż efektu tego nie obserwujemy w komórkach nowotworowych oraz prawdopodobnie we wczesnym cyklu zarodkowym [24].

8. CZYNNIK WYWOŁUJĄCY FAZĘ S I CYKLINY G₁/S

Badania polegające na fuzji komórek znajdujących się w fazie S z komórkami znajdującymi się w G₁ wykazały występowanie w tych ostatnich przedwczesnej replikacji DNA, analogicznie do występowania PCC w przypadku użycia do fuzji komórek mitotycznych. Zaproponowano wówczas istnienie czynnika wywołującego fazę S (*S-phase promoting factor*) czy też czynnika pozwalającego na przejście punktu Start (*Start promoting factor*), w skrócie SPF. W odróżnieniu od uniwersalnego działania MPF, działanie SPF nie powoduje syntezy DNA w komórkach znajdujących się w G₂ lub M, prawdopodobnie wskutek obecności jakiegoś inhibitora. Inną możliwością jest to, że białko p34^{cdc2} koduje informację o tym, czy komórka jest w G₁, czy w G₂, tj. czy dokonała już syntezy DNA (patrz niżej) [75].

Inną poszlaką wskazującą na istnienie SPF był fakt, że komórki, zablokowane na początku fazy S poprzez inhibicję syntezy DNA, po uwolnieniu bloku kończą replikację DNA o wiele szybciej niż trwa faza S w komórkach kontrolnych. Co więcej, mają one więcej miejsc inicjujących replikację w porównaniu z kontrolą, co sugeruje bezpośrednie działanie akumulującego się aktywatora replikacji [16].

O podobieństwie tego czynnika do MPF świadczy ponadto niezależność montażu od wpływów zewnętrznych, wzrost ogólnej aktywności kinazowej komórki na przejściu G₁/S oraz prawdopodobny udział w tym procesie kinazy p34^{cdc2}. Zmutowanie tego białka u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wywołuje bowiem blok na przejściu G₁/S z równą częstotliwością co na przejściu G₂/M.

W okresie poprzedzającym punkt R stwierdzono w liszatkach z synchronizowanych populacji komórek gromadzenie się bliżej nie określonych białek, wśród których mogłyby się znajdować specyficzna dla tej fazy cyklu podjednostka regulatorowa p34^{cdc2} o charakterze cykliny.

U drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano początkowo trzy geny (obecnie znamy ich pięć) oznaczone CLN1, 2 i 3 (*Cyclin Like proteiNs*), wykazujące homologię do cyklin mitotycznych. Produkty tych genów są do siebie bardzo podobne i funkcjonalnie wymienne, tak że dopiero mutacja dwóch spośród nich wywołuje blok cyklu przed G₁/S. Wykazują one homologię do cyklin mitotycznych rzędu najwyżej 30% w skali całego polipeptydu, ograniczającą się do tzw. *cyclin box*. Zawierają one sekwencje PEST, charakterystyczne dla białek o niskiej stabilności metabolicznej [81]. W przypadku CLN2 wykazano jego asocjację z p34^{cdc2} pod postacią aktywnego enzymatycznie kompleksu [103]. Geny dla CLN1 i 2 zawierają w obrębie promotorów sekwencje CCB, a ich transkrypcja może odbywać się w sposób niezależny od *cdc2*, uwarunkowany jedynie rozmiarem komórki, lub w sposób zależny od p34^{cdc2}. Ten ostatni mechanizm generuje dodatnią pętlę sprzężenia zwrotnego, gdyż akumulacja CLN aktywuje p34^{cdc2}, co z kolei stymuluje większą transkrypcję CLNów [61].

U *S. pombe* CLN odpowiada gen *puc1*, podobny do CLN3, choć jego sekwencja bliższa jest cyklinie A oraz *cig1*, podobny do CLB3 i 4 [21, 82]. Poszukiwanie homologicznych genów u wyższych eukariontów, w tym i u ssaków, pozwoliło wyodrębnić trzy nowe grupy cyklin oznaczone kolejnymi literami C, D i E [38].

U *Drosophila melanogaster* wyodrębniono natomiast tylko jeden gen o charakterze cykliny G₁, ratujący letalne mutacje CLN 1,2,3 – *S. cerevisiae*. Gen ten, nazwany CLNDm (*CLN D. melanogaster*) występuje w genomie w pojedynczej kopii i ulega największej

ekspresji w czasie intensywnych podziałów komórkowych, tj. w czasie wczesnego rozwoju zarodkowego [53].

Spośród cyklin G_1 najlepiej poznano rolę ludzkiej cykliny E izolowanej z komórek HeLa. Cyklina ta występuje w kompleksie z $p33^{cdk2}$, przy czym jej ilość oraz związana z nią aktywność kinazy histonu H1 jest największa w późnej fazie G_1 i we wczesnej fazie S. Aktywna forma cykliny E znajduje się poza tym w stanie ufosforylowanym podobnie jak związany z nią produkt genu *cdk2*. Cyklina E może również tworzyć kompleks z $p34^{cdc2}$, lecz nie pociąga to za sobą aktywacji właściwości kinazowych. Opisywana wcześniej aktywność $p34^{cdc2}$ w komórkach kręgowców w G_1/S pochodzi prawdopodobnie od $p33^{cdk2}$, które wykazuje taką samą specyficzność substratową i również, jak to już zostało wspomniane, reaguje z przeciwciałami skierowanymi przeciwko domenie PSTAIRE. (Drożdże nie mają innych od $p34^{cdc2}$ kinaz z rodziny CDK.) Kompleks $p33^{cdk2}$ lub/i $p34^{cdc2}$ z cykliną E jest najbardziej prawdopodobnym kandydatem na SPF [15].

Cyklina E ma sekwencję najbardziej podobną do cyklin mitotycznych, cyklina C najbardziej odmienną, natomiast grupa cyklin D zajmuje pozycję pośrednią. Cyklina C jest najmniej poznana, wiadomo tylko, że kodujący ją mRNA osiąga najwyższy poziom w komórkach ssaków we wczesnej fazie G_1 [41].

Wyróżnia się obecnie trzy klasy cyklin typu D, mianowicie D1, D2 i D3. Należą tutaj również znane wcześniej białka o charakterze onkogenów, mianowicie *bcl-1* wykryty w komórkach białaczek B oraz PRAD1 wykryty w guzach przytarczyc. U myszy wykryto, że ekspresja różnych podklas cyklin z grupy D jest tkankowo specyficzna [82].

Dodanie wyizolowanej z komórek ssaków cykliny D1 do lizatów z zarodków jeźowca aktywuje kinazę H1 mogącą zostać związaną przez $p13^{suc1}$ jednak fizjologicznym partnerem tej grupy cyklin wydaje się być inna CDK. W aktywowanych makrofagach mysich cyklina D1 tworzy kompleks z $p34^{cdk4/PSK-J3}$ akumulujący się w czasie fazy G_1 i znikający z komórki w czasie fazy S, chociaż poziom mRNA dla cykliny D1 jest stały przez cały czas trwania cyklu. Kompleks ten nie wykazuje aktywności kinazy histonu H1, ma natomiast zdolność fosforylowania białka Rb. Kompleksy zawierające w swoim składzie cykliny D2 i D3 zostały zidentyfikowane w proliferujących limfoblastach T, lecz ich dokładna rola wciąż nie jest poznana. Czas ekspresji cyklin z grupy D w ciągu G_1 jest bardzo zmienny i można nań wpływać czynnikami wzrostu (np. CSF-1 lub IL-2), co wiąże wpływy zewnętrzne z autonomicznym napędem cyklu [62].

Oprócz wspomnianych już poprzednio białek ulegających fosforylacji w czasie G_1/S zależnej od CDK, a więc i od kompleksu SPF, najważniejsza wydaje się fosforylacja produktu anty-onkogeny Rb, uwikłanego w regulacji tego przejścia [36, 37].

Nieufosforylowana forma $p110^{Rb}$ zapobiega proliferacji komórek, podczas gdy forma ufosforylowana sprzyja proliferacji. Forma nieufosforylowana występuje w fazie G_1 , podczas gdy forma ufosforylowana w fazach S, G_2 oraz M. Jej defosforylacja zachodzi przy wyjściu z mitozy [2]. Produkt Rb immunoprecypituje razem z kinazą o specyficzności substratowej charakterystycznej dla CDK, przy czym może to być zarówno $p34^{cdc2}$, jak i $p33^{cdk2}$ [50].

Ufosforylowana forma $p110^{Rb}$ uwalnia szereg czynników transkrypcyjnych, które mogą wchodzić wraz z $p33^{cdk2}$ w skład kompleksów zlokalizowanych w jądrze, i uczestniczyć w lokalnej modulacji innych czynników transkrypcyjnych poprzez ich fosforylację, podobnie jak to zachodzi w przypadku *c-abl* [15, 40]. Białko Rb tworzy również kompleksy z licznymi czynnikami transkrypcyjnymi i produktem onkogeny *c-myc* oraz z cykliną A w czasie trwania fazy S [50]. Wyeliminowanie cykliny A z komórek ludzkich za pomocą antysensowego

oligonukleotydu dla jej mRNA powoduje blok przed punktem Start i brak replikacji DNA [92].

Nieufosforylowana forma p110^{Rb} tworzy razem z niezidentyfikowaną bliżej CDK oraz kilkoma innymi białkami inhibujący transkrypcję kompleks Yi1 występujący w regionie promotora genu kinazy tymidynowej w czasie fazy G₁. Na przejściu G₁/S, p110^{Rb} ulega fosforylacji zależnej od CDK, która następnie oddysocjuje, a kompleks Yi1 przechodzi w charakterystyczny dla fazy S kompleks Yi2 indukujący transkrypcję [14].

Podobny do Rb mechanizm działania ma też gorzej poznany produkt anty-onkogenu p53 mogący występować w kompleksach z niewielkimi ilościami p34^{cdc2} [97] oraz różnymi czynnikami transkrypcyjnymi i inicjującymi replikację [38]. Rola i znaczenie p53 oraz Rb zostały ostatnio szeroko opisane na tych łamach [36, 37].

Wydaje się, że SPF nie tylko uczestniczy pośrednio w przygotowywaniu komórki do replikacji jej materiału genetycznego, lecz także bezpośrednio uczestniczy w inicjacji syntezy DNA. Wniosek ten wysnuto na podstawie badań nad wprowadzonymi do komórek drożdży *S. cerevisiae* plazmidami zawierającymi dobrze poznane miejsce inicjacji replikacji *ori* (*origin*) wirusa SV 40 o długości ok. 200 par zasad. Kompleks inicjujący replikację DNA na *ori* jest utworzony przez duży antygen T SV 40 oraz przez komórkowe białko RPA (*replication protein A*) zwane także RFA lub hSSB. Liczne cząsteczki dużego antygeny T rozpoznają *ori* i działają jako helikaza rozwijająca podwójną nić DNA. Z miejscem tym łączy się następnie RPA, przejmując funkcję dalszego rozwijania nici, do której przyłączają się dalsze komponenty kompleksu replikacyjnego [16, 92].

W skład RPA wchodzi trzy podjednostki – p11, p34 i p70. Podjednostka p34 zarówno pochodząca od drożdży, jak i w komórkach ludzkich występuje w fazach S i G₂ w postaci ufosforylowanej na miejscach konsensusu dla CDK, a w fazie G₁ występuje w postaci nieufosforylowanej. Początek fosforylacji przypada na przejście G₁/S. Dodanie oczyszczonego preparatu zawierającego białko p34^{cdc2} do nieaktywnych replikacyjnie ekstraktów z komórek ludzkich w fazie G₁ zawierających plazmid z *ori*, duży antygen T oraz RPA indukuje replikację plazmidowego DNA [16, 92].

Ostatnio pojawiły się sugestie, że być może w przypadku cyklu wyższych eukariontów należy wyraźnie rozdzielić aktywność SPF, związaną z regulacją przejścia punktu R, od aktywności wymaganej do inicjacji i kontynuacji fazy S, gdyż zależą one od różnych cyklin, a być może także od różnych CDK [81, 82].

9. SPRZĘŻENIA ZWROTNE W CYKLU KOMÓRKOWYM

Wszystkie omówione do tej pory zjawiska obejmują tzw. napęd cyklu komórkowego, powodujący cykl skoordynowanych zmian w aktywności omówionych tu kinaz CDK oraz innych enzymów, w tym kinaz typu *wee1* oraz nieswoistych i swoistych (*cdc25*) fosfataz. Powodują one szereg zjawisk następczych. W przypadku wejścia w mitozę (*mitotic ENTER*) jest to formacja wrzeciona kariokinetycznego, kondensacja chromatyny i rozpad otoczki jądrowej. W przypadku wyjścia z mitozy (*mitotic EXIT*, należy pamiętać, że nie jest to równoznaczne z morfologicznym zakończeniem mitozy) jest to segregacja chromosomów, dekondensacja chromatyny, odtworzenie otoczki jądra, rozpad wrzeciona i ewentualna cyto-kineza. W przypadku punktu R, czyli START, jest to replikacja DNA oraz duplikacja centrum

organizującego mikrotubule MTOC (*microtubule organizing center*) [72]. Nie wykryto dotychczas jakiegoś ściśle zdefiniowanego punktu w cyklu oznaczającego wyjście z fazy S i związanego z inaktywacją SPF.

W większości przypadków komórek znajdujących się w cyklu tzw. somatycznym inhibicja efektów następczych zatrzymuje również napęd cyklu, przynajmniej na jakiś okres. Nie dotyczy to z reguły zjawisk zachodzących we wczesnym cyklu zarodkowym.

I tak, w ciągu pierwszych dwunastu cykli komórkowych zarodka *X. laevis* nie wykrywa się ufosforylowanej na Tyr 15 formy $p34^{cdc2}$, co by mogło znaczyć, że cykl komórkowy wczesnych zarodków znajduje się pod kontrolą cykliny A, pomimo obecności cykliny B. Jest to hipoteza dość atrakcyjna, zważywszy, że aktywność kinazowa zależna od cykliny A nie ulega supresji pod wpływem niezreplikowanego DNA w warunkach, gdy niknie aktywność zależna od cykliny B, a jedną z cech charakterystycznych wczesnego cyklu zarodkowego jest jego autonomia i brak kontroli typu sprzężenia zwrotnego [11, 33]. Enukleowane jaja *X. laevis* poddane aktywacji wykazują szereg zmian morfologicznych i cykliczny wzrost aktywności MPF pomimo braku DNA przez szereg cykli [104].

Ostatnio jednak wykazano, że dodanie do takich jaj nawet niewielkiej ilości DNA w obecności inhibitora jego syntezy, jakim jest afidicholina, wywołuje blok w G_1 , a z kolei dodanie nadmiaru chromatyny wydłuża interfazę [98]. Wydaje się więc, że nawet w cyklu zarodkowym istnieją pewne mechanizmy typu sprzężenia zwrotnego, przynajmniej ograniczone do kontroli syntezy DNA. Co więcej, blok taki można usunąć za pomocą antysensowego oligonukleotydu dla mRNA cykliny A, co znosi tę kontrolę i powoduje mitozę pomimo nieukończenia syntezy DNA. Podkreśla to wspomniane wyżej znaczenie tej cykliny w cyklu zarodkowym.

Natomiast prawie na pewno wczesny cykl zarodkowy wykazuje niezależność od dostarczanych z zewnątrz substratów oraz od obecności różnych czynników wzrostu, co wiąże się ze znacznym skróceniem fazy G_1 . Poddawana bywa w wątpliwość obecność w tym cyklu punktu R, jednak wykrycie w zarodkach różnych cyklin G_1 wskazuje, że i tutaj odgrywa on jakąś rolę. Pewną, bardzo istotną różnicą pomiędzy cyklem zarodkowym a somatycznym jest fakt, że w tym pierwszym akumulacja cykliny B rozpoczyna się już w momencie wyjścia z mitozy, natomiast w tym drugim dopiero po przekroczeniu punktu Start [72].

Aktywność cdk2 w zarodkach *X. laevis*, opisana pierwotnie jako Eg1, oscyluje niezależnie od $p34^{cdc2}$ i od cyklin mitotycznych, osiągając maksimum w czasie mitozy. Tak wczesna aktywacja cdk2 sugeruje praktycznie przechodzenie punktu R i aktywację SPF jeszcze w czasie trwania mitozy. Wspomniane powyżej skrócenie fazy G_1 oznaczałoby ograniczenie jej do okresu montażu [22]. Aktywacja i inaktywacja cdk2 w embrionalnym cyklu *X. laevis* zdaje się nie zależeć od podjednostki typu cykliny, natomiast jest regulowana złożonymi reakcjami fosforylacji/defosforylacji na resztach Ser/Thr i Tyr. Aktywacja cdk2 może się odbywać pod wpływem produktu genu *cdc25* [23].

Wydaje się, że w celu skoordynowania zjawisk zachodzących w przebiegu cyklu wczesne zarodki opierają się jednak głównie na mechanizmie czasowym, tj. na tym, że zjawiska zachodzące w napędzie cyklu są wolniejsze niż efekty następcze przez nie kontrolowane. Mechanizm ten jednak byłby bardzo zawodny w przypadku komórek somatycznych, uzależnionych w różnoraki sposób czy to od środowiska zewnętrznego (w przypadku jednokomórkowców takich jak drożdże), czy to od różnorodnych sygnałów ze środowiska wewnętrznego makroorganizmu (w przypadku wielokomórkowców).

Każde sprzężenie zwrotne występujące w komórkach somatycznych musi mieć przynajmniej trzy elementy, mianowicie sensor sprawdzający zakończenie efektu następczego, sygnał generowany przez ten sensor oraz efektor w napędzie cyklu komórkowego, powodujący jego zatrzymanie, w przypadku nie dopełnienia któregoś z efektów następczych.

Rozpoczęto intensywne poszukiwania elementów wchodzących w skład sprzężeń zwrotnych cyklu komórkowego. I tak, kofeina (będąca inhibitorem różnych kinaz) pozwala na wejście w mitozę niektórym komórkom ssaków z uszkodzonym lub z niezreplikowanym DNA. Kontynuacja cyklu pomimo bloku przez sprzężenie zwrotne może w warunkach fizjologicznych być jednym z mechanizmów prowadzących do apoptozy komórek [72].

Po zadziałaniu czynnikami alkilującymi na komórki chłoniaka CA46 obserwuje się blok w G_2 z wysokim poziomem cykliny B i ufosforylowanym na Tyr15 $p34^{cdc2}$. Natomiast komórki innej linii, JLP119 omijały ten punkt kontrolny, co czyniło je wrażliwymi na działanie iperytu. Możliwa droga zahamowania aktywacji MPF wiedzie poprzez represję *cdc25* lub stymulację *wee1* [76].

Obecnie zidentyfikowano u drożdży *S. pombe* i *S. cerevisiae* szereg mutantów niweczących sprzężenie zwrotne zapobiegające kontynuacji cyklu w obecności uszkodzonego lub niezreplikowanego DNA. Natomiast u ssaków wykryto gen *RCC1* (*repressor of chromosome condensation*), którego zmutowana forma aktywowana w S hamuje replikację DNA i indukuje przedwczesną mitozę, a uruchomiona w G_1 blokuje zarówno fazę S, jak i mitozę [72].

Produkt tego genu, $p45^{RCC1}$ jest zlokalizowany w chromatynie i ma domenę wiążącą DNA. Oddziałuje on tam z białkiem będącym produktem onkogenu *c-ran*, należącego do rodziny onkogenów *c-ras*. Białko ran jest małym białkiem G i pod wpływem oddziaływania z $p45^{RCC1}$ zachodzi w nim wymiana GDP na GTP. Wskazuje to na występowanie mechanizmu transdukcji sygnału z chromatyny do jakiegoś efektora analogicznego do transdukcji zachodzącej poprzez duże białka G zlokalizowane w błonie komórkowej [88].

10. REGULACJA POZIOMU $p34^{cdc2}$ W KOMÓRCIE

Jak już wzmiankowałem powyżej, poziom białka $p34^{cdc2}$ jest stały podczas całego cyklu komórkowego. Nie dotyczy to jednak komórek w G_0 oraz komórek starzejących się. Po zadziałaniu na te dwie populacje komórek surowicą w pierwszym przypadku rozpoczyna się ekspresja genów *cdc2*, cyklin A i B, a w drugim odpowiednie białka i transkrypty utrzymują się na niewykrywalnym poziomie, chociaż stymulacja surowicą wywołuje w komórkach senescentnych ekspresję innych genów (np. *c-myc*, *c-jun*) [91].

Brak ekspresji *cdc2* w komórkach senescentnych nie jest jednak pierwotną przyczyną starzenia się komórek, gdyż transfekcja takich komórek plazmidem zawierającym wiele kopii *cdc2* ulegającym ekspresji nie powodowała transformacji i wejścia w cykl [85].

Stały poziom $p34^{cdc2}$ w komórkach znajdujących się w cyklu jest spowodowany utrzymywaniem się dynamicznej równowagi pomiędzy syntezą i degradacją białka oraz jego mRNA. Zarówno w przypadku ludzkich diploidalnych fibroblastów, jak i komórek HeLa wykazano, że po ukończeniu mitozy transkrypcja i translacja *cdc2* jest wyłączana, a jego mRNA ulega szybkiej degradacji, dopiero na przejściu G_1/S następuje 12-krotne zwiększenie transkrypcji oraz aktywacja translacji [100].

W czasie fazy G_1 poziom $p34^{cdc2}$ jest utrzymywany przez wydłużenie jego czasu półtrwania do 18 h, wynoszącego w pozostałych fazach cyklu jedynie 7,5 h. Pomimo tego może dojść jednak w niektórych przypadkach do jego obniżenia się we wczesnej G_1 [8].

W ciągu cyklu komórkowego dochodzi do wymiany 75–85% $p34^{cdc2}$, który występuje w dwóch pulach: starej, pozostałej po poprzednim cyklu, i nowej, gromadzącej się od G_1/S , wchodzącej w skład MPF [100].

Wydaje się, że ta wymiana $p34^{cdc2}$ ma znaczenie w kodowaniu informacji o tym, czy komórka znajduje się w fazie G_1 , czy w fazie G_2 , co tworzyłoby jeszcze jeden mechanizm kontroli typu sprzężenia zwrotnego pomiędzy fazą S a mitozą. Otrzymano mutanty *S. pombe*, których pula $p34^{cdc2}$ ulega całkowitemu zniszczeniu po umieszczeniu w odpowiednio wysokiej temperaturze. Jeżeli uczyni się tak z komórkami będącymi w G_2 , to nie wchodzi one w mitozę, lecz jak gdyby bezpośrednio "przeskakują" w fazę G_1 i dokonują kolejnej rundy syntezy DNA [7].

Co ciekawe, informacja ta nie jest kodowana ani przez asocjację z $p56^{cdc13}$ (cykliną B), ani przez fosforylację tyrozyny 15, choć inne obserwacje zdawały się wskazywać na tę ostatnią możliwość i na udział w tym procesie *cdc25* [17].

Ostatnio pojawiły się doniesienia, że obniżenie poziomu białka $p34^{cdc2}$ w komórkach może być istotne w ich różnicowaniu się. Wykazano, że różnicujące się pod wpływem kwasu retinowego komórki zwojaka zarodkowego wykazują 75-krotne zmniejszenie się poziomu $p34^{cdc2}$, któremu towarzyszy zmniejszenie się poziomu $p107^{Rb}$ oraz spadek jego fosforylacji [25]. Kwas retinowy poprzez swoje receptory [28] reguluje zapewne ekspresję genów indukujących degradację $p34^{cdc2}$ lub blok translacji, gdyż poziom mRNA dla *cdc2* utrzymuje się na nie zmienionym poziomie [25].

Niewiele jeszcze wiadomo o metabolizmie innych CDK. Poziom *cdk2* jest w komórkach będących w cyklu również względnie stały. W przypadku przechodzenia z fazy G_0 do cyklu mRNA *cdk2* i samo białko pojawiają się o wiele wcześniej niż mRNA dla *cdc2* [81].

11. ROLA Ca^{2+} I INNYCH CZYNNIKÓW W CYKLU KOMÓRKOWYM

Od dawna wiadomo, że z aktywacją zahamowanego w metafazie II podziału mejotycznego oocyty wiąże się przejściowy wzrost wewnątrzcytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów wapniowych (oznaczanego dalej jako $[Ca^{2+}]_i$). Podobne zwiększenie się $[Ca^{2+}]_i$ zostało również stwierdzone bezpośrednio przed mitozą w komórkach somatycznych ssaków [3, 80]. Co więcej, degradacja cyklin i wyjście z fazy M zależy w bliżej nieokreślony sposób od wapnia i kalmoduliny [59]. Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ można indukować mikroiniekcją $p34^{cdc2}$ [78, 101].

Pozbawione Ca^{2+} komórki ssaków blokują się w G_1 , a komórki *S. cerevisiae* poza blokiem w G_1 blokują się także w G_2/M . Kontrola zależna od wapnia odbywa się prawdopodobnie poprzez kalmodulinę. W komórkach linii CHO wzrost jej poziomu występuje przy wchodzeniu w cykl z G_0 , a następnie jej stężenie ulega podwojeniu na przejściu G_1/S , po czym rośnie dalej przy wchodzeniu w mitozę. Delecja genu dla kalmoduliny u *S. cerevisiae* powoduje blok na przejściu G_2/M , natomiast jej nadmierna ekspresja powoduje skrócenie fazy G_1 [3, 80].

Jednym z głównych efektorów Ca^{2+} /kalmoduliny jest zależna od niej kinaza II. Lokalizuje się ona w jądrze i w aparacie mitotycznym, a rozpad otoczki jądrowej może zostać powstrzymany poprzez zablokowanie jej aktywności przeciwciałami lub odpowiednimi oligopeptyda-

mi. Ekspresja zmutowanej, stale aktywnej formy tej kinazy w komórkach ssaków wywołuje blok w G_2 pomimo wzrostu aktywności MPF do poziomu występującego w komórkach mitotycznych [3, 80].

Sugeruje to, że co prawda napęd cyklu zależny od $p34^{cdc2}$, cyklin i związanych z nimi białek jest bardzo ważny, lecz nie wystarczający do indukcji mitozy, przynajmniej w pewnych układach. Innym przykładem jest występująca u pleśni *Aspergillus nidulans* kinaza NIMA (*never in mitosis A*), której aktywność na przejściu G_2/M jest wymagana niezależnie od aktywności $p34^{cdc2}$. Wydaje się, że jej aktywność przynajmniej częściowo jest regulowana w sposób zależny od jonów wapnia [70].

Ostatnio wykryto u myszy kinazę o sekwencji zupełnie niepodobnej do CDK, o zupełnie unikalnych właściwościach, fosforylującą zarówno reszty treoninowe i serynowe, jak i tyrozynowe. Ze względu na sięgającą 42% homologię z kinazą NIMA nazwano tę kinazę nek1 (*NIMA rElated Kinase*). Za pomocą hybrydyzacji in situ wykazano, że wysoki poziom mRNA dla nek1 występuje przede wszystkim w komórkach płciowych, zarówno męskich jak i żeńskich. W związku z tym postuluje się jej udział w regulacji mejozy [57].

Innymi poszlakami dowodzącymi istnienia niezależnych mechanizmów kontroli cyklu jest zależna od kinazy białkowej A inhibicja rozpadu otoczki jądrowej [68] i refosforylacja Tyr15 aktywnego $p34^{cdc2}$ [86] oraz blok w G_2 wywołowany u *S. cerevisiae* przez brak ekspresji kinazy NPS1 [94].

W przypadku aktywacji jaj *Xenopus laevis*, po wspomnianej na początku fali wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ następuje zależna od niej fala wzrostu pH_i równoległa w czasie do inaktywacji MPF. W każdym następnym cyklu najniższe pH_i wiąże się z metafazą. Ponieważ plazmalemma oocytu nie zawiera systemu transportującego H^+ , gromadzony on jest prawdopodobnie w pęcherzykowatych kompartmentach. Wysłunięto hipotezę, że alkalizacja cytoplazmy zachodząca w czasie inaktywacji MPF odzwierciedla być może magazynowanie w tym kompartmentie wolnego $p34^{cdc2}$, a zakwaszenie w kolejnych mitozach odzwierciedla uwalnianie małych porcji tej kinazy do cytoplazmy [9].

12. ZAKOŃCZENIE

Jak wynika z przytoczonych tu danych, wiemy dziś o wiele więcej na temat regulacji cyklu komórkowego, kontrolujących ten proces białek i reakcji biochemicznych niż dwa czy trzy lata temu. Niemniej jednak jest to dopiero wierzchołek góry lodowej. Najbliższe lata przyniosą zapewne o wiele więcej wiadomości [39].

Nie sposób na zakończenie nie wspomnieć o implikacjach praktycznych wynikających z tych odkryć. Rozregulowanie delikatnej sieci zależności pomiędzy poszczególnymi elementami napędu cyklu leży u podstaw powstawania nowotworów [41]. Do tej pory stwierdzono zaburzenia w różnych nowotworach dotyczące cyklin A i D. Dla przykładu, bardzo często w pierwotnym raku wątroby znajduje się sekwencje HBV wbudowane w obrębie genu dla cykliny A [27]. Nadmierna ekspresja cykliny A wydaje się też charakterystyczna dla proliferacyjnych schorzeń układu krwiotwórczego [77]. O wykryciu cyklin D w komórkach nowotworowych wspomniano już w odpowiednim rozdziale. Również *cdc25* jest potencjalnym protoonkogenem, gdyż wykryto jego nadmierną ekspresję w transformowanych SV40 fibroblastach oraz w komórkach raka pęcherza moczowego [5].

Znalezienie odpowiednich, selektywnych inhibitorów różnych enzymów napędu cyklu doprowadzi do powstania nowej generacji leków cytostaticznych, które będą mogły być tkankowo specyficzne ze względu na zróżnicowaną tkankowo ekspresję różnych CDK i cyklin. Zostały już opracowane łatwe w użyciu testy pozwalające na poszukiwania tego typu substancji [5, 83].

LITERATURA

- [1] ABATE C, MARSHAK DR, CURRAN T. Fos is phosphorylated by p34^{cdc2}, cAMP dependent protein kinase and protein kinase C at multiple sites clustered within regulatory regions. *Oncogene* 1991; **6**: 2179–2185.
- [2] ABRAHAM SE, CARTER MC, MORAN E. Transforming Growth Factor β_1 (TGF β_1) Reduces Cellular Levels of p34^{cdc2} and This Effect is Abrogated by Adenovirus Independently of the E1A-Associated pRB Binding Activity. *Molec Biol Cell* 1992; **3**: 655–665.
- [3] ANRAKU Y, OHYA Y, IDA H. Cell cycle control by calcium and calmodulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1991; **109**: 169–177.
- [4] BAILLY E, PINES J, HUNTER T, BORNENS M. Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *J Cell Sci* 1992; **101**: 529–545.
- [5] BARATTE B, MEIJER L, GALAKTIONOV K, BEACH D. Screening for Antimitotic Compound Using the cdc25 Tyrosine Phosphatase, an Activator of the Mitosis-Inducing p34^{cdc2}/Cyclin B^{cdc13} Protein Kinase. *Anticancer Res* 1992; **12**: 873–880.
- [6] BELLE R, OLLIVIER E, GUERRUCCI MA. Higher eucaryotic cdc25 proteins are structurally related to phosphoseryl/threonyl protein phosphatases. *Biol Cell* 1992; **75**: 139–143.
- [7] BROEK D, BARTLETT R, CRAWFORD K, NURSE P. Involvement of p34^{cdc2} in establishing the dependency of S phase on mitosis. *Nature* 1991; **349**: 388–393.
- [8] BYBEE A, THOMAS NSB. The synthesis of p58^{cyclin A} and the phosphorylation of p34^{cdc2} are inhibited in human lymphoid cells arrested in G₁ by α -interferon. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1137**: 73–76.
- [9] CHARBONNEAU M, GRANDIN N. A hypothesis on p34^{cdc2} sequestration based on the existence of Ca²⁺-coordinated changes in H⁺ and MPF activities during *Xenopus* egg activation. *Biol Cell* 1992; **75**: 165–172.
- [10] CHENG HC, NISHIO H, HATASE O, RALPH S, WANG JH. A Synthetic Peptide Derived from p34^{cdc2} Is a Specific and Efficient Substrate of src-Family Tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 1992; **267**: 9248–9256.
- [11] CLARKE PR, LEISS D, PAGANO M, KARSENTI E. Cyclin A- and Cyclin B-dependent protein kinases are regulated by different mechanisms in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J* 1992; **11**: 1751–1761.
- [12] CROSS F, MCKINNEY J. Is Start a switch ? [w] Regulation of the eucaryotic cell cycle. Ciba Foundation Symposia vol.170. Chichester: Wiley 1992: 20–29.
- [13] DIRICK L, MOLL T, AUER H, NASMYTH K. A central role for SW16 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature* 1992; **357**: 508–511.
- [14] DOU QP, MARKELL PJ, PARDEE A.B. Thymidine kinase transcription is regulated at G₁/S phase by a complex that contains retinoblastoma-like protein and a cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3256–3260.
- [15] DULIC V, LEES E, REED SI. Association of Human Cyclin E with a Periodic G₁-S Phase Protein Kinase. *Science* 1992; **257**: 1958–1961.
- [16] DUTTA A, STILLMAN B. cdc2 family kinases phosphorylates a human cell DNA replication factor, RPA, and activate DNA replication. *EMBO J* 1992; **11**: 2189–2199.
- [17] ENOCH T, NURSE P. Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell* 1990; **60**: 665–673.
- [18] EPSTEIN CB, CROSS FR. CLB 5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Devel* 1992; **6**: 1695–1706.
- [19] FARUKI S, DOREE M, KARSENTI E. cdc2 kinase - induced destabilization of MAP2-coated microtubules in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* 1992; **101**: 69–78.
- [20] FLEIG UN, GOULD KL, NURSE P. A Dominant Negative Allele of p34^{cdc2} Shows Altered Phosphoaminoacid Content and Sequesters p56^{cdc13} Cyclin. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2295–2301.
- [21] FORSBURG SL, NURSE P. Identification of a G₁-type cyclin puc1⁺ in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 1991; **351**: 245–248.

- [22] GABRIELLI BG, LEE MS, WALKER DH, PIWNICA-WORMS H, MALLER JL. Cdc25 Regulates the Phosphorylation and Activity of the *Xenopus* cdk2 Protein Kinase Complex. *J Biol Chem* 1992; **267**: 18040–18046.
- [23] GABRIELLI BG, ROY LM, GAUTIER J, PHILIPPE M, MALLER JL. A cdc2-related Kinase Oscillates in the Cell Cycle Independently of Cyclins G₁/M and cdc2. *J Biol Chem* 1992; **267**: 1969–1975.
- [24] GADBOIS DM, CRISSMAN HA, TOBEY RA, BRADBURY EM. Multiple kinase arrest points in the G₁ phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8626–8630.
- [25] GAETANO C, MATSUMOTO K, THIELE CJ. Retinoic Acid Negatively Regulates p34^{cdc2} Expression during Human Neuroblastoma Differentiation. *Cell Growth Differ* 1991; **2**: 487–493.
- [26] GALLANT P, NIGG EA. Cyclin B2 Undergoes Cell cycle-dependent Nuclear Translocation and, when Expressed as a Non-Destructible Mutant, Causes Mitotic Arrest in Hela Cells. *J Cell Biol* 1992; **117**: 213–224.
- [27] GIRARD F, STRAUSFELD U, FERNANDEZ A, LAMB NJC. Cyclin A Is Required for the Onset of DNA Replication in Mammalian Fibroblasts. *Cell* 1991; **67**: 1169–1179.
- [28] GLASS CK, DIRENZO J, KUROKAWA R, ZHIHUA H. Regulation of Gene Expression by Retinoic Acid Receptors. *DNA Cell Biol* 1991; **10**: 623–638.
- [29] GLENNEY JR. jr. Tyrosine-phosphorylated proteins: mediators of signal transduction from the tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1134**: 113–127.
- [30] GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [31] GOLDBERG AL, ROCK KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992; **357**: 375–378.
- [32] HAMAGUSHI JR, TOBEY RA, PINES J, CRISSMAN HA, HUNTER T, BRADBURY EM. Requirement for p34^{cdc2} Kinase Is Restricted to Mitosis in the Mammalian cdc2 Mutant FT 210. *J Cell Biol* 1992; **117**: 1041–1053.
- [33] HARTWELL LH. Twenty-Five Years of Cell Cycle Genetics. *Genetics* 1991; **129**: 975–980.
- [34] HATA S, KOUCHI H, SUZUKA I, ISHII T. Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO J* 1991; **10**: 2681–2688.
- [35] HELLMICH MR, PANT HC, WADA E, BATTEY JF. Neuronal cdc2-Like Kinase - A cdc2-Related Protein Kinase with Predominantly Neuronal Expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10867–10876.
- [36] HETMAN M. Geny przeciwnowotworowe – ważny element w powstawaniu nowotworów. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 203–216.
- [37] HORST A. Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 3–21.
- [38] HUBERMAN JA. Cell cycle control of initiation of eukaryotic DNA replication. *Chromosoma* 1991; **100**: 419–423.
- [39] HUNTER T. Introduction. [w] Regulation of the eucaryotic cell cycle. Ciba Foundation Symposia vol.170. Chichester: Wiley 1992: 1–6.
- [40] HUNTER T, KARIN M. The Regulation of Transcription by Phosphorylation. *Cell* 1992; **70**: 375–387.
- [41] HUNTER T, PINES J. Cyclins and Cancer. *Cell* 1991; **66**: 1071–1074.
- [42] IZUMI T, MALLER J. Phosphorylation of *Xenopus* Cyclins B1 and B2 Is Not Required for Cell Cycle Transition. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 3860–3867.
- [43] IZUMI T, WALKER DH, MALLER JL. Periodic Changes in Phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 Phosphatase Regulate Its Activity. *Mol Biol Cell* 1992; **3**: 927–939.
- [44] JENTSCH S. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *T Cell Biol* 1992; **2**: 98–103.
- [45] KAKIZUKA A, SEBASTIAN B, BORGMAYER U, HERMANS-BORGMAYER I, BOLADO J, HUNTER T, HOEKSTRA MF, EVANS RM. A mouse cdc25 homolog is differentially and developmentally expressed. *Genes Devel* 1992; **6**: 578–590.
- [46] KAMIJOM, YASUDA H, YAU PM, YAMASHITA M, NAGAHAMA Y, OHBA Y. Preference of Human cdc2 Kinase for Peptide Substrate. *Peptide Res* 1992; **5**: 281–285.
- [47] KAWAHARA H, YOKOSAWA H. Cell Cycle-Dependent Change of Proteasome Distribution During Embryogenesis of the Ascidian *Halocynthia roretzi*. *Dev Biol* 1992; **151**: 27–33.
- [48] KAWIAK J. Regulacja cyklu mitotycznego. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 325–333.
- [49] KIRSCHNER M. The cell cycle then and now. *T Biol Sci* 1992; **67**: 281–285.
- [50] KITAGAWA M, SAITOH S, OGINO H, TAKAYOSHI O, MATSUMOTO H, OKUYAMA A, TAMAI K, OHBA Y, YASUDA H, NISHIMURA S, TAYA Y. cdc2-like kinase is associated with the retinoblastoma protein. *Oncogene* 1992; **7**: 1067–1074.
- [51] KNOBLICH JA, LEHNER CF. Synergistic Action of *Drosophila* Cyclin-A and Cyclin-B During the G₂-M Transition. *EMBO J* 1993; **12**: 65–74.

- [52] KREK W, NIGG EA. Cell Cycle Regulation of Vertebrate p34^{cdc2} Activity: Identification of Thr161 as an Essential In Vivo Phosphorylation Site. *New Biol* 1992; **4**: 323–329.
- [53] LAHVEEE, SMITH AV, ORR-WEAVER TL. A novel cyclin gene from *Drosophila* complements CLN function in yeast. *Genes Dev* 1991; **5**: 2166–2175.
- [54] LEDESMA MD, CORREAS I, AVILA J, DIAZ-NIDO J. Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 1992; **308**: 218–224.
- [55] LEISS D, FELIX MA, KARSENTIE. Association of cyclin-bound p34^{cdc2} with subcellular structures in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 1992; **102**: 285–297.
- [56] LERE A KM. Inhibitors of Protein Phosphatase Type 1 and 2A Attenuate Phosphatidylinositol Metabolism and Ca²⁺-Transients in Human Platelets. Role of a cdc2 Related Protein Kinase. *Biochem* 1992; **31**: 6553–6561.
- [57] LETWIN K, MIZZEN L, MOTRO B, BEN-DAVID Y, BERNSTEIN A, PAWSON T. A mammalian dual specificity protein kinase, Nek1, is related to the NIMA cell cycle regulator and highly expressed in meiotic germ cells. *EMBO J* 1992; **11**: 3521–3531.
- [58] LOCK LF, PINES J, HUNTER T, GILBERT DJ, GOPALAN G, JENKINS NA, COPELAND NG, DONOVAN PJ. A Single Cyclin A Gene and Multiple Cyclin B1 - Related Sequences Are Dispersed in the Mouse Genome. *Genomics* 1992; **13**: 415–424.
- [59] LORCA T, GALAS S, FESQUET D, DEVAULT A, CAVADORE JC, DOREE M. Degradation of the proto-oncogene product p39^{mos} is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca²⁺-calmodulin dependent event. *EMBO J* 1991; **10**: 2087–2093.
- [60] MALLER JL, ROY LM, IZUMI T. Cell Cycle and Mitotic Controls in *Xenopus* Eggs. [w:] Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology vol. LVI. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991: 533–538.
- [61] MARINI NJ, REED SI. Direct induction of G₁-specific transcripts following reactivation of the CDC28 kinase in the absence of de novo protein synthesis. *Genes Dev* 1992; **6**: 557–567.
- [62] MATSUSHIME H, EWEN ME, STROM DK, KATO JY, HANKS SK, ROUSSEL MF, SHERR CJ. Identification and Properties of an PSK-J3/cdk4 A typical Catalytic Subunit (p34) for Mammalian D Type G₁ Cyclins. *Cell* 1992; **71**: 323–334.
- [63] MCGOWAN CH, RUSSELL P. Human Wee1 Kinase Inhibits Cell Division by Phosphorylating p34^{cdc2} Exclusively on Tyr15. *EMBO J* 1993; **12**: 75–86.
- [64] MEIKRANTZ W, SCHLEGEL RA. M-phase promoting factor activation. *J Cell Sci* 1992; **101**: 475–481.
- [65] MEYERSON M, ENDERS GH, WU CH, SU LK, GORKA C, NELSON C, HARLOW E, TSA LH. A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J* 1992; **11**: 2909–2917.
- [66] MILLAR JBA, MCGOWAN CH, LEANERS G, JONES R, RUSSELL P. p80^{cdc25} mitotic inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34^{cdc2} kinase in fission yeast. *EMBO J* 1991; **10**: 4301–4309.
- [67] MINSHULL J, GOLSTEYN R, HILL CS, HUNTT. The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J* 1990; **9**: 2865–2875.
- [68] MOLLOY S., LITTLE M. p34^{cdc2} Kinase-Mediated Release of Lamins Is Inhibited by cAMP-Dependent Protein Kinase. *Exp Cell Res* 1992; **201**: 494–499.
- [69] MORENO S, NURSE P, RUSSELL P. Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80^{cdc25} mitotic inducer in fission yeast. *Nature* 1990; **344**: 549–552.
- [70] MORRIS NR, ENOS AP. Mitotic gold in a mold: *Aspergillus* genetics and the biology of mitosis. *T Gen* 1992; **8**: 32–37.
- [71] MULNER-LORILLON O, CORMIER P, CAVADORE JC, MORALES J, POULHE R, BELLE R. Phosphorylation of *Xenopus* Elongation Factor-1 γ by cdc2 Protein Kinase: Identification of the Phosphorylation Site. *Exp Cell Res* 1992; **202**: 549–551.
- [72] MURRAY AW. Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 1992; **359**: 599–604.
- [73] MURRAY AW, SALOMON MJ, KIRSCHNER MW. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of MPF activity. *Nature* 1989; **339**: 280–286.
- [74] NIGG EA, GALLANT P, KREK W. Regulation of p34^{cdc2} protein kinase activity by phosphorylation and cyclin binding. [w] Regulation of the eucaryotic cell cycle. Ciba Foundation Symposia vol.170. Chichester: Wiley 1992: 72–96.
- [75] NURSE P. Eukaryotic Cell Cycle Control. *Bioch Soc Trans* 1992; **20**: 239–242.
- [76] O'CONNOR PM, FERRIS DK, WHITE GA, PINES J, HUNTER T, LONGO DL, KOHN KW. Relationships between cdc2 Kinase, DNA Cross-Linking, and Cell Cycle Perturbations Induced by Nitrogen Mustard. *Cell Growth Differ* 1992; **3**: 43–52.

- [77] PATERLINI P, SUBERVILLE AM, ZINDY F, MELLE J, SONNIER M, MARIE JP, DREYFUS F, BRECHOT C. Cyclin A Expression in Human Hematological Malignancies – A New Method for Cell Proliferation. *Cancer Res* 1993; **53**: 235–238.
- [78] PICARD A, CAVADORE JC, LORY P, BERNENGO JC, OJEDA C, DOREE M. Microinjection of a conserved peptide sequence of p34^{cdc2} induces a Ca²⁺ transient in oocytes. *Science* 1990; **247**: 327–329.
- [79] PINES J, HUNTER T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell-cycle dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 1991; **115**: 1–17.
- [80] PLANAS-SILVA MD, MEANS AR. Expression of a constitutive form of calcium/calmodulin dependent protein kinase II leads to arrest of the cell cycle in G₂. *EMBO J* 1992; **11**: 507–517.
- [81] REED SI, WITTENBERG C, LEW DJ, DULIC V, HENZE M. G₂ control in Yeast and Animal Cells. [w:] Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology vol.LVI. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991: 61–67.
- [82] REED SI. The Role of p34 Kinases In The G₂ to S-Phase Transition. *Ann Rev Cell Biol* 1992; **8**: 529–561.
- [83] RIALET V, MEIJER J. A New Screening Test for Antimitotic Compounds Using the Universal M Phase-Specific Protein Kinase p34^{cdc2}/cyclin B^{cdc13} Affinity Immobilized on p13^{suc1}-Coated Microtiteration Plates. *Anticancer Res* 1991; **11**: 1581–1590.
- [84] RICHARDSON H, LEW DJ, HENZE M, SUGIMOTO K, REED SI. Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S-phase and in G₂. *Genes Dev* 1992; **6**: 2021–2034.
- [85] RICHTER KH, AFSHARI CA, ANNAB LA, BURKHART BA, OWEN RD, BOYD J, BARRETT JC. Down-Regulation of cdc2 in senescent Human and Hamster Cells. *Cancer Res* 1991; **51**: 6010–6013.
- [86] RIME H, HACCARD O, OZON R. Activation of p34^{cdc2} Kinase by Cyclin Is Negatively Regulated by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in *Xenopus* Oocytes. *Devel Biol* 1992; **151**: 105–110.
- [87] SANGHERA JS, HALL FL, WARBURTON D, CAMPBELL D, PELECH SL. Identification of epidermal growth factor Thr-669 phosphorylation site peptide kinases as distinct MAP kinases and p34^{cdc2}. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1135**: 335–342.
- [88] SEINO H, HISAMOTO N, UZAWA S, SEKIGUSHI T, NISHIMOTO T. DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication. *J Cell Sci* 1992; **102**: 393–400.
- [89] SHALLOWAY D, BAGRODIA S, CHACKALAPARAMPIL I, SHENOY S, LIN PH, TAYLOR J. c-Src and mitosis. [w] Regulation of the eucaryotic cell cycle. Ciba Foundation Symposia vol.170. Chichester: Wiley 1992: 248–275.
- [90] SHENOY S, CHACKALAPARAMPIL I, BAGRODIA S, LIN PH, SHALLOWAY D. Role of p34^{cdc2}-mediated phosphorylations in two-step activation of pp60^{c-src} during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7237–7241.
- [91] STEIN GH, DRULLINGER LF, ROBETO-RYE RS, PEREIRA-SMITH OM, SMITH JR. Senescent cells fail to express cdc2, cycA and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 11012–11016.
- [92] STILLMAN B, BELL SP, DUTTA A, MARAHRENS Y. DNA Replication and the Cell Cycle. [w] Regulation of the eucaryotic cell cycle. Ciba Foundation Symposia vol.170. Chichester: Wiley 1992: 147–160.
- [93] TORRY DS. Proto-Oncogenes and Germ-Cell Differentiation. *Amer J Reprod Immunol* 1992; **27**: 167–170.
- [94] TSUCHIYA E, UNO M, KIGUSHI A, MASUOKA K, KANEMORI Y, OKABE S, MIKAYAWA T. The *Saccharomyces cerevisiae* NPS1 gene, a novel CDC gene which encodes a 160 kDa nuclear protein involved in G₂ phase control. *EMBO J* 1992; **11**: 4017–4026.
- [95] VIGERS GPA, LOHKA MJ. Regulation of nuclear envelope precursor functions during cell division. *J Cell Sci* 1992; **102**: 273–284.
- [96] VILLA-MORUZI E. Activation of type-1 protein phosphatase by cdc2 kinase. *FEBS Lett* 1992; **304**: 211–215.
- [97] WAGNER P, SIMANIS V, MAIMETS T, KEENAN E, ADDISON C, BRAIN R, GRIMALDI M, STURZBECHER HW, JENKINS J. A human tumour derived mutant p53 protein induces a p34^{cdc2} reversible growth arrest in fission yeast. *Oncogene* 1991; **6**: 1539–1547.
- [98] WALKER DH, MALLER JL. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 1991; **354**: 314–317.
- [99] WARBRICK E, FANTES P.A. The wis1 protein kinase is a dosage dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 1991; **10**: 4291–4299.
- [100] WELCH PJ, WANG JY. Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3093–3097.
- [101] WHITAKER M, PATEL R. Calcium and cell cycle control. *Development* 1990; **108**: 525–542.
- [102] WHITFIELD WGF, GONZALEZ C, MALDONADO-CODINA G, GLOVER DM. The A- and B-type cyclins of *Drosophila* are accumulated and destroyed in temporally distinct events that delineate separable phases of the G2-M transition. *EMBO J* 1990; **9**: 2563–2572.

- [103] WITTENBERG C, SUGIMOTO K, REED SI. G₁-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity regulation by mating pheromone, and association with the p34^{cdc2} protein kinase. *Cell* 1990; **62**: 225-229.
- [104] WÓJCIK C. Współczesne poglądy na temat regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 153-167.
- [105] YANAGIDA M, KINOSHITA N, STONE EM, YAMANO H. Protein phosphatases and cell cycle control. [w] Regulation of the eucaryotic cell cycle. Ciba Foundation Symposia vol.170. Chichester: Wiley 1992: 130-146.
- [106] ZHOUR, DAAR I, FERRIS DK, WHITE G, PAULES RS, WOUDE GV. pp39^{mos} Is Associated with p34^{cdc2} Kinase in c-mos^{xc}-Transformed NIH 3T3 Cells. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 3583-3589.

Otrzymano: 26.02.1993 r.

Przyjęto: 31.08.1993 r.

Adres autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNJLICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.]Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

TREŚĆ

KOPIECZNA–GRZEBIENIAK E., GRABOWSKA–BOCHENEK R.: Funkcje biologiczne α_2 -makroglobuliny i jej receptora	245
SZWECH P.: Czynniki pobudzające kolonie granulocytarno-makrofagalne (GM-CSF) i jego kliniczne zastosowanie	257
RATAJCZAK M., GEWIRTZ A. M.: Rola receptorów obdarzonych wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej w regulacji krwiotworzenia u człowieka	279
JACKOWSKI G.: Organizacja strukturalna anten energetycznych fotosystemu II	297
HORST A.: Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego	311
WÓJCIK C.: Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego	331

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1994

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1994 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 1 i 2 suplement) na rok 1994:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 160 000 zł.

W 1993 r. zostaną wydane dwa suplementy:

1. A. Klein – Peptydowe czynniki wzrostowe, 96 str., ukazał się we wrześniu 1993 r.
2. H. Gabryś (red.) – Postęp w badaniach ruchów komórek

Cena pojedynczego zeszytu suplementu 60 000 zł (płatne na konto Fundacji), dla prenumeratorów bezpłatnie.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705