

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 20 1993**

**Suplement nr 1**

# **Postępy Biologii Kórnórki**

**Andrzej Klein**

**PEPTYDOWE  
CZYNNIKI  
WZROSTOWE**

**Rodzina  
hormonów  
plejotropowych**

<http://rcin.org.pl>

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

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, 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*

---



## I. PEPTYDY JAKO NOŚNIKI INFORMACJI BIOLOGICZNEJ

Interakcja międzykomórkowa jest procesem niezbędnym dla funkcjonalnej integracji organizmów wielokomórkowych, tak w stadium rozwojowym jak i w trakcie dorosłego życia. Od czasów odkrycia pierwszych hormonów rośnie stale liczba "chemicznych posłańców", czyli związków niosących określoną informację biologiczną od komórek wydzielniczych do komórek docelowych. Ostatnie 20 lat przyniosło wiele doniesień na temat nieznanych dotąd peptydów o aktywności: hormonalnej, neuromodulacyjnej, immunoregulacyjnej i mitogennej. Wszystkie te peptydy określane są często wspólną nazwą peptydów regulacyjnych.

Sposób odbioru informacji biologicznej jest podobny dla wszystkich peptydów regulacyjnych i odbywa się poprzez swoiste receptory usytuowane w błonie plazmatycznej komórek docelowych. Natomiast, różna może być droga, na której peptydy przenoszone są od komórek wydzielniczych do komórek docelowych, a także różny może być charakter i mechanizm odpowiedzi komórkowej.

### PRZENOSZENIE INFORMACJI PRZEZ PEPTYDY REGULACYJNE

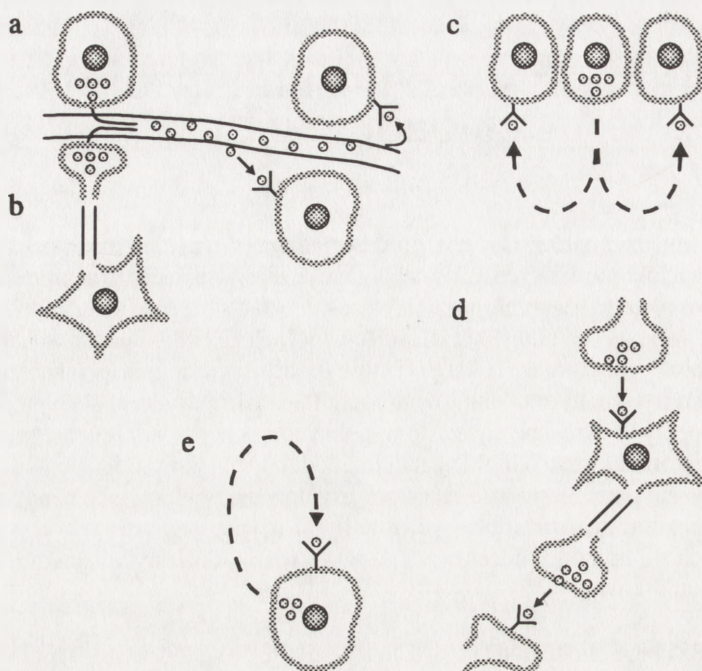
Przyjmuje się obecnie trzy podstawowe sposoby przekazywania informacji międzykomórkowej z udziałem peptydów regulacyjnych (rys.1): endokryny, parakryny i autokryny.

(1) Transport endokryny, w którym peptyd syntetyzowany przez wyspecjalizowane komórki wydzielany jest do krwioobiegu i przenoszony z krwią do komórek docelowych. Ten sposób transportu jest typowy dla hormonów dokrewnych. Podobny sposób przenoszenia informacji biologicznej przyjmuje się dla peptydów regulacyjnych wydzielanych do krwioobiegu z zakończeń komórek nerwowych (tzw. transport neuroendokryny), charakterystyczny m.in. dla neurohormonów podwzgórza.

(2) Hipoteza transportu parakrynnego zakłada, że peptydy regulacyjne przenoszone są w drodze dyfuzji międzykomórkowej. Przypuszczalnie wiele peptydów działa lokalnie tą drogą. Podobny sposób transportu (neuparakryny) przyjmuje się w przypadku przenoszenia sygnału przez synapsy chemiczne w obrębie układu nerwowego.

(3) Hipoteza regulacji autokryny przyjmuje, że komórkami docelowymi są te same komórki, które syntetyzują peptyd regulacyjny. Regulacja autokryna ma przypuszczalnie istotne znaczenie w kontroli wzrostu komórek neoplastycznych, aczkolwiek autoregulacja jest zjawiskiem stwierdzonym wielokrotnie w hodowlach komórek nietransformowanych (patrz rozdział VIII).

Opisane możliwości transportu peptydów regulacyjnych nie oznaczają jednak, że każdy peptyd ma jeden określony sposób przenoszenia informacji od komórek wydzielniczych do



Rys. 1. Przekaz informacji drogą: a – endokrynną, b – neuroendokrynną, c – parakrynną, d – neuroparakrynną, e – autokrynną

komórek docelowych. Ten sam peptyd może być przenoszony różnymi drogami w zależności od jego funkcji fizjologicznej i rodzaju tkanki docelowej.

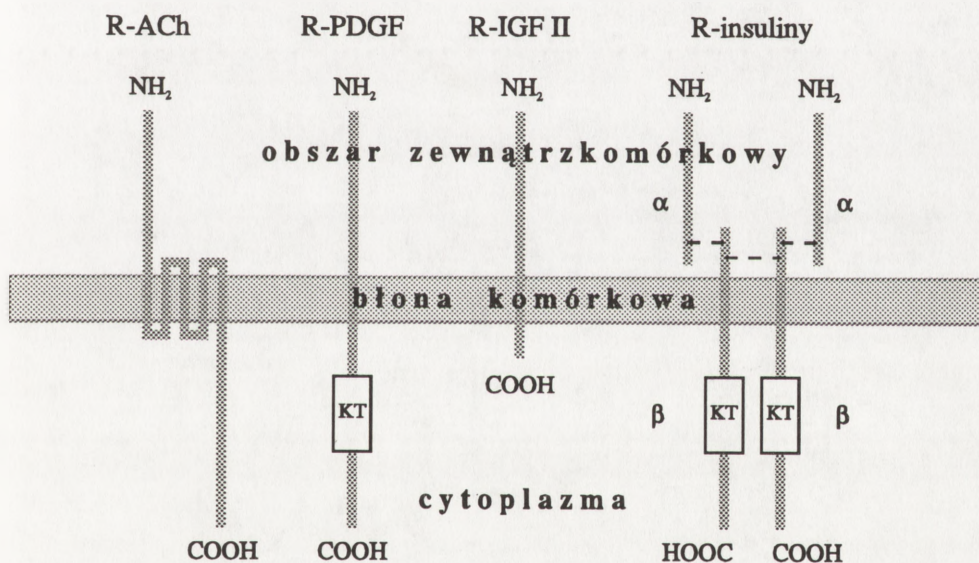
#### ODBIÓR INFORMACJI PRZEZ KOMÓRKĘ DOCELOWĄ – RECEPTORY BŁONOWE

Mimo że podstawową funkcją błony komórkowej jest stworzenie bariery pomiędzy środowiskiem zewnątrz- i wewnątrzkomórkowym, wyspecjalizowane struktury błonowe pełnią rolę selektywnych przenośników informacji tam i z powrotem. W pewnych przypadkach informacja jest przenoszona wprost przez wyłapywanie określonych jonów lub metabolitów i ich transport przez odpowiednie kanały transbłonowe. Energia konieczna do transportu może pochodzić z gradientu stężenia cząsteczki transportowanej po obu stronach błony lub z procesów komórkowych sprzężonych z transportem. W tym przypadku jon lub metabolit jest postaniem, które przesłane do wnętrza komórki skłania środowisko wewnątrzkomórkowe do regulacji szybkości transportu lub ilości przenoszonej substancji. Składniki błony komórkowej, które funkcjonują jako selektywne cząsteczki transportujące, są kompleksami białkowymi, podlegającymi regulacji allosterycznej. W wielu przypadkach substancje, które przenoszą

informację biologiczną są zasocjowane z białkami nośnikowymi, takimi jak transkobalamina dla witaminy B<sub>12</sub> lub lipoproteiny o niskiej gęstości dla cholesterolu. Białka nośnikowe są swoiście rozpoznawane przez transportery błonowe, odpowiedzialne za selektywną adsorpcyjną pinocytózę ligandów. Zarówno białka wiążące, jak i transportery błonowe same nie generują sygnału i są zwykle określane jako akceptory lub receptory klasy II. W przeciwieństwie do akceptorów, receptory zlokalizowane w błonie komórkowej mają właściwości nie tylko selektywnego rozpoznawania liganda, ale także zdolność (w połączeniu z ligandem) do uczestniczenia w procesie odpowiedzi komórkowej [1].

Jakkolwiek nie zdołano dotychczas wyjaśnić całkowicie mechanizmu działania żadnego z peptydów regulacyjnych, wiadomo, że każdy z nich wywiera swój efekt biologiczny poprzez interakcję ze swoistym receptorem zlokalizowanym w błonie komórek docelowych. Związanie liganda z receptorem inicjuje serię zdarzeń prowadzących do określonej odpowiedzi komórkowej.

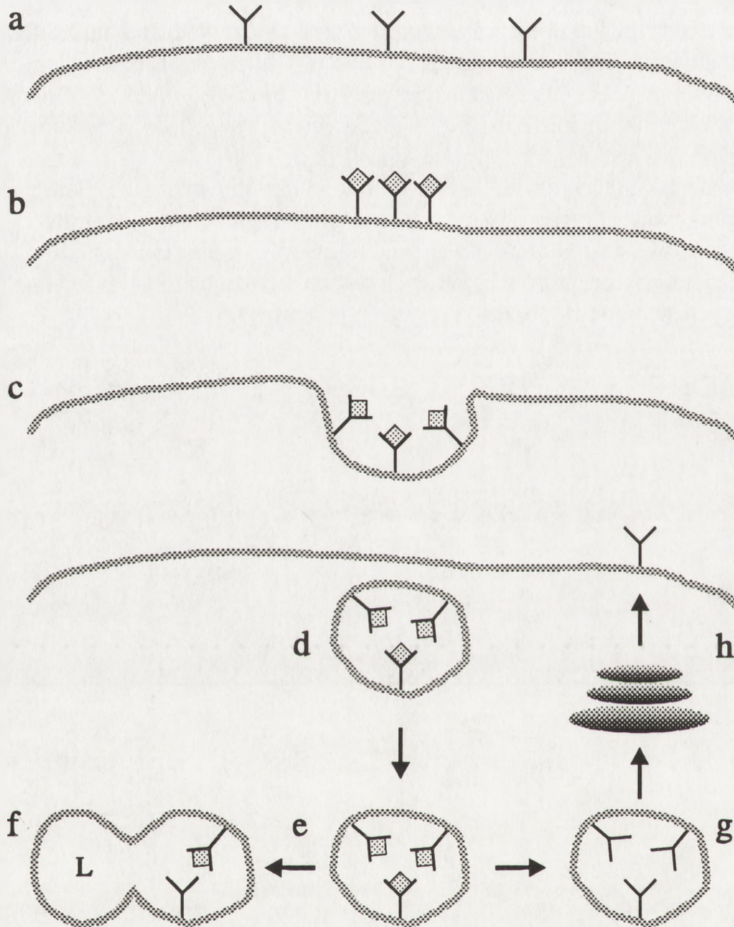
Ogólna koncepcja receptora zakłada, że jest to białko transbłonowe, zbudowane z części zewnątrzkomórkowej (akceptorowej), fragmentu (lub fragmentów) penetrującego błonę komórkową i części wewnątrzkomórkowej (efektorowej). Na podstawie analizy strukturalnej dotychczas zbadanych receptorów błonowych można wyróżnić kilka typów białek receptorowych różniących się budową poszczególnych fragmentów (rys.2).



Rys. 2. Przykładowe białka receptorowe różniące się strukturą podjednostkową, formą części transbłonowej oraz budową i funkcją części efektorowej (KT – obszar kinazy tyrozynowej)

Bez względu na różnice strukturalne funkcja biologiczna poszczególnych części receptora jest podobna i ściśle określona. Podstawową cechą części akceptorowej receptora jest wysoka swoistość wiązania liganda, natomiast części efektorowej jest zdolność do generowania sygnału wewnątrzkomórkowego (aktywacji określonych procesów metabolicznych). Pierwszym i przez długi czas niewyjaśnionym pytaniem były dalsze losy kompleksu peptyd-re-

ceptor. Możliwość, że peptydy mogą wnikać do wnętrza komórki nie była poważnie brana pod uwagę do połowy lat siedemdziesiątych. Panowała bowiem powszechnie opinia, że hormony peptydowe w przeciwieństwie do hormonów sterydowych wiążą się odwracalnie z receptorami na powierzchni komórki i nie mogą aktywnie lub biernie wnikać do wnętrza komórki. Obecnie wiadomo [2], że peptydy regulacyjne po związaniu z receptorem ulegają internalizacji w drodze endocytozy (rys.3).



Rys. 3. Model internalizacji kompleksów hormon-receptor (H-R): a – przed przyłączeniem hormonu, b – agregacja kompleksów H-R, c – wpuklenie błony komórkowej, d – tworzenie pęcherzyków opłaszczonych klatryną, e – powstawanie receptosomów, f – fuzja z lizosomami i degradacja kompleksów H-R lub g – segregacja kompleksów i uwalnianie hormonów, h – fuzja z błonami systemu wakuolarnego i wbudowywanie receptorów w błonę komórkową

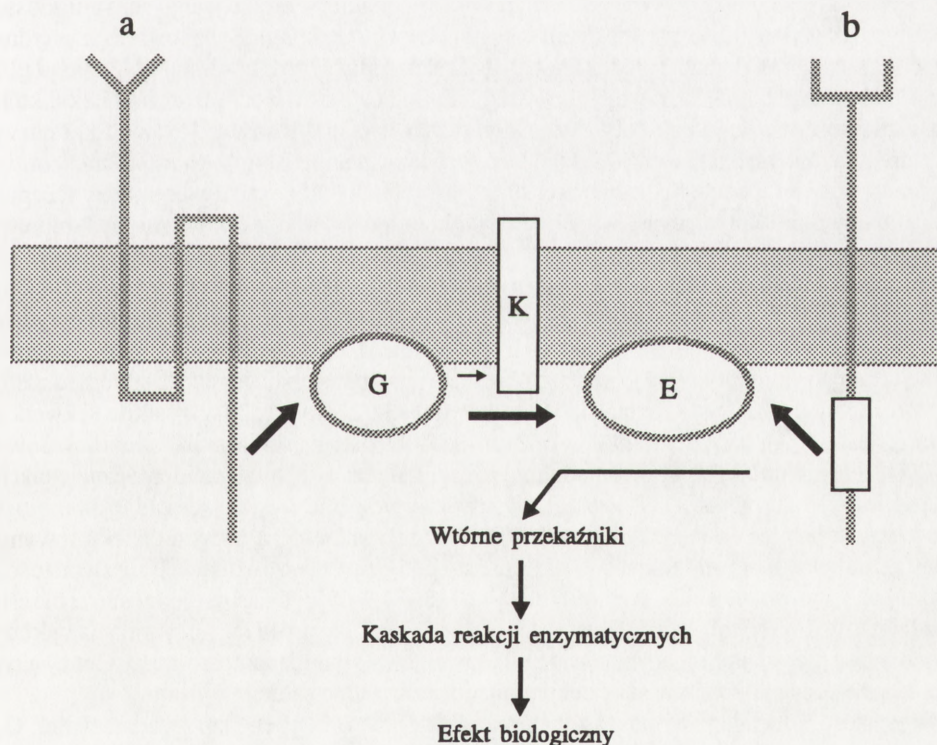
Kompleksy ligand-receptor (2–10 kompleksów) ulegają procesowi mikroagregacji, co unieruchamia je w błonie komórkowej i prowadzi do dalszego powiększania agregatów do skupisk liczących kilkadziesiąt, a nawet kilkaset kompleksów. W miejscu nagromadzenia

kompleksów ligand-receptor rozpoczyna się wpuklanie błony komórkowej i tworzenie opłaszczonych klatryną pęcherzyków endocytarnych. Po wnikięciu do wnętrza komórki następuje "rozebranie" płaszcza klatrynowego i powstają pęcherzyki endocytarne, określane często mianem receptosomów. Receptosomy mogą ulegać fuzji z lizosomami, co prowadzi do degradacji zarówno liganda, jak i receptora lub procesowi segregacji składników kompleksu, po czym ligand jest degradowany, a receptor recykluje do błony komórkowej. Regulacja procesu internalizacji jest istotna, bowiem decyduje (oprócz syntezy de novo) o liczbie receptorów na powierzchni komórki. Molekularne podstawy tego zjawiska są jeszcze niejasne, aczkolwiek pierwsze doniesienia wskazują, że ważną rolę regulacyjną odgrywa fosforylacja efektorowej części receptora (patrz rozdział III-1).

Podstawowym zagadnieniem jest jednak wyjaśnienie mechanizmu przekazania sygnału przez błonę komórkową i określenie łańcucha reakcji wewnątrzkomórkowych prowadzących do swoistej odpowiedzi komórki.

### MECHANIZM SYGNALIZACJI TRANSBŁONOWEJ

Przyjmuje się obecnie dwa mechanizmy generowania sygnału za pośrednictwem efektorowej części receptora (rys.4):



Rys. 4. Mechanizm generowania sygnału hormonalnego: a – pośredni i b – bezpośredni; G – białka G, E – efektorowy układ enzymatyczny, K – kanał jonowy



(a) pośredni – stymulowana przyłączeniem liganda aktywacja uniwersalnego pośrednika wewnątrzłonowego (białka G),

(b) bezpośredni – indukowana przyłączeniem liganda stymulacja aktywności enzymatycznej efektorowej części receptora (tyrozyno-swoista kinaza białkowa).

W obu przypadkach następuje aktywacja kluczowego układu enzymatycznego (cyklaza adenylanowa, cyklaza guanylanowa, fosfolipaza C, fosfolipaza A<sub>2</sub>) stymulującego reakcje syntezy lub uwalniania tzw. wtórnych przekaźników informacji hormonalnej [4–6]. Jest to stosunkowo nieliczna grupa substancji drobnocząsteczkowych napędzających kaskadę reakcji enzymatycznych, których wynikiem jest określona odpowiedź biologiczna komórki. Najczęściej rolę wtórnych przekaźników pełnią jony (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>), cykliczne nukleotydy (cAMP, cGMP) lub produkty rozpadu fosfatydyloinozytoli (diacylglycerol, inozytolotrójfosforan, kwas arachidonowy). Punktem krytycznym w wyjaśnieniu mechanizmu sygnalizacji transłonowej jest identyfikacja fizjologicznych substratów dla wtórnych przekaźników.

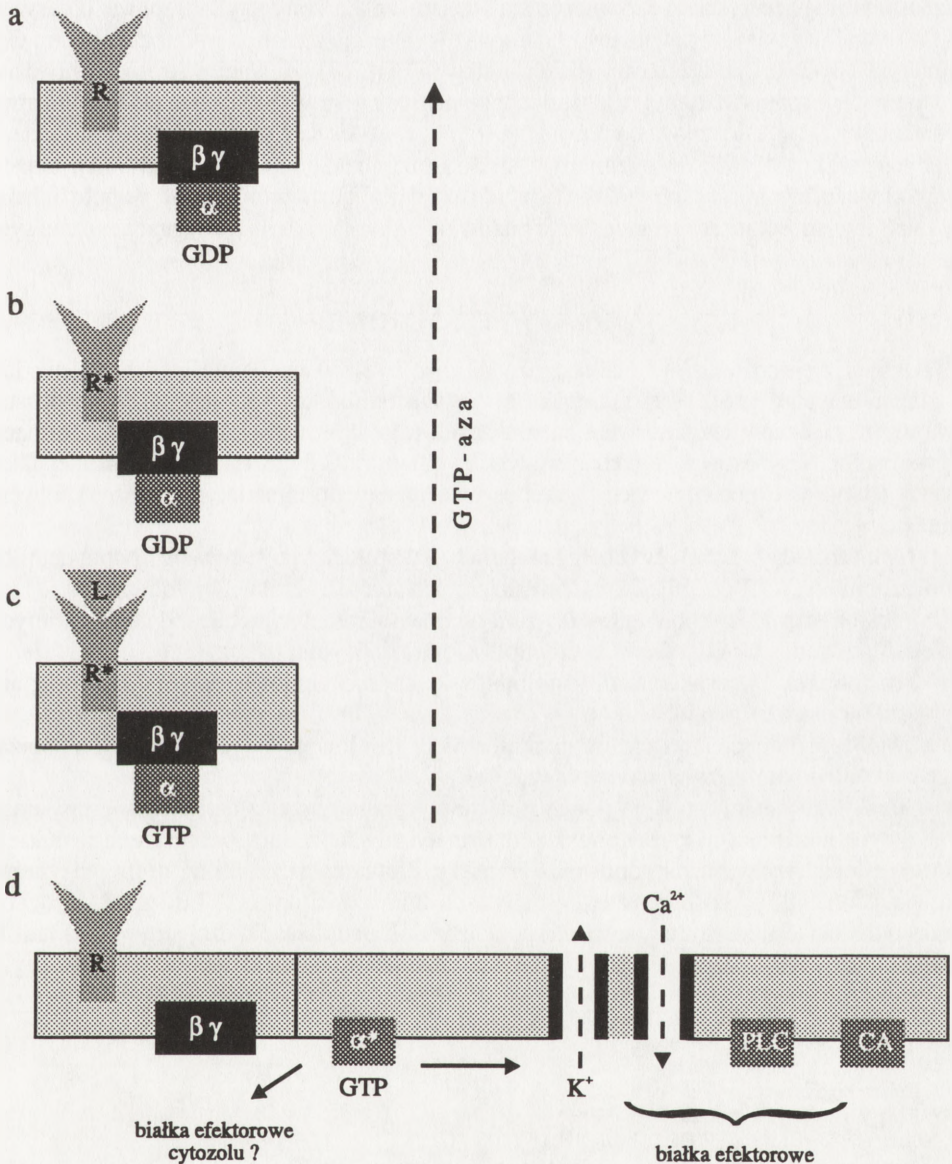
### BIAŁKA G

W roku 1971 Rodbell i wsp. [7] opisali po raz pierwszy wpływ nukleotydów guanylowych na przebieg hormonalnej regulacji aktywności cyklazy adenylanowej (CA) w komórkach wątroby. W ciągu kilku następnych lat potwierdzono, że GTP stymuluje aktywność CA w różnych układach komórkowych i pośredniczy w hormonalnej stymulacji tego enzymu. Cossel i Selinger [8] wykazali, że przeniesieniu sygnału przez błonę komórkową towarzyszy hydroliza GTP do GDP i Pi oraz że proces ten wygasza pierwotny sygnał hormonalny (reakcja *turn off*). Pod koniec lat siedemdziesiątych wyodrębniono i częściowo oczyszczono białka, które miały zdolność wiązania nukleotydów guanylowych oraz aktywność GTP-azy. Stąd nazwa tej grupy białek – białka G (lub N) od ich nazwy w języku angielskim – *guanine (nucleotide) binding proteins*. Obecnie białka G mają status uniwersalnych łączników pomiędzy receptorami błonowymi odbierającymi sygnał zewnątrzkomórkowy a komórkowymi białkami efektorowymi [9–11].

Białka G są heterotrimerami zbudowanymi z trzech podjednostek:  $\alpha$  (m.cz. 39–50 kDa),  $\beta$  (m.cz. 35–36 kDa),  $\gamma$  (m.cz. 6–10 kDa) [12]. Podjednostki  $\beta$  są białkami hydrofobowymi o podobnej (niezależnie od rodzaju białek G) budowie i nieokreślonej roli biologicznej. W sensie funkcjonalnym polipeptydy  $\beta$  i  $\gamma$  są często określane jako jedna podjednostka  $\beta\gamma$ . Podjednostki  $\alpha$  poszczególnych białek G różnią się nie tylko wielkością, ale przede wszystkim sekwencją aminokwasową. Oprócz regionów o dużym podobieństwie sekwencji aminokwasowej (>90%), reprezentujących prawdopodobnie części łańcucha spełniające identyczną funkcję (wiązanie GTP, aktywność GTP-azowa), występują regiony nie wykazujące żadnej homologii sekwencji, odpowiedzialne prawdopodobnie za oddziaływanie z cząsteczkami efektorowymi. Znamy dziś sekwencję aminokwasową kilkunastu podjednostek  $\alpha$  różniących się swoistością wiązania do określonych układów efektorowych [12, 13]. Rodzaj danej podjednostki  $\alpha$  określa jej udział w znanych (lub przewidywanych) efektach biologicznych ( $\alpha_s$  – stymulacja cyklazy adenylanowej,  $\alpha_i$  – inhibicja cyklazy adenylanowej,  $\alpha_q$  – stymulacja fosfolipazy C itd.) a typ ( $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$ ) różnice w sekwencji podjednostek  $\alpha$  tego samego rodzaju.

Większość informacji na temat funkcjonowania białek G pochodzi z badań białek G<sub>s</sub>, uczestniczących w hormonalnej stymulacji aktywności cyklazy adenylanowej. Przyjmuje się, że ogólny schemat działania innych białek G jest identyczny [14]. Proponowany mechanizm przekazywania sygnału od receptora do efektoru z udziałem białek G przedstawia rysunek 5.

W wyniku stymulacji ligandem następuje dysocjacja kompleksu białek G i podjednostka  $\alpha$  przyłącza się do odpowiedniego układu efektorowego, stymulując lub hamując aktywność



Rys. 5. Hipotetyczny mechanizm regulacji hormonalnej za pośrednictwem białek G: a – stan spoczynkowy, b – podniesienie powinowactwa receptora do liganda przez tworzenie kompleksu receptor- białko G, c – związanie liganda, zmiana konformacyjna podjednostki  $\alpha$  i związana z tym wymiana GDP na GTP, d – oddysocjowanie aktywnej podjednostki  $\alpha$  i związanie jej z białkiem efektorowym (PLC, CA lub białkami regulującymi kanały jonowe), GTP-aza – hydroliza GTP do GDP przez zaktywowaną podjednostkę  $\alpha$ , jej asocjacja z podjednostkami  $\beta\gamma$  i powrót do stanu wyjściowego

enzymatyczną lub inicjując zmiany konformacyjne białek regulujących funkcjonowanie kanałów jonowych [15]. Regulacja procesów wewnątrzkomórkowych za pośrednictwem białek G jest w rzeczywistości o wiele bardziej skomplikowana, niżby to wynikało ze schematu przedstawionego na rysunku 5. Stwierdzono bowiem, że ten sam receptor [np. wazopresyny] może modulować dwa różne układy efektorowe: stymulację fosfolipazy C (przez białko  $G_o$ ) i inhibicję cyklazy adenylanowej (przez białko  $G_i$ ) [16,17]. Z drugiej strony, dwa różne receptory (np. somatostatyny i wazoaktywnego peptydu jelitowego) działające poprzez dwa różne białka G ( $G_i$  i  $G_o$ ) mogą hamować lub stymulować ten sam układ efektorowy (cyklazę adenylanową) [18]. Jeśli uwzględnimy fakt, że istnieje także możliwość aktywacji układu efektorowego z pominięciem białek G (patrz rozdział VII) zrozumiemy, że współdziałanie kilku różnych hormonów wymaga funkcjonalnej integracji wielu szlaków przenoszenia sygnału [19].

### UKŁADY EFEKTOROWE

Układy efektorowe są to białka pośredniczące w regulacji (syntezie, uwalnianiu lub regulacji transportu przez błonę komórkową) wewnątrzkomórkowego stężenia drobnocząsteczkowych związków chemicznych, spełniających rolę wtórnych przekaźników informacji hormonalnej. Na podstawie dotychczas uzyskanych informacji można wyróżnić następujące układy efektorowe, pośredniczące w przenoszeniu sygnału hormonalnego za pośrednictwem białek G:

- a) cyklaza adenylanowa i cyklaza guanylanowa, stymulujące powstawanie z odpowiednich trójfosforanów cAMP i cGMP jako wtórnych przekaźników informacji biologicznej,
- b) fosfolipaza C, hydrolizująca fosfatydyloinozytyle z uwolnieniem dwóch wtórnych przekaźników: diacyloglicerolu (DAG) i trójfosforanu inozytoli ( $IP_3$ ),
- c) fosfolipaza  $A_2$ , uwalniająca z fosfolipidów kwas arachidonowy (prekursor: prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanów),
- d) białka regulujące otwarcie lub zamknięcie kanałów jonowych, podnoszące lub obniżające wewnątrzkomórkowy poziom jonów  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ .

Wtórne przekaźniki aktywują głównie (ale nie wyłącznie) enzymy należące do grupy kinaz białkowych, inicjujących kaskadę reakcji enzymatycznych, których ostatecznym wynikiem jest określona, fizjologiczna odpowiedź komórki. Białka należące do tej grupy enzymów, liczącej ponad 100 przedstawicieli, podzielono na dwie główne klasy A i B (w zależności od rodzaju fosforylowanego aminokwasu) i podklasy, uwzględniające rodzaj aktywatora (tab.1) [20].

TABELA 1. Wstępna klasyfikacja kinaz białkowych (wg Komisji Słownictwa Biochemicznego PTBiochem)\*

#### A. Kinazy białkowe serynowo/treoninowe:

##### I. Zależne od cyklicznych nukleotydów

1. Kinazy białkowe A – zależne od cAMP
2. Kinazy białkowe G – zależne od cGMP

##### II. Kinazy białkowe zależne od $Ca^{2+}$ i kalmoduliny

##### III. Kinazy białkowe zależne od $Ca^{2+}$ i fosfolipidów (w tym kinaza białkowa C)

##### IV. Kinazy białkowe o innym (lub nieznanym) sposobie regulacji

#### B. Kinazy białkowe tyrozynowe:

##### I. Kinazy retrowirusów i ich tkankowe homologi (w/c *-src*, *-abl*, *-fes*)

##### II. Kinazy receptorów czynników wzrostowych

\*- Omówienie właściwości przedstawicieli poszczególnych klas kinaz białkowych znajdzie czytelnik w artykułach przeglądowych [21–25].

Kinazy białkowe uczestniczą w regulacji ogromnej liczby procesów metabolicznych, między innymi pośredniczą w stymulacji wzrostu i różnicowania komórkowego [21]. Kluczowa rola kinazy C w transmisji sygnału mitogennego omówiona została w rozdziale VII.

Odpowiedź na dwa podstawowe pytania ma decydujące znaczenie dla zrozumienia mechanizmu działania peptydów regulacyjnych. Pierwsze, to jak komórki rozumieją i odpowiadają na olbrzymią liczbę sygnałów zewnętrznych, a drugie, w jaki sposób komórki odpowiadają swoiście na każdy z tych sygnałów? Zdolność wielu rodzajów białek G do oddziaływania z bardzo wieloma receptorami błonowymi może tłumaczyć, jak komórka odpowiada na dużą liczbę różnych hormonów poprzez zaangażowanie względnie małej liczby wtórnych przekaźników. Odpowiedź na drugie pytanie, jak ograniczona liczba wtórnych przekaźników inicjuje bardzo zróżnicowaną odpowiedź komórkową, jest znacznie trudniejsza. Wyjaśnienie tego problemu wydaje się jeszcze bardzo odległe. Obecnie jesteśmy na etapie określania ciągów reakcji inicjowanych działaniem poszczególnych wtórnych przekaźników. Dopiero wyjaśnienie wzajemnych powiązań odrębnych łańcuchów reakcji i ich funkcjonalnej integracji przybliży nas do zrozumienia molekularnych podstaw regulacji hormonalnej. Jest to szczególnie istotne przy przenoszeniu sygnału od receptora błonowego do jądra komórkowego, w przypadku długoczasowej odpowiedzi na działanie czynników wzrostowych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] HOLENBERG MD. *Experientia* 1986; **42**: 718–727.
- [2] PASTAN IH, WILLINGHAM MG. *Annu Rev Physiol* 1981; **43**: 239–250.
- [3] HOLLENBERG MD (W.) *Handbook of Experimental Pharmacology*, P Cuatrecasas i S Jacobs (red.), Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg 1990; **92**: 183–207.
- [4] LICHTSTEIN D, RODBARD E. *Life Sci* 1987; **40**: 2041–2051.
- [5] SHENOLIKAR S. *FASEB J* 1988; **2**: 2753–2764.
- [6] PUTNEY JW, TAKEMURA H, HUGHES AR, HORSTMAN DA, THARTRUP AO. *FASEB J* 1989; **3**: 1899–1905.
- [7] RODBELL M, BIRNBAUMER L, POHL S, KRANS MJ. *J Biol Chem* 1971; **246**: 1877–1882.
- [8] CASSEL D, SELINGER Z. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 4155–4159.
- [9] GILMAN AG. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 615–649.
- [10] NEER EJ, CLAPHAM DE. *Nature* 1988; **333**: 129–134.
- [11] LOCHNE MA, SIMON MI. *Biochemistry* 1988; **27**: 4957–4965.
- [12] BIRNBAUMER L, ABRAMOWITZ J, BROWN AM. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1031**: 163–224.
- [13] IYENGAR R, BIRNBAUMER L. *Lymphokine Res* 1990; **9**: 533–537.
- [14] LITOSCH J. *Life Sci* 1987; **41**: 251–258.
- [15] DOLPHIN AC. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 53–57.
- [16] JACOBS KH, BAUER S, WATANABE Y. *Eur J Biochem* 1985; **151**: 425–430.
- [17] KATADA T, GILMAN AG, WATANABE Y, BAUER S, JACOBS KH. *Eur J Biochem* 1985; **151**: 431–437.
- [18] CHRISTOPHE J, SVOBODA M, LAMBERT M, WAELBROECK J, WINAND J-P, DEHAYE M-C, VANDERMEERS-PIRET A, VANDERMEERS A, ROBBERECHT P. *Peptides* 1986; **7**: 101–107.
- [19] MOOIBROEK MJ, WANG JH. *Biochem Cell Biol* 1988; **66**: 557–560.
- [20] Klasyfikacja kinaz białkowych wyższych Eukariota – wskazania doraźne. *Post Biochem* 1989; **35**: 209–210.
- [21] HUNTER T. *Cell* 1987; **50**: 823–829.
- [22] EDELMAN AM, BLUMENTHAL DK, KREBS EG. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 567–617.
- [23] GĘSIOR E. *Post Biochem* 1989; **35**: 211–217.
- [24] KAMIŃSKA B. *Post Biochem* 1989; **35**: 219–230.
- [25] DOBROWOLSKA G. *Post Biochem* 1989; **35**: 231–244.

## II. CZYNNIKI WZROSTOWE – NOWA RODZINA PEPTYDÓW REGULACYJNYCH

Wzrost jest procesem charakterystycznym dla wszystkich organizmów żywych. Jakkolwiek cechuje przede wszystkim wczesne etapy rozwoju, pozostaje niekiedy także właściwością niektórych tkanek organizmów dorosłych (zdolność do regeneracji, stałe zastępowanie komórek obumarłych). Proliferacja komórek konieczna dla uzyskania liczby wystarczającej do ukształtowania dorosłych tkanek jest także często drogą prowadzącą do ich ostatecznego zróżnicowania. Regulacja procesów wzrostu i różnicowania *in vivo* jest zagadnieniem bardzo skomplikowanym i słabo dotychczas poznanym. Kontrola tych procesów jest sumą różnych oddziaływań, z których najistotniejsze są: bezpośrednie oddziaływania między komórkami homo- i heterologicznymi oraz regulacja poprzez związki pośredniczące w przekazywaniu sygnałów międzykomórkowych (peptydy, sterydy, prostaglandyny). W celu ułatwienia badań złożonych mechanizmów regulacyjnych konieczne było uproszczenie modelu doświadczalnego. Modelem takim stały się hodowle komórkowe (tkankowe) prowadzone w ściśle określonych (zdefiniowanych) warunkach, zazwyczaj na ustalonych liniach komórkowych. Należy jednak pamiętać, że chociaż komórki takie wykazują prawidłowy obraz wzrostu, to różnią się zazwyczaj od komórek pierwotnych obrazem chromosomowym i najczęściej nie uzewnętrzniają swoistych właściwości, charakterystycznych dla tkanki, z której pochodzą. Alternatywą jest prowadzenie doświadczeń na hodowlach pierwotnych, czyli na hodowlach komórek uzyskanych bezpośrednio z tkanek, ale komórki te przeżywają w hodowli zazwyczaj kilka lub kilkanaście pasaży i giną.

Pośród związków zaangażowanych w regulację wzrostu i różnicowania komórek szczególną rolę przypisuje się związkom o budowie peptydowej. Przez analogię do innych peptydów regulacyjnych przyjmuje się, że ostateczny efekt może być wynikiem działania peptydów, które w stężeniu fizjologicznym stymulują (czynniki wzrostowe – ang. *growth factors*) lub hamują (inhibitory wzrostu – ang. *growth inhibiting factors*) wzrost komórkowy. Aczkolwiek, należy wyraźnie podkreślić, że ten sam peptyd może zarówno stymulować, jak i hamować wzrost w zależności od rodzaju komórek docelowych i warunków hodowli (patrz rozdział IV). Stąd podział na dwie grupy peptydowych regulatorów wzrostu jest umowny. Najczęściej przyjmowanym kryterium aktywności biologicznej *in vitro* jest zdolność do symulacji bądź inhibicji syntezy DNA lub proliferacji komórek. Wykazanie aktywności danego peptydu w hodowli tkankowej nie jest wystarczającym dowodem, że związek ten jest fizjologicznym regulatorem wzrostu, chociaż w wielu przypadkach udało się stwierdzić korelację pomiędzy aktywnością oznaczaną *in vitro* i *in vivo*.

Odkrycie czynników wzrostowych związane jest ściśle z doświadczeniami prowadzonymi przez Levi-Montalcini i Cohena w połowie lat pięćdziesiątych w Uniwersytecie Washingtona [1]. Naukowcy ci próbowali określić charakter chemiczny czynnika obecnego w ekstraktach

mysiego mięsaka 180, wykazującego aktywność stymulacji wzrostu neuronów i nazwanego później czynnikiem wzrostu nerwu (NGF – ang. *nerve growth factor*). Początkowo podejrzewano, że czynnik aktywujący wzrost komórek nerwowych jest związkiem o charakterze polinukleotydu. Za poradą Artura Kornberga, Levi-Montalcini i Cohen użyli do trawienia ekstraktów komórkowych jadu węża (*Agkistrodon piscovorus*), jako bogatego źródła fosfo-diesterazy. Niespodziewanie, preparaty traktowane jadem, zamiast obniżonej, wykazywały wyraźnie zwiększoną aktywność NGF. Doświadczenia kontrolne dowiodły, że jad węża sam zawiera związek lub związki o aktywności NGF. Sformułowano hipotezę, że gruczoł śliniankowy ssaków może być dostępniejszym i bezpieczniejszym w użyciu źródłem NGF. W roku 1960 Stanley Cohen wyizolował z ślinianki podszczękowej myszy czysty polipeptyd o aktywności NGF [2]. Tym razem szczęście dopisało autorom hipotezy. Spośród wszystkich dotychczas przebadanych ssaków jedynie gruczoł śliniankowy myszy i afrykańskiego gryzonia (*Praomys natalensis*) zawierają istotne, przydatne dla celów preparatycznych ilości NGF. W dodatku, podczas oczyszczania NGF, którego aktywność sprawdzano *in vivo*, Cohen zauważył, że jedna z frakcji (niewykazująca aktywności NGF) powoduje o 5 dni wcześniejsze otwieranie oczu noworodków mysich. Szczegółowa analiza jakościowa tej frakcji doprowadziła do wyizolowania peptydu, który dla podkreślenia jego aktywności *in vitro*, nazwany został epidermalnym czynnikiem wzrostowym (EGF – ang. *epidermal growth factor*) [3]. Po trzydziestu latach pracy nad NGF i EGF odkrywcy pierwszych czynników wzrostowych wyróżnieni zostali w roku 1986 nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny [4].

TABELA 2. Peptydowe czynniki wzrostowe o znanej sekwencji aminokwasów

Nazwa w języku polskim	Stosowany skrót	Omówienie*
Czynnik wzrostu nerwu	NGF	6–8
Epidermalny czynnik wzrostowy	EGF	9–11
Transformujący czynnik wzrostowy typu $\alpha$	TGF $\alpha$	11–13
Płytkowy czynnik wzrostowy	PDGF	14–17
Insulino-podobne czynniki wzrostowe	IGFs	18–20
Fibroblastyczne czynniki wzrostowe	FGFs	21,22
Czynnik wzrostu hepatocytów	HGF	23,24
Transformujący czynnik wzrostowy typu $\beta$	TGF $\beta$	25–28
Czynnik komórek macierzystych	SCF	29–31
Czynniki stymulujące wzrost kolonii	CSFs	32–35
Erytropoetyna	Epo	36–38
Interleukiny	ILs	32–34,39
Czynniki nekrozy nowotworu	TNFs	40,41

\*Wybrane artykuły przeglądowe w piśmiennictwie angielskim, opublikowane po roku 1985.

Od momentu odkrycia pierwszego peptydowego czynnika wzrostowego do chwili obecnej wyizolowano i przynajmniej częściowo scharakteryzowano kilkadziesiąt innych. Ze względu na bardzo zróżnicowaną ilość informacji dotyczących poszczególnych związków rzeczywista liczba czynników wzrostowych jest trudna do ustalenia. Jeszcze kilka lat temu lista tych związków obejmowała prawie pięćdziesiąt peptydów wyróżnionych na podstawie ich aktywności biologicznej [5]. Obecnie, kiedy znamy już sekwencję ok. trzydziestu różnych czynników wzrostowych, możemy wśród nich wyróżnić rodziny czynników (tab. 2) o podobnej

budowie chemicznej (EGF-, PDGF-, TGF $\beta$ -, FGF- i insulino-podobnych) lub o określonej aktywności biologicznej (hematopoetyczne, limfocytotroficzne).

Trudno podać precyzyjną definicję peptydowych czynników wzrostowych ze względu na dość szeroki, zależny od tkanki docelowej zakres ich aktywności biologicznej. Zgodnie z propozycją Jamesa i Bradshowa [42] czynnikami wzrostowymi nazywamy peptydy inicjujące w komórkach docelowych swoistą odpowiedź hipertroficzną lub hiperplastyczną i działające poprzez określony mechanizm receptorowy. Jak łatwo zauważyć, definicja ta nie zawęża pojęcia czynnika wzrostowego do peptydów o aktywności mitogennej, natomiast nie odzwierciedla faktu, że ten sam peptyd może być stymulatorem i inhibitorem wzrostu komórkowego, jak na przykład TGF  $\beta$  [27].

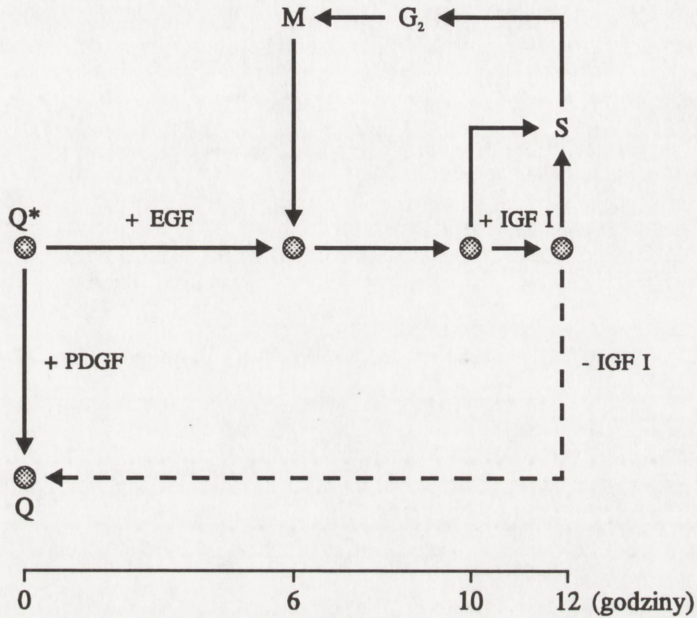
Przyjmuje się powszechnie, że przejście komórek przez pełny cykl komórkowy wymaga współdziałania kilku różnych czynników wzrostowych. W latach 1977–1978 Pledger i wsp. [43,44] przedstawili "kompetencyjno-progresywną" hipotezę regulacji cyklu komórkowego, uwzględniającą sekwencję czasową działania czynników wzrostowych na komórki spoczynkowe. Według tej koncepcji zdarzenia regulacyjne powodujące wyjście komórek z fazy G<sub>0</sub> następują w określonej kolejności i kończą się po kilkunastu godzinach (w warunkach optymalnych) pobudzeniem syntezy DNA. Okres przedreplikacyjny (faza latencji lub faza opóźniania) obejmuje przedział czasowy od momentu przyłączenia czynnika wzrostowego (do receptorów błonowych) do początku fazy S. Długość fazy opóźniania zależy od rodzaju komórek oraz warunków hodowli. W optymalnych warunkach okres ten dla fibroblastów mysich Balb/c 3T3 wynosi ok. 12 godzin. Działanie czynników wzrostowych, takich jak PDGF czy FGFs, powoduje, że po określonym czasie komórki stają się zdolne (kompetentne) do odpowiedzi na czynniki progresywne, umożliwiające przejście komórek z fazy G<sub>1</sub> do fazy S. Jest to prawdopodobnie związane m.in. z syntezą i ekspresją receptorów dla czynników progresywnych [45]. Wykazano, że stan kompetencji można przenosić w drodze fuzji komórkowej z komórek pobudzonych (działaniem PDGF) na komórki spoczynkowe [46] oraz że kompetencja utrzymuje się po neutralizacji zewnątrzkomórkowego PDGF przeciwciałami dla tego czynnika [47]. Stwierdzono także, że stan kompetencji jest względnie trwały i w przypadku działania PDGF na komórki 3T3 utrzymuje się przez 10–12 godzin [48]. W chemicznie zdefiniowanym płynie hodowlanym komórki 3T3 wymagają trzech peptydowych czynników wzrostowych (rys. 6) do przejścia przez pełny cykl komórkowy: PDGF (czynnika kompetencyjnego) oraz EGF i IGF I (czynników progresywnych) [49]. Spoczynkowe komórki 3T3 stają się kompetentne po okresie ok. 2 godzin i wymagają współdziałania EGF (na początku fazy G<sub>1</sub>) i IGF I (niezbędny do wejścia w fazę S) do rozpoczęcia po dalszych 10 godzinach syntezy DNA.

Jeżeli po czasie ok. 12 godzin od dodania PDGF (i EGF) dodany zostanie IGF I, komórki prawie natychmiast rozpoczynają syntezę DNA, jeśli IGF I nie zostanie dodany, komórki przechodzą w fazę spoczynkową (G<sub>0</sub>).

Kompetencyjno-progresywna hipoteza stymulacji wzrostu komórkowego obrazuje model wielostopniowej regulacji cyklu komórkowego, prawdopodobnie prawdziwy dla wielu różnych rodzajów komórek. Bowiem mimo że wiele komórek prawidłowych w hodowli *in vitro* wymaga do proliferacji wyłącznie jednego czynnika wzrostowego, potrafią one same syntetyzować (i wydzielać do medium) pozostałe czynniki niezbędne dla ich wzrostu. Przykładowo, fibroblasty skóry ludzkiej inicjują pełny cykl komórkowy po działaniu wyłącznie jednego czynnika (PDGF), ale same produkują zarówno czynniki kompetencyjne, jak i progresywne [50–52]. Mimo że hipoteza Pledgera jest zapewne uproszczoną wizją współdziałania czynni-

ków wzrostowych w warunkach *in vivo*, idea wielostopniowej regulacji wzrostu i różnicowania komórek przybliży nas do zrozumienia mechanizmów fizjologicznej kontroli wzrostu.

Czynniki wzrostowe są grupą peptydów regulacyjnych o bardzo konserwatywnej strukturze i funkcji. Przykładowo, krew minoga i człowieka zawierają podobne ilości (15–20 ng/ml)



Rys. 6. Kompetycyjno-progresywny model regulacji cyklu komórkowego: Q – komórki spoczynkowe, Q\* – komórki kompetentne

nierozróżnialnego immunologicznie PDGF, co wskazuje, że pojawienie się tego peptydu w rozwoju ewolucyjnym kręgowców poprzedza o setki milionów lat wykształcenie płytek krwi [53]. Podobnie, praktycznie identyczna (u ssaków) struktura I-rzędowa insulino-podobnych czynników wzrostowych w zestawieniu ze zmiennością gatunkową insuliny [54] sugeruje, że czynniki te pełniły swoją funkcję na długo przed powstaniem wyspecjalizowanych tkanek (gruczołów). Plejotropowy efekt działania wszystkich znanych czynników wzrostowych, a także powszechna zdolność do syntezy tego typu białek sekrecyjnych przez wiele typów komórek czyni prawdopodobną hipotezę, że czynniki wzrostowe są w sensie funkcjonalnym prekursorami klasycznych hormonów peptydowych.

Ostatnie dziesięciolecie zaowocowało prawdziwą lawiną prac na temat czynników wzrostowych. W roku 1985 opublikowano ponad 400 artykułów dotyczących jednego tylko czynnika wzrostowego (EGF), a obecnie ukazuje się kilka tysięcy prac rocznie na temat peptydowych czynników wzrostowych. Gwałtowny rozwój badań tej grupy związków przyniósł rozwiązanie wielu problemów mających kluczowe znaczenie w rozumieniu mechanizmu działania innych peptydów regulacyjnych (internalizacja kompleksów peptyd-receptor, rola



fosforylacji receptorów w modulacji ich funkcji efektorowej, udział fosfatydyloinozytoli w sygnalizacji transbłonowej, mechanizm regulacji autokrynej i inne). Wyniki badań podstawowych tej grupy związków stwarzają również nadzieję na postęp w leczeniu schorzeń wynikających z zaburzenia prawidłowego wzrostu komórkowego, przede wszystkim w terapii nowotworów.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] MURPHY RA, WATSON AY, RODES JA. *Appl Neurophysiol* 1984; **47**: 33–42.
- [2] COHEN S, LEVI-MONTALCINI R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960; **46**: 571–574.
- [3] COHEN S. *J Biol Chem* 1962; **237**: 1555–1562.
- [4] KLEIN A. *Post Biochem* 1987; **33**: 199–201.
- [5] KLEIN A. *Post Biochem* 1987; **33**: 125–150.
- [6] PEREZ-POLO JR, FOREMAN PJ, JACKSON GR, SHAN D, TAGLIALATELA G, THORPE LW, WERBACH-PEREZ K. (W:) *Molecular Neurobiology*, N.G. Bazan (red.) ,The Humana Press, New York 1990; 57–91.
- [7] ROHRER H. *Eur J Neurosci* 1990; **2**: 1005–1015.
- [8] PEREZ-POLO JR. (W:) *Trophic Factors and Nervous System*, L.A.Horrocks, (red.) Raven Press, New York 1990; 107–118.
- [9] MROCZKOWSKI B, COHEN S. (W:) *Platelets and Vascular Occlusion*, C.Patrono i G.A.Fitzgerald (red.) Raven Press, New York 1989; 1–17.
- [10] COHEN S. *Biosci Rep* 1986; **6**: 1017–1028.
- [11] BURGESS AW. *Br Med Bull* 1989; **45**: 401–413.
- [12] DERYNCK R. *J Cell Biol* 1986; **32**: 293–304.
- [13] DERYNCK R. *Cell* 1988; **54**: 593–595.
- [14] ROSS R, RAINES EW. (W:) *Growth Factors: From Genes to Clinical Application*, V.R.Sara, (red.) Raven Press, New York, 1990; 193–199.
- [15] HELDIN C-H, CLAESSON-WELSH L, WESTERMARK B. (W:) *Growth Factors: From Genes to Clinical Application*, V.R.Sara (red.) Raven Press, New York 1990; 41–50.
- [16] HELDIN C-H, WESTERMARK B. *Cell Regul* 1990; **1**: 555–566.
- [17] ROSS R. *Ann Rev Med* 1987; **38**: 71–79.
- [18] KRYWICKI RF, YEE D. *Breast Cancer Res Treat* 1992; **22**: 7–19.
- [19] GUYDA HJ, RAPPAPORT R. (W:) *Pediatric Endocrinology*, R.Collu, J.R.Ducharme i H.J.Guyda (red.) Raven Press, New York 1989; 217–250.
- [20] BAXTER RC. *Comp Biochem Physiol* 1988; **91B**: 229–235.
- [21] WHITMAN M, MELTON DA. *Annu Rev Cell Biol* 1989; **5**: 98–117.
- [22] BURGESS WM, MACIĄG T. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 575–606.
- [23] MATSUMOTO K, NAKAMURA T. *Critical Rev Oncogenesis* 1992; **3**: 27–54.
- [24] MICHALOPOULOS GK, ZARNEGAR R. *Hepatology* 1992; **15**: 149–155.
- [25] FAUSTO N. *Laboratory Invest* 1991; **66**: 497–499.
- [26] HOOPER WC. *Leukemia Res* 1991; **15**: 179–184.
- [27] RIZZINO A. *Develop Biol* 1988; **130**: 411–422.
- [28] SPORN MB, ROBERTS AB, WAKEFIELD LM, ASSOIAN RK. *Science* 1986; **233**: 532–534.
- [29] NOCKA K. *Sigma Immu Notes* 1992; **8**: 1–3.
- [30] ZREBO K, WYPYCH J, MCNIECE I i in. *Cell* 1990; **63**: 195–201.
- [31] MARTIN F, SUGGS S, LANGLEY K i in. *Cell* 1990; **63**: 203–211.
- [32] NICOLA NA. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 45–77.
- [33] TROTTA PP. *Am J Reproduc Immunol* 1991; **25**: 131–141.
- [34] MAZUR EM, COHEN J. *Clin Pharmacol Ther* 1989; **46**: 250–256.
- [35] TABBARA IA, ROBINSON BE. *Anticancer Res* 1991; **11**: 81–90.
- [36] SIEFF CA. *J Clin Invest* 1987; **79**: 1549–1557.
- [37] KOURY MJ, BONDURANT MC. *Eur J Biochem* 1992; **210**: 649–663.
- [38] ERSLEV AJ. *Leukemia Res* 1990; **14**: 683–688.

- [39] MIZEL SB. *FASEB J* 1989; **3**: 2379–2388.
- [40] BALKWILL FR. *Br Med Bull* 1989; **45**: 389–400.
- [41] VILCEK J, LEE TH. *J Biol Chem* 1991; **266**: 7313–7316.
- [42] JAMES R, BRADSHAW RA. *Annu Rev Biochem* 1984; **53**: 259–292.
- [43] PLEDGER WJ, STILES CD, ANTONIADES HN, SCHER CD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 4481–4485.
- [44] PLEDGER WJ, STILES CD, ANTONIADES HN, SCHER CD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 2839–2843.
- [45] PAUL D. *Drug Res* 1985; **35**: 772–779.
- [46] SMITH JC, STILES CD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 4363–4367.
- [47] SINGH JP, CHAIKIN MA, PLEDGER WJ, SCHER CD, STILES CD. *J Cell Biol* 1983; **96**: 1497–1502.
- [48] O KEEFE E, PLEDGER WJ. *Molec Cell Endocrinol* 1983; **31**: 167–186.
- [49] CAMPRISI J, PARDEE AB. *Molec Cell Biol* 1984; **4**: 1807–1814.
- [50] BETSHOLTZ C, WESTERMARK B. *J Cell Physiol* 1984; **118**: 203–210.
- [51] CLEMMONS DR. *J Cell Physiol* 1983; **114**: 61–67.
- [52] CLEMMONS DR, UNDERWOOD LE, VAN WYKK JJ. *J Clin Invest* 1981; **67**: 10–19.
- [53] SINGH JP, CHAIKIN MA, STILES CD. *J Cell Biol* 1982; **95**: 667–671.
- [54] HUMBEL RE, BURGISSER D, HONEGGER AM, LUTHI C, ROTH B. (W:) *Growth Factors: From Genes to Clinical Application*, V.R.Sara (red.) Raven Press, New York 1990; 1–10.

### III. CZYNNIKI WZROSTOWE KOMÓREK SOMATYCZNYCH

#### 1. PŁYTKOWY CZYNNIK WZROSTOWY (PDGF)

Zainteresowanie PDGF związane jest bezpośrednio z obserwacją Sama Balka [1], który na początku lat siedemdziesiątych zauważył, że surowica krwi jest bardziej efektywna niż osocze w stymulacji wzrostu prawidłowych fibroblastów *in vitro*. W roku 1974 Russell Ross i wsp. [2] i niezależnie Kohler i Lipton [3] wykazali, że jeden z kluczowych mitogenów surowicy zawarty jest w płytkach krwi. Co więcej, grupa z Seattle wykazała, że PDGF może odgrywać istotną rolę w patogenezie arteriosklerozy [4]. Praca ta zwróciła powszechną uwagę na PDGF i wprowadziła na stałe do piśmiennictwa naukowego. Dalsze prace prowadzone były głównie przez dwie grupy naukowców: amerykańską (Antoniades, Scher i Stiles) oraz szwedzką (Heldin, Westermarck i Westeson). W roku 1979 uzyskali oni pierwsze czyste preparaty PDGF z płytek krwi ludzkiej [5,6]. Także w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu opracowano pomysłówą i prostą metodę oczyszczania PDGF [7], stosowaną dziś na skalę laboratoryjną.

#### IZOFORMY PDGF I ICH RECEPTORY

Na początku lat osiemdziesiątych z ludzkich płytek krwi wyizolowano dwa białka o aktywności PDGF: PDGF I o m.c. 31 kDa i PDGF II o m.c. 28 kDa, mające identyczną aktywność mitogenną, taki sam skład aminokwasowy, reaktywność immunologiczną i powinowactwo do receptorów na komórkach 3T3 [8,9]. Okazało się, że różnią się jedynie stopniem glikozylacji; I – 7% węglowodanów, II – 4% węglowodanów. PDGF izolowany z ludzkich płytek krwi okazał się białkiem zasadowym ( $pI = 10,2$ ), mającym 16 reszt cysteinowych (wszystkie połączone mostkami dwusiarczkowymi). Redukcja mostków dwusiarczkowych znosiła aktywność biologiczną i powodowała rozpad cząsteczki na dwie podjednostki: A i B o podobnej masie cząsteczkowej [14 i 17 kDa] i różnym stopniu glikozylacji [10,11]. Wyniki te wskazywały, że ludzki PDGF jest heterodimerem podjednostek A i B powiązanych mostkami -S-S-. Dojrzałe łańcuchy A i B wykazują ok. 60% podobieństwa w sekwencji aminokwasowej [12].

Nowy punkt widzenia na strukturę PDGF przyniosły badania genów kodujących łańcuchy A i B tego czynnika. Kluczowym elementem w identyfikacji genu kodującego B-PDGF była obserwacja, że częściowo poznana sekwencja tego peptydu wykazuje ponad 90% homologii z sekwencją produktu białkowego ( $p28^{sis}$ ) genu *v-sis* wirusa SSV [13]. Naturalnym następstwem tego było ustalenie, że przewidywana sekwencja aminokwasowa, wydedukowana z sekwencji DNA ludzkiego genu *c-sis* odpowiada sekwencji łańcucha B-PDGF [14,15]. Ludzki

gen *c-sis* zlokalizowany jest na dłuższym ramieniu chromosomu 22 [16]. Natomiast całkowita sekwencja aminokwasowa A-PDGF została określona na podstawie sekwencji odpowiedniego cDNA, a gen kodujący łańcuch A został zlokalizowany w chromosomie 7 [17]. Ocyszczanie i charakterystyka strukturalna czynników PDGF-podobnych, wyizolowanych z różnych komórek prawidłowych i nowotworowych dowiodły, że heterodimer AB nie jest jedyną formą PDGF syntetyzowaną przez komórki ssaków. Wykazano m.in., że: komórki mięśni gładkich szczura oraz niektóre komórki nowotworowe (mięsaków i glejaków) syntetyzują homodimer AA [18–20], a komórki transformowane wirusem SSV syntetyzują homodimer BB [21–23].

Obecnie wiadomo, że w ludzkich płytkach krwi gromadzone są wszystkie trzy formy dimeryczne, a homodimery AA i BB stanowią odpowiednio do 27% i 41% całkowitej ilości tego czynnika [24]. Natomiast, PDGF-BB dominuje w surowicy krwi większości gatunków zwierząt poza naczelnymi [25]. Łańcuchy A i B są syntetyzowane w postaci większych cząsteczek prekursorowych, które dimeryzują i podlegają obróbce proteolitycznej w trakcie procesu dojrzewania. Badania nad PDGF syntetyzowanym przez komórki nowotworowe lub przez komórki transfekowane cDNA dla tego czynnika wzrostowego wykazały istotne różnice w obrazie sekrecji poszczególnych izoform PDGF. Podczas gdy PDGF-AA i PDGF-AB są wydzielane z komórki natychmiast po ich syntezie i obróbce, PDGF-BB pozostaje zasocjowany przez dłuższy czas z komórkami macierzystymi [26,27]. Fakt ten sugeruje, że działanie PDGF-BB jest głównie autokryne, a PDGF-AA i PDGF-AB przede wszystkim parakryne lub endokryne. Hipoteza taka mogłaby wyjaśnić, dlaczego łańcuch B ma znacznie silniejszą aktywność transformującą niż łańcuch A, co stwierdzono w doświadczeniach nad transfekcją odpowiednich cDNA do komórek ssaków [28,29].

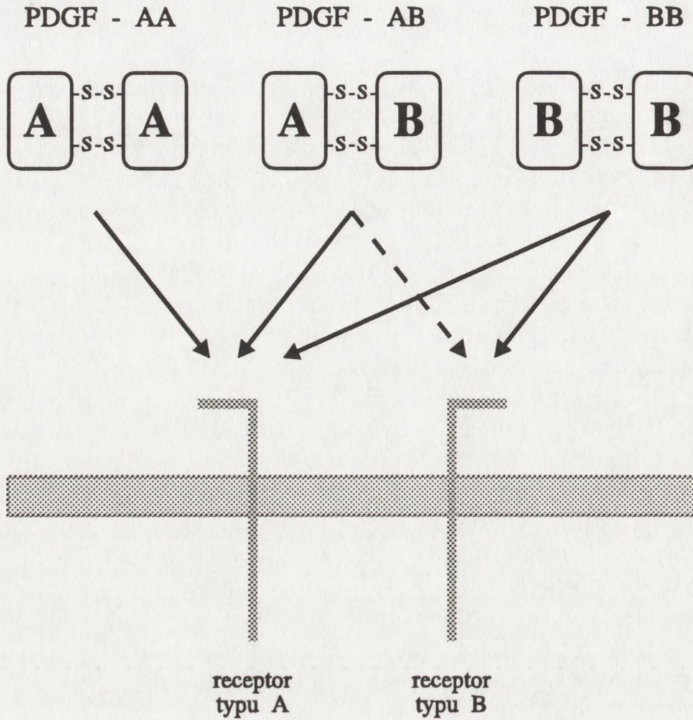
Poszczególne izoformy PDGF mają również odmienną aktywność biologiczną. Między innymi wykazano, że homodimer AA w przeciwieństwie do heterodimeru AB przejawia niewielką aktywność mitogenną w stosunku do fibroblastów skóry ludzkiej oraz nie ma aktywności chemotaktycznej lub zdolności stymulowania reorganizacji filamentów aktynowych [30]. Przyczyną tych różnic okazało się istnienie dwóch różnych typów receptorów [A i B] o różnym powinowactwie do poszczególnych izoform PDGF [31,32]. Receptory typu A wiążą wszystkie rodzaje PDGF z podobnym powinowactwem ( $K_d = 0,2-0,5$  nM) [33]. Receptory typu B wiążą PDGF-BB z wysokim powinowactwem, PDGF-AB z powinowactwem ok. 10-krotnie mniejszym oraz nie wiążą PDGF-AA [31,32,34]. Za różnice w zdolności wiązania liganda z receptorami A i B odpowiedzialne są prawdopodobnie swoiste sekwencje wiążące, różne dla łańcuchów A i B PDGF [35].

Schemat oddziaływania izoform PDGF z receptorami typu A i B ilustruje rysunek 7.

Pojedynczy fibroblast skóry ludzkiej ma  $20-30 \times 10^3$  receptorów typu A i ok.  $100 \times 10^3$  receptorów typu B [36]. Tak więc, odpowiedź komórkowa na działanie różnych form PDGF może zależeć od obecności lub liczby receptorów poszczególnych typów. Przykładowo, komórki fibroblastów mysich Swiss 3T3 (w odróżnieniu od fibroblastów skóry ludzkiej) mają podobną liczbę receptorów obu typów i odpowiadają podobnie na mitogenne działanie PDGF-AA, jak i PDGF-BB [37].

Porównanie struktury odpowiednich cDNA dla receptorów typu A i B [33,38–40] wskazuje, że są to podobne cząsteczki. W części zewnątrzkomórkowej (akceptorowej) każdego z typów można wyróżnić pięć domen immunoglobulino-podobnych, a homologia sekwencji aminokwasowej sięga 30%. Część wewnątrzkomórkowa (efektorowa) zawiera sekwencję tyrozyno-swoistej kinazy białkowej, rozdzielonej insercją ok. 100 reszt aminokwa-

sowych. Podobieństwo struktury I-rzędowej w obszarze kinazowym wynosi ok. 80%, a w części C-końcowej ok. 30%. Receptor typu B jest syntetyzowany w postaci 160 kDa prekursora, który w procesie dojrzewania tworzy glikoproteinę o masie cząsteczkowej 180 kDa [41–43]. Dojrzały receptor typu A (170 kDa) powstaje z mniejszej cząsteczki prekursorowej



Rys. 7. Możliwości oddziaływań trzech izoform PDGF (AA, AB, BB) z dwoma typami receptora PDGF (A i B)

o masie cząsteczkowej 140 kDa [44]. Badania prowadzone na ustalonych liniach komórek nowotworowych wykazują, że synteza mRNA dla receptorów A i B może być bardzo zróżnicowana [38]. Niektóre z badanych linii komórkowych wykazywały wyłącznie ekspresję receptorów typu A [44] inne tylko typu B [46]. Przypuszcza się, że poszczególne formy PDGF oddziałując z receptorami różnych typów mogą inicjować niezależne drogi przekazywania sygnału w komórce docelowej. Niestety, nasze wiadomości o funkcjonowaniu receptorów PDGF są niekompletne i uniemożliwiają ocenę różnic w ich funkcjonowaniu na poziomie molekularnym.

## WYSTĘPOWANIE I KOMÓRKI DOCELOWE

Wiele różnych rodzajów komórek prawidłowych (monocyty/makrofagi, komórki endotelialne i epithelialne, fibroblasty, mioblasty, astrocyty, komórki mięśni gładkich) *in vitro* syntetyzuje i wydziela do płynu hodowlanego, jedną lub więcej izoform PDGF [46–50]. Natomiast, *in vivo* komórki prawidłowe syntetyzują bardzo małe lub niewykrywalne ilości PDGF, a sekrecja tego czynnika jest precyzyjnie regulowana [51]. U ssaków swoistym magazynem PDGF są płytki krwi [51]. PDGF jest syntetyzowany w megakariocytach, pakowany do  $\alpha$ -granuli płytek krwi i uwalniany z nich działaniem trombiny, kwasu arachidonowego czy kolagenu lub w drodze aktywacji mechanicznej, w miejscach uszkodzenia naczyń krwionośnych [52,53]. Przez analogię do płytkowego czynnika 4 (także zlokalizowanego w granulach) przyjmuje się, że PDGF dyfunduje z  $\alpha$ -granuli do powierzchni komórki i jest wydzielany na zewnątrz po ok. 10 minutach od przyłączenia płytek do obnażonego endotelium naczyniowego. Stężenie PDGF w surowicy ludzkiej wynosi w zależności od metody oznaczania: 50 ng/ml (immunologicznie) lub 15 ng/ml (metodą radioreceptorową) [25,54]. Natomiast stężenie PDGF w osoczu wynosi mniej niż 1 ng/ml. Precyzyjne określenie poziomu PDGF w tych płynach fizjologicznych jest trudne, ponieważ czynnik ten wiąże się nieodwracalnie z  $\alpha_2$ -makroglobuliną [55], co ma istotne znaczenie fizjologiczne. Lokalnie uwalniany PDGF może przedostawać się do krążenia i wywierać niepożądane efekty w tkankach odległych od miejsca uwalniania. Wagę tego zjawiska podkreślają oznaczenia szybkości usuwania egzogenego PDGF z krwi ssaków. Przykładowo, PDGF podany dożylnie pawianowi był usuwany z krwi z  $T_{1/2} = 2$  minuty [54].

Płytkowy czynnik wzrostowy jest bardzo silnym mitogenem dla większości komórek tkanki łącznej pochodzenia mezodermalnego. W hodowli *in vitro* PDGF stymuluje proliferację komórek glejowych, komórek mięśni gładkich i fibroblastów [56]. Ponadto, dla komórek mięśni gładkich i fibroblastów, a także dla neutrofilii jest silnym chemoatraktantem, co sugeruje jego udział w procesie gojenia ran i regeneracji tkanki łącznej [57,58]. PDGF nie jest czynnikiem wzrostowym dla komórek nabłonka, śródbłonka, komórek limfoidalnych i hemopoetycznych [59–61], aczkolwiek może pośrednio stymulować erytropoezę *in vitro* [62]. Aktywność biologiczna PDGF sugeruje udział tego czynnika w stanach związanych z patologiczną proliferacją komórek tkanki łącznej, takich jak arteroskleroza, fibroza czy choroby nowotworowe [63,64].

## PLEJOTROPOWY EFEKT DZIAŁANIA PDGF

Związanie PDGF z jego receptorem błonowym wywołuje (podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych czynników wzrostowych) kaskadę reakcji chemicznych, których ostatecznym wynikiem jest wzrost komórkowy. Odpowiedź anaboliczna komórki obejmuje szereg różnych zdarzeń wewnątrzkomórkowych, przebiegających na różnych poziomach subkomórkowych i w różnym czasie od związania czynnika z receptorem. Plejotropowa odpowiedź różnych rodzajów komórek na działanie PDGF jest podobna. W uproszczeniu można ją przedstawić w postaci następującej sekwencji zdarzeń (tab. 3), przyjmując jako czas zero moment przyłączenia czynnika do receptora komórkowego. Wśród nich wyróżnić można reakcje związane z przeniesieniem sygnału mitogennego (fosforylacja receptora, podniesienie poziomu wapnia, stymulacja obrotu fosfatydyloinozytoli i antyportu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ekspresja genów cyklu komórkowego), ogólne efekty anaboliczne towarzyszące procesowi wzrostu (transport jonów, cukrów i aminokwasów, synteza białek, polisacharydów i lipidów) oraz reakcje

TABELA 3. Plejotropowa odpowiedź komórkowa na działanie PDGF na podstawie doświadczeń *in vitro*, prowadzonych na różnych rodzajach komórek

Czas od przyłączenia PDGF do receptora	Efekt biologiczny
1–2 min	>fosforylacji receptora [65,66] > fosf. białek cytoplazmat. [66] > poziomu komórkowego Ca <sup>2+</sup> [67] > antyportu Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> [68] > transportu aminokwasów [69] > obrotu fosfatydyloinozytoli [70,71]
2–5 min	> uwalniania kwasu arachidonowego i PGE <sub>2</sub> [72,73]
10–20 min	internalizacja kompleksu PDGF-receptor [74]
15 min	> syntezy białek (maks. po 4–5 godz.) [69,75]
2 godz.	> syntezy RNA (maks. po 3 godz.) [76]
2–6 godz.	> metabolizmu cholesterolu [77] odpowiedź chemotaktyczna [78]
10–16 godz.	> syntezy DNA [79,80]

związane z określoną istotną fizjologicznie odpowiedzią komórki, np. z chemotaksją (reorganizacja białek cytoszkieletu, aktywacja metabolizmu energetycznego). Ogromna liczba reakcji często wzajemnie ze sobą sprzężonych powoduje, że wyjaśnienie całości zmian metabolicznych stymulowanych czynnikiem wzrostowym jest jeszcze bardzo odległe. Jednym z najważniejszych zagadnień, także z praktycznego punktu widzenia jest poznanie łańcucha reakcji przenoszących sygnał mitogenny od receptora błonowego do jądra komórki, określane często skrótowo "sygnalizacją mitogenną". Problemowi temu poświęcony jest odrębny rozdział tej monografii.

#### PRZYPUSZCZALNA ROLA PDGF W TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Strukturalne podobieństwo pomiędzy PDGF a białkiem transformującym wirusa SSV legło u podstaw hipotezy o udziale czynników PDGF-podobnych w transformacji nowotworowej. Analiza strukturalna genu *c-sis* (koduje łańcuch B-PDGF) i genomu wirusa SSV wykazała, że gen *v-sis* zawiera prawie całą sekwencję odpowiadającą B-PDGF za wyjątkiem pierwszego eksonu, kodującego peptyd sygnałowy [81,82]. Przepuszczalnie delekcja ta w genie *v-sis* jest kompensowana przez hydrofobowy odcinek genu *env*. Mutanty wirusa SSV, które nie mają odpowiednika sekwencji sygnałowej B-PDGF nie mają zdolności do transformacji, co wskazuje na związek pomiędzy transformacją a sekrecją białka p28<sup>v-sis</sup> [83,84]. Utrata sekwencji sygnałowej uniemożliwia bowiem jego przerzut do retikulum endoplazmatycznego, dalszą jego obróbkę i wydzielanie na zewnątrz komórki. Ponadto wykazano, że komórki, które nie mają receptorów dla PDGF, nie ulegają transformacji wirusem SSV [85]. Co więcej, transformacja tym wirusem może być zahamowana przez przeciwciała swoiste dla PDGF [23,86]. Wszystkie te informacje wskazują, że transformacja wirusem SSV jest ściśle związana z syntezą i wydzielaniem PDGF-BB, co umożliwia jego działanie w drodze auto- lub parakrynnnej. Wiele linii komórkowych wyprowadzonych z guzów nowotworowych produkuje PDGF-podobne czynniki wzrostu i ma dla nich receptory (głównie mięsaki i glejaki), co wskazuje, że wzrost ich może być regulowany w drodze autokrynnnej [85,87]. Fakty te legły

u podstaw zaproponowanej przez Betsholtza [88] hipotezy tzw. zewnątrzkomórkowej transformacji autokrynej. Istnieje jednak wiele przesłanek świadczących przeciwko tej hipotezie:

a. Komórki Swiss 3T3 i NIH 3T3 nie przejawiały fenotypu charakterystycznego dla komórek transformowanych, mimo ich dwumiesięcznej inkubacji w obecności białka p28<sup>v-sis</sup> [90].

b. Nie donoszono o permanentnej aktywności transformującej surowicy, chociaż PDGF jest jej podstawowym mitogenem.

c. Przeciwciała dla PDGF hamują wzrost tylko niektórych rodzajów komórek transformowanych SSV [86].

d. Syntezę PDGF wykazano w wielu liniach komórek wyprowadzonych z ludzkiego czerniaka, ale w tym przypadku autokrynną regulacją wzrostu jest mało prawdopodobna, ponieważ komórki te nie mają receptorów błonowych dla PDGF [89].

e. Niektóre komórki transformowane SSV nie wydzielają PDGF do otoczenia, a mimo to obserwowano efekt autostymulacji wzrostu [86].

Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem tych obserwacji była wewnątrzkomórkowa interakcja produktu genu *v-sis* z nowosyntetyzowanymi receptorami PDGF zachodząca w świetle wakuoli retikulum endoplazmatycznego lub aparatu Golgiego [86]. Prowadziłoby to do aktywacji kinazy tyrozynowej, zlokalizowanej w cytoplazmatycznej części receptora inicjując sygnał mitogeny i stan transformacji w komórkach infekowanych wirusem SSV. Szereg dowodów doświadczalnych potwierdza hipotezę "wewnątrzkomórkowej transformacji autokrynej", wynikającej z permanentnej sygnalizacji mitogennej, indukowanej w wymienionych wyżej organellach komórkowych [90,91].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BALK SD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 271–275.
- [2] ROSS R, GLOMSET JA, KARIYA B, HARKER L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; **71**: 1207–1210.
- [3] KOHLER N, LIPTON A. *Exp Cell Res* 1974; **87**: 297–301.
- [4] ROSS R, GLOMSET JA. *N Engl J Med* 1976; **295**: 369–377.
- [5] ANTONIADES HN, SCHER CD, STILES CD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 1809–1813.
- [6] HELDIN C-H, WESTERMARK B, WASTESON A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 3722–3726.
- [7] CZYRSKI JA, NARCZEWSKA B, INGLOT AD. *Arch Immunol Ther Exp* 1984; **32**: 589–598.
- [8] DEUEL TF, HUANG JS, PROFFITT RT, BAENZIGER JU, CHANG, KENNEDY BB. *J Biol Chem* 1981; **256**: 8896–8899.
- [9] ANTONIADES HN. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7314–7317.
- [10] JOHNSON A, HELDIN C-H, WESTERMARK B, WASTESON A. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **104**: 66–74.
- [11] DEUEL TF, HUANG JS. *Prog Hematol* 1983; **13**: 201–221.
- [12] JOHNSON A, HELDIN C-H, WASTESON A i in. *EMBO J* 1984; **3**: 921–928.
- [13] WATERFIELD MD, SCRACE GT, WHITTLE N i in. *Nature* 1983; **304**: 35–39.
- [14] JOSEPHS SF, GUO G, RATNER L, WONG-STAAAL F. *Science* 1984; **223**: 487–490.
- [15] CHIU I-M, REDDY EP, GIVOL D, ROBBINS KC, TRONICK SR, AARONSON SA. *Cell* 1984; **37**: 123–129.
- [16] DALLA-FAVERA R, GALLO RC, GIALONGO A, CROCE CM. *Science* 1982; **218**: 686–688.
- [17] BETSHOLTZ C, JOHNSON A, HELDIN C-H i in. *Nature* 1986; **320**: 695–699.
- [18] HELDIN C-H, JOHNSON A, WENNERGREN S, WERNSTEDT C, BETSHOLTZ C, WESTERMARK B. *Nature* 1986; **319**: 511–514.
- [19] WESTERMARK B, JOHNSON A, PAULSSON Y i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7197–7200.
- [20] HAMMACHER A, NISTER M, WESTERMARK B, HELDIN C-H *Eur J Biochem* 1988; **176**: 179–186.
- [21] GARRET JS, COUGHLIN SR, NIMAN HL, TREMBLE PM, GIELS GH, WILLIAMS LT. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 7466–7470.
- [22] JOHNSON A, BETSHOLTZ C, HELM K, HELDIN C-H, WESTERMARK B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 1721–1725.



- [23] JOHNSON A, BETSHOLTZ C, HELDIN C-H, WESTERMARK B. *Nature* 1985; **317**: 438–440.
- [24] HART CE, BAILEY M, CURTIS DA, OSBORN S, RAINES E, ROSS R, FORSTROM JW. *Biochemistry* 1990; **29**: 166–172.
- [25] BOWEN-POPE DF, HART CE, SEIFERT RA. *J Biol Chem* 1989; **264**: 2502–2508.
- [26] OSTMAN A, RALL L, HAMMACHER A, WORMSTEAD MA, COIT D, VALENZUELA P, BETSHOLTZ C, WESTERMARK B, HELDIN C-H. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16202–16208.
- [27] ROBBINS KC, LEAL F, PIERCE JH, AARONSON SA. *EMBO J* 1985; **4**: 1783–1792.
- [28] BECKMANN MP, BETSHOLTZ C, HELDIN C-H, WESTERMARK B, DI MARCO E, DI FIORE PP, ROBBINS KC, AARONSON SA. *Science* 1988; **241**: 1346–1349.
- [29] BYWATER M, HELDIN C-H, WESTERMARK B, BETSHOLTZ C. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 2753–2762.
- [30] NISTER M, HAMMACHER A, MELLSTROM K, SIEGBAHN A, RONNSTRAND L, WESTERMARK B, HELDIN C-H. *Cell* 1988; **52**: 791–799.
- [31] HART CE, FORSTROM JW, KELLY JD, SEIFERT RA, SMITH RA, ROSS R, MURRAY MJ, BOWEN-POPE DF. *Science* 1988; **240**: 1529–1531.
- [32] HELDIN C-H, BACKSTROM G, OSTMAN A, HAMMACHER A, RONNSTRAND L, RUBIN K, NISTER M, WESTERMARK B. *EMBO J* 1988; **7**: 1387–1394.
- [33] CLAESON-WELSH L, ERKSSON A, WESTERMARK B, HELDIN C-H. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4917–4921.
- [34] SEVERINSSON L, CLAESON-WELSH L, HELDIN C-H. *Eur J Biochem* 1989; **182**: 679–68.
- [35] ENGSTROM U, ENGSTROM A, ERNLUND A, WESTERMARK B, HELDIN C-H. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16581–16587.
- [36] OSTMAN A, BACKSTROM G, FONG N, BETSHOLTZ C, WERNSTEDT C, HELLMAN U, WESTERMARK B, VALENZUELA P, HELDIN C-H. *Growth Factors* 1989; **1**: 271–281.
- [37] KAZLAUSKAS A, BOWEN-POPE DF, SEIFERT R, HART CE, COOPER JA. *EMBO J* 1988; **7**: 3727–3736.
- [38] MATSUI T, HEIDERAN M, TORUM M, POPESCU N, LA ROCHELLE W, KRAUS M, PIERCE J, AARONSON SA. *Science* 1989; **243**: 800–803.
- [39] CLAESON-WELSH L, ERIKSSON A, MOREN A, SEVEINSSON L, EK B, OSTMAN A, BETSHOLTZ C, HELDIN C-H. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 3476–3486.
- [40] GRONWALD RGK, SEIFERT RA, BOWEN-POPE DF. *J Biol Chem* 1989; **264**: 8120–8125.
- [41] CLAESON-WELSH L, RONNSTRAND L, HELDIN C-H. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8796–8800.
- [42] HART CE, SEIFERT RA, ROSS R, BOWEN-POPE DF. *J Biol Chem* 1987; **262**: 10780–10785.
- [43] KEATING MT, WILLIAMS LT. *J Biol Chem* 1987; **262**: 7932–7937.
- [44] CLAESON-WELSH L, HAMMACHER A, WESTERMARK B, HELDIN C-H, NISTER M. *J Biol Chem* 1989; **264**: 1742–1747.
- [45] HELDIN N-E, GUSTAVSSON G, CLAESON-WELSH L, HAMMACHER A, MARK J, HELDIN C-H, WESTERMARK B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9302–9306.
- [46] MARTINET Y, BITTERMAN PB, MORNEX J-F, GROTENDORST GR, MARTIN GR, CRYSTAL RG. *Nature* 1986; **319**: 158–160.
- [47] SEJERSEN T, BETSHOLTZ C, SJOLUND M, HELDIN C-H, WESTERMARK B, THYBERG J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 6844–6848.
- [48] COLLINS T, POBER JS, GIMBRONE MA, HAMMACHER A, BETSHOLTZ C, WESTERMARK B, HELDIN C-H. *Am J Pathol* 1987; **126**: 7–12.
- [49] ROSS R, RAINES EW, BOWEN-POPE DF. *Cell* 1986; **46**: 155–169.
- [50] RICHARDON WD, PRINGLE N, MOSLEY MJ, WESTERMARK B, DUBOIS-DALCQ M. *Cell* 1988; **53**: 309–319.
- [51] HELDIN C-H, CLAESON-WELSH L, WESTERMARK B. (W:) Growth Factors: From Genes to Clinical Application, V.R.Sara (red.) Raven Press, New York 1990; 41–50.
- [52] WITTE LD, KAPLAN KL, NOSSEL HL, LAQES BA, WEISS HG, GOODMAN DS. *Circ Res* 1978; **42**: 402–409.
- [53] KAPLAN PL, BROCKMAN MJ, CHERNOFF A, LESZNIK GR, DRILLINGS M. *Blood* 1979; **53**: 604–618.
- [54] BOWEN-POPE DF, MALPASS TW, FOSTER DM, ROSS R. *Blood* 1984; **64**: 458–469.
- [55] HUANG JS, HUANG SS, DEUEL TF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 342–346.
- [56] BOWEN-POPE DF, SEIFERT RA, ROSS R. (W:) Control of Animal Cell Proliferation, A.L. Boyton i H.L. Leffert (red.) Academic Press, New York 1985; 281–312.
- [57] DEUEL TF, HUANG JS. *J Clin Invest* 1984; **74**: 669–676.
- [58] REIDY MA, FINGERLE J, LINDNER V. *Circulation* 1992; **86** (Suppl.): 43–46.

- [59] WESTERMARK B, HELDIN C-H, EK B, JOHNSON A, MELLSTROM K, NISTER M, WASTESON A. (W:) Growth and Maturation Factors, G.Guroff (red.) Wiley Press, New York 1983; 1: 73–115.
- [60] STILES CD. *Cell* 1983; 33: 653–655.
- [61] ACRES RB, LAMB JR, FELDMANN M. *Immunology* 1985; 54: 9–16.
- [62] DELWICHE F, RAINES E, POWELL J, ROSS R, ADAMSON J. *J Clin Invest* 1985; 76: 137–142.
- [63] HELDIN C-H, WESTERMARK B. *Cell Regul* 1990; 1: 555–566.
- [64] REINES EW, BOWEN-POPE DF, ROSS R. (W:) Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and Their Receptors, M.B. Sporn i A.B. Roberts, (red.) Springer-Verlag, Heidelberg, 1990; 95: 173–262.
- [65] PIKE LJ, BOWEN-POPE DF, ROSS R, KREBS EG. *J Biol Chem* 1983; 258: 9383–9390.
- [66] EK B, HELDIN C-H *J Biol Chem* 1984; 259: 11145–11152.
- [67] MOOLENAAR WH, TERTOOLEN GJ, DE LAAT SW. *J Biol Chem* 1984; 259: 8066–8069.
- [68] CASSEL D, ROTHENBERG P, ZHUANG Y-X, DEUEL TF, GLASER L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 6224–6228.
- [69] OWEN AJ, GEYER RP, ANTONIADES HN. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3203–3207.
- [70] BERRIDGE MJ, HESLOP JP, IRVINE RF, BROWN KD. *Biochem J* 1984; 222: 195–201.
- [71] NANBERG E, ROZENGURT E. *EMBO J* 1988; 7: 2741–2747.
- [72] NAKAO J, ITO H., CHANG W-C, KOSHIHARA Y, MUROTA S. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 866–871.
- [73] ROZENGURT E, STROOBANT P, WATERFIELD MD, DEUEL TF, KEEHAN M. *Cell* 1983; 34: 265–272.
- [74] SCHMIDT RA, GLOMSET JA, WRIGHT TN, HABENICHT AJR, ROSS R. *J Cell Biol* 1982; 95: 144–153.
- [75] OLASHOW NE, PLEDGER WJ. *Nature* 1983; 306: 272–274.
- [76] COHRAN B.H., REFFEL AC, STILES CD. *Cell* 1983; 33: 939–947.
- [77] LESLIE CC, ANTONIADES HN, GEYER RP. *Biochim Biophys Acta* 1982; 711: 290–304.
- [78] BERNSTEIN LR, ANTONIADES HN, ZETTER BR. *J Cell Sci* 1982; 56: 71–82.
- [79] ROSS R. *Ann Rev Med* 1987; 38: 71–79.
- [80] BOWEN-POPE DF. (W:) Developmental Biology, H.S. Steinberg (red.) Plenum Press, New York-London 1986; 3: 111–128.
- [81] ROBBINS KC, ANTONIADES HN, DEVARE SG, HUNKAPILER MW, AARONSON SA. *Nature* 1983; 305: 605–608.
- [82] RAO CH, IGARASHI H, CHIU IM, ROBBINS KC, AARONSON SA *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2392–2396.
- [83] HANNIK M, DONOGHUE DJ. *Science* 1984; 230: 1197–1199.
- [84] KING CR, GIESE NA, ROBBINS KC, AARONSON SA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5295–5299.
- [85] HELDIN C-H, WESTERMARK B. ISI Atlas of Science: Immunology, 1988; 44–48.
- [86] HUANG JS, HUANG SS, DEUEL TF. *Cell* 1984; 39: 79–87.
- [87] HELDIN C-H, WESTERMARK B. *J Cell Physiol* (Suppl.) 1987; 5: 31–34.
- [88] BETSHOLTZ C, JOHANSSON A, HELDIN C-H, WESTERMARK B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6440–6444.
- [89] HELDIN C-H, BETSHOLTZ C, JOHANSSON A, WESTERMARK B. *Cancer Rev* 1986; 2: 34–47.
- [90] HUANG SS, HUANG JS. *J Biol Chem* 1988; 263: 12608–12618.
- [91] KAETING M, WILLIAMS LT. *Science* 1988; 239: 914–916.

## 2. EPIDERMALNY CZYNNIK WZROSTOWY (EGF)

Od roku 1940, w którym Lacassagne wykazał wyraźny dimorfizm płciowy ślinianki podżuchwowej gryzoni, gruczoł ten stał się obiektem intensywnej badań. Na początku lat sześćdziesiątych wykazano, że komórki przykanalikowe ślinianki myszy syntetyzują m. in. dwa peptydowe czynniki wzrostowe: NGF i EGF. Oba występują w postaci wysokocząsteczkowych kompleksów o m.cz. odpowiednio: 140 i 74 kDa z białkiem o aktywności esteropeptydazy argininy [1,2]. Pierwszy z wymienionych czynników jest czynnikiem przeżyciowym dla komórek nerwowych (nie jest mitogenem) stymuluje syntezę swoistych dla tych komórek enzymów ( $\beta$ -hydroksylaza dopaminy, hydroksylaza tyrozyny) i wydłużanie neurytów. Drugi

stymuluje zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* proliferację komórek nabłonka i naskórka, dlatego został nazwany epidermalnym czynnikiem wzrostowym. Ślinianka podżuchwowa nie jest jedynym miejscem syntezy EGF. Usunięcie gruczołów śliniankowych nie obniża poziomu EGF w osoczu [3]. W krwi głównym magazynem EGF są płytki krwi ( $\alpha$ -granule), skąd wydzielany jest łącznie z innymi gromadzonymi tam czynnikami wzrostowymi (PDGF, TGF- $\beta$ ) [4,5]. Obecność EGF wykazano także w: skórze, nerkach, mózgu, jelitach i prostatie [6–8]. Szereg ustalonych linii komórkowych syntetyzuje i wydziela do medium hodowlanego EGF-podobne czynniki wzrostowe [9].

### STRUKTURA I BIOSYNTENZA

Dojrzały mysz EGF jest kwaśnym polipeptydem o m.cz. 6045 zbudowanym z 53 reszt aminokwasowych, z trzema wewnętrznymi mostkami dwusiarczkowymi [10]. Odpowiednikiem mEGF jest  $\beta$ -urogastron (hEGF), wyizolowany z moczu ludzkiego w roku 1975 [11], którego sekwencja aminokwasowa wykazuje 70% identyczności z mEGF [12]. Z ludzkich i szczurzych komórek nowotworowych wyizolowano peptydy strukturalnie i funkcjonalnie podobne do EGF, nazwane TGF- $\alpha$  (51 reszt aa) – od ich zdolności do fenotypowej transformacji komórek prawidłowych w warunkach *in vitro* (patrz rozdział IV). Obecnie rodzina peptydów EGF-podobnych liczy 5 przedstawicieli (mEGF, hEGF, rTGF- $\alpha$ , hTGF- $\alpha$  i VVGF), a ich strukturalne podobieństwo do mEGF przedstawia rysunek 8. Wszystkie peptydy mają trzy mostki dwusiarczkowe, decydujące o podobieństwie ich struktury przestrzennej i możliwości działania przez ten sam receptor komórkowy, natomiast podobieństwo sekwencji aminokwasowej jest ograniczone i zależy bardziej od typu czynnika (EGF czy TGF- $\alpha$ ) niż od różnic gatunkowych. Przykładowo hTGF- $\alpha$  wykazuje tylko 40% homologii sekwencji aminokwasowej z hEGF, natomiast aż 92% homologii z rTGF- $\alpha$  [12]. Ekspresję genu TGF- $\alpha$  wykazano wyłącznie w epitelialnych komórkach prawidłowych osobników dojrzałych [12,13]. Natomiast, aktywność TGF- $\alpha$  stwierdzono w wielu typach komórek embrjonalnych, co wskazuje, że czynnik ten może zastępować EGF w życiu płodowym [14–17]. Czynnik wzrostu określanym skrótem VVGF jest peptydem kodowanym przez DNA wirusa ospy krowiej, którego rola w replikacji wirusowej czy efektach wywieranych w komórkach zakażonych jest nieznana [18]. Zastanawiające jest jednak, że jego powinowactwo do receptora mEGF jest większe niż naturalnego liganda, mimo że VVGF ma w porównaniu z EGF dodatkowo 18 aminokwasów od N-końca i 9 od C-końca.

Szczegóły biosyntezy EGF nie są jeszcze poznane. Poszczególne zdarzenia mogą być obecnie przewidywane na podstawie znajomości sekwencji mRNA kodującego prekursorowy EGF. Dojrzały EGF powstaje z dużej cząsteczki prekursorowej, zbudowanej z 1217 aminokwasów [19]. Reszty 7–19 stanowią hydrofobową sekwencję sygnałową. Przypuszcza się, że prekursor EGF może być białkiem transmembranowym, zakotwiczonym w błonie sekwencją 1039–1059, w którym część zewnątrzkomórkowa zawiera m.in. sekwencję EGF. Dojrzały EGF jest prawdopodobnie wycinany z prekursora działaniem esteropeptydazy argininowej, z którą jak wiadomo tworzy *in vivo* wysokocząsteczkowy kompleks 74 kDa w gruczole śliniankowym. Prekursor EGF zawiera dodatkowo 9 sekwencji homologicznych do EGF, ale żadna z nich nie jest zakończona Arg lub Lys, co wyklucza równoczesne uwalnianie form EGF-podobnych działaniem omawianej wcześniej esteropeptydazy [20]. Pytanie, czy prekursor EGF podobnie jak np. proopiokortyna zawiera inne peptydy o znaczeniu fizjologicznym, pozostaje narazie bez odpowiedzi.

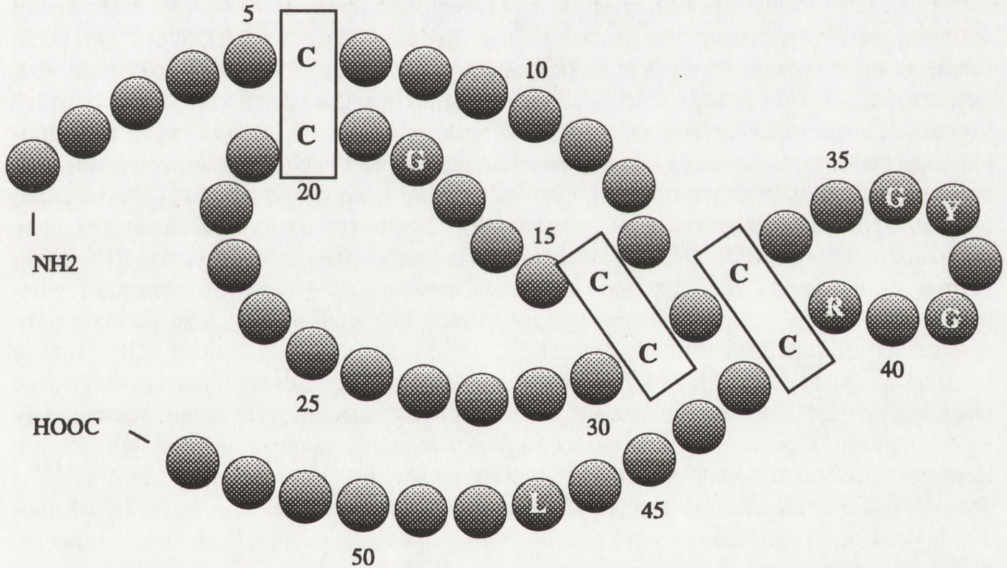
a

	1	5	10-	15	20	25
mEGF	N	S Y P G C P S	S Y D G Y C L N G G V C M H I E S			
hEGF	N	S D S E C P L	S H D G Y C L H D G V C M Y I E A			
rTGF	V V S	H F N K C P D S	H T Q Y C F H	- G T C R F L V Q		
hTGF	V V S	H F N D C P D S	H T Q F C F H	- G T C R F L V Q		
VGF	P	A I R L C G P E G D G Y C L H	- G D C I H A R D			

	30	35	40	45	50
mEGF	L D S Y T C N C V I G Y S G D R C Q T R D L R W W E L R				
hEGF	L D K Y A C N C V V G Y I G E R C Q Y R D L K W W E L F				
rTGF	E E K P A C V C H S G Y V G V R C E H A D L L A				
hTGF	E D K P A C V C H S G Y V G A R C E H A D L L A				
VGF	I D G M Y C R C S H G Y T G I R C Q H V V L V D Y Q R S				

b



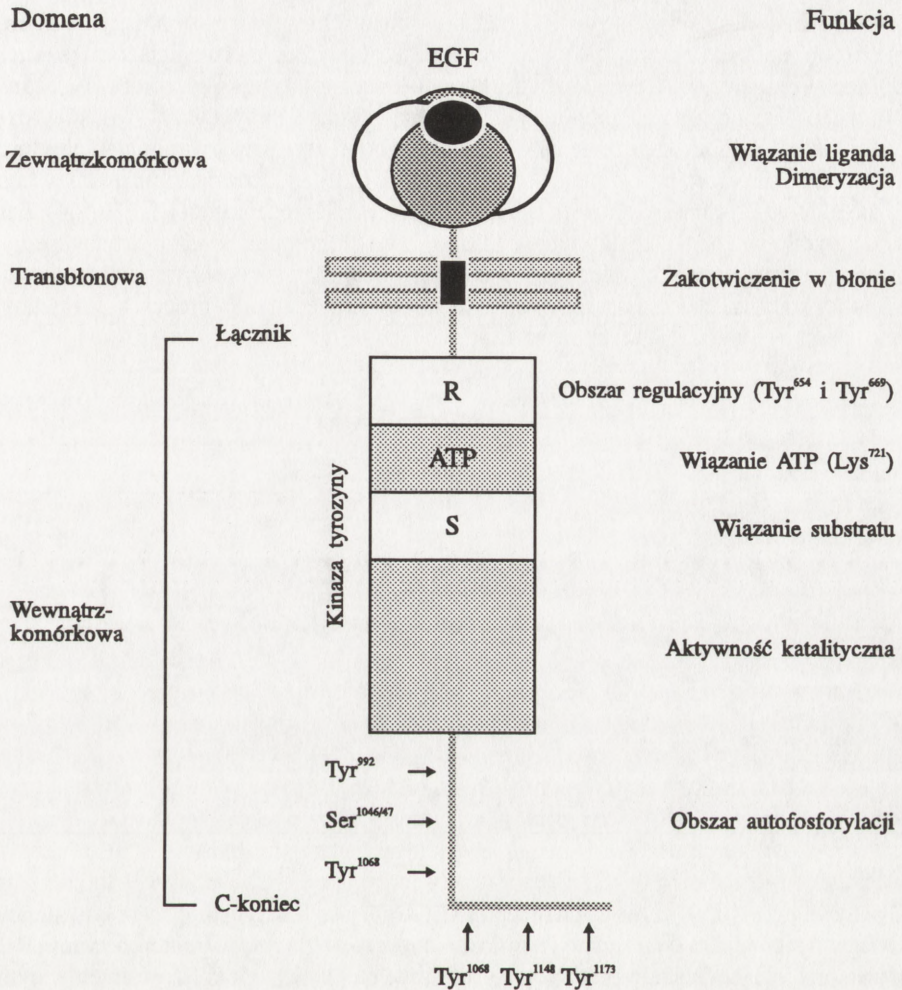
Rys. 8. Strukturalne podobieństwo czynników wzrostowych zaliczanych do rodziny EGF/TGF- $\alpha$  (wg [12] za zgodą autora); wyróżniono konserwatywne ewolucyjnie aminokwasy oraz usytuowanie mostków dwusiarczkowych warunkujących podobną strukturę przestrzenną wszystkich peptydów EGF-podobnych

## RECEPTOR EGF

Obecność receptora EGF wykazano praktycznie u wszystkich gatunków ssaków i w błonach bardzo wielu różnych rodzajów komórek. Jednym z niewielu typów komórek, w których nie stwierdzono obecności receptorów EGF są komórki hemopoetyczne. Przełomowym momentem w badaniach R-EGF było odkrycie, że linia komórkowa A-431 wyprowadzona z ludzkiego raka skóry ma niespotykaną ilość cząsteczek receptora EGF =  $2.5 \times 10^6$ /komórkę, to jest 20–100-krotnie więcej niż inne typy komórek [21,22]. Pozwoliło to na izolację, oczyszczenie i charakterystykę tego białka. Wiadomo dziś, że R-EGF (niezależnie od źródła izolowania) jest jednołańcuchowym białkiem o m.cz. 170 kDa [23]. Receptor ten jest zglikozylowany w części zewnątrzkomórkowej i ufosforylowany w części cytoplazmatycznej. Glikozylacja zabezpiecza go przed niepożądaną degradacją enzymatyczną (odporny na działanie trypsyny, papainy i chymotrypsyny) – co jest szczególnie istotne w przypadku komórek przewodu pokarmowego. Fosforylacja, podobnie jak w przypadku receptorów innych czynników wzrostowych ma znaczenie regulacyjne. Efektorowa część R-EGF wykazuje podobnie jak R-PDGF, R-IGF I aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej, stymulowanej przyłączeniem liganda [24]. Budowę R-EGF przedstawiono schematycznie na rysunku 9. N-końcowa część zewnątrzkomórkowa (621 reszt aminokwasowych) zawiera domenę wiążącą ligand. Sekwencja aminokwasów 622–644 reprezentuje pojedynczy, hydrofobowy region transmembranowy, a sekwencja 645–1186 część efektorową zawierającą domenę kinazową (reszty 694–937).

Przyłączenie EGF do części akceptorowej receptora inicjuje w jego części efektorowej aktywację tyrozyno-swoistej kinazy fosforylującej różne substraty komórkowe, w tym także sam receptor. W nienaruszonych komórkach autofosforylacja zachodzi na tyrozynach: 992, 1068, 1086, 1148, 1173 [25]. Bertics i Gill [26] sugerowali, że proces ten "odblokowuje" aktywność kinazową receptora i umożliwia fosforylację substratów komórkowych. Stymulowana przyłączeniem liganda autofosforylacja receptora jest cechą charakterystyczną tych receptorów czynników wzrostowych, które mają aktywność kinazy tyrozynowej. Stąd szeroko zakrojone badania mechanizmu i roli procesu autofosforylacji, szczególnie zaawansowane w przypadku receptora EGF. Metodą, która przyniosła najlepsze rezultaty w tej dziedzinie, okazała się transfekcja zmodyfikowanego (mutacje punktowe, częściowa degradacja enzymatyczna, konstrukcja receptorów chimericznych) receptora EGF do komórek nie mających tego receptora (najczęściej do komórek NIH 3T3). Wykazano, że receptory EGF, które w miejsce tyrozyn 1068, 1148 lub 1173 zawierały fenyloalaninę, miały ograniczoną aktywność kinazową [27,28]. Komórki transfekowane tak zmodyfikowanymi receptorami odpowiadały na działanie EGF podobnie jak komórki transfekowane receptorem prawidłowym [29,30]. Receptor EGF pozbawiony 63 aminokwasów od C-końca (obszar obejmujący Tyr<sup>1148</sup> i Tyr<sup>1173</sup>) był nierozróżnialny od receptora prawidłowego w stymulacji: obrotu fosfatydyloinozyloli, otwierania bądź zamykania kanałów jonowych i syntezy DNA [31]. Dane te sugerowały, że autofosforylacja R-EGF nie jest procesem koniecznym do przeniesienia sygnału mitogennego stymulowanego EGF. Rzeczywista rola autofosforylacji jest dyskusyjna, aczkolwiek proces ten jest konieczny dla asocjacji receptora z określonymi substratami komórkowymi (patrz rozdział VIII), np. fosforylacja tyrozyn: 992, 1068 i 1173 jest odpowiedzialna za asocjację R-EGF z fosfolipazą C- $\gamma$  [25]. Niejasny jest również mechanizm tego procesu, chociaż badania z użyciem mieszaniny receptorów prawidłowych i pozbawionych aktywności kinazowej (mutacja punktowa Lys<sup>721</sup> – Ala) wskazują, że autofosforylacja zachodzi w drodze

krzyżowej fosforylacji dwóch cząsteczek receptora, będącej wynikiem stymulowanej ligandem dimeryzacji receptora EGF [32].



Rys. 9. Schemat budowy receptora EGF z uwzględnieniem obszarów odpowiedzialnych za określoną funkcję biologiczną

Model allosterycznej oligomeryzacji R-EGF został zaproponowany przez Schlessingera i wsp. [33-35] w celu wyjaśnienia mechanizmu aktywacji kinazy tyrozynowej przyłączeniem EGF do zewnątrzkomórkowej części receptora. Zgodnie z tym modelem, monomeryczne receptory EGF są w stanie równowagi dynamicznej z receptorami dimerycznymi. Forma dimeryczna ma większe powinowactwo do liganda, a związanie liganda stabilizuje stan dimeryzacji. Prowadzi to do aktywacji katalitycznych właściwości domeny kinazowej poprzez bezpośrednią interakcję cytoplazmatycznych części dimeru. Wiele danych wskazuje, że mechanizm dimeryzacji zależy zarówno od struktury liganda, jak i receptora [25]. W przypad-

ku R-EGF przyjmuje się, że związanie liganda inicjuje zmiany konformacyjne w zewnętrzno-komórkowej części receptora, które stabilizują wiązanie dwóch kompleksów ligand-receptor [36].

Szczególnie interesujące są wyniki badań aktywności receptorowej mutantów R-EGF z upośledzoną funkcją efektorową. Wykazano, że Lys<sup>721</sup> usytuowana w miejscu wiązania ATP do domeny kinazowej jest niezbędna dla aktywności enzymatycznej receptora [37]. Mutacja punktowa, polegająca na zastąpieniu Lys<sup>721</sup> alaniną hamuje całkowicie aktywność tyrozynoswoistej kinazy R-EGF. Znaczenie modulacji aktywności kinazowej w regulacji efektorowej funkcji R-EGF ilustruje porównanie stymulowanych EGF efektów biologicznych w komórkach transfekowanych prawidłowym (A) i zmutowanym (B) receptorem EGF (tab. 4). Zamieszczone wyniki wskazują, że aktywność kinazowa jest niezbędna w reakcjach związanych z transdukcją sygnału indukowanego przyłączeniem liganda, a w konsekwencji w odpowiedzi mitogennej komórki. Natomiast aktywność ta nie jest konieczna dla procesów związanych z internalizacją i recykliczacją receptorów EGF.

TABELA 4. Odpowiedź komórek NIH 3T3 transfekowanych prawidłowym (A) i zmutowanym (B) receptorem EGF na działanie EGF [wg 30]

Odpowiedź komórkowa	A	B
Aktywność swoistej kinazy tyrozynowej	+	-
Ekspresja receptorów na pow. komórki	+	+
Transmodulacja receptora przez TPA	+	+
Internalizacja liganda	+	+
Degradacja liganda	+	+
Efekt "down regulation"	+	-
Degradacja receptora	+	-
Stymulacja antyportu Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	+	-
Napływ jonów Ca <sup>2+</sup>	+	-
Hydroliza fosfatydyloinozytoli	+	-
Fosforylacja białka S6	+	-
Ekspresja genów c-fos i c-myc	+	-
Synteza DNA i proliferacja komórek	+	-

Fosforylacja reszt tyrozynowych receptora EGF nie jest jedynym miejscem kowalencyjnej modyfikacji tego białka. Wiele danych wskazywało, że istotną rolę w funkcjonowaniu R-EGF odgrywa fosforylacja reszt treoninowych i serynowych [30,38], zlokalizowanych w cytoplazmatycznej części receptora. Rolę krytyczną w regulacji aktywności R-EGF przypisuje się resztom treoniny (Thr<sup>654</sup> i Thr<sup>669</sup>) oraz seryny (Ser<sup>1046</sup> i Ser<sup>1047</sup>). Fosforylacja Thr<sup>654</sup> receptora EGF powoduje obniżenie aktywności kinazowej receptora [39–43]. Fosforylacja Thr<sup>654</sup> katalizowana kinazą białkową C jest przypuszczalnie odpowiedzialna za regulowane ligandami homologicznymi (agoniści EGF) obniżenie aktywności receptorowej poprzez ujemne sprzężenie zwrotne. Natomiast, fosforylacja Thr<sup>669</sup> katalizowana enzymami MAP2 (ang.– *microtubule-associated protein 2*) oraz ERT (ang.– *EGF receptor Thr<sup>669</sup> protein kinase*) reguluje procesy internalizacji receptora i podniesienia jego aktywności kinazowej [38,44–46]. Ponieważ PDGF, insulina, bombesyna i PMA stymulują fosforylację Thr<sup>669</sup> nie można wykluczyć udziału kowalencyjnej modyfikacji tego aminokwasu w procesie transmodulacji receptora EGF działaniem ligandów heterologicznych [45]. Kluczowe w procesie

regulacji aktywności receptorowej miejsca fosforylacji efektorowej części R-EGF zaznaczono na rysunku 9.

### ROLA R-EGF W PROCESIE TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ

Szczególnie interesującą koncepcję udziału R-EGF w procesach onkogenezy nasunęło porównanie struktury tego białka ze strukturą produktu białkowego onkogenu *erb B* wirusa erytroblastomy ptasiej (AEV) – gp74<sup>erb B</sup>. Okazało się, że białko to, odpowiedzialne za jego aktywność tumorogenną (białaczki, włóknakiomięśaki), jest bardzo podobne do okrojonego o część akceptorową receptora EGF (95% homologii sekwencji aminokwasowej) [47,48]. Wydawało się prawdopodobne [49–51], że brak odcinka regulującego aktywność powodować może stałą, niezależną od wiązania liganda aktywację części efektorowej (ciągła aktywacja kinazy tyrozynowej). Szybko jednak wykazano, że chimeryczna cząsteczka zbudowana z efektorowej i transbłonowej części R-EGF oraz cytoplazmatycznej części produktu genu *v-erb B* nadal miała aktywność transformującą [52]. Sugerowano także, że czynnikiem warunkującym stałą aktywność białka wirusowego jest brak w porównaniu z R-EGF 34 aminokwasów C-końcowych [49–51]. Szereg różnych danych wskazywało, że odcinek C-końcowy białka prawidłowego może pełnić istotną rolę w negatywnej regulacji funkcji kinazowej [53]. Po pierwsze, onkogeny wirusowe *v-src*, *v-fms* i *v-erb B*, kodujące białka o aktywności kinaz tyrozynowych nie zawierają sekwencji kodujących odcinki C-końcowe ich komórkowych odpowiedników, obejmujących także C- terminalne reszty tyrozynowe. Po drugie wykazano, że odcinki C-końcowe produktów protoonkogenów *c-src* i *c-fms* uczestniczą w negatywnej regulacji ich funkcji kinazowej. Badania aktywności biologicznej zarówno zmutowanych (Tyr - Phe) w części C-końcowej receptorów R-EGF wykazały, że modyfikacja ta nie ma znaczenia w negatywnej regulacji funkcji kinazowej R-EGF [54], w przeciwieństwie do mutacji Ser<sup>1045/47</sup> - Ala<sup>1046/47</sup> [43]. Wydaje się prawdopodobne, że utrata tych reszt serynowych jest odpowiedzialna za potencjał onkogenny produktu genu *erbB* [55]. Są dane wskazujące, że biologiczne konsekwencje delecji C-końcowego odcinka R-EGF mogą zależeć od obecności bądź nieobecności części N-terminalnej receptora [56–58]. Brak odcinka C-końcowego obniża aktywność biologiczną receptora, jeśli receptor zawiera część akceptorową, natomiast podwyższa jego aktywność przy braku części N-końcowej.

Istotną rolę w procesie onkogenezy wiąże się z podwyższoną ekspresją genu receptora EGF, ponieważ amplifikację tego genu powiązaną z jego hiperekspresją wykazano doświadczalnie w wielu typach ludzkich nowotworów, głównie w glejakach i rakach naskórka [59–61]. Wykazano również, że EGF jest zdolny do transformacji in vitro transfekowanych komórek NIH 3T3 z hiperekspresją genu R-EGF [62,63]. R-EGF może odgrywać istotną rolę w procesach transformacji nowotworowej także dlatego, że różne nowotwory zwierzęce i ludzkie, mające podwyższony poziom R-EGF produkują TGF- $\alpha$  lub EGF i mogą na nie odpowiadać w drodze autokrynej [53].

### PRAWDOPODOBNA ROLA FIZJOLOGICZNA EGF

Mimo wielu informacji uzyskanych dotychczas w doświadczeniach in vitro rola fizjologiczna EGF nie jest ustalona. Wydaje się prawdopodobne, że EGF może pełnić odmienną funkcję w zależności od stadium rozwoju organizmu. Wstrzyknięty płodom zwierzęcym przyspiesza szereg procesów rozwojowych, takich jak: formowanie podniebienia, wyrznięcie się siekaczy, otwieranie oczu i dojrzewanie płuc [9,64,65]. Stymuluje wzrost wielu tkanek



plodowych włącznie ze śluzówką jelitowo-żołądkową [66,67] i jest obecny w wysokim stężeniu w mleku karmiących matek [68,69]. Moduluje aktywność disacharydaz śluzówki jelita małego i amylazy trzustkowej [70, 71]. Dane te sugerują udział EGF w różnicowaniu komórek przewodu pokarmowego u noworodków i w ontogenezie egzokrynnej funkcji trzustki i jelita małego [67]. Z drugiej strony wiadomo, że u organizmów dorosłych EGF wydzielany jest przez śliniankę i trzustkę do przewodu pokarmowego, gdzie reguluje wydzielanie kwasu żołądkowego [72]. W doświadczeniach in vitro i in vivo wykazano także jego pozytywny wpływ na proces gojenia ran [73,74]. Wszechobecność receptora EGF w organizmach ssaków wskazuje, że fizjologiczny efekt działania EGF może zależeć przede wszystkim od rodzaju tkanki docelowej.

### PIŚMIENNICTWO

- [1] TAYLOR JM, COHEN S, MITCHELL WM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; **67**: 164–171.
- [2] SEVER AC, SHOOTER EM. *J Biol Chem* 1976; **251**: 165–173.
- [3] BYYNY RL, ORTH DN, COHEN S, DOYNE ES. *Endocrinology* 1974; **95**: 776–782.
- [4] OKA T, ORTH DN. *J Clin Invest* 1983; **72**: 249–259.
- [5] BOWEN-POPE DF, ROSS R. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **114**: 1036–1041.
- [6] BYYNY RL, ORTH DN, COHEN S. *Endocrinology* 1972; **90**: 1261–1266.
- [7] FRATIL, CENCI G, SBARAGLIA G, TETI DV, COVELLI I. *Life Sci* 1976; **18**: 905–912.
- [8] RALL LB, SCOTT J, BELL GI, CRAWFORD R.J, PENSCHOW JD, NIALL HD. *Nature* 1985; **313**: 228–231.
- [9] CARPENTER G, COHEN S. *Ann Rev Biochem* 1979; **48**: 193–216.
- [10] SAVAGE CR, INAGAMI T, COHEN S. *J Biol Chem* 1972; **247**: 7612–7621.
- [11] COHEN S, CARPENTER G. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 1317–1321.
- [12] YASUI W, JI ZQ, KUNIIYASU H, AYHAN A, YOKOZAKI H, ITO H, TAHARA E. *Virchows Arch* 1992; **421**: 513–519.
- [13] COFFEY RJ. *Nature* 1987; **328**: 817–820.
- [14] TWARDZIK DR, RANCHALIS JE, TODARO GJ. *Cancer Res* 1982; **42**: 590–593.
- [15] PROPER JA, BJORNSON CL, MOSES HL. *J Cell Physiol* 1982; **110**: 169–174.
- [16] MATRISIAN LM, PATHAK M, MAGUN BE. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **107**: 761–766.
- [17] TWARDZIK DR. *Cancer Res* 1985; **45**: 5413–5416.
- [18] STROOBANT P, RICE AP, GULLICK WJ, CHENG DJ, KERR IM, WATERFIELD MD. *Cell* 1985; **42**: 383–393.
- [19] SCOTT J, URDEA M, QUIROGA M, SANCHEZ-PESCADOR R, FONG N, SELBY M, RUTTER WJ, BELL GI. *Science* 1989; **221**: 236–240.
- [20] BELL GI, FONG NM, STEMPIEN MM, WORMSTED MA, CAPUT D, KU L, URDEA MS, RALL LB, SNACHEZ-PESCADOR R. *Nucleic Acid Res* 1986; **14**: 8427–8446.
- [21] HAIGLER HT, ASH JF, SINGER SJ, COHEN S. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 3317–3321.
- [22] STOSCHECK CM, CARPENTER GJ. *J Cell Physiol* 1984; **120**: 296–302.
- [23] USHIRO H, COHEN S. *J Biol Chem* 1980; **255**: 8363–8365.
- [24] HUNTER T, COOPER JA. *Ann Rev Biochem* 1985; **54**: 897–930.
- [25] SCHLESSINGER J, ULLRICH A. *Neuron* 1992; **9**: 383–391.
- [26] BERTICS PJ, GILL GN. *J Biol Chem* 1985; **260**: 14642–14647.
- [27] HONEGGER AM, DULL TJ, BELLOT F, VAN-OBBERGHENE E, SZAPARY D, SCHMIDT A, ULLRICH A, SCHLESSINGER J. *EMBO J* 1988; **7**: 3045–3052.
- [28] HONEGGER AM, DULL TJ, SZAPARY D, KOMORIYA A, KRIS R, ULLRICH A, SCHLESSINGER J. *EMBO J* 1988; **7**: 3053–3060.
- [29] MOOLENAAR WH, BIERMAN AJ, TILLY BC, VERLAAN I, HONEGGER AM, ULLRICH A, SCHLESSINGER J. *EMBO J* 1988; **7**: 707–710.
- [30] SCHLESSINGER J. *Biochemistry* 1988; **27**: 3119–3123.
- [31] SCHLESSINGER J. *J Cell Biol* 1986; **103**: 2067–2072.
- [32] HONEGGER AM, KRIS R, ULLRICH A, SCHLESSINGER J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **86**: 925–929.
- [33] YARDEN Y, SCHLESSINGER J. *Biochemistry* 1987; **26**: 1434–1442.
- [34] YARDEN Y, SCHLESSINGER J. *Biochemistry* 1987; **26**: 1443–1451.
- [35] SCHLESSINGER J. *Trends in Biochem Sci* 1988; **13**: 443–447.

- [36] LAX I, MITRA AK, RAVERA C, HURWITZ DR, RUBINSTEIN M, ULLRICH A, STROUND RM, SCHLESSINGER J. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13828–13833.
- [37] HONEGGER AM, SZAPARY D, SCHMIDT A, LYALL R, VAN-OBBERGHEN E, DULL TJ, ULLRICH A, SCHLESSINGER J. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 4568–4571.
- [38] COUNTAWAY JL, MCQUILKIN P, GIRONES N, DAVIS RJ. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4307–3416.
- [39] DEEKER SJ, ELLIS C, PAWSON T, VELU T. *J Biol Chem* 1990; **265**: 7009–7015.
- [40] LUND KA, LAZAR CS, CHEN WS, WALSH BJ, WELSH JB, HERBST JJ, WALTON GH, ROSENFELD MG, GILL GN, WILEY H S. *J Biol Chem* 1990; **265**: 20517–29523.
- [41] BOWEN S, STANLEY K, SELVA E, DAVIS RJ. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1162–1169.
- [42] COUNTAWAY JL, NAIRN AC, DAVIS RJ. *J Biol Chem* 1992; **267**: 1129–1140.
- [43] THEROUX SJ, LATOUR DA, STANLEY K, RADEN DL, DAVIS RJ. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16620–16626.
- [44] HEISERMANN GJ, GILL GN. *J Biol Chem* 1988. **263**: 13152–13158.
- [45] CONTAWAY JL, NORTHWOOD IC, DAVIS RJ. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10828–10835.
- [46] NORTHWOOD IC, GONZALEZ FA, WARTMANN M, RADEN DL, DAVIS RJ. *J Biol Chem* 1991; **266**: 15266–15276.
- [47] DOWNWARD J, PARKER P, WATERFIELD MD. *Nature* 1984; **311**: 483–485.
- [48] DOWNWARD J, YARDEN Y, MAYES E, SCRACE G, TOTTY N, STOCKWELL P, ULLRICH A, SCHLESSINGER J, WATERFIELD MD. *Nature* 1984; **307**: 521–527.
- [49] LAX I, KRIS R, SASSON L, ULLRICH A, HAYMAN MJ, BEUG H, SCHLESSINGER J. *EMBO J* 1985; **4**: 3179–3182.
- [50] ULLRICH A, COUSSINS L, HAYFLICK JS, DULL TJ, GRAY A i wsp. *Nature* 1984; **309**: 418–425.
- [51] KRIS RM, LAX I, GULLICK W, WATERFIELD MD, ULLRICH A, FRIDKIN M, SCHLESSINGER J. *Cell* 1985; **40**: 619–625.
- [52] RIEDEL H, SCHLESSINGER J, ULLRICH A. *Science* 1987; **236**: 197–200.
- [53] VELU TJ, MARTIN P, VASS WC, HELIN K, RITZHAUPT A, BEGUINOT L, SCHILLER JT, LOWY DR. *Hormones and cell regulation* 1989; **198**: 65–70.
- [54] VELU TJ, BEGUINOT L, VASS WC, ZHANG K, PASTAN I, LOWY DR. *Science* 1987; **238**: 1408–1410.
- [55] THEROUX SJ, TAGLIANTI-SIAN C, NAIR N, COUNTAWAY JL, ROBINSON H, DAVIS RJ. *J Biol Chem* 1992; **267**: 7967–7970.
- [56] KHAZALE K, DULL TJ, GRAF T, SCHLESSINGER J, ULLRICH A, BEUG H, VENNSTRM B. *EMBO J* 1988; **7**: 3061–3071.
- [57] WELLS A, BISHOP JM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7597–7601.
- [58] HALEY JD, HSUAN JJ, WATERFIELD MD. *Oncogene* 1989; **4**: 273–283.
- [59] HENDLER FJ, OZANNE BW. *J Clin Invest* 1984; **74**: 647–651.
- [60] LIBERMANN TA, RAZON N, BARTAL AD, YARDEN Y, SCHLESSINGER J, SOREQ M. *Cancer Res* 1984; **44**: 735–760.
- [61] YAMAMOTO T, KAMATA N, KAWANO H i wsp. *Cancer Res* 1986; **46**: 414–416.
- [62] DIFLORE PP, PIERCE JH, FLEMING TP, HAZAN R, ULLRICH A, KING CR, SCHLESSINGER J, AARONSON SA. *Cell* 1987; **51**: 1063–1070.
- [63] RIEDEL H, MASSOGLIA S, SCHLESSINGER J, ULLRICH A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1477–1481.
- [64] SUNDELL HW, GRAY ME, SERENIUS FS, ESCOBEDO MB, STAHLMAN MT. *Am J Pathol* 1980; **100**: 707–726.
- [65] CATTERTON WZ, ESCOBEDO MB, SEXSON WR, GRAY ME, SUNDELL HW, STAHLMAN MT. *Pediatr Res* 1979; **13**: 104–108.
- [66] BEAULIEU J, CALVERT T, MENARD D. *Experientia* 1982; **38**: 1096–1097.
- [67] O'LOUGHLIN EV, CHUNG M, HOLLENBERG M, HAYDEN J, ZAHAVI I, GALL DG. *Am J Physiol* 1985; **249**: G674–G678.
- [68] BEARDMORE J, RICHARDS RC. *J Endocrinol* 1983; **96**: 287–292.
- [69] CARPENTER G. *Science* 1980; **210**: 198–199.
- [70] LOGSDON G, WILLIAMS J. *Gastroenterology* 1983; **85**: 339–345.
- [71] DEMBINSKI A, GREGORY M, KONTUREK SJ, POLANSKI M. *J Physiol Lond* 1983; **325**: 35–42.
- [72] KONTUREK SJ, CIESZKOWSKI M, JAWOREK J, KONTUREK J, BRZOZOWSKI T, GREGORY H. *Am J Physiol* 1984; **246**: G580–G586.
- [73] LAATO M, NINIKOSKI J, GERDIN B, LEBEL L. *Ann Surg* 1986; **203**: 379–381.
- [74] FRANKLIN TJ, GREGORY H, MORRIS WP. *J Lab Clin Med* 1986; **108**: 103–108.

### 3. INSULINO-PODOBNE CZYNNIKI WZROSTOWE (IGFs)

Trzy odmienne drogi poszukiwań i trzy różne obserwacje doprowadziły do odkrycia polipeptydów określanych dziś nazwą insulino-podobne czynniki wzrostowe (IGFs). W roku 1957 Salmon, Daughaday [1] i wsp. wykazali, że prawidłowa surowica ludzka stymuluje wbudowywanie  $^{35}\text{S}$  w tkankę chrzęstną *in vitro*. Autorzy zaproponowali, aby czynnik surowiczy odpowiedzialny za sulfonowanie proteoglikanów tkanki chrzęstnej nazwać "czynnikiem sulfatacyjnym". Dalsze doświadczenia wykazały, że czynnik ten ma znacznie szerszy zakres aktywności biologicznej i m.in. stymuluje syntezę: DNA, RNA i białek w hodowlach tkankowych [2]. Ponadto stwierdzono, że surowica zwierząt z usuniętą przysadką mózgową nie ma zdolności sulfatacyjnej, co sugerowało, że czynnik sulfatacyjny jest powiązany z działaniem hormonów przysadki. Głównym "podejrzany" został hormon wzrostu, który sam nie ma właściwości sulfatacyjnych, ale podany dożylnie szczurom pozbawionym przysadki przywracał częściowo sulfatację tkanki chrzęstnej. Na tej podstawie Daughaday postawił hipotezę, że GH nie stymuluje samodzielnie procesów wzrostu *in vivo*, lecz indukuje syntezę związków, które pośredniczą w jego działaniu. Aby podkreślić szeroki zakres aktywności biologicznej czynnika sulfatacyjnego i jego pośrednictwo w działaniu GH, nazwał go somatomedyną [3]. W wyniku dalszych badań wykazano obecność trzech różnych somatomedyn: A, B i C [4,5]. Niezależnie od prac Daughadaya, Froesch i wsp. [6] wykazali, że surowica wywiera podobny do insuliny wpływ na adipocyty i komórki mięśniowe i że wywierany efekt jest znacznie większy, niż należałoby oczekiwać na podstawie poziomu insuliny w surowicy. Co więcej okazało się, że stwierdzona aktywność surowicy nie była całkowicie hamowana przez przeciwciała dla insuliny. Na tej właśnie podstawie badana frakcja związków nazwana została frakcją NSILA (ang. – *non-suppressible insulin activity*). W latach 1976–1978 z frakcji tej wyizolowano i scharakteryzowano strukturalnie dwa bardzo podobne polipeptydy o m.cz. 7500 [7–9]. Ze względu na podobieństwo strukturalne i zdolność do naśladowania niektórych efektów biologicznych insuliny (stymulacja utleniania glukozy i lipogenezy, hamowanie lipolizy) nazwano je insulino-podobnymi czynnikami wzrostu: IGF I i IGF II [7–9]. Piętnaście lat po pierwszych doświadczeniach Daughadaya, Temin i wsp. [10] wyosobnili z surowicy cielęcej frakcję związków stymulującą namnażanie wielu rodzajów komórek *in vitro*, którą nazwali MSA (ang. – *multiplication-stimulating activity*). Frakcja ta syntetyzowana także *in vitro* przez ustaloną linię komórek wątroby szczurzej BRL-3A [11] stymulowała szereg procesów anabolicznych (synteza DNA, RNA, proteoglikanów) i miała aktywność insulino-podobną. Pod koniec lat siedemdziesiątych somatomedyny, IGF I i IGF II oraz MSA zaliczono do insulino-podobnych czynników wzrostowych.

Dlaczego ponad 20 lat potrzebne było do rozwiązania zagadki IGFs? Zawinił nie tyle poziom tych czynników we krwi, ile metody stosowane do ich izolacji i kompleksowanie badanych czynników przez swoiste białka nośnikowe. Rinderknecht i Humbel potrzebowali aż 3 ton białek surowicy ludzkiej dla uzyskania czystych preparatów IGF I i IGF II w ilości wystarczającej do analizy sekwencji aminokwasowej [8,9]. Trudno nawet dziś autorytatywnie rozstrzygnąć liczebność rodziny IGFs. Wiadomo, że IGF I i IGF II stanowią ponad 90% insulino-podobnej aktywności surowicy, a poznanie sekwencji aminokwasowej somatomedyn i MSA pozwoliło ustalić, że:

- somatomedyna C jest strukturalnie identyczna z IGF I [12],
- somatomedyna A to dezamidowana forma IGF I [13],



ków wszystkie peptydy IGF I zbudowane są z 70 aminokwasów, a IGF II z 66–67 aminokwasów. Ludzkie IGF I i IGF II różnią się od bydłych (0 i 3), świńskich (0 i ?), owczych (1 i 4), szczurzych (3 i 5) oraz mysich (4 i 6) resztami aminokwasowymi [18]. Konserwatywna ewolucyjnie struktura IGFs sugeruje, że geny tych peptydów powstały z jednego prągu w okresie pojawienia się na Ziemi ssaków, ok. 300 milionów lat temu.

Różnice strukturalne pomiędzy IGFs a insuliną, dotyczące zwłaszcza łańcucha C, wskazują na odmienny sposób obróbki potranslacyjnej insuliny i IGFs. W rzeczywistości zarówno dojrzewanie, jak i sekrecja insuliny i IGFs przebiegają w sposób odmienny. Synteza insuliny zachodzi w komórkach B trzustki w drodze wycięcia peptydu C z cząsteczki proinsuliny i utworzeniu cząsteczki dwułańcuchowej. Zarówno natywna insulina, jak i peptyd C zlokalizowane są w granulach wydzielniczych i wydzielane do krwi przez aktywny mechanizm endocytarny. IGFs są syntetyzowane przede wszystkim w komórkach wątroby, ale odmiennie od insuliny w wyniku obróbki potranslacyjnej zachowany zostaje łańcuch C. Wykazano także, że sekrecja IGFs jest procesem ciągłym (podobnie jak albuminy), a wbudowywanie <sup>35</sup>S-cysteiny w wydzielane IGFs osiąga wartość stałą po 1 godzinie od dodania znakowanego aminokwasu [19]. Te różnice w sposobie sekrecji IGFs i insuliny mają określone konsekwencje zarówno w sposobie ich transportu do tkanek docelowych, jak i w odmiennej funkcji fizjologicznej tych tak podobnych strukturalnie peptydów (tab. 5).

TABELA 5. Ważniejsze różnice pomiędzy IGFs a insuliną

	Insulina	IGFs
Miejsce syntezy	trzustka	wątroba
Struktura peptydu	2-łańcuchowy	1-łańcuchowy
Okres półtrwania	10 min	16 godzin
Białka nośnikowe	brak	3 rodzaje
Poziom w osoczu krwi	0,5–5,0 ng/ml	200–600 ng/ml
Receptory	swoisty dla insuliny	swoiste dla IGFs

### BIAŁKA WIĄŻĄCE INSULINO-PODOBNE CZYNNIKI WZROSTU

Jedną z cech odróżniających IGFs od insuliny jest występowanie swoistych białek nośnikowych (IGFBP) dla tych czynników wzrostowych. Obecność IGFBP dla IGFs została opisana po raz pierwszy przez Hintza i Liu [20] w roku 1977. Początkowo sądzono, że białka te pełnią jedynie funkcję transportową i ochronną, tj. umożliwiają dotarcie aktywnych biologicznie czynników do komórek docelowych. Podstawą tej hipotezy było założenie, że jedynym miejscem ich syntezy jest wątroba i taki sposób transportu wydawał się nieodzowny. Obecnie, kiedy wiadomo, że zarówno IGFs, jak i ich białka nośnikowe syntetyzowane są przez wiele różnych tkanek, przyjmuje się, że podstawową rolą białek nośnikowych jest lokalna modulacja działania IGFs. Tylko takie założenie może wyjaśnić, dlaczego IGFs obecne w surowicy w stężeniu 1000 razy większym od insuliny i mające 5% aktywności insulino-podobnej nie wywołują symptomów hyperinsulinemii in vivo.

Z płynów ustrojowych oraz z kondycjonowanych płynów hodowlanych komórek ssaków wyizolowano wiele białek wiążących IGFs różniących się masą cząsteczkową, zdolnością wiązania IGFs oraz zależnością od hormonu wzrostu. Ostatnio sklonowano trzy różne białka nośnikowe i oznaczono je symbolami: IGFBP-1, IGFBP-2 i IGFBP-3 [21]. W celu klasyfikacji opisanych dotychczas białek nośnikowych o nieznannej sekwencji aminokwasowej, poszcze-

gólne białka zaszeregowano do w pełni scharakteryzowanych IGFBP na podstawie wielkości cząsteczki i zdolności do wiązania IGFs (tab. 6).

TABELA 6. Podział białek nośnikowych dla IGFs zgodnie z zaleceniami "International Workshop on IGF Binding Proteins", Vancouver, 17–19 czerwiec, 1989

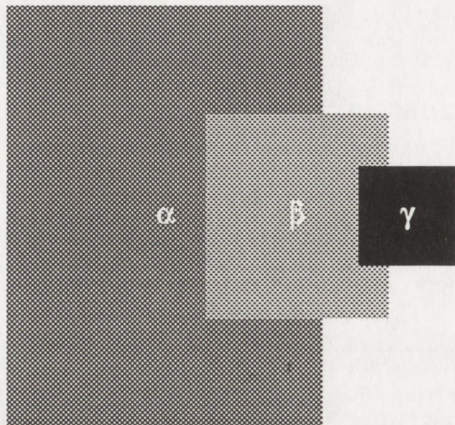
Klasa białek	Masa cząsteczkowa	Dotychczas poznane białka nośnikowe dla IGFs
IGFBP-1	28–35 kDa	białko wiążące z płynu owodniowego [22] łożyskowe białko 12 (PP12) [23] ciążowa $\alpha_1$ globulina ( $\alpha_1$ PEG) [24] białko wiążące 25 (BP-25) [25] białko wiążące 28 (BP-28) [26] białko wiążące IBP-1 [27]
IGFBP-2	31–40 kDa	białko wiążące IBP-2 [28] białko wiążące izolowane z płynu hodowlanego komórek: MDBK [29] BRL-3A [30]
IGFBP-3	47–53 kDa	białko wiążące zależne od GH [31] kwasostabilna podjednostka kompleksu 140 kDa [32] białko wiążące 53 (BP-53) [33]

**IGFBP-1** – Białko to jest glikoproteiną o m. cz. 28–35 kDa, którego część peptydowa (m. cz. 25,3 kDa) zbudowana jest z 234 reszt aminokwasowych [25]. W części C-końcowej zawiera sekwencję -Arg-Gly-Asp- odpowiedzialną przypuszczalnie za jego wiązanie z komórką docelową. IGFBP-1 wiąże oba insulino-podobne czynniki wzrostowe z podobnym powinowactwem. Wykazano, że śluzówka macicy [34], komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka Graafa [35], skrawki wątroby płodowej [36] i komórki wątrobiaka HEP G2 [25] syntetyzują IGFBP-1. Synteza tego białka w śluzówce macicy jest regulowana przez progesteron [34], natomiast w wątrobie przez insulinę [36]. Stężenie IGFBP-1 w krwi zależy od poziomu insuliny [37], wykazuje znaczne wahania dobowe i jest najwyższe we wczesnych godzinach rannych [38]. Poziom tego białka w krwi wzrasta w okresie ciąży do kilkuset mg/l, a jego stężenie w płynie owodniowym jest ok. 1000 razy wyższe niż we krwi [38].

**IGFBP-2** – Białka wiążące należące do grupy IGFBP-2 zostały wyizolowane z ludzkiej wątroby płodowej oraz z płynów hodowlanych ustalonych linii komórek wątroby szczurzej (BRL 3A) i nerki bydłowej (MDBK) [28,29,30]. Sklonowanie odpowiednich cDNA dla szczurzego i ludzkiego IGFBP-2 pozwoliło na określenie ich przewidywanej sekwencji aminokwasowej [39,40]. Wyliczona na tej podstawie wielkość cząsteczki peptydu szczurzego i ludzkiego wynosi odpowiednio 29,5 kDa (270 reszt aminokwasowych) i 31,3 kDa (289 reszt aminokwasowych). IGFBP-2 (podobnie jak IGFBP-1) zawiera sekwencję wiążącą -Arg-Gly-Asp-. Białko to wiąże IGF II ze znacznie większym powinowactwem niż IGF I [29]. Występuje w znacznie wyższym stężeniu w tkankach płodowych, co wskazuje na potencjalną rolę tego białka w ontogenezie [41].

**IGFBP-3** – Większość IGFs obecnych we krwi występuje w postaci dużych kompleksów (125–150 kDa), których poziom zależy od poziomu hormonu wzrostu. IGFBP-3 spełnia w tych kompleksach rolę podjednostki wiążącej IGFs (podjednostka  $\beta$ ) [42]. Jest kwasosta-

bilnym glikopeptydem, który w trakcie rozdzielania na żelu poliakrylamidowym rozdziela się na dwa pasma elektroforetyczne: dominujące (m. cz. 53 kDa) i dodatkowe (m. cz. 47 kDa). Dlatego białko to określane jest często jako białko wiążące BP-53 [42]. Pozostałymi składnikami kompleksów 125–150 kDa są: kwasolabilna podjednostka o m. cz. 84–86 kDa (podjednostka  $\alpha$ ) i jeden z insulino-podobnych czynników wzrostowych (podjednostka  $\gamma$ ). Zakwaszenie środowiska powoduje nieodwracalny rozpad kompleksów do białka BP-53 i wolnych IGFs [32]. Schemat ideowy kompleksu 125–150 kDa przedstawiono na rysunku 11.



Rys. 11. Schemat budowy kompleksu (125–150 kDa) wiążącego insulino-podobne czynniki wzrostowe:  $\alpha$  – kwasolabilna podjednostka  $\alpha$ ,  $\beta$  – białko wiążące IGF-3,  $\gamma$  – IGF I lub IGF II

Sekwencja sklonowanego cDNA dla IGFBP-3 wskazuje, że masa cząsteczkowa nieglikozylowanego białka wynosi 28,7 kDa [43]. IGFBP-3 wykazuje zaledwie 33% homologii sekwencji aminokwasowej z IGFBP-1 oraz nie ma sekwencji -Arg-Gly-Asp- obecnej w IGFBP-1 i IGFBP-2 [43].

Nie wyjaśniono dotąd ani potrzeby istnienia różnych białek nośnikowych, ani mechanizmu regulującego dysocjację kompleksu czynnik wzrostu-nośnik. Ostatnie doniesienia wskazują, że powinowactwo IGFs do IGFBP-1 jest regulowane w drodze fosforylacji lub defosforylacji nośnika (głównie na Ser<sup>101</sup>) [44]. Faktem

bezsprzecznym jest, że krążące kompleksy IGFs-nośnik stanowią swoisty magazyn czynników insulino-podobnych, co ma daleko idące konsekwencje biologiczne:

- długi czas półtrwania, rzędu 4 godzin (szczur) lub 16 godzin (człowiek) dla IGFs związanych z nośnikiem, a tylko 10 min bez nośnika,
- ograniczone wahania dobowe stężenia wolnych IGFs we krwi,
- zapewnienie niezbędnych ilości IGFs, które lokalnie oddysocjowane od nośnika mogą oddziaływać na komórki docelowe.

Wiele opisanych efektów biologicznych IGFBP<sub>s</sub> in vitro, takich jak: hamowanie syntezy proteoglikanów w chondrocytach, hamowanie lipolizy w komórkach tłuszczowych czy hamowanie proliferacji fibroblastów, wskazuje, że białka wiążące mogą pełnić rolę lokalnych regulatorów działania IGFs. Zdecydowana większość wyników wskazuje, że IGFBP-1 i IGFBP-2 hamują działanie IGFs [45–48]. Natomiast wpływ IGFBP-3 zależy od warunków doświadczalnych [49]. Białko to dodane równocześnie z czynnikiem wzrostowym hamuje stymulowaną IGF I proliferację fibroblastów skóry ludzkiej. Wzmaga zaś stymulujący efekt IGF I, jeśli badane komórki były preinkubowane z białkiem nośnikowym. Mimo stale rosnącej liczby danych na temat struktury i aktywności biologicznej białek wiążących IGFs, określenie funkcji biologicznej IGFBP<sub>s</sub> dalekie jest od wyjaśnienia.

### RECEPTORY IGFs

Zarówno insulina, jak i IGFs mają własne receptory błonowe. Receptory insuliny i IGF I wykazują wiele właściwości podobnych. Oba zbudowane są z dwóch różnych podjednostek

$\alpha$  (130 kDa) i  $\beta$  (90 kDa) tworzących aktywne cząsteczki typu ( $\beta$ -S-S- $\alpha$ )-S-S-( $\alpha$ -S-S- $\beta$ ), o m. cz. ok. 400 kDa [50–52]. Podjednostki  $\alpha$  zawierają miejsca wiążące ligand, podjednostki  $\beta$  domenę transbłonową oraz część efektorową mającą aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej [53–55]. Sekwencja aminokwasowa domeny kinazowej IGF I i insuliny wykazuje 84% homologii [56]. Każdy z tych receptorów może wiązać ligand homologiczny, ale z powinowactwem mniejszym od wiązania naturalnego liganda. Receptor dla IGF II różni się całkowicie od receptorów dla insuliny i IGF I. Jest zbudowany z pojedynczego łańcucha o m. cz. 250 kDa, nie wykazuje aktywności kinazowej i nie wiąże insuliny [50,52,57]. Zewnątrzkomórkowa część R-IGF II reprezentuje aż 92% całej cząsteczki, a część cytoplazmatyczna jest relatywnie mała (18 kDa). Przyjmując powinowactwo receptora do jego naturalnego liganda jako równe jeden, zdolność wiązania ligandów homologicznych można w przybliżeniu przedstawić w postaci następujących proporcji:

a. R-IGF I : IGF I > IGF II > insulina = 1 : 1/4 : 1/800,

b. R-IGF II : IGF II > IGF I > insulina = 1 : 1/3 : 0

W 1987 roku [58] wykazano, że ludzki R-IGF II jest bardzo podobny (ponad 80% homologii w sekwencji aminokwasowej) do bydłowego, niezależnego od stężenia kationów receptora mannozo-6-fosforanu (R-Man-6-P). Następnie ustalono, że R-IGF II łączy się z przeciwciałami dla R-Man-6-P oraz że IGF II i Man-6-P wiążą się z tym samym wysokim powinowactwem ( $K_d = 0,2$  nM) z receptorem dla Man-6-P [59–61]. W końcu stwierdzono [62], że receptory dla IGF II i dla Man-6-P izolowane z komórek ludzkich mają identyczną strukturę i rzędową (99,8% homologii sekwencji). Aczkolwiek, funkcja R-Man-6-P nie jest dokładnie poznana, szereg wyników [63–65] wskazuje, że pełni on rolę transportera szeregu nowosyntetyzowanych białek (zwłaszcza hydrolaz) do lizosomów:

- 1) wewnątrzkomórkowa lokalizacja i zdolność do translokacji,
- 2) przeciwciała dla Man-6-P zaburzają transport hydrolaz do lizosomów,
- 3) komórki nie mające R-Man-6-P wykazują zwiększoną sekrecję enzymów lizosomalnych.

Szereg związków stymuluje translokację R-Man-6-P z lizosomów do błony komórkowej. Najbardziej interesującym przykładem jest insulina, która stymuluje w ciągu 10 min translokację 50% receptorów Man-6-P [66]. Jest to o tyle ciekawe, że taka translokacja może obniżyć transport nowosyntetyzowanych enzymów proteolitycznych z aparatu Golgiego do lizosomów, co z kolei tłumaczyłoby zdolność insuliny do hamowania wewnątrzkomórkowego katabolizmu białek [67].

Przyjmując, że R-IGF II i R-Man-6-P to jedno białko, nasuwa się pytanie, czy białko to może pełnić dwie tak różne funkcje jak receptor dla czynnika wzrostu i pośrednictwo w wewnątrzkomórkowym transporcie białek? Odpowiedź na to pytanie jest obecnie trudna, chociaż istnieją receptory pośredniczące w działaniu dwóch różnych funkcjonalnie ligandów (np. receptor dla acetylocholiności pośredniczy także w działaniu tymopetyny) [68]. W przypadku R-IGF II/Man-6-P taka właściwość receptora może integrować dwa różne sygnały. Wykazano, że Man-6-P podnosi powinowactwo IGF II do receptora [59,60], co wskazuje, że oba ligandy mogą działać synergistycznie. Zaproponowano [69], że receptor IGF II/Man-6-P ma dwa różne miejsca wiążące IGF II i Man-6-P. Wyjaśnienie rzeczywistej roli biologicznej receptora IGF II/Man-6-P nie jest możliwe na podstawie dotychczasowych informacji, chociaż wiadomo, że IGF II odgrywa istotną rolę w rozwoju wielu tkanek płodowych [70].



## AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA IGFs W HODOWLACH IN VITRO

Podobnie jak w przypadku innych czynników wzrostowych także insulino-podobne czynniki indukują w komórkach docelowych odpowiedź plejotropową. Wyróżnia się dwa rodzaje odpowiedzi biologicznej komórek na działanie IGFs [15,71]:

a) szybką (krótkotrwałą) stymulację procesów metabolicznych (transport kationów, cukrów i aminokwasów oraz efekty insulino-podobne),

b) wolną (długotrwałą) stymulację mitogenną (synteza białek i kwasów nukleinowych).

Generalnie, insulina, IGF I i IGF II mogą zastępować się wzajemnie w regulacji większości procesów szybkich i wolnych, aczkolwiek ich efektywność zależy od rodzaju tkanki docelowej. Insulina jest od 5–10-krotnie (mięśnie) do 100-krotnie (tkanka tłuszczowa) aktywniejsza od IGFs w stymulacji szybkich efektów metabolicznych. Natomiast, IGFs są ok. 100-krotnie bardziej aktywne od insuliny w stymulacji mitogennej [72,73]. Insulino-podobne czynniki wzrostowe są raczej słabymi mitogenami w porównaniu do takich czynników, jak PDGF czy FGFs, mają natomiast istotny wpływ na różnicowanie komórek pochodzenia mezodermalnego [74]. Wykazano m. in., że komórki erytroidalne (prekursorowe dla komórek mięśniowych i osteoblastów) podejmują różnicowanie w obecności nanogramowych ilości IGFs [74–76]. Insulino-podobne czynniki wzrostowe mogą także odgrywać ważną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu komórek nerwowych [77]. Są niezbędnymi składnikami przeżyciowymi komórek nerwowych izolowanych z płodowych mózgów szczurzych i ludzkich hodowanych w płynach bezsurowiczych [78,79]. Wykazano, że IGF I stymuluje (ok. 100-krotnie) wzrost liczby oligodendrocytów w komórkach mózgowych [80], a IGF II stymuluje wzrost neuronów czuciowych i współczulnych [81,82]. IGFs stymulują także uwalnianie acetylocholiny [83], katecholoaminy [84] i neuropeptydów [79] z błon presynaptycznych komórek nerwowych.

IGFs stymulują wzrost i różnicowanie wielu różnych typów komórek prawidłowych i nowotworowych [15,76,85–90]. Działają synergistycznie z innymi czynnikami wzrostu (PDGF, EGF i FGF) czy hormonami, takimi jak: trójiodotyronina, glukokortykoidy i glukagon [15].

## PRAWDOPODOBNA ROLA FIZJOLOGICZNA IGFs

Prawidłowe stężenie IGFs we krwi zależy głównie od właściwie funkcjonującej wątroby, która jest miejscem syntezy tych czynników i od prawidłowo funkcjonującej przysadki mózgowej, która jest źródłem hormonu wzrostu regulującego poziom IGFs we krwi [91–94]. Wykazano, że krążeniowy poziom GH może być regulowany IGFs przez ujemne sprzężenie zwrotne i to na dwóch drogach: pośrednio przez stymulację sekrecji somatostatyny z podwzgórza lub poprzez bezpośrednio obniżenie sekrecji GH z przysadki [95]. Poziom krążeniowy IGFs zmienia się drastycznie w chorobach związanych z upośledzeniem funkcji przysadki i wątroby. Przykładowo, stężenie IGF I w krwi ludzi zdrowych (ok. 200 ng/ml) ulega obniżeniu: w marskości wątroby (do 17 ng/ml) i w karłowatości przysadki (do 34 ng/ml), natomiast ulega podwyższeniu w akromegalii (do 801 ng/ml) [96]. O ile jednak krążeniowy poziom IGF I jest bezwzględnie zależny od poziomu GH, o tyle analogiczna zależność dla IGF II jest kwestionowana [97,98].

Zależność pomiędzy poziomem IGFs a poziomem insuliny jest złożona. Obniżone stężenie IGF I koreluje z poziomem insuliny w krwi pacjentów cukrzycowych [99] i powraca do normy po intensywnej terapii insulinowej [100,101]. Natomiast, nie obserwowano podniesionego poziomu IGF I i IGF II w hiperinsulinemii [102]. IGFs pośredniczą także w działaniu innych

hormonów, takich jak prolaktyna, estrogeny czy testosteron [103]. Trudno jednak rozstrzygnąć, jaka jest rola fizjologiczna IGFs w regulacji metabolicznej, kontrolowanej przez wymienione hormony dokrewne.

Wiele danych wskazuje, że IGF I jest głównym regulatorem wzrostu somatycznego. Pigmeje mający normalnie funkcjonującą przysadkę mózgową oraz prawidłowy poziom krążeniowy hormonu wzrostu (i IGF II) wykazują znacznie niższe od normy stężenie IGF I we krwi [104]. Ciekawe, że poziom IGF I i IGF II w surowicy dzieci Pigmejów nie odbiega od normy, natomiast poziom IGF I w wieku dojrzwania stanowi zaledwie jedną trzecią prawidłowego poziomu tego czynnika [105]. Przypuszcza się, że obniżenie krążeniowego poziomu IGF I w okresie dojrzwania jest odpowiedzialne za charakterystyczny, niewielki wzrost populacji Pigmejów. W karłowatości Laron obserwuje się podwyższony poziom GH ale bardzo niski poziom IGF I i IGF II [106,107]. Przyczyną tej choroby jest prawdopodobnie obniżona liczba receptorów GH w komórkach wątroby [108, 109], a co za tym idzie zmniejszona synteza i sekrecja IGF I. Obniżony poziom IGF I obserwuje się także w przypadkach: niedożywienia, hipoinsulinemii, schorzeniach wątroby i pierwotnym hipotyroidyzmie [110]. Należy jednak pamiętać, że nie tylko poziom krążeniowy (endokryny), ale także lokalne stężenie (para- lub autokryny) IGFs może odgrywać istotną rolę w fizjologicznej kontroli jak i w patologicznych zaburzeniach wzrostu poszczególnych tkanek.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] SALMON WD jr, DAUGHADAY WH. *J Lab Clin Med* 1957; **49**: 825–836.
- [2] HALL K, UTHNE K. *Acta Med Scand* 1971; **190**: 137–143.
- [3] DAUGHADAY WH, HALL K, RABEN M, SALMON WD. jr, VAN DEN BRANDE JL, VAN WYK JJ. *Nature* 1972; **235**: 107.
- [4] SIEVERTSSON H, FRYKLUND L, UTHNE K, HALL K, WESTERMARK B. *Adv Metab Disord* 1975; **8**: 47–60.
- [5] VAN WYK JJ, UNDERWOOD LE, HINTZ RL, CLEMMONS DR, VOINA SJ, WEAVER RP. *Recent Prog Horm Res* 1974; **30**: 259–318,
- [6] FROESCH ER, BURGI H, RAMSEIER EB, BALLY P, LABHART A. *J Clin Invest* 1963; **42**: 1816–1821.
- [7] RINDERKNECHT E, HUMBEL RE. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73**: 2365–2363.
- [8] RINDERKNECHT E, HUMBEL RE. *J Biol Chem* 1978; **253**: 2769–2776.
- [9] RINDERKNECHT E, HUMBEL RE. *FEBS Lett* 1978; **89**: 283–286.
- [10] PIERSON RW, TEMIN HM. *J Cell Physiol* 1972; **79**: 319–330.
- [11] DULAK NC, TEMIN HM. *J Cell Physiol* 1973; **81**: 153–160.
- [12] KLAPPER DG, SVOBODA ME, VAN WYK JJ. *Endocrinology* 1983; **112**: 2215–2217
- [13] ENBERG G, CARLQUIST M, JORNAVALL H, HALL K. *Eur J Biochem* 1984; **143**: 117–123.
- [14] MARQUARDT H, TODARO GJ, HENDERSON LE, OROSZLAN S. *J Biol Chem* 1981; **256**: 6859–6863.
- [15] MOSES AG, PILISTINE S. *Control of Animal Cell Proliferation* 1985; **1**: 91–120.
- [16] DAUGHADAY WH, HALL K, SALMON WD jr, VAN DEN BRANDE JL, VAN WYK JJ. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; **65**: 1075–1076.
- [17] DAUGHADAY WH, ROTWEIN P. *Endocrinol Rev* 1989; **10**: 68–91.
- [18] HUMBEL RE, BURGISSER D, HONEGGER AM, LUTHI C, ROTH B. (W.) *Growth Factors: From Genes to Clinical Application*, V.S.Sara (red.) Raven Press, New York 1990; 1–10.
- [19] SCHWANDER JC, HAURI C, ZAPF J, FROESCH ER. *Endocrinology* 1983; **113**: 297–305.
- [20] HINTZ RL, LIU F. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; **45**: 988–995.
- [21] BALLARD J, BAXTER R, BINOUX M, CLEMMONS D, DROP S, HALL K, HINTZ R, RECHLER M, RUTANEN E, SCHWANDER J. *Acta Endocrinol* 1989; **121**: 751–752.
- [22] POVOA G, ENBERG G, JORNAVALL H, HALL K. *Eur J Biochem* 1984; **144**: 199–204.
- [23] KIOSTINEN R, KALKKINEN N, HUHTALA M-L, SEPPALA M, BOHN H, RUTANEN E-M. *Endocrinology* 1986; **118**: 1375–1378.
- [24] BELL SC, KEYTE JW. *Endocrinology* 1988; **123**: 1202–1204.
- [25] LEE Y-L, HINTZ RL, JAMES PM, LEE PDK, SHIVELY JE, POWELL DR. *Mol Endocrinol* 1988; **2**: 404–411.

- [26] BAXTER RC, MARTIN JL. *Progr Growth Factor Res* 1989; **1**: 49–68.
- [27] BRINKMAN A, GROFFEN C, KORTLEVE DJ, GEURTS VAN KESSEL A, DROP SLS. *EMBO J* 1988; **7**: 2417–2423.
- [28] HOSSENLOPP P, SEURIN D, SEGOVIA-QUINSON B, BINOX M. *FEBS Lett* 1986; **208**: 439–444.
- [29] SZABO L, MOTTERSHEAD DG, BALLARD FJ, WALLACE JC. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **151**: 207–214.
- [30] MOTTOLA C, MACDONALD RG, BRACKETT JL, MOLE JE, ANDERSON JK, CZECH MP. *J Biol Chem* 1986; **261**: 11180–11188.
- [31] DAUGHADAY WH, WARD AP, GOLDBERG AC, TRIVEDI B, KAPADIA M. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; **55**: 916–921.
- [32] MORRIS DH, SCHALCH DS. *Endocrinology* 1982; **111**: 801–805.
- [33] BAXTER RC, MARTIN JL, WOOD MH. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; **65**: 423–431.
- [34] RUTANEN E-M, KOISTINEN R, SJOBERG J, JULKUNEN M, WAHLSTROM T, BOHN H, SEPPALA M. *Endocrinology* 1986; **118**: 1067–1071.
- [35] JALKANEN J, SUIKKARI A-M, KOISTINEN R i wsp. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **69**: 1174–1179.
- [36] LEWITT MS, BAXTER RC. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **69**: 246–252.
- [37] SUIKKARI A-M, KOIVISTO SL, RUTANEN E-M, YKI-JARVINEN H, KARONEN SL, SEPPALA M. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **66**: 266–272.
- [38] RUTANEN E-M, SEPPALA M, PIETILA R, BOHN H. *Placenta* 1984; **5**: 243–248.
- [39] MARGOT JB, BINKERT C, MARY J-L, LANDWEHR J, HEINRICH G, SCHWANDER J. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1053–1060.
- [40] BINKERT C, LANDWEHR J, MARY J-L, SCHWANDER J, HEINRICH G. *EMBO J* 1989; **8**: 2497–2502.
- [41] BROWN AL, CHIARIOTTI L, ORLOWSKI CC, MEHLMAN T, BURGESS WH, ACKERMAN EJ, BRUNI CB, RECHLER MM. *J Biol Chem* 1989; **264**: 5148–5154.
- [42] BAXTER RC, MARTIN JL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6898–6902.
- [43] WOOD WI, CACHIANES G, HENZEL WJ, WINSLOW GA, SPENCER SA, HELLMISS R, MARTIN JL, BAXTER RC. *Mol Endocrinol* 1988; **2**: 1176–1185.
- [44] JONES JI, BUSBY WH, WRIGHT G, SMITH CE, KIMACK NM, CLEMMONS DR. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1125–1131.
- [45] RUTANEN E-M, PEKONEN F, MAKINEN T. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **66**: 1973–1980.
- [46] ROSS M, FRANCIS GL, SZABO L, WALLACE JC, BALLARD FJ. *Biochem J* 1989; **258**: 267–272.
- [47] RITVOS O, RANTA T, JALKANEN J, SUIKKARI A-M, VOUTILAINEN R, BOHN H, RUTANEN E-M. *Endocrinology* 1988; **122**: 2150–2157.
- [48] PEKONEN F, SUIKKARI A-M, MAKINEN T, RUTANEN E-M. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; **67**: 2150–2157.
- [49] DEMELLOW JSM, BAXTER RC. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 199–204.
- [50] KASUGA M, VAN OBBERGHEN E, NISSLEY SP, RECHLER MM. *J Biol Chem* 1981; **256**: 5305–5308.
- [51] CHERNAUSEK SD, JACOBS S, VAN WYKK JJ. *Biochemistry* 1981; **20**: 7345–7350.
- [52] MASSAGUE J, CZECH MP. *J Biol Chem* 1982; **257**: 5038–5045.
- [53] KASUGA M, KARLSSON FA, KAHN CR. *Science* 1982; **215**: 185–186.
- [54] JACOBS S, KULL FC jr, EARP HS, SVOBODA ME, VAN WYKK JJ, CUATRECASAS P. *J Biol Chem* 1983; **258**: 9581–9584.
- [55] RUBIN JB, SHIA MA, PILCH PF. *Nature* 1983; **305**: 438–440.
- [56] ULLRICH A, GRAY A, TAM A i in. *EMBO J* 1986; **5**: 2503–2512.
- [57] CORVERA S, WHITEHEAD RE, MOTTOLA C, CZECH MP. *J Biol Chem* 1986; **261**: 7675–7679.
- [58] MORGAN DO, EDMAN JC, STANDRING DN, FRIED VA, SMITH MC, ROTH RA, RUTTER WJ. *Nature* 1987; **329**: 301–307.
- [59] ROTH RA, STOVER C, HARI J, MORGAN DO, SMITH MC, SARA V, FRIED VA. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **149**: 600–606.
- [60] MACDONALD RG, PFEFFER SR, COUSSENS L i in. *Science* 1988; **239**: 1134–1137.
- [61] TONG PT, TOLLEFSEN SE, KORNFELD S. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2585–2588.
- [62] OSHIMA A, NOLAN CM, KYLE JW, GRUBB JH, SLY WS. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2553–2562.
- [63] VON FIGURA K, HASLIK AA. *Annu Rev Biochem* 1986; **55**: 167–193.
- [64] NOLAN CM, CREEK KE, GRUBB JH, SLY WS. *J Cell Biochem* 1987; **35**: 137–142.
- [65] GABEL CA, GOLDBERG DE, KORNFELD S. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 775–779.
- [66] CORVERA S, CZECH MP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7314–7318.
- [67] MORTIMORE GE, MONDON C.E. *J Biol Chem* 1970; **245**: 2375–2380.

- [68] VENKATASUBRAMANIAN K, AUDHYA T, GOLDSTEIN G. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3171–3177.
- [69] WAHEED A, BRAULKE T, JUNGHANS U, VON FIGURA K. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **152**: 1248–1254.
- [70] HAN VKM, LU F, BASSET K, YANG KP, DELHANTY PJD, CHALLIS JRG. *Endocrinology* 1992; **131**: 3100–3109.
- [71] HUMBEL RE. *Eur J Biochem* 1990; **190**: 445–462.
- [72] FROESCH ER, SCHMID C, SCHWANDER J, ZAPF J. *Annu Rev Physiol* 1985; **47**: 443–467.
- [73] VAN WYK JJ. (W:) Hormonal proteins and peptides, C.H. Li (red.) Academic Press, Orlando, 1984; 81–125.
- [74] FROESCH ER, SCHMID CH, ZANGGER I, SCHOENLE E, EIGENMANN E, ZAPF J. *J Anim Sci* 1986; **63** (suppl.2): 57–75.
- [75] SCHMID CH, STEINER TH, FROESCH ER. *FEBS Lett* 1983; **161**: 117–121.
- [76] SCHMID CH, STEINER TH, FROESCH ER. *FEBS Lett* 1984; **173**: 48–52.
- [77] BASKIN DG, WILCOX BJ, FIGLEWICZ DP, DORSA DM. *Trends Neurosci* 1988; **11**: 107–111.
- [78] AIZENMAN Y, DE VELLIS J. *Brain Res* 1987; **406**: 32–42.
- [79] HASELBACHER G, GROSCURTH P, OTTEN U, VEDDER H, LUTZ U, SONDEREGGER P, BULATKO A, GREEFF N, HUMBEL R. *J Neurosci Methods* 1989; **30**: 121–131.
- [80] MCMORRIS FA, SMITH TM, DESALVO S, FURLANETTO RW. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 822–826.
- [81] BOTHWELL M. *J Neurosci Res* 1982; **8**: 225–231.
- [82] RECIO-PINTO E, RECHLER MM, ISHII DN. *J Neurosci* 1986; **6**: 1211–1219.
- [83] NILSSON L, SARA VR, NORDBERG A. *Neurosci Lett* 1988; **88**: 221–226.
- [84] DASHNER MK, PERLMAN RL. *J Neurochem* 1988; **51**: 321–323.
- [85] MACAULAY VM, EVERARD MJ, TEALE JD, TROTT PA, VAN WYK JJ, SMITH IE, MILLAR JL. *Cancer Res* 1990; **50**: 2511–2517.
- [86] MCCARTHY TL, CENTRELLA M, CANALIS E. *Conn Tiss Res* 1989; **20**: 277–282.
- [87] SLOOTWEG MC, HOOGERBRUGGE CM, DE POORTER TL, DUURSMA SA, VAN BUUL-OFFERS SC. *J Endocrinol* 1990; **125**: 271–277.
- [88] DE PABLO F, SCOTT LA, ROTH J. *Endocrine Rev* 1990; **11**: 558–577.
- [89] POLLAK MN, POLYCHRONAKOS C, RICHARD M. *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 301–305.
- [90] OSBORNE CK, CLEMMONS DR, ARTEAGA CL. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1990; **37**: 805–809.
- [91] BINOUX M, HOSSENLOPP P, GOURMELEN M, GIRARAD F. *Ann Endocrinol* 1980; **41**: 487–494.
- [92] BINOUX M, HOSSENLOPP P, LASSARRE C, SEURIN D. *Acta Endocrinol* 1980; **93**: 73–82.
- [93] BINOUX M, LASSARRE C, SEURIN D. *Acta Endocrinol* 1980; **93**: 83–90.
- [94] LEE JA, DICKINSON LS, KILGORE BS, WARREN RH, ELDERS MJ. *Ann Clin Lab Sci* 1980; **10**: 227–233.
- [95] BERELOWITZ K, SZABO M, FROHMAN LA, FIRESTONE S, CHU L, HINTZ RL. *Science* 1981; **212**: 1279–1281.
- [96] FROESCH ER, ZAPF J. *Ann Endocrinol* 1980; **41**: 502–511.
- [97] ROSENFELD RG, WILSON DM, LEE PD, HINTZ RL. *J Pediatr* 1986; **109**: 428–433.
- [98] WILSON DM, PERKINS SN, THOMAS JA i in. *Metabolism* 1989; **38**: 57–62.
- [99] RIEU M, BINOUX M. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; **60**: 781–785.
- [100] MERIMEE TJ, GARDNER DF, ZAPF J, FROESCH ER. *Diabetes* 1984; **33**: 790–793.
- [101] TAMBORLANE WV, HINTZ RL, BERGMAN M, GENEL M, FELIG P, SHERWIN RS. *N Engl J Med* 1981; **305**: 303–307.
- [102] BLETHEN SL, WHITE NH, SANTIAGO JV, DAUGHADAY WH. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; **52**: 748–750.
- [103] GUYDA HJ, RAPPAPORT R. (W:) Pediatric Endocrinology, R.Collu, J.R.Ducharme i H.J.Guyda (red.) Raven Press, New York, 1989; 217–250.
- [104] MERIMEE TJ, ZAPF J, FROESCH ER. *N Engl J Med* 1981; **305**: 965–968.
- [105] MERIMEE TJ, ZAPF J, HEWLETT B, CAVALLI-SFORZA LL. *N Engl J Med* 1987; **316**: 906–911.
- [106] ZAPF J, MORELL B, WALTER H, LARON Z, FROESCH ER. *Acta Endocrinol* 1980; **95**: 505–517.
- [107] LARON Z. *Isr J Med Sci* 1974; **10**: 1247–1253.
- [108] ESHET R, LARON Z, PERTZELAN A, ARNON R, DINTZMAN M. *Isr J Med Sci* 1984; **20**: 8–11.
- [109] GODOWSKI PJ, LEUNG DW, MEACHAM LR i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 8083–8087.
- [110] ZAPF J, FROESCH ER. *Hormone Res* 1986; **24**: 160–165.

#### 4. FIBROBLASTYCZNE CZYNNIKI WZROSTOWE (FGFs)

Historia badań fibroblastycznych czynników wzrostowych liczy już ponad 50 lat. W latach 1939–1940 wykazano, że nieoczyszczone homogenaty tkanki mózgowej zawierają substancje stymulujące wzrost pierwotnych hodowli fibroblastów [1,2]. Pod koniec lat siedemdziesiątych Gospodarowicz i wsp. [3] wyizolowali i częściowo oczyścili peptyd o aktywności czynnika wzrostowego fibroblastów (FGF). Rozdział wstępnie oczyszczonego preparatu metodą ogniskowania izoelektrycznego wykazał obecność dwóch peptydów o aktywności FGF: jednego kwaśnego ( $pI < 6$ ) a drugiego zasadowego ( $pI > 9$ ) [4,5]. Metoda ta pozwoliła na całkowite oczyszczenie i charakterystykę chemiczną dwóch podobnych peptydów, określanych dzisiaj jako kwaśny, fibroblastyczny czynnik wzrostowy (aFGF) i zasadowy, fibroblastyczny czynnik wzrostowy (bFGF).

Na podstawie badań sekwencji aminokwasowej ustalono, że wiele peptydów uważanych dotychczas za różne czynniki wzrostowe jest identycznych z aFGF lub bFGF [6–8]. I tak czynnik wzrostowy komórek endotelialnych (ECGF), czynnik wzrostowy II wyizolowany z oka (EDGF II), czynnik wzrostowy wiążący heparynę typu  $\alpha$  (HBGF $\alpha$ ), czynnik wzrostowy pochodzący z rogówki (RDGF) i czynnik wzrostowy 1 astrocytów (AGF 1) są identyczne z aFGF. Natomiast, czynnik wzrostowy wyizolowany z wątrobiaka (HDGF), czynnik wzrostowy wyizolowany z chrząstki (CDGF) oraz EDGF I, EBGF  $\beta$  i AGF 2 są homologiczne z bFGF.

Wspólną właściwością wszystkich FGFs była zdolność do wiązania się z heparyną [9], co znalazło praktyczne zastosowanie w metodzie izolowania tych czynników wzrostowych (chromatografia powinowactwa na żelu Sefaroz-heparyna), a także w często spotykanym nazewnictwie tej grupy związków – czynniki wiążące się z heparyną (ang. – *heparin binding growth factors* – HBGF).

#### RODZINA FIBROBLASTYCZNYCH CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

Obecnie do rodziny FGFs (poza a i b FGF) zalicza się także produkty białkowe genów INT 2, HST, FGF5, FGF6, KGF (tab. 7). Geny te zakwalifikowano do rodziny FGFs na podstawie podobieństwa ich sekwencji nukleotydowych z genami FGFs. Gen INT2 (ang. – *INTegration region*) zidentyfikowano po raz pierwszy w trakcie wirusowo indukowanej karcinogenezy gruczołów mlecznych myszy BR6 [10]. W 17 z 40 indukowanych wirusowo guzów piersi prowirusowy DNA był zintegrowany z tym samym regionem chromosomowym gospodarza o długości 24 kb nazwanym INT2 (występuje także co najmniej jeszcze jeden podobny region nazwany INT1). Ustalono, że onkogen ten związany jest z wirusowo indukowaną deregulacją wzrostu komórek infekowanych. Ludzki homolog produktu mysiego genu INT2 [11] jest typowym białkiem karcinoembrionalnym, którego gen nie ulega ekspresji w tkankach osobników dorosłych, natomiast jest syntetyzowany w tkankach embrjonalnych oraz w wirusowo indukowanych nowotworach piersi [12,13,14]. W roku 1986 Sakamoto i wsp. [15] opisali nowy onkogen. W przypadku 3 z 21 prób transfekcji komórek NIH 3T3 DNA otrzymanym z ludzkiego raka żołądka przeniesiona została sekwencja o aktywności transformującej, nazwana HST (ang. – *Human STomach cancer*). Inni autorzy wykazali sekwencję HST po transfekcji do komórek zwierzęcych DNA uzyskanym z ludzkich nowotworów, takich jak: mięsak Kaposiego, rak okrężnicy czy czerniaki [16]. Ustalono, że protoonkogen HST u ludzi zlokalizowany jest w paśmie chromosomowym 11q13 [17] oddalonym od genu INT2 o niecałe 40 kb [18,19]. Nie wykazano obecności mRNA dla HST w tkankach prawidłowych

osobników dorosłych. Podobnie jak INT2 gen HST ulega ekspresji w tkankach embrionalnych i nowotworowych [20]. Rok później Zhan i wsp. [21] zidentyfikowali onkogen kodujący białko zaliczane do rodziny FGF po transfekcji DNA ekstrahowanego z linii komórkowej raka pęcherza do komórek NIH 3T3 [22]. Gen ten (FGF5) został następnie sklonowany z wykorzystaniem RNA uzyskanego z jednodniowego mózgu ludzkiego. Gen FGF5 jest zlokalizowany w paśmie chromosomowym 4q21 [18]. W roku 1989 wyizolowano dwa dalsze czynniki wzrostowe zaliczane do rodziny FGF: białko kodowane przez gen FGF6 (zlokalizowany w chromosomie 12) oraz białko kodowane przez gen KGF, wyizolowane z płynu hodowlanego linii komórkowej embrionalnych fibroblastów ludzkich [23,24].

TABELA 7. Rodzina genów kodujących peptydy zaliczane do fibroblastycznych czynników wzrostowych

	Pierwotny produkt translacji (liczba aa)	% homologii* z bFGF
bFGF	155	
aFGF	140	55
INT2	239	40
HST	206	42
FGF5	267	43
FGF6	207	43
KGF	194	39

\* – Procent homologii sekwencji aminokwasowej wyliczony dla środkowej części genów z pominięciem części N-końcowych (niehomologicznych) i dodatkowych odcinków C-końcowych obecnych w FGF5 i INT2.

Wspólną cechą odróżniającą FGFs kodowane przez geny INT2, HST, FGF5, FGF6, KGF od aFGF i bFGF jest obecność w ich cząsteczkach prekursorowych sekwencji sygnałowej (odpowiedzialnej za sekrecję). Jest to prawdopodobnie związane z odmienną funkcją fizjologiczną tych białek, z których pierwsze są istotne w procesie embriogenezy (a w warunkach patologicznych we wzroście nowotworowym), natomiast, drugie regulują wzrost i różnicowanie dorosłych tkanek.

Fibroblastyczne czynniki wzrostowe są, podobnie jak inni przedstawiciele tej grupy związków, peptydami o konserwatywnej ewolucyjnie strukturze. FGFs wyizolowane z mózgu bydłęcego są prawie identyczne z ludzkimi i różnią się 12 resztami aminokwasowymi w przypadku aFGF i dwoma w przypadku bFGF [5,25]. bFGF wykazuje niewielką identyczność sekwencji (10%) z interleukiną 1b, a mimo to podobieństwo struktury przestrzennej tych dwóch białek jest zaskakująco duże [26]. Ponadto, te dwa różne funkcjonalnie białka mają jeszcze jedną wspólną cechę strukturalną – brak sekwencji sygnałowej w prekursorowej cząsteczce obu polipeptydów [27].

### RECEPTORY FGFs

Receptory FGFs są glikoproteinami o m. cz. 130–135 kDa, w których część akceptorowa zawiera trzy domeny Ig-podobne, a część efektorowa ma aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej [28,29]. Zidentyfikowano cztery geny kodujące białka receptorowe dla FGFs [30]. Wszystkie wiążą poszczególne FGFs z podobnym powinowactwem, a wiązanie czynników wzrostowych do ich receptorów jest zależne od interakcji FGFs z proteoglikanami błony komórkowej, zawierającymi siarczan heparyny [30]. Komórki docelowe mają na swojej

powierzchni  $10^3$  do  $10^5$  receptorów dla FGFs [31–33] o wysokim powinowactwie do liganda ( $K_d = 10\text{--}200$  pM).

### AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Chociaż FGFs zostały wyizolowane i scharakteryzowane na podstawie ich zdolności do stymulacji proliferacji fibroblastów, szybko ustalono, że czynniki te są także mitogenami dla komórek pochodzenia mezodermalnego i neuroektodermalnego. Stymulują m.in. wzrost i różnicowanie: naczyńniowych komórek śródbłonna, komórek mięśni gładkich, komórek glejowych, chondrocytów, osteoblastów i komórek nabłonka [9, 34–37]. Udowodniono także, że FGFs są chemoatraktantami dla: komórek endotelialnych, glejowych i fibroblastów [38,39]. Aktywność biologiczna tych białek wskazuje na ich prawdopodobny udział w: procesie gojenia ran [40,41], rozwoju embrionalnym [42,43], formowaniu kości [44], angiogenezie [45,46] oraz przeżyciu i wroście neuronów [47,48].

Aczkolwiek, nie stwierdzono, aby czynniki wzrostowe indukowały genotypową transformację nowotworową, ich niekontrolowana, stała produkcja w tkance nowotworowej może powodować generowanie i podtrzymywanie fenotypu transformowanego. Wykazano, że liczne komórki nowotworowe produkują czynniki z rodziny FGFs i mogą na nie odpowiadać [49–51]. Z drugiej strony stwierdzono, że syntetyzujące bFGF komórki ludzkiego wątrobiaka SK-HEP-1 oraz szczurzego glejaka C6 wydzielają ten czynnik do płynu hodowlanego w znikomych ilościach [51,52]. Tak więc znaczenie a i b FGFs jako autokrynych stymulatorów wzrostu komórek nowotworowych pozostaje niejasne. Natomiast, nie ulega wątpliwości, że FGFs produkowane przez komórki nowotworowe mające sekwencję sygnałową (np. produkty genów IN2, HST) mogą regulować wzrost komórek macierzystych w drodze autokrynej [53]. Wydawało się prawdopodobne, że FGFs produkowane przez komórki nowotworowe mogą także stymulować wzrost sąsiednich komórek prawidłowych w drodze parakrynej [54]. Warunkiem auto- lub parakrynnego działania FGFs była problematyczna zdolność komórek produkujących te czynniki do ich sekrecji poza komórkę macierzystą.

### SEKRECJA FGFs

Określenie struktury I rzędowej a i b FGFs ujawniło, że żaden z tych czynników nie ma typowej sekwencji sygnałowej [8,55]. Podstawowe pytanie, jakie nasuwało się w tej sytuacji brzmiało: czy FGFs nie są wydzielane na zewnątrz komórki, czy też są wydzielane w sposób niekonwencjonalny? Pierwsze próby wyjaśnienia tego problemu [56,57] nie przyniosły zdecydowanej odpowiedzi. Stwierdzono bardzo małe (choć mieralne) stężenie bFGF w płynach hodowlanych komórek syntetyzujących ten czynnik. Dodanie do hodowli przeciwciał dla bFGF obniżało (20–35%) szybkość proliferacji badanych komórek, ale nie hamowało jej całkowicie. Szereg dowodów pośrednich, wskazujących na sekrecję FGFs zostało przedstawionych w latach 1989–1990. Po pierwsze wykazano, że poziom bFGF w płynie hodowlanym obniża się gwałtownie wraz ze wzrostem gęstości badanych komórek, co wskazywało, że wydzielany czynnik jest wiązany przez składniki matryks pozakomórkowej lub zewnętrznej powierzchni komórki [58]. Po drugie, transfekcja komórek prawidłowych cDNA zawierającym sekwencję kodującą bFGF połączoną z sekwencją sygnałową IgG powodowała zmiany charakterystyczne dla komórek transformowanych (utrata zahamowania kontaktowego, wzrost w płynach bezsurowiczych), a mimo to nie stwierdzono obecności bFGF w płynie hodowlanym [59,60]. Wyjaśnienie tej zagadki nasunęły zarówno charakterystyczna dla FGFs

zdolność wiązania się z heparyną, jak i fakt, że istotnym składnikiem matriks pozakomórkowej oraz powierzchni zewnątrzkomórkowej jest siarczan heparanu (proteoglikan zawierający związaną heparynę). Zaproponowano, że FGFs są wydzielane na zewnątrz komórki i wiązane z siarczanem heparanu z szybkością uniemożliwiającą ich oznaczenie metodami immunologicznymi [59,60].

Przyjmując poprawność powyższej hipotezy należało udowodnić obecność związanych form FGFs w matriks pozakomórkowej i/lub w zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Istnienie tych ostatnich sygnalizowały doświadczenia Moscatelliego [61] nad liczbą receptorów bFGF w komórkach śródbłonna naczyń włoskowatych. Określił on liczbę miejsc wiążących bFGF na  $10^6$ /komórkę, przy czym tylko 1% tej liczby stanowiły receptory o stałej dysocjacji  $K_d = 20$  pM. Pozostałe 99% miejsc wiązało bFGF z dużo mniejszym powinowactwem ( $K_d = 2$  nM). Co więcej FGF był łatwo uwalniany z tych miejsc działaniem heparyny. Działanie heparynazy powodowało także dysocjację FGFs z kompleksów wiążących o wysokim powinowactwie (receptorów FGFs), ale proces ten przebiegał znacznie wolniej (połowiczny czas dysocjacji kompleksu  $T_{50} = 46$  min) niż kompleksów o niskim powinowactwie ( $T_{50} = 6$  min) [62]. Obecność miejsc wiążących bFGF o niskim powinowactwie do czynnika wzrostowego wykazano także (in vitro i in vivo) w matriks pozakomórkowej endotelialnych komórek rogówki [63,64]. Podobnie jak w doświadczeniach Moscatelliego FGF był uwalniany działaniem substancji heparyno-podobnych oraz działaniem heparynazy [65]. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy sugerowali, że matriks pozakomórkowa jest rezerwuarem aktywnych FGFs, a lokalne uwalnianie tych czynników może regulować różnicowanie neuronów lub miocytów oraz angiogenezę [66]. Ostatecznym dowodem na wydzielanie i gromadzenie FGFs w obszarach zewnątrzkomórkowych były doświadczenia Thompsona i wsp. [67] nad desorpcją bFGF z endotelium naczyniowego przez dożylnie podawanie heparyny. Wstrzyknięta dożylnie heparyna powodowała gwałtowne podniesienie poziomu wolnego FGF w osoczu krwi królika, a podany w chwilę później bFGF znakowany  $^{125}\text{J}$  był równie szybko usuwany z krążenia. Ponowne podanie heparyny pozwalało na ilościowe określenie uwalnianego FGF przez oznaczenie piętna izotopowego w osoczu krwi.

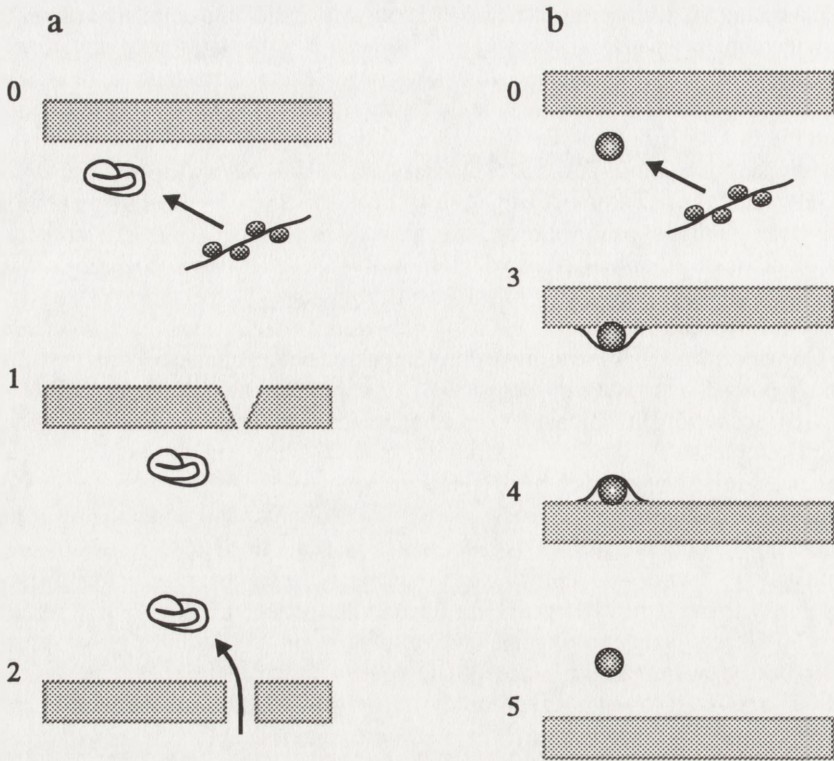
Obecnie przyjmuje się, że proteoglikany zawierające siarczan heparyny mają kluczowe znaczenie w regulacji aktywności FGFs in vivo [68]. Spekuluje się, że uwalnianie FGFs z zapasów zewnątrzkomórkowych może być odpowiedzialne za proces waskularyzacji nowotworów, gdzie lokalnym źródłem heparyny mogą być komórki tuczne [69].

O ile sama sekrecja i proponowany sposób magazynowania FGFs mają spore uzasadnienie doświadczalne, o tyle mechanizm transportu FGFs z cytoplazmy na zewnątrz komórki jest niejasny. Zaproponowano dwie różne możliwości uwalniania FGFs, głównie na podstawie badania innych białek, pozbawionych sekwencji sygnałowej (rys. 12):

- a) uwalnianie FGFs spowodowane uszkodzeniem lub śmiercią komórki [62],
- b) gromadzenie FGFs w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych powstałych przez wynicowanie błony komórkowej [22,62].

Trudno ocenić, który lub które z przedstawionych modeli mają znaczenie w fizjologicznej regulacji wzrostu i różnicowania tkanek, stymulowanej działaniem fibroblastycznych czynników wzrostowych.





Rys. 12. Hipotetyczne możliwości uwalniania FGFs przez uszkodzenie komórki (a) lub wycinowanie błony plazmatycznej (b); syntetyzowane na rybosomach FGFs (0) mogą być wydzielane na zewnątrz komórki po uszkodzeniu błony plazmatycznej (1, 2) lub pakowane do pęcherzyków zbiorczych, które asocjują z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej (3) i po jej wycinowaniu (4) uwalniane są do otoczenia

## PIŚMIENNICTWO

- [1] TROWELL OA, CHIR B, WILLMER EN. *J Exp Biol* 1939; **16**: 60–70.
- [2] HOFFMAN RS. *Growth* 1940; **4**: 361–376.
- [3] GOSPODAROWICZ D, BIALECKI H, GREENBURG G. *J Biol Chem* 1978; **253**: 3736–3743.
- [4] THOMAS KA, RILEY MC, LEMMON SK, BAGIAN NC, BRADSHAW RA. *J Biol Chem* 1980; **255**: 5517–5520.
- [5] LEMMON SK, RILEY MC, THOMAS KA, HOOVER GA, MACIĄG T, BRADSHAW RA. *J Cell Biol* 1982; **95**: 162–169.
- [6] THOMAS KA, GIMENEZ-GALLEGO G. *Trends Biochem Sci* 1986; **11**: 81–84.
- [7] FOLKMAN J, KLAGSBRUN M. *Science* 1987; **235**: 442–447.
- [8] JAYE M, HOWK R, BURGESS W, RICCA GA, CHIU I-M, RAVERA MW, O'BRIEN SJ, MODI WS, MACIĄG T, DROHAN WN. *Science* 1986; **233**: 541–545.
- [9] BURGESS WH, MACIĄG T. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 575–606.
- [10] PETERS G, BROOKES S, SMITH R, DICKSON C. *Cell* 1983; **33**: 269–377.
- [11] CASEY G, SMITH R, MCGILLIVRAY D, PETERS G, DICKSON C. *Mol Cell Biol* 1986; **6**: 502–505.
- [12] BROOKES S, SMITH R, CASEY G, DICKSON C, PETERS G. *Oncogene* 1989; **4**: 429–436.
- [13] WILKINSON D, PETERS G, DICKSON C, MCMAHON A. *EMBO J* 1988; **7**: 691–695.

- [14] WILKINSON D, BHATT S, MCMAHON A. *Development* 1989; **105**: 131–136.
- [15] SAKAMOTO H, MORI M, TAIRA M i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3997–4001.
- [16] DELLI-BOVID, CURATOLA AM, KERNF, GRECO A, ITTMANN M, BASILICOC. *Cell* 1987; **50**: 729–737.
- [17] ADELAIDE J, MATTEI MG, MARICS I i in. *Oncogene* 1988; **2**: 413–416.
- [18] NGUYEN C, ROUX D, MATTEI MG i in. *Oncogene* 1988; **3**: 703–708.
- [19] WADA A, SAKAMOTO H, KATOH O i in. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **157**: 828–835.
- [20] YOSHIDA T, TSUTSUMI M, SAKAMOTO H, MIYAGAWA K, TESHIMA S, SUGIMURA T, TERADA M. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **155**: 1324–1329.
- [21] ZHAN X, CULPEPPER A, REDDY M i in. *Oncogene* 1987; **1**: 369–376.
- [22] ZHAN X, BATES B, HU X, GOLDFARB M. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 3487–3495.
- [23] MARICS I, ADELAIDE J, RAYBAUD F, MATTEI M-G, COULIER F, PLANCHE J, DELAPEYRIERE O, BIRNBAUM D. *Oncogene* 1989; **4**: 335–340.
- [24] FINCH P, RUBIN J, MIKI T, RON D, AARONSON S. *Science* 1989; **245**: 752–755.
- [25] SOMMER A, BREWER MT, THOMPSON RC, MOSCATELLI D, PRESTA M, RIFKIN DB. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **144**: 543–550.
- [26] ERIKSSON AE, COUSENS LS, WEAVER LH, MATTHEWS BW. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3441–3445.
- [27] GIMENEZ-GALLEGO G, RODKEY J, BENNETT C, RIOS-CANDELORE M, DISALVO J, THOMAS K. *Science* 1985; **230**: 1385–1388.
- [28] LEE PL, JOHNSON DE, COUSENS LS, FRIED VA, WILLIAMS LT. *Science* 1989; **245**: 57–60.
- [29] KUO M-D, HUANG SS, HUANG JS. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16455–16463.
- [30] GIVOL D, YAYON A. *FASEB J* 1992; **6**: 3362–3369.
- [31] NEUFELD G, GOSPODAROWICZ D. *J Biol Chem* 1986; **261**: 5631–5637.
- [32] OLWIN BB, HAUSCHKA SD. *Biochemistry* 1986; **25**: 3487–3492.
- [33] FRIESEL R, BURGESS WH, MEHLMAN T, MACIĄG T. *J Biol Chem* 1986; **261**: 7581–7584.
- [34] HUANG JS, HUANG SS, KUO M-D. *J Biol Chem* 1986; **261**: 11600–11607.
- [35] GOSPODAROWICZ D, NEUFELD G, SCHWEIGERER L. *J Cell Physiol* 1987; Suppl. **5**: 15–26.
- [36] GOSPODAROWICZ D, FERRARA N, SCHWEIGERER L, NEUFELD G. *Endocr Rev* 1987; **8**: 95–114.
- [37] REIDY MA. *Arch Pathol Lab Med* 1992; **116**: 1276–1280.
- [38] TERRANOVA VP, D.FLORIO R, LYALL R, HIC S, FRIESEL R, MACIĄG T. *J Cell Biol* 1985; **101**: 2330–2334.
- [39] SENIOR RM, HUANG SS, GRIFFIN GL, HUANG JS. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **141**: 67–72.
- [40] DAVIDSON JM, KLAGSBURN M, HILL KZ, BUCKLEY A, SULLIVAN R, BREWER PS, WOODWARD SC. *J Cell Biol* 1985; **100**: 1219–1227.
- [41] EGUCHI K, MIGITA K, NAKASHIMA M, IDA H, TERADA K, SAKAI M, KAWAKAMI A, AOYAGI T, ISHIMARU T, NAGATAKI S. *J Rheumatol* 1992; **19**: 925–932.
- [42] SLACK JM, DARLINGTON BG, HEATH JK, GODSAVE SF. *Nature* 1987; **326**: 197–200.
- [43] RISAN W, GANTSCHI-SOVA P, BOHLEN P. *EMBO J* 1988; **7**: 959–962.
- [44] CANALIS Z, LORENZO J, BURGESS W, MACIĄG T. *J Clin Invest* 1987; **79**: 52–58.
- [45] THOMPSON JA, ANDERSON KD, DIPIETRO JM, ZWEIBEL JA, ZAMETTA M, ANDERSON WF, MACIĄG T. *Science* 1988; **241**: 1349–1352.
- [46] LOBB RR, ALDERMAN ZM, FETT JW. *Biochemistry* 1985; **24**: 4969–4973.
- [47] MORRISON RS, SHARMA A, VELLIS J, BRADSHAW RA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7537–7541.
- [48] NEUFELD G, GOSPODAROWICZ D, DODGE L, FUJII DK. *J Cell Physiol* 1987; **131**: 131–140.
- [49] VAN VEGGEL JH, VAN OOSTWAARD TMJ, DE LAAT SW, VAN ZOELLEN EJJ. *Exp Cell Res* 1987; **169**: 280–286.
- [50] WERNER S, HOFSCHEIDER PH, STURZL M, DICK I, ROTH WK. *J Cell Physiol* 1989; **141**: 490–502.
- [51] OKUMURA N, TAKIMOTO K, OKADA M, NAKAGAWA H. *J Biol Chem* 1989; **106**: 904–909.
- [52] KLAGSBRUN M, SASSE J, SULLIVAN R, SMITH JA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2448–2452.
- [53] BENHARROCH D, BIRNBAUM D. *Israel J Med Sci* 1990; **26**: 212–219.
- [54] TAKAHASHI JA, MORI H, FUKUMOTO M, IGARASHI K, JAYE M, ODA Y, KIKUCHI H, HATANAKA M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5710–5714.
- [55] ABRAHAM JA, WHANG JL, TUMOLO A, MERGIA A, FRIDMAN J, GOSPODAROWICZ D, FIDDES JC. *EMBO J* 1986; **5**: 2523–2528.
- [56] SCHEIGERER L, NEUFELD G, FRIDMAN J, ABRAHAM JA, FIDDES J, GOSPODAROWICZ D. *Nature* 1987; **325**: 257–259.
- [57] D'AMORE PA, ANTONELLI A, SMITH SR, HERMAN IM. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; **31**: 199.

- [58] SATO Y, RIFKIN DB. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1199–1205.  
 [59] NEUFELD G, MITCHELL R, PONTE P, GOSPODAROWICZ D. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1385–1394.  
 [60] ROGELJ S, WEINBERG RA, FANNING P, KLAGSBURN M. *Nature* 1988; **331**: 173–175.  
 [61] MOSCATELLI D. *J Cell Physiol* 1987; **131**: 123–130.  
 [62] MOSCATELLI D. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25803–25809.  
 [63] ROGELJ S, KLAGSBURN M, ATZMON R, KUROKAWA M, HAIMOWITZ A, FUKS Z, VLODAVSKY I. *J Cell Biol* 1989; **109**: 823–831.  
 [64] FOLKMAN J, KLAGSBURN M, SASSE J, WADZINSKI M, INGBER D, VLODAVSKY I. *Am J Pathol* 1988; **130**: 393–400.  
 [65] BASHKIN P, DOCTROW S, KLAGSBURN M, SAVAHN CM, FOLKMAN J, VLODAVSKY I. *Biochemistry* 1989; **28**: 1737–1743.  
 [66] D'AMORE PA. *Cancer and Metastasis Rev* 1990; **9**: 227–238.  
 [67] THOMPSON RW, WHALEN GF, SAUNDERS KB, HORES T, D'AMORE PA. *Growth Factors* 1990; **3**: 221–229.  
 [68] GALLAGER JT, TURNBULL JE. *Glycobiology* 1992; **2**: 523–528.  
 [69] KESSLER DA, LANGER RS, PLESS NA, FOLKMAN J. *Int J Cancer* 1976; **18**: 703–709.

## 5. CZYNNIK WZROSTOWY HEPATOCYTÓW (HGF)

Mija ponad czterdzieści lat od czasu, kiedy Christensen i Jacobsen [1] oraz Bucher [2] wykazali, że aktywność mitotyczna nienaruszonej wątroby w parze parabiotycznych szczurów wzrasta po częściowej hepatektomii, dokonanej u partnera. Wyniki prac eksperymentalnych, prowadzonych na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych obecnego stulecia wskazywały, że krew szczurów poddanych częściowej resekcji wątroby zawiera czynnik stymulujący proliferację hepatocytów w wątrobach parabiotycznych partnerów [3,4], skrawkach tkanki wątrobowej [5] lub w transplantowanych hepatocytach [6]. W latach osiemdziesiątych okazało się, że czynnik ten jest białkiem stymulującym wzrost hepatocytów w hodowli pierwotnej, określanym jako hepatopoetyna A [7,8] lub hepatotropina [8]. Po uzyskaniu homogennych preparatów stwierdzono, że HGF (ang. – *hepatocyte growth factor*) jest dwułańcuchowym polipeptydem o m. cz. 82 kDa [10] i sekwencji aminokwasów identycznej z białkami określanymi w piśmiennictwie anglojęzycznym jako *scatter factor* [11] lub *tumor cytotoxic factor* [12].

### WŁAŚCIWOŚCI HGF

Dojrzały HGF zbudowany jest z dwóch łańcuchów: ciężkiego (podjednostka  $\alpha$ ) o m.c. 69 kDa i lekkiego (podjednostka  $\beta$ ) o m.c. 34 kDa [13–15]. Łańcuch ciężki zawiera 4 domeny o strukturze podobnej do precla, z których mniejsza pętla połączona jest z większą wiązaniem dwusiarczkowym [16,17]. Domeny te cechuje zdolność do wiązania z innymi białkami i obecność charakterystycznej sekwencji aminokwasowej -Asn-Tyr-Cys-Arg-Pro-Asp-. Obecność podobnych struktur o zbliżonej sekwencji aminokwasów wykazano w plazminogenie (domeny 1, 4, 5) i protrombinie (domena 1) [18–20]. Łańcuch lekki ma strukturę pseudoproteazy, w której dwa z trzech aminokwasów centrum aktywnego (Ser, His, Asp) zostały zastąpione innym: Ser - Tyr a His - Gln [16]. Dlatego HGF nie ma aktywności proteolitycznej. Czynnik wzrostowy hepatocytów, podobnie jak FGFs jest białkiem termo- i kwasolabilnym, podatnym na traktowanie ditiotreiolem i trypsyną [13,21].

HGF jest sytyzowany w formie jednołańcuchowej cząsteczki prekursorowej, zbudowanej z 728 aminokwasów [16]. Postać dimeryczna tworzona jest z prekursora w wyniku cięcia enzymatycznego pomiędzy Arg<sup>494</sup> a Val<sup>495</sup>. Sekwencja aminokwasów w miejscu rozcięcia łańcucha jest identyczna jak w plazminogenu [22]. Dlatego uważa się, że aktywator plazminogenu jest enzymem katalizującym tworzenie dojrzałej cząsteczki czynnika wzrostowego hepatocytów.

Receptorem HGF jest produkt onkogenu *c-met* [23], białko o m.c. ok. 190 kDa, zbudowane z dwóch podjednostek:  $\alpha$  (50 kDa) i  $\beta$  (145 kDa) [24,25]. Część cytoplazmatyczna podjednostki  $\beta$  receptora HGF ma aktywność kinazy tyrozynowej, stymulowanej przyłączeniem liganda [26–28]. Szczurze hepatocyty mają 500–600 receptorów o wysokim powinowactwie do HGF ( $K_d = 20$  pM) w przeliczeniu na jedną komórkę [29]. Obecność receptorów HGF wykazano w wielu tkankach, m.in. w wątrobie, śledzionie, nerkach, płucach i skórze [28,30].

Magazynem HGF podobnie jak wielu innych czynników wzrostowych są płytki krwi [13,31]. HGF jest mitogenem i chemoatraktantem głównie dla komórek epitelialnych i epidermalnych oraz inhibitorem wzrostu dla niektórych komórek transformowanych (czerniak B6/F1, wątrobiak HepG2) [32,33]. Dane te wskazują, że aktywność biologiczna HGF nie ogranicza się do hepatocytów i czynnik ten, podobnie jak inne czynniki wzrostowe, jest białkiem wielofunkcyjnym. Wybrane właściwości czynnika wzrostowego hepatocytów zebrano w tabeli 8.

TABELA 8. Wybrane właściwości czynnika wzrostowego hepatocytów (HGF)

Właściwość	Wartość
Masa cząsteczkowa	82 kDa
Podjednostki	$\alpha$ – 69 kDa, $\beta$ – 34 kDa
Inaktywacja	ogrzewanie (110°C przez 3 min) 1 M kwas octowy, ditiotreitol, trypsyna
Maksimum aktywności	60–90 pM
Addytywność działania	z EGF i insuliną
Swoistość gatunkowa	nieswoisty
Komórki produkujące	głównie komórki mezenchymalne
Komórki docelowe:	
stymulator wzrostu	hepatocyty, fibroblasty, melanocyty, keratynocyty, komórki epitelialne kanalików nerkowych
inhibitor	czerniak B6/F1, wątrobiak Hep G2
chemoatraktant	epitelialne komórki nerki, epidermalne keratynocyty, wątrobiak Hep G2
Receptor	produkt onkogenu <i>c-met</i> (m.c. 190 kDa, aktywność kinazy tyrozynowej)

## ROLA HGF W REGENERACJI WĄTROBY

Zdolność wątroby do regeneracji była znana już w starożytności, a eksperymentalny model regeneracji wątroby został opisany po raz pierwszy w roku 1931 [34]. Usunięcie 70% wątroby szczyrzej powoduje, że pozostałe komórki wątroby podejmują proliferację i po ok. 10 dniach narząd ten powraca do swojej początkowej wielkości i aktywności metabolicznej. Funkcjonalne jednostki wątroby ssaków zbudowane są z kilku rodzajów komórek: mięszszowych, odpowiedzialnych za swoiste funkcje metaboliczne (hepatocyty) i nieparenchymalnych (sinusoidalne komórki epitelialne, komórki Browicza-Kupffera, komórki Ito, fibroblasty), sta-

nowiących 30–40% całkowitej liczby komórek wątroby. Regeneracja hepatocytów rozpoczyna się już 30 minut po hepatektomii (dispersja ciałek zasadowych, pęcznienie mitochondriów). Synteza DNA wzrasta gwałtownie po 16–18 godzinach, osiąga maksimum między 20 a 24 godziną, po czym szybko spada. Maksimum aktywności mitotycznej występuje w 6 do 8 godzin po maksimum syntezy DNA. Mniej więcej w tym samym czasie (29–35 godzin po resekcji) obserwuje się ok. 100-krotny spadek połączeń międzykomórkowych (*gap junctions*) [35,36]. Jest to istotne, ponieważ z doświadczeń *in vitro* wynika, że gęste hodowle pierwotnych hepatocytów są niewrażliwe na działanie mitogenów, w przeciwieństwie do hodowli rzadkich. Udowodniono, że wrażliwość hepatocytów na stymulację mitogenną jest regulowana przez kontakt międzykomórkowy i zależna od obecności zlokalizowanych na powierzchni błony cząsteczek białka CSM (ang. – *Cell Surface Modulator*) [37,38]. Tak więc, uszkodzenie wątroby i spowodowany tym spadek połączeń międzykomórkowych mogą czynić hepatocyty zdolnymi do odpowiedzi na HGF.

Źródłem HGF w wątrobie są komórki nieparenchymalne, głównie komórki Browicza-Kupffera i sinusoidalne komórki epitelialne [39]. Ale maksimum ekspresji genu HGF w tych komórkach obserwowano po ok. 30 godzinach, podczas gdy poziom HGF w płucach, nerkach i śledzionie wzrastał gwałtownie po 6 godzinach, a w krwi już po 3 godzinach po hepatektomii [40,41]. Prawdopodobnie więc działanie HGF przebiega dwoma drogami: endokrynną (HGF uwalniany z płytek krwi, śledziony, płuc i nerek) oraz parakrynną (HGF syntetyzowany przez komórki wątroby). Nie wiadomo natomiast, jaki sygnał powoduje wzmożoną syntezę i sekrecję HGF w omawianych tkankach. Trudno również powiedzieć, jaki sygnał kończy proces regeneracji wątroby, chociaż problem ten leży u podstaw hipotezy naturalnych inhibitorów wzrostu, określanych nazwą chalone [42,43]. Wydaje się jednak, że w proces hamowania proliferacji hepatocytów zaangażowane są inne polipeptydy. Podczas izolacji HGF z płytek krwi uzyskano dwa inhibitory wzrostu hepatocytów: PDGI- $\alpha$  i PDGI- $\beta$  (ang. – *platelet derived growth inhibitor*) [44]. PDGI- $\beta$  okazał się identyczny z TGF $\beta$ 1, a PDGI- $\alpha$  – z peptydem o zbliżonej do TGF $\beta$  sekwencji aminokwasów. Dożylnie podanie TGF $\beta$ 1 hamuje wczesną fazę regeneracji wątroby (67% redukcji frakcji hepatocytów zaangażowanych w syntezę DNA po 22 godzinach), aczkolwiek nawet ciągle podawanie TGF $\beta$ 1 nie hamuje całkowicie procesu regeneracji [45]. Silnym inhibitorem wzrostu hepatocytów jest także interleukina 1 $\beta$  [46]. W odróżnieniu od transformującego czynnika wzrostowego IL-1 $\beta$  hamuje wzrost gęstych hodowli hepatocytów i jest produkowana m.in. przez komórki Browicza-Kupffera. Możliwe więc, że regeneracja wątroby jest hamowana dwutorowo w drodze endo- (TGF $\beta$ 1) i parakrynną (IL-1). Nie należy zapominać, że naturalnym procesem hamowania proliferacji hepatocytów w regenerującej wątrobie będzie wzrost połączeń międzykomórkowych i spadek wrażliwości na mitogeny. Mimo że przedstawiony powyżej zarys procesu regeneracji wątroby jest obrazem bardzo uproszczonym i niekompletnym, nie ulega dziś wątpliwości, że kluczową rolę w naprawie omawianej tkanki odgrywa czynnik wzrostowy hepatocytów.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] CHRISTENSEN BG, JACOBSEN E. *Acta Med Scand* 1949; **234** (Suppl.): 103–105.
- [2] BUCHER NLR, SCOTT JF, AUB JC. *Cancer Res* 1951; **11**: 457–462.
- [3] FISHER B, SZUCH P, LEVINE M, FISHER ERA. *Science* 1971; **171**: 575–577.
- [4] MOOLTEN CGD, BUCHER NRL. *Science* 1967; **158**: 272–274.
- [5] GRISHAM JW, LOENG GF, HOLE BW. *Cancer Res* 1964; **24**: 1474–1482.

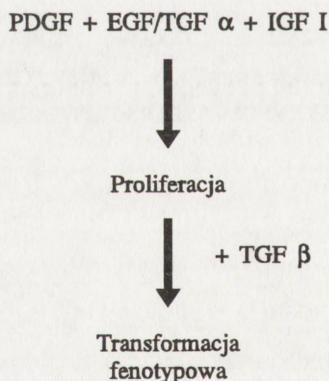
- [6] JIRTLE RL, MICHALOPOULOS G. *Cancer Res* 1982; **42**: 3000–3004.
- [7] MICHALOPOULOS G, HOUCK KA, DOLAN M., LUETTEKE NC. *Cancer Res* 1985; **45**: 2545–2549.
- [8] THALER J, MICHALOPOULOS G. *Cancer Res* 1985; **45**: 2545–2549.
- [9] NAKAMURA T, NAWA K, ICHIHARA A. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **122**: 1450–1459.
- [10] NAKAMURA T, TERAMOTO H, ICHIHARA A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 6489–6493.
- [11] WEIDER KM, BECHRENS J, VANDERCKHOWE J, BIRCHMEIER W. *J Cell Biol* 1990; **111**: 2097–2108.
- [12] HIGASHIO K, SHIMAN, GOTO M, ITAGAKI Y, NAGAO M, YASUDA H, MORINAGA T. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **170**: 397–404.
- [13] NAKAMURA T, NAWA K, ICHIHARA A, KAISE N, NISHINO T. *FEBS Lett* 1987; **224**: 311–316.
- [14] GOHDA E, TSUBOUCHI H, NAKAYAMA H, HIRONO S, SAKIYAMA O, TAKAHASHI K, MIYAZAKI H, HASHIMOTO S, DAIKUHARA Y. *J Clin Invest* 1988; **81**: 414–419.
- [15] ZARNEGAR R, MICHALOPOULOS G. *Cancer Res* 1989; **49**: 3314–3320.
- [16] TASHIRO K, HAGIYA M, NISHIZAWA T, SEKI T, SHIMONISHI M, SHIMIZU S, NAKAMURA T. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3200–3204.
- [17] OKAJIMA A, MIYAZAWA K, KITAMURA N. *Eur J Biochem* 1990; **193**: 375–381.
- [18] PETERSEN TE, MARTZEN MR, ICHINOSE A, DAVIE EW. *J Biol Chem* 1990; **265**: 6104–6111.
- [19] DEGEN SJF, DAVIE EW. *Biochemistry* 1987; **26**: 6165–6177.
- [20] MIYAZAWA K, KITAMURA A, NAKA D, KITAMURA N. *Eur J Biochem* 1991; **197**: 15–22.
- [21] GOHDA E, TSUBOUCHI H, NAKAYAMA H, HIRONO S, TAKAHASHI K, KOURA M, HASHIMOTO S, DAIKUHARA Y. *Exp Cell Res* 1986; **166**: 139–150.
- [22] RUBIN JS, CHAN AMN, BOTTARO DP i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 415–419.
- [23] BOTTARO DP, RUBIN JS, FALETTO DL, CHAN AM-L, KMIECIK TE, VAN DE WOUDE GF, AARONSON SA. *Science* 1991; **251**: 802–804.
- [24] TEMPEST PR, STRATTON MR, COOPER CS. *Br J Cancer* 1988; **58**: 3–9.
- [25] NAKAMURA T, NISHIZAWA T, HAGIYA M, SEKI T, SHIMONISHI M, SUGIMURA A, TASHIRO K, SHIMIZU S. *Nature* 1989; **342**: 440–449.
- [26] PARK M, DEAN M, KAUL K, BRAUN MJ, GONDA MA, VAN DE WOUDE GF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6379–6389.
- [27] GIORDANO S, PONZETTO G, DI RENZO MF, COOPER CS, COMOGLIO PM. *Nature* 1989; **339**: 155–156.
- [28] NALDINI L, VIGNA E, NARSIMHAN R, GAUDINO G, ZARNEGAR R, MICHALOPOULOS GK, COMOGLIO PM. *Oncogene* 1991; **6**: 501–504.
- [29] HIGUCHI O, NAKAMURA T. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **176**: 599–609.
- [30] TAJIMA H, HIGUCHI O, MIZUNO K, NAKAMURA T. *J Biol Chem* 1992; **267**: 401–406.
- [31] NAKAMURA T, TERAMOTO H, ICHIHARA A. *Cell Biol* 1986; **83**: 6489–6493.
- [32] MATSUMOTO K, NAKAMURA T. *Critical Rev Oncogenesis* 1992; **3**: 27–54.
- [33] MICHALOPOULOS GK, ZARNEGAR R. *Hepatology* 1992; **15**: 149–155.
- [34] HIGGINS GM, ANDERSON RM. *Arch Pathol* 1931; **12**: 186–190.
- [35] MEYER DJ, YANCY M, REVEL J-P. *J Cell Biol* 1981; **91**: 505–509.
- [36] TRAUB O, DRUGE PM, WILLECKE K. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 755–759.
- [37] NAKAMURA T, NAKAYAMA Y, ICHIHARA A. *J Biol Chem* 1984; **259**: 8056–8058.
- [38] NAKAMURA T, NAKAYAMA Y, TERAMOTO H, NAWA K, ICHIHARA A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6398–6402.
- [39] NOJI S, TASHIRO K, KOYAMA E, NOHNO T, OHYAMA K, TANIGUCHI S, NAKAMURA T. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **173**: 42–47.
- [40] KINOSHITA T, HIRAO S, MATSUMOTO K, NAKAMURA T. *Biochem Biophys Res Commun* 1991.; **177**: 330–335.
- [41] LIDROOS PM, ZARNEGAR R, MICHALOPOULOS GK. *Hepatology* 1991; **13**: 743–750.
- [42] SCAIFE JF. *Experientia* 1970; **26**: 1071–1072.
- [43] VERLY WG, DESCHAMPS V, PUSHATHAMADAM J i in. *Can J Biochem* 1971; **49**: 1376–1383.
- [44] NAKAMURA T, TERAMOTO H, TOMITA Y, ICHIHARA A. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **134**: 755–763.
- [45] RUSSEL WE, COFFEY RJ, QUELLETTE AJ, MOSES HL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5126.
- [46] NAKAMURA T, ARAKAKI R, ICHIHARA A. *Exp Cell Res* 1988; **179**: 488–497.

## IV. TRANSFORMUJĄCE CZYNNIKI WZROSTOWE TYPU $\beta$ (TGF $\beta$ s)

Transformujące czynniki wzrostu (TGFs) zostały odkryte w roku 1978 przez DeLarco i Todaro [1] w płynie hodowlanym fibroblastów mysich transformowanych wirusem Mo-RSV. Nazwa "czynnik transformujący" została zaproponowana ze względu na zdolność tych związków do odwracalnej, fenotypowej transformacji prawidłowych fibroblastów [2]. Niektóre, ustalone linie komórek prawidłowych (głównie pochodzenia mezenchymalnego), poddane działaniu TGFs wykazywały:

- utratę zahamowania kontaktowego i wzrost wielowarstwowy,
- zmianę morfologii na typową dla komórek transformowanych,
- zdolność do wzrostu niezależnego od przyczepienia do podłoża, charakterystyczną dla większości komórek nowotworowych.

TGFs wyizolowano z płynów hodowlanych różnych komórek transformowanych wirusowo i chemicznie, nowotworowych linii komórkowych oraz prawidłowych komórek embrionalnych i dorosłych różnych gatunków ssaków [3,4,5]. Różnice w właściwościach chemicznych i aktywności biologicznej wskazywały, że istnieją różne typy TGFs. Podstawowym kryterium, które posłużyło do klasyfikacji TGFs było podobieństwo strukturalne i współdziałanie z EGF. A. Roberts i wsp. [3] zaproponowali podział TGFs na trzy typy czynników:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . TGF $\alpha$  są homologiczne do EGF i działają poprzez receptor tego czynnika wzrostu. TGF $\beta$  nie działają poprzez receptor EGF, ale wymagają obecności EGF dla optymalnej stymulacji wzrostu klonalnego. Natomiast TGF $\gamma$  nie działają poprzez receptor EGF i nie wymagają obecności EGF do stymulacji wzrostu niezależnego od przyczepienia do podłoża. Istotną cechą TGFs jest ich synergistyczne działanie. Maksymalna odpowiedź komórek NRK-49F (maksymalna liczba dużych kolonii rosnących w półpłynnym środowisku) wymaga obecności zarówno TGF $\alpha$ , jak i TGF $\beta$ . Przyjmuje się, że w zależności od rodzaju komórek docelowych stymulacja wzrostu klonalnego może być uzależniona od współdziałania z innymi czynnikami (egzogennymi lub endogennymi) wzrostowymi, takimi jak PDGF czy IGFs. Hipotetyczny model takiego współdziałania przedstawiono na rysunku 13.



Rys. 13. Współdziałanie czynników wzrostowych (PDGF, EGF/TGF $\alpha$ , IGF I i TGF $\beta$ ) w stymulacji niezależnego od przyczepiania do podłoża wzrostu komórek prawidłowych

Mechanizm stymulacji wzrostu niezależnego od przyłączenia do podłoża jest nieznany. Transformujący czynnik wzrostu typu  $\alpha$  został omówiony w rozdziale II.1., natomiast czynniki zaliczane do typu  $\gamma$  są dotychczas słabo scharakteryzowane strukturalnie i nie będą omawiane w niniejszej monografii. Niewątpliwie najciekawszą grupą transformujących czynników wzrostowych są peptydy zaliczane do typu  $\beta$ , przede wszystkim ze względu na niespotykaną, wielokierunkową aktywność biologiczną.

### SYNTEZA I SEKRECJA TGF $\beta$ s

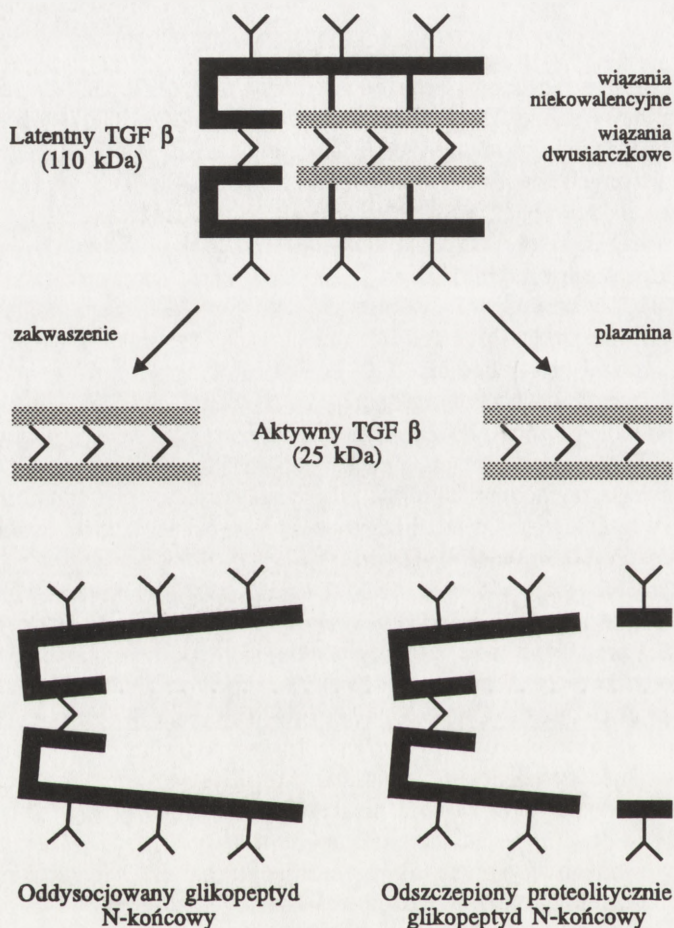
Dotychczas ustalono strukturę trzech homodimerycznych (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 i TGF $\beta$ 3) oraz jednego heterodimerycznego (TGF $\beta$ 1,2) czynnika o aktywności TGF $\beta$ . Wszystkie są peptydami o m.c. 25 kDa zbudowanymi z dwóch podjednostek o m.c. 12,5 kDa (112 aminokwasów), połączonych mostkami dwusiarczkowymi [6–8]. TGF $\beta$ 1 został pierwotnie wyizolowany z ludzkich płytek krwi, które pełnią rolę swoistego magazynu tego czynnika, podobnie jak to ma miejsce w przypadku PDGF [9]. Z płytek krwi świńskiej został wyosobniony TGF $\beta$ 2, identyczny z inhibitorem wzrostu BSC-1 wyizolowanym z nerki zielonej małpy afrykańskiej [10]. Ten sam peptyd wyizolowano z komórek adenokarcinomy [11] i glioblastomy [12]. Wykazano, że TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 2 są identyczne z czynnikami indukującymi wzrost chrząstki, określanymi pierwotnie jako CIF A i CIF B (ang. – *cartilage-inducing factors*) [13,14]. TGF $\beta$ 3 wyizolowano z komórek chondrocytów kurzych [6]. Wszystkie TGF $\beta$  wykazują ok. 70% podobieństwa w sekwencji aminokwasowej oraz bardzo podobną aktywność biologiczną. TGF $\beta$ s wykazują ponadto pewne podobieństwo strukturalne (28–38% homologii) do C-końcowego fragmentu inhibitora Mulleriana (substancji powodującej regresję kanałika Mulleriana w trakcie rozwoju układu reprodukcyjnego samców) oraz do aktywin i inhibin, które regulują sekrecję hormonu FSH [15,16].

TGF $\beta$  są syntetyzowane w formie nieaktywnej cząsteczki prekursorowej zbudowanej z 391 reszt aminokwasowych. Peptyd sygnałowy (29 reszt aminokwasowych) jest odcinany podczas przejścia prekursora przez błony szorstkiej siateczki endoplazmatycznej. Inne posttranslacyjne modyfikacje (glikozylacja, fosforylacja i dimeryzacja) mają miejsce przed sekrecją peptydu w błonach aparatu Golgiego [17,18]. Dojrzały, aktywny dimer TGF $\beta$  (m.c. 25 kDa) jest w płytkach krwi niekowalencyjnie związany z pozostałą częścią prekursora (m.c. 75–85 kDa), a całość kowalencyjnie związana z białkiem nośnikowym o m.c. 135 kDa [19,20] i uwalniana do krążenia w formie nieaktywnego kompleksu. Wiele komórek syntetyzuje i wydziela TGF $\beta$  w formie latentnego kompleksu o m.c. 110 kDa [21,22]. Kompleks ten może być aktywowany *in vitro* przez zakwaszenie (pH <4), traktowanie czynnikami chaotropowymi (SDS, mocznik), proteazami lub glikozydazami [22–25]. Na podstawie doświadczeń prowadzonych na komórkach CHO Lyons i wsp. [26] zaproponowali model aktywacji latentnej formy TGF $\beta$  działaniem plazminy (rys.14). Wydaje się prawdopodobne, że fizjologiczna aktywacja TGF $\beta$  uwalnianego z płytek krwi przebiega podobnie, bowiem obecność białka nośnikowego nie ma wpływu na uwalnianie dojrzałego TGF $\beta$  działaniem plazminy. Ponieważ TGF $\beta$  stymuluje w komórkach tkanki łącznej produkcję inhibitora aktywatora plazminogenu oraz obniża aktywność aktywatora plazminogenu [27–29], mechanizm ten mógłby kontrolować poziom TGF $\beta$  na zasadzie sprzężenia zwrotnego [20].

Aktywna cząsteczka TGF $\beta$  może wiązać się do swoistych receptorów komórkowych lub do rozpuszczalnych białek, takich jak: fibronektyna [30] lub  $\alpha_2$ -makroglobulina [31,32]. Wykazano, że głównym białkiem wiążącym osocza krwi dla TGF $\beta$  jest  $\alpha_2$ -makroglobulina



[31]. Ponieważ kompleks  $TGF\beta$ - $\alpha_2M$  jest biologicznie nieaktywny [31,32],  $\alpha_2$ -makroglobulina może przenosić  $TGF\beta$  do komórek docelowych, gdzie uwolniony czynnik wywiera swój efekt biologiczny. Prawdopodobne jest także, że kompleks  $TGF\beta$ - $\alpha_2M$  kierowany jest do komórek mających receptory dla  $\alpha_2$ -makroglobuliny (makrofagi, hepatocyty) i w ten sposób nadmiar  $TGF\beta$  jest usuwany z krążenia [33].



Rys. 14. Schemat niefizjologicznej (zakwaszenie środowiska) i fizjologicznej (działanie plazminy) aktywacji latentnej formy  $TGF\beta$  (wg [26] za zgodą autora)

### RECEPTORY $TGF\beta$

Obecność receptorów dla  $TGF\beta$  stwierdzono w błonach cytoplazmatycznych bardzo wielu różnych typów komórek [34,35]. Wykazano istnienie trzech klas receptorów dla transformujących czynników typu  $\beta$ , różniących się strukturą i powinowactwem do liganda [6,36].

Receptory klasy I (m.cz. 65 kDa) i II (m.cz. 85–110 kDa) wiążą TGFβ1 z wyższym powinowactwem niż TGFβ2. Natomiast, receptor klasy III jest proteoglikanem o m.cz. ok. 600 kDa, zbudowanym z dwóch podjednostek (280–330 kDa) powiązanych mostkami dwusiarczkowymi. Receptory tej klasy wiążą TGFβ1 i TGFβ2 z podobnym powinowactwem. Mechanizm przeniesienia sygnału z udziałem receptorów dla TGFβ jest niejasny. Sugerowano istnienie wielu układów efektorowych, stymulowanych działaniem TGFβ, takich jak: cyklaza adenylationowa, fosfolipaza C czy białka regulujące funkcjonowanie kanałów jonowych [37]. Przypuszczalnie, czynniki wzrostowe należące do rodziny TGFβ mogą uruchamiać zależną bądź niezależną od białek G drogę przekazywania sygnału [38], a efekt ostateczny zależy od typu komórek docelowych.

### AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA TGFβ

Badania prowadzone w hodowlach tkankowych wskazują, że peptydy zaliczane do rodziny TGFβ mają bardzo szeroki zakres działania. Efekt końcowy zależy od rodzaju komórek docelowych i obecności innych czynników regulacyjnych w medium hodowlanym. Podstawowe kierunki działania TGFβ można w uproszczeniu sprowadzić do następujących efektów:

(a) stymulacja niezależnego od przyoczenia do podłoża wzrostu prawidłowych fibroblastów,

(b) stymulacja wzrostu komórek mezenchymalnych,

(c) inhibicja wzrostu większości komórek epitelialnych i prekursorowych komórek krwi,

(d) regulacja różnicowania wielu różnych rodzajów komórek,

(e) modulacja odpowiedzi immunologicznej.

Początkowo sądzono, że TGFβ jest typowym mitogenem, mającym ponadto zdolność do fenotypowej transformacji komórek prawidłowych. Później wykazano, że aktywność transformująca ograniczona jest do linii komórkowych pochodzenia mezenchymalnego [39,40]. Badania prowadzone na prawidłowych komórkach epitelialnych i epidermalnych dowiodły, że TGFβ jest efektywnym inhibitorem ich wzrostu [41–43]. Również dla większości komórek nowotworowych TGFβ jest inhibitorem wzrostu [44–46]. Trudno odpowiedzieć na pytanie, jaki jest mechanizm hamowania wzrostu komórkowego. Istnieje wiele hipotez, z których co najmniej kilka ma uzasadnienie doświadczalne. Jedną z najlepiej udokumentowanych jest indukowana TGFβ transmodulacja receptorów innych czynników wzrostowych, obniżająca odpowiedź komórki na fizjologiczną stymulację wzrostu [47,48]. Wykazano również, że odpowiedź progenitorowych komórek krwi na hamujące wzrost działanie TGFβ zależy od stopnia ich zróżnicowania i związana jest z liczbą receptorów TGFβ na ich powierzchni [49,50]. Przypuszcza się, że transformacja nowotworowa może obniżać liczbę receptorów błonowych dla TGFβ i w ten sposób uwalniać komórki nowotworowe spod fizjologicznej kontroli wzrostu, której podlegają komórki prawidłowe [51].

Mechanizm stymulacji wzrostu komórek mezenchymalnych działaniem TGFβ jest prawdopodobnie unikalny spośród wszystkich znanych czynników wzrostowych. Wykazano, że kinetyka wzrostu komórek mysich AKR-2B stymulowanych TGFβ jest różna od obserwowanej dla klasycznych czynników wzrostowych [52]. W przypadku działania PDGF, EGF, FGF lub insuliny synteza DNA w komórkach AKR-2B rozpoczynała się po ok. 12 godzinach i osiągała maksimum między 20 a 25 godziną inkubacji. Natomiast w przypadku TGFβ synteza DNA rozpoczynała się po 20–24 godzinach i osiągała maksimum między 30 a 35 godziną inkubacji. Obserwowane opóźnienie w stymulacji syntezy DNA sugerowało, że TGFβ nie jest

czynnikiem wzrostu dla badanych komórek, a stymuluje ich wzrost pośrednio. Hipotezę taką potwierdziły doświadczenia o indukowanej TGF $\beta$  ekspresji protoonkogenu *c-sis*, kodującego łańcuch B płytkowego czynnika wzrostowego [53]. Pierwsze peptydy PDGF-podobne pojawiały się w płynie hodowlanym po 8 godzinach osiągając najwyższy poziom po 16 godzinach od momentu dodania TGF $\beta$ . Uzyskane wyniki wykazały, że właściwym mitogenem dla komórek AKR-2B jest produkt genu *c-sis* a nie TGF $\beta$ .

Zainteresowanie TGF $\beta$  wzrosło znacznie po obserwacji, że ma on *in vitro* silną aktywność immunoregulatorową. Dane uzyskane dotychczas wskazują, że jest on związkiem oddziaływującym z różnymi uczestnikami układu immunologicznego (tab. 9).

TABELA 9. Aktywność immunoregulacyjna transformującego czynnika wzrostowego typu  $\beta$

Efekt biologiczny	Piśmiennictwo
Inhibicja proliferacji limfocytów	54–56
Inhibicja proliferacji limfocytów T i B	57,58
Inhibicja produkcji IgM i IgG	59,60
Stymulacja produkcji IgA	23,61
Inhibicja produkcji cytokin	62
Inhibicja aktywności komórek NK	63
Inhibicja rozwoju cytotoksycznych komórek T	64–66
Inhibicja aktywności LAK	65,67
Inhibicja chemotaksji monocytów	68
Obniżenie zdolności makrofagów do uwalniania H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , aktywności cytotoksycznej, ekspresji antygenów klasy II	69,70

Zarówno szeroki zakres aktywności immunoregulacyjnej, jak i wysoka aktywność biologiczna TGF $\beta$  (rzędu 10<sup>-12</sup>M) sprawiają, że peptyd ten jest uważany powszechnie za jeden z najsilniejszych fizjologicznych czynników immunosupresyjnych [71–73]. Jeśli do tego dodamy zdolność TGF $\beta$  do selektywnej inhibicji wzrostu i różnicowania komórek hematopoetycznych [74], łatwo zrozumieć, dlaczego wielu autorów uważa ten czynnik za jedną z ważniejszych cytokin. Zwłaszcza że wiele komórek obrony immunologicznej (monocyty, makrofagi, limfocyty T) syntetyzuje i uwalnia do otoczenia TGF $\beta$  w formie aktywnej [57,75,76]. Zwraca uwagę także fakt, że działanie TGF $\beta$  jest dokładnie przeciwstawne do wpływu czynnika nekrozy nowotworu (TNF $\alpha$ ) na komórki układu immunologicznego [67]. Ponieważ wiele różnych komórek nowotworowych wydziela TGF $\beta$  (patrz rozdział VIII), podniesiony poziom tego białka może być odpowiedzialny za obniżenie odporności immunologicznej, obserwowane w niektórych chorobach nowotworowych [77].

W trakcie ostatnich kilku lat nagromadzono szereg dowodów doświadczalnych potwierdzających wpływ TGF $\beta$  na różnicowanie komórek ssaków (tab. 10). Mnogość efektów obserwowanych w doświadczeniach *in vitro* wskazywała, że podstawową funkcją TGF $\beta$  może być regulacja różnicowania komórkowego. Przyjęcie takiej hipotezy wymagało odpowiedzi na dwa podstawowe pytania: czy działanie *in vitro* znajduje potwierdzenie w warunkach *in vivo* oraz jaki jest mechanizm stymulacji bądź inhibicji różnicowania?

Chociaż udowodniono, że TGF $\beta$  reguluje *in vitro* różnicowanie ponad 20 różnych rodzajów komórek, przeniesienie wyników uzyskanych w hodowlach tkankowych na cały organizm wymaga ostrożności. Przykładowo, w warunkach *in vitro* TGF $\beta$  hamuje różnicowanie komórek endotelialnych i wydawałoby się, że powinien on również hamować angiogene-

nezę *in vivo*. Tymczasem, Roberts i wsp. [90] wykazali, że czynnik ten wstrzyknięty podskórnie noworodkom mysim stymuluje wzrost tkanki naczyniowej. Wydaje się prawdopodobne, że obserwowane różnice w aktywności *in vitro* i *in vivo* są między innymi spowodowane oddziaływaniem TGF $\beta$  z innymi komórkami tkanki naczyniowej lub z innymi czynnikami regulującymi angiogenezę. I tak, TGF $\beta$  może oddziaływać zarówno bezpośrednio z komórkami endotelialnymi, modulując działanie innych czynników wzrostowych (np. hamując działanie typowych czynników angiogennych, takich jak FGFs) [91,92] lub pośrednio, stymulując syntezę i uwalnianie czynników wzrostowych, takich jak TNF $\alpha$  czy PDGF przez inne rodzaje komórek [93,94].

TABELA 10. Wpływ TGF $\beta$  na różnicowanie komórek ssaków *in vitro*

Komórki lub proces	Efekt działania	Piśmiennictwo
Keratynocyty	stymulacja	78
Komórki epitelialne:		
oskrzeli	tymulacja	79
jelita	stymulacja	80
Komórki Leydiga	hamowanie sterydogenezy	81,82
Komórki kory nadnerczy	hamowanie sterydogenezy	83,84
Komórki mięśni szkieletowych	hamowanie	85
Adipogeneza	hamowanie	86
Miogeneza	hamowanie	87,88
Chondrogeneza	stymulacja/hamowanie	89

Pytaniem obecnie najważniejszym jest nie czy, ale jak TGF $\beta$  reguluje różnicowanie komórek. Wiele różnych mechanizmów jest prawdopodobnie zaangażowanych w ten proces. Jednym z nich jest supresja lub promocja różnicowania poprzez wpływ na matriks pozakomórkową. TGF $\beta$  stymuluje syntezę licznych białek matriks pozakomórkowej (kolagen, fibronektyna, proteoglikany), a także obniża aktywność proteinaz tkanki łącznej, takich jak: kolagenaza, stromelizyna czy aktywator plazminogenu [95–100].

Wykazano m.in., że dodatek TGF $\beta$  do hodowli mioblastów, preadipocytów i chondrocytów stymuluje produkcję fibronektyny [101–103], zaś sama fibronektyna hamuje różnicowanie badanych komórek [103–105]. Podobnie, TGF $\beta$  stymuluje syntezę i sekrecję fibronektyny w komórkach endotelialnych, natomiast zarówno TGF $\beta$ , jak i fibronektyna hamują wzrost tych komórek *in vitro* [106]. Kolejnym pytaniem jest: w jaki sposób matriks pozakomórkowa może wpływać na proces różnicowania komórkowego. Wiadomo, że matriks pozakomórkowa oddziałuje na powierzchnię komórki, co z kolei wpływa na syntezę RNA i białek. W klasycznych już dziś doświadczeniach wykazano, że komórki prawidłowe, hodowane w zawieszynie drastycznie obniżają syntezę RNA, a synteza białek spada, nawet o 80% [107]. Udowodniono także, że powierzchnia komórki wpływa na proliferację komórek i na ich odpowiedź na czynniki wzrostowe [108]. Przykładowo, Madri i wsp. [106] wykazali, że TGF $\beta$  nie hamuje wzrostu komórek endotelialnych rosnących trójwymiarowo na podłożu kolagenowym, natomiast hamuje wzrost tych komórek w monowarstwie. Tak więc, czynniki wzrostowe i matriks pozakomórkowa mogą tworzyć układ naczyń połączonych, w których czynniki wzrostowe regulują produkcję białek matriks pozakomórkowej, a ta z kolei wpływa na odpowiedź komórki na działanie czynników wzrostowych.

Określenie "TGFβs" obejmuje stale rosnącą liczbę peptydów, które łącznie tworzą superrodzinę czynników wzrostowych o niezwykłych właściwościach [109,110]. Zakres aktywności różnych członków tej rodziny jest bardzo szeroki, a wszechstronność ich działania przewyższa jakąkolwiek inną, znaną grupę hormonów. Peptydy te mogą regulować tak różne procesy, jak: wzrost tkanek, fibroza, gojenie ran, angiogeneza, odpowiedź immunologiczna, formowanie kości, hematopoeza, rozwój embrionalny czy morfogeneza [109]. Jednym z najbardziej fascynujących aspektów działania TGFβs jest fakt, że mogą one różnie czy wręcz przeciwnie wpływać na ten sam proces biologiczny, zależnie od rodzaju komórek docelowych. Co więcej, efekt działania tych czynników na ten sam typ komórek zależy od ich stopnia zróżnicowania, kondycji metabolicznej i interakcji z innymi czynnikami regulacyjnymi. W końcu, TGFβs mogą równocześnie regulować wiele procesów biochemicznych w tej samej komórce docelowej. Dlatego tak trudno określić funkcję fizjologiczną tej grupy czynników i dlatego związki te określane są często jako czynniki "warunkowe"[110].

Z uwagi na wszechstronność działania i powszechność występowania TGFβs jest zrozumiałe, że ich aktywność musi być regulowana bardzo precyzyjnie. To prawdopodobnie jest przyczyną rzadko spotykanej, wielostopniowej regulacji aktywności biologicznej na poziomie syntezy, sekrecji, uwalniania z nieaktywnego kompleksu oraz wiązania TGFβs ze swoistymi białkami nośnikowymi.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] DELARCO JE, TODARO GJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 4001–4005.
- [2] SPORN MB, NEWTON DL, ROBERTS AB, DELARCO JE, TODARO GJ. [W:] "Molecular actions and targets for cancer chemotherapeutic agents, A.C. Sartorelli, J.S. Lazo, J.R. Bertino (red.) Academic Press, New York, 1988; 541–554.
- [3] ROBERTS AB, FROLIK CA, ANZANO MA, SPORN MB. *Federation Proc* 1983; **42**: 2621–2626.
- [4] SPORN MB, ROBERTS AB, WAKEFIELD LM, ASSOIAN RK. *Science* 1986; **233**: 532–534.
- [5] ROBERTS AB, SPORN MB. *Adv Cancer Res* 1988; **51**: 107–145.
- [6] CHEIFETZ S, WEATHERBEE JA, TSANG M.L.S, ANDERSON JK, MOLEE, LUCAS R, MASSAQUE J. *Cell* 1987; **48**: 409–415.
- [7] TEN DJIKE P, HANSEN P, IWATA KK, PIELER C, FOULKES JG. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4715–4719.
- [8] MASSAQUE J. *Cell* 1987; **49**: 437–438.
- [9] ASSOIAN RK, KOMORIYA A, MEYERS CA, MILLER DM, SPORN MB. *J Biol Chem* 1983; **258**: 7155–7160.
- [10] TUCER RF, SHIPLEY GD, MOSES HL, HOLLEY RW. *Science* 1984; **226**: 705–707.
- [11] IKEDA T, LIOBIN MM, MARQUARDT H. *Biochemistry* 1987; **26**: 2406–2410.
- [12] DEMARTIN R, HAENDLER B, HOFER-WARBINEK R i in. *EMBO J* 1987; **6**: 3673–3677.
- [13] SEYEDIN SM, THOMPSON AY, BENTZ H i in. *J Biol Chem* 1986; **261**: 5693–5695.
- [14] SEYEDIN SM, SEGARINI PR, ROSEN DM, THOMPSON AY, BENTZ H, GRAYCAR J. *J Biol Chem* 1987; **262**: 1946–1949.
- [15] HSUAN JJ. *Br Med Bull* 1989; **45**: 425–437.
- [16] BARNARD JA, LYONS RM, MOSES HL. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1032**: 79–87.
- [17] BRUNNER AM, GENTRY LE, COOPER JA, PURCHIO AF. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 2229–2232.
- [18] WENTRY LE, LIOUBIN MN, PURCHIO AF, MARQUARDT H. *Moll Cell Biol* 1988; **8**: 4162–4168.
- [19] WAKEFIELD LM, SMITH DM, FLANDERS KC, SPORN MB. *J Biol Chem* 1988; **263**: 7646–7654.
- [20] MIYAZANO K, HELLMAN U, WERNSTEDT C, HELDIN C-H. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6407–6415.
- [21] LAWRENCE DA, PISCHER R, KRYCEVE-MARTINERIE C, JULLIEN P. *J Cell Physiol* 1984; **121**: 184–188.
- [22] LYONS RM, KESKI-OJA J, MOSES H. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1659–1665.
- [23] BROWN PD, WAKEFIELD LM, LEVINSON AD, SPORN MB. *Growth Factors* 1990; **3**: 35–39.
- [24] MIYAZANO K, HELDIN C-H. *Nature* 1989; **338**: 158–160.
- [25] TAIPALE J, KOLI K, KESKI-OJA J. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25378–25384.
- [26] LYONS RM, GENTRY LE, PURCHIO AF, MOSES HL. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1361–1367.
- [27] LAIHO M, SAKSELA O, ANDREASEN PA, KESKI-OJA J. *J Cell Biol* 1986; **103**: 2403–2410.

- [28] KESKI-OJA J, BLASI JF, LEOF EB, MOSES HL. *J Cell Biol* 1988; **106**: 451–459.
- [29] THALACKER FW, NILSEN-HAMILTON M. *Biochem J* 1992; **287**: 855–862.
- [30] MOORADIAN DL, LUCAS RC, WEATHERBEE JA, FURCHT LT. *J Cell Biochem* 1989; **41**: 189–200.
- [31] O'CONNOR-MCCOURT MD, WAKEFIELD LM. *J Biol Chem* 1987; **262**: 14090–14099.
- [32] HUANG SS, O'GRADY P, HUANG JS. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1535–1541.
- [33] LAMARRE J, HAYES MA, WOLLENBERG GK, HUSSAINI I, HALL SW, GONIAS SL. *J Clin Invest* 1991; **87**: 39–44.
- [34] MASSAQUE J, LIKE B. *J Biol Chem* 1985; **260**: 2636–2645.
- [35] WAKEFIELD LM, SMITH DM, MASUI T, HARRIS CC, SPORN MB. *J Cell Biol* 1987; **105**: 965–975.
- [36] MASSAQUE J. *Methods Enzymol* 1987; **146**: 174–195.
- [37] OLASHAW NE, PLEDGER WJ. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1988; **22**: 139–173.
- [38] HOWE PH, BASCOM CHC, CUNNINGHAM MR, LEOF EB. *Cancer Res* 1989; **49**: 6024–6031.
- [39] HAMEL E, KATOH F, MUELLER G, BIRCHMEIER W, YAMASAKI H. *Cancer Res* 1988; **48**: 2832–2836.
- [40] JULLIEN P. *J Cell Physiol* 1988; **136**: 175–181.
- [41] KESKI-OJA J, MOSES HL. *Med Biol* 1987; **65**: 13–20.
- [42] LIN P, LIU C, TSAO M-S, GRISHAM JW. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **143**: 26–30.
- [43] BARNARD JA, BASCOM CC, LYONS RM, SIPES NJ, MOSES HL. *Am J Med Sci* 1988; **31**: 159–163.
- [44] GOMELLA LG, SARGENT ER, LINEHAN WM, KASID A. *J Urol* 1989; **141**: 1240–1244.
- [45] KELLER JR, MANTEI C, SING GK, ELLINGSWORTH LR, RUSCETTI SK, RUSCETTI FW. *J Exp Med* 1988; **168**: 737–750.
- [46] KNABBE C, LIPPMAN ME, WAKEFIELD LM, FLANDERS KC, KASID A, DERYNCK R, DICKSON RB. *Cell* 1987; **48**: 417–428.
- [47] DUBOIS CM, RUSCETTI FW, PALASZYNSKI E, FALK L, OPPENHEIM J, KELLER JR. *J Exp Med* 1990; **172**: 737–744.
- [48] JACOBSEN SE, RUSCETTI FW, DUBOIS CM, LEE J, BOONE TC, KELLER JR. *Blood* 1991; **77**: 1706–1716.
- [49] SING GK, KELLER JR, ELLINGSWORTH LR, RUSCETTI FW. *Blood* 1988; **72**: 1504–1511.
- [50] KELLER JR, MCNIECE L, SILL K, ELLINGSWORTH LR, QUESENBERRY P, SING GK, RUSCETTI FW. *Blood* 1990; **75**: 596–602.
- [51] KESKI-OJA J, LEOF EB, LYONS RM, COFFEY RJ, MOSES HL. *J Cell Biochem* 1987; **33**: 95–107.
- [52] SHIPLEY GD, TUCKER RF, MOSES HL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 4147–4151.
- [53] FERNANDEZ-POL JA, KLOS DJ, GRANT GA. *Cancer Res* 1986; **46**: 5153–5161.
- [54] ELLINGSWORTH LR, NAKAYAMA D, SEGARINI P, DASCH J, CARRILLO P, WAEGELL W. *Cell Immunol* 1988; **114**: 41–54.
- [55] KIM KJ, ABRAMS J, ALPHONSO M, PEARCE M, THORBECKE GJ, PALLADINO MA. *Cell Immunol* 1990; **131**: 261–271.
- [56] CHANTRY D, TURNER M, FELDMANN M. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 783–790.
- [57] KEHRL JH, WAKEFIELD LM, ROBERTS AB, JAKOWLEW S, ALVAREZ-MONM, DERYNCK R, SPORN MB, FAUCI AS. *J Exp Med* 1986; **163**: 1037–1050.
- [58] KEHRL JH, ROBERTS AB, WAKEFIELD LM, JAKOWLEW S, SPORN MB, FAUCI AS. *J Immunol* 1986; **137**: 3855–3860.
- [59] KEHRL JH, TAYLOR AS, DELSING GA, ROBERTS AB, SPORN MB, FAUCI AS. *J Immunol* 1989; **143**: 1868–1874.
- [60] PALLADINO MA, MORRIS RE, STARNES HF, LEVINSON AD. *Ann NY Acad Sci* 1990; **593**: 181–196.
- [61] COFFMAN RL, LEBMAN DA, SHRADER B. *J Exp Med* 1989; **170**: 1039–1044.
- [62] ESPEVIK T, FIGARI IS, SHALABY MR, LACKIDES GA, LEVIS GD, SHEPARD HM, PALLADINO MA. *J Exp Med* 1987; **166**: 571–576.
- [63] ROOK AH, KEHRL JH, WAKEFIELD LM, ROBERTS AB, SPORN MB, BURLINGTON DB, LANE HC, FAUCI AS. *J Immunol* 1986; **136**: 3916–3920.
- [64] RANGES GE, FIGARI IS, ESPEVIK T, PALLADINO MA. *J Exp Med* 1987; **166**: 991–998.
- [65] MULEJJ, SCHWARZSL, ROBERTS AB, SPORN MB, ROSENBERG SA. *Cancer Immunol Immunother* 1988; **26**: 95–103.
- [66] FONTANA A, FREI K, BODMER S, HOFER E, SCHREIER MH, PALLADINO MA, ZINKERNAGEL RM. *J Immunol* 1989; **143**: 3230–3234.
- [67] ESPEVIK T, FIGARI IS, RANGES GE, PALLADINO MA. *J Immunol* 1988; **140**: 2312–2316.
- [68] WAHL SM, HUNT DA, WAKEFIELD LM, FRANCIS-MCCARTNEY N, WAHL LM, ROBERTS AB, SPORN MB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5788–5792.
- [69] TSUNAWAKI S, SPORN MB, DING A, NATHAN C. *Nature* 1988; **334**: 260–262.

- [70] CZARNIECKI CW, CHIU HH, WONG GHW, MCCABE SM, PALLADINO MA. *J Immunol* 1988; **140**: 4217–4223.
- [71] SCHALCH L, RORDORF-ADAM C, DARCH JR, JUNGI TW. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 885–891.
- [72] FONTANA A, CONSTAM DB, FREI K, MALIPIERO U, PFISTER HW. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; **99**: 1–7.
- [73] MOORE SC, SHAW MA, SODERBERG LSF. *J Leukocyte Biol* 1992; **52**: 596–601.
- [74] KELLER JR, SING GK, ELLINGSWORTH LR, RUSCETTI FW. *J Cell Biochem* 1989; **39**: 175–184.
- [75] SAGE H, VERNON RB, FUNK SE, EVERITT EA, ANGELLO J. *J Cell Biol* 1989; **109**: 341–356.
- [76] WAHL SM, HUNT DA, BANSAH G, MCCARTNEY-FRANCIS N, ELLINGSWORTH L, ALLEN JB. *J Exp Med* 1988; **168**: 1403–1417.
- [77] WRANN M, BODMER S, DE MARTIN R, SIEPL C, HOFER-WARBINEK R, FREI K, HOFER E, FONTANA A. *EMBO J* 1987; **6**: 1633–1636.
- [78] REISS M, SARTORELLI AC. *Cancer Res* 1987; **47**: 6705–6709.
- [79] MASUI T, WAKEFIELD LM, LECHNER JF, LA VECK MA, SPORN MB, HARRIS CC. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2438–2442.
- [80] KUROKOWA M, LYNCH K, PODOLSKY DK. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **142**: 775–782.
- [81] AVALLET O, VIGIER M, PERRARD-SAPORI MH, SAEZ JM. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 575–581.
- [82] LIN T, BLAISDELL J, HASKELL JF. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 387–394.
- [83] HOTTA M, BAIRD A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7795–7799.
- [84] FEIGE JJ, COCHET C, RAINEY WE, MADANI C, CHAMBAZ EM. *J Biol Chem* 1987; **262**: 13491–13495.
- [85] ALLEN RE, BOXHORN LK. *J Cell Physiol* 1987; **133**: 567–572.
- [86] IGNOTZ RA, MASSAGUE J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8530–8534.
- [87] MASSAGUE J, CHEIFETZ S, ENDO T, NADAL-GINARD B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 8206–8210.
- [88] OLSON EN, STERNBERG E, HU JS, SPIZZ G, WILCOX C. *J Cell Biol* 1986; **103**: 1799–1805.
- [89] ROSEN DM, STEMPIEN SA, THOMPSON AY, SEYEDIN SM. *J Cell Physiol* 1988; **134**: 337–346.
- [90] ROBERTS AB, SPORN MB, ASSOIAN RK i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 4167–4171.
- [91] MULLER G, BEHRENS J, NUSSBAUMER U, BOHLEN P, BIRCH-MEIER W. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5600–5604.
- [92] SAKSELA O, MOSCATELLI D, RIFKIN DB. *J Cell Biol* 1987; **105**: 957–963.
- [93] WAHL SM, HUNT DA, WAKEFIELD LM, MCCARTNEY-FRANCIS N, WAHL LM, ROBERTS AB, SPORN MB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5788–5792.
- [94] LEOF EB, PROPER JA, GOUSTIN AS, SHIPLEY GD, DICORLETO PE, MOSES HL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 2453–2457.
- [95] CENTRELLA M, CASINGHIO S, IGNOTZ R, MCCARTHY TL. *Endocrinology* 1992; **131**: 2863–2872.
- [96] FINE A, GOLDSTEIN RH. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3897–3902.
- [97] BASSOLS A, MASSAGUE J. *J Biol Chem* 1988; **263**: 3039–3045.
- [98] CHEN J-K, HOSHI H, MCKEEHAN WL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5287–5291.
- [99] KESKI-OJAJ, RAGHOWR, SAWDEY M, LOSKUTOFF DJ, POST-LETHWAITE AE, KANG AH, MOSES HL. *J Biol Chem* 1988; **263**: 3111–3115.
- [100] EDWARDS DR, MURPHY G, REYNOLDS JJ, WHITHAM SE, DOCHERTY AJP, ANGEL P, HEATH JK. *EMBO J* 1987; **6**: 1899–1904.
- [101] IGNOTZ RA, ENDO T, MASSAGUE J. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6443–6446.
- [102] IGNOTZ RA, MASSAGUE J. *Cell* 1987; **5**: 189–197.
- [103] ROSEN DM, STEMPIEN SA, THOPSON AY, SEYEDIN SM. *J Cell Physiol* 1988; **134**: 337–346.
- [104] PODLESKI TR, GREENBERG L, SCHESSINGER J, YAMADA KM. *Exp Cell Res* 1979; **122**: 317–326.
- [105] SPIEGELMAN BM, GINTY CA. *Cell* 1983; **35**: 657–666.
- [106] MADRI JA, PRATT BM, TUCKER AM. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1375–1384.
- [107] BENECKE B-J, BEN-ZEEV A, PENMAN S. *Cell* 1978; **14**: 931–939.
- [108] GOSPODAROWICZ D, VLODAVSKY I, GREENBURG G, JOHNSON LK. Proceedings, Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation 1979; **6**: 561–592.
- [109] ROBERTS AB, SPORN MB. (W.) Handbook of Experimental Pharmacology, M.B. Sporn i A.B. Roberts (red.) Springer-Verlag, Heidelberg 1990; 95/I: 419–457.
- [110] SPORN MB, ROBERTS AB. (W.) Clinical Application of TGF $\beta$ , G.R. Book i J.Marsh (red.) John Wiley and Sons, Chichester 1991; 1–23.

## V. CZYNNIKI WZROSTU I RÓŻNICOWANIA KOMÓREK KRWI

Komórki krwi są produkowane w szpiku kostnym, śledzionie oraz w węzłach limfatycznych i wydzielane do krążenia jako dojrzałe erytrocyty, megakariocyty, granulocyty, makrofagi i limfocyty. Większość dojrzałych komórek krwi raz wydzielonych do krążenia ma zróżnicowany, ale zazwyczaj krótki czas życia (od 120 dni dla erytrocytów do 6–12 godzin dla neutrofilii). Dlatego organizm musi produkować olbrzymią liczbę tych komórek, np. człowiek produkuje przeciętnie ok.  $3,5 \times 10^{11}$  komórek czerwonych,  $1 \times 10^{11}$  płytek krwi oraz tyle samo neutrofilii na dobę. Biologia wzrostu i różnicowania komórek aktywnych immunologicznie jest nadzorowana bezpośrednio lub pośrednio przez peptydy określane wspólną nazwą cytokin (limfokin lub monokin). Zjawiska immunologiczne przypisywane obecnie cytokinom były przedmiotem obserwacji naukowych już w latach osiemdziesiątych ubiegłego stulecia. Większość doświadczeń prowadzonych w latach 1950–1970 koncentrowała się na wpływie antygenów i genów immunoregulatorowych (Ir) na nabywanie lub wzmacnianie odporności immunologicznej. Później, wykazano udział rozpuszczalnych mediatorów w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Ustalono m.in., że ekspozycja uczulonych limfocytów na swoiste antygeny stymuluje uwalnianie przez te komórki czynnika, który hamował migrację makrofagów, nazwanego później "czynnikiem hamowania migracji" (MIF). Obserwacje te sugerowały, że rozpuszczalne mediatory różne od immunoglobulin są zdolne do modulowania odpowiedzi biologicznej komórek immunologicznych. Odkrycie MIF zainicjowało badania innych czynników, które modyfikowały odpowiedź immunologiczną. Szybko wykazano, że supernatanty otrzymane z hodowli limfocytów stymulowanych antygenami lub lektynami roślinnymi, zawierają związki wywołujące zmiany komórkowe typowe dla opóźnionego hiperuczulenia *in vivo*. Dla opisanego tych czynników rozwinął się system akronimów o nazewnictwie opartym na obserwowanej aktywności biologicznej. Przykładowo, wędrówka komórek mononuklearnych do miejsca zakażenia przypisana została działaniu "czynnika chemotaktycznego" – CF, akumulację makrofagów w tym miejscu powiązano z działaniem MIF lub "czynnika agregacji makrofagów" – MAgF, centra nekrotyczne z aktywnością "limfotoksyny" – LF, a obecność limfoblastów i figur mitotycznych z "czynnikiem mitogennym, pochodzącym z limfocytów" – LMFs.

Mimo rozwoju biologicznych metod oznaczania aktywności, postęp w dziedzinie oczyszczania cytokin był w latach siedemdziesiątych stosunkowo niewielki. Czyniono natomiast intensywne wysiłki w kierunku odkrywania coraz to nowych czynników o różnej aktywności immunologicznej, co doprowadziło do opisanego ponad stu różnych cytokin. Istotny postęp w oczyszczaniu i charakterystyce chemicznej cytokin zawdzięczamy pracom naukowców, takich jak: J.J. Oppenheim, S. Mizel i J. Farrar z National Institute of Health, K. Smith i S. Gillis z Dartmouth University, L. Lachman z Duke University oraz J. Watson z University of



California. Oczyszczenie szeregu cytokin, określenie ich komórek docelowych i rozwój linii komórkowych produkujących cytokiny umożliwiły rozwój koncepcji, które są obecnie podstawą dla zrozumienia mechanizmów regulacji układu immunologicznego. Co więcej, długa lista opisanych czynników skróciła się gwałtownie, kiedy wykazano, że pojedynczy peptyd wykazuje więcej niż jedną aktywność biologiczną. Przykładowo, wykazano, że czynnik aktywacji limfocytów (LAF) przejawia także aktywność: czynnika aktywującego komórki B (BAF), czynnika zastępującego limfocyty T (TRF), białka mitogennego (MP) oraz endogenego pyrogenu (EP). Dla odzwierciedlenia zdolności tego białka do przenoszenia informacji pomiędzy różnymi komórkami krwi nadano mu nazwę interleukina 1 [1]. Wykazano ponadto, że dla większości limfokin występuje określona sekwencja ich produkcji i działania. Podczas rozwoju immunoodporności humoralnej i komórkowej jedne cytokiny są zależne od innych, które poprzedzają je w trakcie rozwoju wydarzeń prowadzących do różnicowania komórkowego. Na przykład IL-1 stymuluje wydzielanie z limfocytów T – IL-2, która z kolei stymuluje wydzielanie INF- $\gamma$ . Tak więc cytokiny nie tylko regulują biologiczną odpowiedź komórki, ale także kontrolują wydzielanie dodatkowych limfokin, koniecznych do różnicowania komórkowego. Kaskada działania cytokin w rozwoju odporności została po raz pierwszy zaproponowana przez Farrara i wsp. [2] na początku lat osiemdziesiątych.

Rozwój metod inżynierii genetycznej pozwolił na uzyskanie czystych peptydów o aktywności immunoregulacyjnej techniką klonowania molekularnego i związane z tym znaczne przyspieszenie badań. Tabela 11 przedstawia cytokiny, których strukturę chemiczną poznano w pełni.

TABELA 11. Wybrane właściwości czynników wzrostu i różnicowania komórek krwi ludzkiej

Czynnik	Masa cząsteczkowa (kDa)		Lokalizacja chromosomalna	Komórki źródłowe*
	F.N.	C.P.		
<b>Interleukiny</b>				
IL-1 $\alpha$	17	17	2	T,B,M,F,inne
IL-1 $\beta$	17	17	2	T,B,M,F,inne
IL-2	23	15	4	T
IL-3	25	15	5	T,kT
IL-4	20**	14**	5	T,kT,S
IL-5	23	13	5	T,kT
IL-6	26	21	7	T,M,F,kT,inne
IL-7	25**	15**	?	S
<b>Czynniki hematopoetyczne</b>				
M-CSF	(35) <sub>2</sub>	21	5	T,M,F,E
G-CSF	22	18	17	M,F,E
GM-CSF	23	14	5	T,M,F,E,kT
EPO	30	18	?	N,W
SCF	30**	25**	?	T,S,F,W

\* T – limfocyty T, B – limfocyty B, E – komórki endotelialne, F – fibroblasty, kT – komórki tuczne, M – makrofagi, N – komórki nerki, S – stromalne komórki szpiku, W – komórki wątroby; F. N. – forma natywna; C. P. – część peptydowa; \*\* – dane dotyczą peptydów mysich

Doświadczenia prowadzone na homogenych cytokinach udowodniły, że pojedyncze peptydy mają bardzo zróżnicowany, zależny od tkanki docelowej zakres działania. Wszechstronne omówienie właściwości chemicznych i aktywności biologicznej całej grupy związków

przekracza ramy tego opracowania. Ograniczono się do krótkiej charakterystyki poszczególnych cytokin i przedstawienia ogólnej koncepcji udziału tych związków w hematopoecie.

Zgodnie z przyjętym powszechnie podziałem wyróżnia się tradycyjnie dwie grupy peptydów regulujących wzrost i różnicowanie komórek krwi: interleukiny (ILs) i czynniki hematopoetyczne (CSF, SCF i Epo).

## 1. INTERLEUKINY (ILs)

Wzrost i różnicowanie limfocytów T i B jest kontrolowane przez grupę polipeptydów nazwanych interleukinami. Są one grupą czynników wzrostowych produkowanych przez wiele różnych rodzajów komórek i działających także na komórki nielimfoidalne. Dotąd scharakteryzowano całkowicie siedem białek tej klasy (patrz tab. 1), ale co najmniej pięć dalszych interleukin (IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12) zostało już opisanych [3–10]. Wszystkie interleukiny są jednołańcuchowymi polipeptydami, nie wykazującymi homologii strukturalnej i działającymi poprzez swoiste receptory błonowe. Wspólna nazwa odzwierciedla ich pośrednictwo w działaniu na limfocyty, a numeracja – kolejność odkrywania poszczególnych przedstawicieli tej grupy cytokin.

### INTERLEUKINA 1 (IL-1)

Czynnik ten został odkryty przez Gary'ego i wsp. [11] w roku 1972 jako mitogen dla tymocytów i limfocytów. IL-1 jest ważnym regulatorem odpowiedzi ostrej fazy na infekcję bakteryjną, stan zapalny czy uszkodzenie tkanki oraz uczestnikiem obrony immunologicznej organizmu [12,13]. Wzmaga odpowiedź limfocytów T na działanie antygenów lub mitogenów, działa jako kofaktor podczas aktywacji limfocytów B, indukuje uwalnianie histaminy przez eozynofile, ich degranulację oraz produkcję lipooksygenazy przez limfocyty T [13–16]. Stymuluje aktywność komórek NK i jest chemoatraktantem dla monocytów i limfocytów [17]. Działa synergistycznie z IL-6, GM-CSF i G-CSF w pobudzaniu wzrostu kolonii komórek szpiku kostnego [18]. IL-1 indukuje syntezę IL-2 i jej receptora przez limfocyty T oraz syntezę IL-3 i IL-6 przez monocyty [19,20]. Działa na wiele rodzajów komórek, m.in. na fibroblasty i hepatocyty. Stymuluje syntezę i sekrecję GM-CSF, interferonu  $\beta$  i kolagenazy przez komórki fibroblastów oraz syntezę białek ostrej fazy przez hepatocyty [21–23].

Zidentyfikowano dwa różne geny kodujące polipeptydy określane jako IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , wykazujące tylko 26% homologii sekwencji aminokwasowej [24–26]. Mimo różnic strukturalnych IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  wykazują taką samą aktywność biologiczną i wiążą się z tym samym receptorem błonowym [27].

### INTERLEUKINA 2 (IL-2)

Proliferacja i wzrost klonalny limfocytów T są stymulowane przez IL-2, początkowo określaną jako czynnik wzrostowy limfocytów T (TCGF) [28]. IL-2 jest produkowana przez aktywowane limfocyty pomocnicze T, natomiast spoczynkowe limfocyty T ani nie syntetyzują IL-2, ani nie są zdolne do odpowiedzi na jej działanie [29]. IL-2 stymuluje tworzenie cytotoksycznych komórek T oraz komórek NK [2,30]. Ponadto, stymuluje proliferację i

różnicowanie aktywowanych antygenami limfocytów B [31], a także efektorową i sekrecyjną aktywność monocytów [32].

Receptor IL-2 jest zbudowany z dwóch różnych polipeptydów o masach cząsteczkowych 70 kDa (a) i 55 (b) [33–35]. Oba białka mają miejsca wiążące IL-2 i tworzą niekwalencyjnie związany heterodimer o wysokim powinowactwie do liganda. Z podjednostką  $\beta$  zasocjowane jest białko (Lck) o aktywności kinazy tyrozynowej, stymulowanej wiązaniem IL-2 do receptora [36]. Ponieważ większość receptorów cytokin nie ma domeny kinazowej (w przeciwieństwie do większości receptorów czynników wzrostowych komórek somatycznych), wymagają one asocjacji z białkami o aktywności enzymatycznej dla transmisji sygnału. Cecha ta jest charakterystyczna dla interleukin [37].

### INTERLEUKINA 3 (IL-3)

Interleukina 3 ma bardzo szeroki zakres działania, zwłaszcza w obrębie układu hematopoetycznego. Z uwagi na zróżnicowaną aktywność biologiczną była wcześniej określana jako: czynnik stymulujący komórki P (PSF), aktywność promująca wybuch oddechowy (BPA), czynnik wzrostowy komórek tucznych (MCGF), czynnik wzrostowy komórek hematopoetycznych (HCGF) lub multi-CSF [38–40]. Jest jednym z dwóch (oprócz SCF) hematopoetycznych czynników wzrostowych podtrzymujących zarówno odnowę, jak i przeżycie oraz różnicowanie pluripotentnych komórek macierzystych [40,41]. Stymuluje tworzenie czystych i mieszanych populacji granulocytów oraz makrofażów, megakariocytów, eozynofili, komórek tucznych i erytroidalnych [40,41].

Geny ludzkiej i mysiej IL-3 różnią się znacznie sekwencją nukleotydową (48% podobieństwa), co implikuje różną drogę ewolucyjną i prawdopodobnie odmienną rolę w regulacji hematopoezy u tych dwóch gatunków [42].

Nie sklonowano dotychczas receptora dla tej cytokiny. Wykazano natomiast, że IL-3 wiąże się z białkiem receptorowym (m.c. 140 kDa) mającym stymulowaną przyłączeniem liganda aktywność kinazy tyrozynowej [43]. Związanie IL-3 z receptorem komórkowym stymuluje uwalnianie diacyloglicerolu (DAG), chociaż nie stymuluje metabolizmu fosfatydyloinozytoli [44]. Mechanizm uwalniania DAG w tym przypadku jest niewiadomy.

### INTERLEUKINA 4 (IL-4)

Interleukina 4 była początkowo opisana jako limfokina, która stymuluje proliferację komórek B i nazwana czynnikiem wzrostowym komórek B (BCGF) [45–47]. Ponieważ czynnik ten stymulował także ekspresję antygenów zgodności tkankowej klasy II oraz produkcję przeciwciał IgG i IgE przez limfocyty B [48,49], został nazwany czynnikiem 1 stymulującym komórki B (BSF-1) [50]. Po stwierdzeniu, że BSF-1 działa także na inne komórki krwi, zaproponowano obecnie powszechnie stosowaną nazwę – interleukina 4. IL-4 stymuluje proliferację tymocytów, limfocytów T oraz fibroblastów i jest autokrynnym czynnikiem wzrostowym dla komórek TH2 [51]. Przypuszcza się, że stymulowana IL-4 produkcja IgE może być odpowiedzialna za degranulację komórek tucznych. Degranulacja tych komórek powoduje uwalnianie wielu substancji aktywnych biologicznie, takich jak: histamina, serotonina czy leukotrieny. Dlatego cytokinie tej przypisuje się istotną rolę w inicjacji odpowiedzi alergicznej organizmu [52]. Wykazano także, że hydrokortyzon hamuje stymulowaną mitogenami syntezę i sekrecję IL-4 przez limfocyty T [53]. Efekt ten może, przynajmniej częściowo wyjaśnić immunosupresyjny wpływ glukokortykoidów, obserwowany w terapii chorób

alergicznym. Receptor IL-4 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej ok. 130 kDa występującą w niewielkich ilościach (100–1000 receptorów na komórkę) w błonach komórkowych, praktycznie wszystkich dotąd przebadanych rodzajów komórek [51].

### INTERLEUKINA 5 (IL-5)

Interleukina ta jest odpowiedzialna za wiele efektów przypisywanych uprzednio: czynnikowi wzrostowemu (II) komórek B (BCGF II), czynnikowi różnicowania eozynofili (EDF) oraz czynnikowi zastępującemu limfocyty T (TRF) [46,47,54,55]. IL-5 stymuluje proliferację i końcowy etap różnicowania komórek prekursorowych eozynofili [55]. Jednocześnie, jej działanie na eozynofile powoduje produkcję anionu ponadtlenkowego oraz chemotaksję [56]. Właściwości te wskazują, że IL-5 może pośredniczyć w odpowiedzi tych komórek na alergeny i pasożyty. Ponadto IL-5 stymuluje sekrecję IgG, IgM i IgA przez aktywowane antygenami limfocyty B [54,57–59] i uczestniczy w indukowanej IL-2 aktywności komórek NK [60].

Mysi i ludzki cDNA dla tej interleukiny wykazują 77% podobieństwa w sekwencji nukleotydowej [61,62], a działanie IL-5 jest nieswoiste gatunkowo [63].

### INTERLEUKINA 6 (IL-6)

Interleukina 6 jest wielofunkcyjnym białkiem działającym na komórki hematopoetyczne, limfoidalne, somatyczne i nerwowe [64–66]. Zakres jej działania usprawiedliwia mnogość akronimów (czynnik stymulujący hepatocyty – HSF, czynnik (2) stymulujący komórki B – BSF-2, interferon  $\beta$ 2, białko 26 kDa, czynnik wzrostowy komórek szpiczaka – HPGF, białko różnicowania komórek mieloidalnych krwi – MGI-2A), którymi określano to białko [67–72]. IL-6 jest zaangażowana w regulację odpowiedzi immunologicznej, zarówno humoralnej (stymuluje końcowy etap różnicowania limfocytów B) jak i komórkowej (czynnik pomocniczy w aktywacji limfocytów T) [68,73–75]. IL-6 stymuluje proliferację pluripotentnych hematopoetycznych komórek progenitorowych [76–80], a efekt ten jest synergistyczny z działaniem IL-3 [78,81,82], IL-4 [79], GM-CSF [77] i M-CSF [76]. Cytokina ta jest ponadto silnym inhibitorem wzrostu dla ludzkich fibroblastów [83] oraz komórek endotelialnych [84]. Ponieważ zarówno fibroblasty, jak i komórki endotelialne syntetyzują IL-6, działanie to może odzwierciedlać mechanizm kontroli wzrostu przez ujemne sprzężenie zwrotne.

Wykazano także, że IL-6 jest zaangażowana w regulację różnicowania komórek nerwowych [85] i uwalnianie ACTH przez komórki przysadki *in vitro* i *in vivo* [86,87]. ACTH stymuluje z kolei syntezę glukokortykoidów w komórkach kory nadnercza, a te hamują syntezę IL-6 w monocytach. Postuluje się, że jest to mechanizm regulujący poziom IL-6, łączący dwa różne układy kontrolne: immunologiczny i neuroendokryny.

Obecnie uważa się, że IL-6 jest głównym mediatorem odpowiedzi ostrej fazy na infekcję bakteryjną i wirusową lub indukowaną chemicznie. Działanie IL-6 na komórki Hep G2 wzmacnia syntezę fibrynogenu,  $\alpha_1$ -antycholesteroliny, ceruloplazminy, haptoglobiny,  $\alpha_1$ -kwaśnej glikoproteiny i komponentu B, chociaż nie stymuluje syntezy reaktywnego białka C i amyloidowego białka A [88]. Ten ostatni efekt okazał się swoisty komórkowo i udowodniono, że IL-6 inicjuje pełną odpowiedź ostrej fazy w hepatocytach, włącznie z syntezą reaktywnego białka C i amyloidowego białka A [89,90]. Porównanie aktywności i IL-1 i TNF $\alpha$  z działaniem IL-6 na prawidłowe hepatocyty wskazuje, że jedynie ta ostatnia jest zdolna do regulacji syntezy pełnego spektrum białek ostrej fazy [91].

Dojrzała cząsteczka IL-6 jest glikoproteiną, której część peptydowa zbudowana jest z 184 (ludzka) i 187 (mysia) reszt aminokwasowych [92,93]. Podobieństwo struktury I-rzędowej genów ludzkiej i mysiej IL-6 wynosi 65%, a ich produktów 42% [93,94]. Receptor ludzkiej IL-6 jest polipeptydem zbudowanym z 449 reszt aminokwasowych, którego część efektorowa nie wykazuje aktywności kinazy tyrozynowej [95].

### INTERLEUKINA 7 (IL-7)

Interleukina ta została pierwotnie opisana jako unikalny czynnik, pochodzący z komórek stromalnych, niezbędny we wczesnych etapach różnicowania limfocytów B [96]. Zakres działania IL-7 jest jeszcze trudny do określenia, ze względu na niezbyt obfity materiał doświadczalny. Wiadomo jednak, że cytokina ta stymuluje także wzrost niedojrzałych i dojrzałych limfocytów T [97,98]. Badano m.in. rolę IL-2 i IL-4 w odpowiedzi komórek T na działanie IL-7. Wykazano, że odpowiedź mitogenna dwóch różnych klonów limfocytów T była niezależna od obecności przeciwciał dla IL-2 i IL-4, co wskazuje, iż IL-7 wywiera bezpośredni, mitogenny wpływ na limfocyty T [99]. In vivo interleukina 7 stymuluje wzrost liczby peryferyjnych komórek limfoidalnych, przede wszystkim limfocytów B, a w mniejszym stopniu limfocytów T. Dane te pozwalają przypuszczać, że IL-7 uczestniczy zarówno w odpowiedzi immunologicznej organizmu, jak i w limfopoezie [100]. Receptor IL-7, podobnie jak innych interleukin, nie ma aktywności kinazy tyrozynowej, a przekazanie sygnału następuje przez asocjację jego części cytoplazmatycznej z białkiem p59fyn, kinazą tyrozynową z rodziny *src* [101].

## 2. CZYNNIKI HEMATOPOETYCZNE

W roku 1961 Till i McCulloch [102] ustalili eksperymentalnie model hematopoezy, który w ogólnych zarysach obowiązuje do dziś. Wykazali m.in. tworzenie makroskopowych kolonii komórek hematopoetycznych w śledzionie napromieniowanych myszy, którym przeszczepiono prawidłowe, syngeniczne komórki szpiku kostnego. Każda z tych kolonii pochodziła z pojedynczej, multipotentnej komórki macierzystej nazwanej komórką tworzącą kolonie w śledzionie (CFU-s – ang. *Colony Forming Unit in the Spleen*) [103]. Te właśnie komórki macierzyste okazały się komórkami prekursorowymi dla dojrzałych: granulocytów, erytrocytów, monocytów i megakariocytów [104]. Odnowa (odtworzenie populacji pluripotentnych komórek macierzystych), ich proliferacja i ostateczne zróżnicowanie są absolutnie zależne od grupy czynników wzrostowych, określanych jako hematopoetyczne czynniki wzrostowe [105]. Do grupy tej zalicza się: czynniki stymulujące wzrost kolonii (CSFs), erytropoetynę (EPO) i czynnik stymulujący komórki macierzyste (SCF).

### CZYNNIKI STYMULUJĄCE WZROST KOLONII (CSFs)

Produkcja komórek mieloidalnych (granulocyty, makrofagi, erytrocyty i megakariocyty) odbywa się w szpiku kostnym, gdzie z pluripotentnych komórek prekursorowych (komórek macierzystych) powstają komórki dojrzałe. Przeżycie i różnicowanie zarówno mieloidalnych komórek prekursorowych, jak i funkcjonalna aktywacja dojrzałych granulocytów i makrofagów kontrolowane są przez rodzinę hematopoetycznych czynników wzrostowych nazwanych

CSFs (od ich zdolności do stymulacji wzrostu klonalnego komórek prekursorowych w agarze) [106–108]. Cztery różne CSFs zostały wyizolowane i oczyszczone do homogenności z materiału ludzkiego [tab. 11]. Wszystkie są glikoproteinami o stosunkowo niewielkich masach cząsteczkowych. Część cukrowa nie jest konieczna dla ich aktywności biologicznej, ale zabezpiecza te cząsteczki przed działaniem czynników denaturujących i proteaz. Nazwy poszczególnych CSFs zostały przyjęte na podstawie ich zdolności do stymulacji różnicowania komórek prekursorowych do określonych typów komórek dojrzałych: G-CSF (granulocytarny-CSF), M-CSF (makrofagowy-CSF), MG-CSF (makrofagowo-granulocytarny-CSF) i opisany wcześniej jako IL-3 multi-CSF.

G-CSF i M-CSF (CSF-1) są głównie związane z różnicowaniem komórek macierzystych odpowiednio do neutrofilii i makrofagów [109,110]. GM-CSF (CSF-2) stymuluje przy niskim stężeniu wzrost neutrofilii i mieszanych kolonii granulocytów i makrofagów [111]. Natomiast, multi-CSF (IL-3) stymuluje wzrost i różnicowanie komórek prekursorowych dla wszystkich typów komórek krwi, aczkolwiek w przypadku erytrocytów i płytek krwi niezbędne jest współdziałanie innych czynników wzrostowych: erytropoetyny i megakariotycznego-CSF. Wstępna charakterystyka megakariotycznego-CSF (Meg-CSF) wskazuje, że jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 29–34 kDa, stymulująca *in vitro* i *in vivo* tworzenie płytek krwi [112]. CSFs działają poprzez swoiste receptory błonowe i są niezbędne dla przeżycia prekursorowych komórek krwi. *In vitro* w nieobecności CSFs komórki macierzysteobumierają z szybkością 5% na godzinę. CSFs są syntetyzowane przez różne rodzaje komórek (monocyty, limfocyty T, fibroblasty, komórki endotelialne), ale w warunkach fizjologicznych najistotniejsze są prawdopodobnie komórki stromalne szpiku kostnego [105]. Wykazanie obecności receptorów dla CSFs w dojrzałych komórkach granulocytów i makrofagów (i to w ilości większej niż w komórkach prekursorowych) sugerowało, że CSFs mogą mieć określone znaczenie biologiczne w regulacji funkcjonalnej dojrzałych komórek [52,105,113]. Odpowiedź komórkowa dojrzałych granulocytów i makrofagów na działanie CSFs jest różnorodna.

Przykładowo, jeden tylko czynnik GM-CSF stymuluje w komórkach neutrofilii i makrofagów takie efekty, jak: regulacja migracji, produkcja nadtlenu, fagocytoza, sekrecja lizozymu czy zależna od przeciwciał cytotoksyczność komórkowa [114]. Możliwość uzyskiwania dużych ilości rekombinantowych CSFs pozwala obecnie na kliniczne zastosowanie tych peptydów w odnowie i uaktywnianiu białych komórek krwi w trakcie terapii przeciwnowotworowej lub po transplantacji szpiku kostnego [114–118].

### ERYTROPOETYNA (EPO)

W roku 1977 Miyake i wsp. [119] określili częściową sekwencję aminokwasową erytropoetyny wyizolowanej z moczu ludzkiego, a osiem lat później Lin i wsp. [120] oraz Jacobs i wsp. [121] sklonowali gen tego białka. Ludzka erytropoetyna jest glikoproteiną o m. cz. 30,4 kDa [122]. Około 40% masy tego czynnika stanowią cukry. EPO działa przez receptor komórkowy (m.c. 62–66 kDa) o nieustalonym dotąd sposobie transmisji sygnału [122]. Przynajmniej 90% EPO jest produkowane w nerkach, a mniej niż 10% w wątrobie [123, 124]. Erytropoetyna działa w końcowej fazie różnicowania komórek erytroidalnych [125]. Co prawda, erytroidalne komórki prekursorowe odpowiadają na szereg innych czynników wzrostowych, takich jak GM-CSF czy IL-3, ale tylko erytropoetyna stymuluje tworzenie dojrzałych erytrocytów [125]. Struktura EPO jest konserwatywna ewolucyjnie, a podobieństwo sekwen-

cji aminokwasowej mysiej i ludzkiej erytropoetyny wynosi 81%. Ludzka rekombinantowa erytropoetyna znalazła już zastosowanie kliniczne w leczeniu niedokrwistości związanej ze schyłkową niewydolnością nerek [126,127].

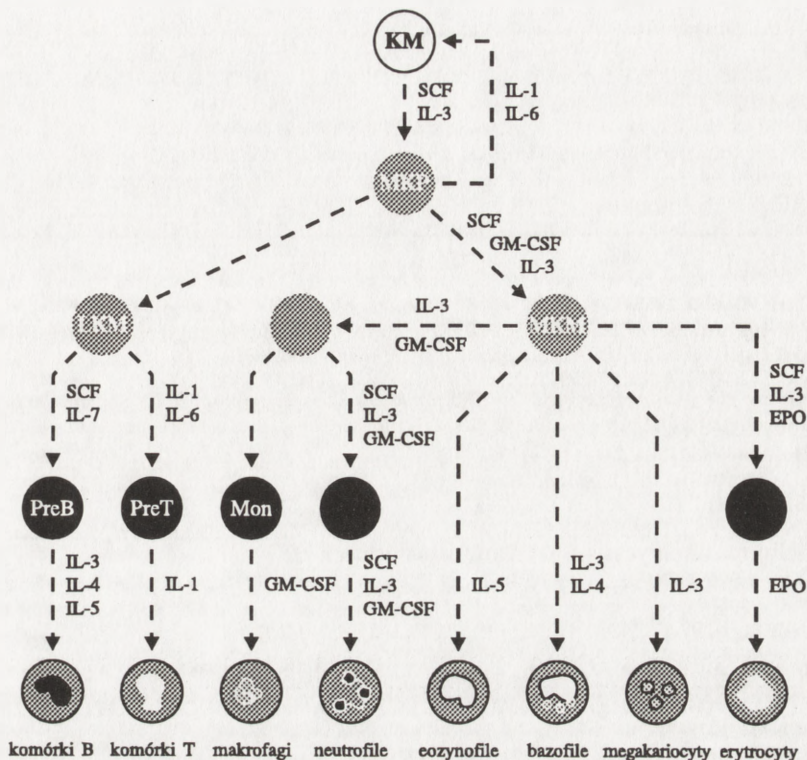
### CZYNNIK (WZROSTOWY) KOMÓREK MACIERZYSTYCH (SCF)

Najmłodszym członkiem rodziny czynników hematopoetycznych jest SCF (ang. – *Stem Cell Factor*) odkryty w roku 1990. Został on wyizolowany z ustalonej linii komórek wątroby szczurzej (BRL-3A), a jego gen sklonowany [128,129]. SCF jest czynnikiem wzrostowym i przeżyciowym dla komórek tucznych [128,129]. Działa synergistycznie: z EPO stymulując tworzenie kolonii erytroblastów, z G-CSF stymulując tworzenie kolonii neutrofilii oraz z GM-CSF lub z IL-3 stymulując powstawanie kolonii mieszanych z wczesnych komórek progenitorowych [130]. Natomiast, w połączeniu z IL-7 stymuluje wczesne stadia różnicowania limfocytów B [131]. Szczurzy SCF jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 28–30 kDa [128]. Natywny SCF jest dimerem, ale w odróżnieniu od PDGF podjednostki nie są związane kowalencyjnie [129]. Receptorem błonowym dla SCF jest przypuszczalnie produkt protoonkogenu *c-kit* o aktywności tyrozyno-swoistej kinazy białkowej [132]. Wydaje się prawdopodobne, że forma dimeryczna czynników wzrostowych jest istotna w transdukcji sygnału przez niektóre receptory o aktywności kinazy białkowej (R-PDGF, R-M-CSF).

### HEMATOPOEZA

Krew jest płynem fizjologicznym, w którym ilość i skład elementów morfotycznych jest pod ścisłą kontrolą homeostatyczną. Liczba komórek poszczególnych typów utrzymywana jest na względnie stałym poziomie mimo szybkiego i zróżnicowanego ich obrotu (obumierania starych i powstawania nowych komórek). Co więcej, liczba ta jest niezmienna w trakcie życia organizmu dzięki stałej produkcji komórek krwi w szpiku kostnym. Mimo że hematopoeza jest procesem bardzo skomplikowanym, wielu autorów proponuje coraz to nowsze, hipotetyczne modele regulacji wzrostu i różnicowania komórek krwi [52,106,109]. Schemat działania interleukin i czynników hematopoetycznych na podstawie najnowszych doniesień o aktywności biologicznej tych związków ilustruje rysunek 15.

Przedstawiony model hematopoezy uwzględnia przede wszystkim udział poszczególnych czynników wzrostowych w odnowie multipotentnych komórek macierzystych oraz sekwencję i współdziałanie tych związków w ostatecznym różnicowaniu komórek krwi. Nie uwzględnia natomiast regulacji syntezy i sekrecji poszczególnych czynników ani działania inhibitorów wzrostu i różnicowania komórek krwi, których klasycznym przedstawicielem jest TGF  $\beta$ . Jak każdy schemat procesu fizjologicznego jest przybliżeniem, opartym głównie na doświadczeniach *in vitro*. Tym niemniej, nawet tak uproszczona wizja procesu hematopoezy ilustruje stopień komplikacji układu odpowiedzialnego za regulację wzrostu i różnicowania komórek krwi .



Rys. 15. Prawdopodobny udział interleukin i czynników hematopoetycznych w regulacji wzrostu i różnicowania komórek krwi: KM – komórka macierzysta, MKM – komórka macierzysta mieloidalna, LKM – komórka macierzysta limfoidalna

## PIŚMIENICTWO

- [1] AARDEN LA, BRUNNER TK, CEROTTINE JC i in. *J Immunol* 1979; **123**: 2928–2929.
- [2] FARRAR JJ, BENJAMIN WR, HILFIKER ML i in. *Immunol Rev* 1982; **63**: 129–166.
- [3] MATSUSHIMA K, MORISHITA K, YOSHIMURA T, LAVU S, KOBAYASHI Y, LEW W, APPELLA E, KUNG SF, LEONARD EJ, OPPENHEIM JJ. *J Exp Med* 1988; **167**: 1883–1893.
- [4] YANG Y-C, RICCIARDI S, CIARLETTA A, CALVETTI J, KELLEHER K, CLARK SC. *Blood* 1989; **74**: 1880–1884.
- [5] MOORE KW, VIEIRA P, FIORENTINO DF, TROUNSTINE ML, KHAN TA, MOSMANN TR. *Science* 1990; **248**: 1230–1234.
- [6] BAUMAN M, SCHENDEL P. *J Biol Chem* 1991; **266**: 20424–20429.
- [7] STRICTER RM, KUNKEL SL, ELNER VH, MARTONYI CL, KOCH AE, POLVERINI PJ, ELNER SG. *Am J Pathol* 1992; **141**: 1279–1284.
- [8] SPITS H, MALEFYT RD. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; **99**: 9–15.
- [9] YANG YC, YIN TG. *Biofactors* 1992; **4**: 15–21.
- [10] BERTAGNOLLI MM, LIN BY, YOUNG D, HERRMANN SH. *J Immunol* 1992; **149**: 3778–3783.
- [11] GERY I, GERSHON RK, WAKSMAN BH. *J Exp Med* 1972; **136**: 128–142.
- [12] SIPE JD. (W:) *The Acute Phase Response to Injury and Infection*, A.H.Gordon i A.Koj (red.) Elsevier, Amsterdam - New York-Oxford, 1985; 23–35.
- [13] GORDON AH. (W:) *The Acute Phase Response to Injury and Infection*, A.H.Gordon i A.Koj (red.) Elsevier, Amsterdam - New York - Oxford, 1985; 87–104.
- [14] HUNNIGHAKE GW, GLAZIER AJ, MARIK MM, DINARELLO CA. *Am Rev Respr Dis* 1986; **135**: 66–71.



- [15] LIPSKY PE. *Contemp Top Mol Immunol* 1985; **10**: 198–217.
- [16] PINCUS SH, WHITCOMB EA, DINARELLA CA. *J Immunol* 1986; **137**: 3509–3514.
- [17] OLIFF A, AGRANOUCKY O, MCKINNEY M, MURTY V, BAUCHWITZ R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 3306–3310.
- [18] MOORE MAS, WARREN DJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 7134–7138.
- [19] DURUM SK, SCHMIDT JA, OPPENHEIM JJ. *Ann Rev Immunol* 1985; **3**: 263–287.
- [20] KURT-JONES EA, BELLER DL, MIZEL SB i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 1204–1208.
- [21] DINARELLO CA. *J Clin Immunol* 1985; **5**: 287–297.
- [22] LAKER C, STOCKING C, BERGHOLTZ V, HESS N, DELAMARTER JF, OSTERTAG W. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8458–8462.
- [23] KOJ A. (W:) *The Acute-Phase Response to Injury and Infection*, A.H. Gordon i A.Koj (red.) Elsevier, Amsterdam - New York - Oxford, 1985; 191–204.
- [24] GRAY PW, GLAISER D, CHEN E, GOEDEL DV, PINNICA D. *J Immunol* 1986; **137**: 3644–3648.
- [25] GUBLER U, CHUA AO, STERN AS. *J Immunol* 1986; **136**: 2492–2497.
- [26] KILIAN PL, KAFFKA KL, STERN AS i in. *J Immunol* 1986; **136**: 4509–4514.
- [27] GIMENEZ-GALLEGO G, RODKEY J, BENNETT C, RIOS-CANDELORE M, DI SALVO J, THOMAS K. *Science* 1985; **230**: 1385–1388.
- [28] SMITH KA. *Science* 1988; **240**: 1169–1176.
- [29] WATSON J, MOCHIZUKI I. *Immunol Rev* 1980; **51**: 257–278.
- [30] PIKE BL, NOSSAL GJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8153–8157.
- [31] LOWENTHAL JW, ZUBLER RH, NOBORU H, NABHOL M, MCDONALD HR. (W:) *Leukocyte and Host Defense*, JW. Lowenthal (red.) Alan R.Liss, Inc., 1986; 109–114.
- [32] MUSSO T, ESPINOZA-DELGADO I, PULKKI K, GUSELLA GL, LONGO DL, KARESIO L. *J Immunol* 1992; **148**: 795–800.
- [33] ROSENBERG N, BALTIMORE D. *J Exp Med* 1976; **143**: 1453–1463.
- [34] TESHIGAWARA K, WANG HM, KATO K, SMITH KA. *J Exp Med* 1987; **165**: 223–236.
- [35] RASCHKE W, BAIRD S, RALPH P, KAKOINZ I. *Cell* 1978; **15**: 261–267.
- [36] SATOH T, MINAMI Y, KONO T, YAMADA K, KAWAHARA A, TANIGUCHI T, KAZIRO Y. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25423–25427.
- [37] TAGA T, KISHIMOTO T. *FASEB J* 1992; **6**: 3387–3396.
- [38] IHLE JN, KELLER J, OROSZLAN S. i in. *J Immunol* 1983; **131**: 282–287.
- [39] RENNICK DM, LEE FD, YOKATA T, ARAI K, CANTOR H, NAVIL G. *J Immunol* 1985; **134**: 910–914.
- [40] SCHRADER JW, CLARK-Lewis I, CRAPPER RM. *Immunol Rev* 1983; **76**: 79–104.
- [41] IHLE JN, PEPPERSACK L, REBAR L. *J Immunol* 1981; **126**: 2184–2192.
- [42] YANG YC, CLARK SC. *Int J Cell Cloning* 1990; **8**: 121–129.
- [43] ISFORT RJ, STEVENS D, MARY WS, IHLE JN. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7982–7986.
- [44] WHETTTON AD, MONK PM, CONSALVEY SD, HUANG SJ, DEXTER TM, DOWNES CP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3284–3288.
- [45] BERRIDGE M. *Biochim Biophys Acta* 1987; **907**: 33–45.
- [46] SIDERAS P, NOMA T, HORIJO T. *Immunol Rev* 1988; **102**: 189–212.
- [47] YOKOTA T, ARAI N, DEVRIES J, SPITS H, HOWARD M, TAKEBEY, MIYATAKE S, LEE F, ARAI K. *Immunol Rev* 1988; **102**: 139–188.
- [48] COHEN DR, HAPPEL AJ, YOUNG IG. *Nucleic Acids Res* 1986; **14**: 3641–3658.
- [49] VITETTA ES, OHARA J, MYERS CD i in. *J Exp Med* 1985; **162**: 1726–1731.
- [50] NOELLE R, KRAMMER PH, OHARA J i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6149–6153.
- [51] BANCHEREAU J. *Nucl Med Biol* 1990; **17**: 619–623.
- [52] PIERCE JH. *Biochim Biophys Acta* 1989; **989**: 179–208.
- [53] BYRON KA, VARIGOS G, WOOTTON A. *Immunology* 1992; **77**: 624–626.
- [54] DUTTON RW, WETZEL GD, SWAIN SL. *J Immunol* 1984; **132**: 2451–2456.
- [55] TAKATSU K, HARADA N, HARA Y i in. *J Immunol* 1985; **134**: 382–389.
- [56] YAMAGUCHI J, YOSHIHIKO Y, SUGAMA Y i in. *J Exp Med* 1988; **167**: 1737–1742.
- [57] COFFMAN RL, OHAR J, BOND MW i in. *J Immunol* 1986; **136**: 4538–4541.
- [58] O'GARRA A, WARREN DJ, SANDESON CJ i in. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986; **132**: 133–141.
- [59] YOKOTA T, COFFMAN RL, HAGIWARA H i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 7388–7392.
- [60] HARADA N, KIKUCHI Y, TOMINAGA A i in. *J Immunol* 1985; **134**: 3944–3951.
- [61] AZUMA C, TANABE T, KONISHI M i in. *Nucleic Acids Res* 1986; **14**: 9149–9158.
- [62] KINISHI I, HARADA HN, SEVERINSON E i in. *Nature* 1986; **324**: 70–73.

- [63] CAMPBELL HD, TUCKER WQ, J, HORT Y, MARTINSON ME, MAYO G. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6629–6633.
- [64] KISHIMOTO T, HIRANO T. *BioEssays* 1988; **9**: 11–15.
- [65] WONG GG, CLARK SC. *Immunol Today* 1988; **9**: 137–139.
- [66] KOJ A. *Ann NY Acad Sci* 1989; **557**: 1–8.
- [67] KOJ A, GORDON HH, GAULDIE J. *Experientia* 1988; **44**: 9–10.
- [68] HIRANO T, YASUKAWA K, HARADA H i in. *Nature* 1986; **324**: 73–76.
- [69] WEISSENBACH J, CHERNAJOWSKY Y, ZEEVI M, SHULMAN L, SOREQ H, NIR U, WALLACH D, PERRICAUDET M, TIOLLAIS P, REVEL M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **79**: 2768–2772.
- [70] HAEGEMAN G, CONTENT J, VOLCKAERT G, DERYNCK R, TAVERNIER J, FIERS W. *Eur J Biochem* 1986; **159**: 625–632.
- [71] VAN DAMME J, CAYPHAS S, OPDENAKKER G, BILLIAU A, VAN SNICK J. *Eur J Immunol* 1987; **17**: 1–7.
- [72] SHABO Y, LOTEM J, RUBINSTEIN M, REVEL M, CLARK SC, WOLF SF, KAMEN R, SACHS L. *Blood* 1988; **72**: 2070–2073.
- [73] KISHIMOTO T, HIRANO T. *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 485–512.
- [74] SUDA T, HODGKIN P, LEE F, ZLOTNIK A. *J Immunol Methods* 1989; **120**: 173–178.
- [75] TOSATO G, PIKE SE. *J Immunol* 1988; **141**: 1556–1562.
- [76] BOT FJ, VAN EIJK L, BROEDERS L, AARDEN LA, LOWENBERG B. *Blood* 1989; **73**: 425–437.
- [77] CARACCILO D, CLARK SC, ROVERA G. *Blood* 1989; **73**: 666–670.
- [78] WONG GG, IKEBUCHI KL, OGAWA M. *J Immunol* 1988; **140**: 2040–2044.
- [79] RENNICK D, JACKSON J, YANG G, WIDEMAN J, LEE F, HUDAK S. *Blood* 1989; **73**: 1828–1835.
- [80] ULICH TR, DEL CASTILLO J, GUO K. *Blood* 1989; **73**: 108–110.
- [81] CHIU C-P, MOULDS C, COFFMAN RL, RENNICK D, LEE F. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7099–7103.
- [82] IKEBUCHI K, IHLE JN, HIRAI Y, WONG GG, CLARK SC, OGAWA M. *Blood* 1988; **72**: 2007–2014.
- [83] KOHASE M, HENRIKSEN-DESTEFANO D, MAY LT, VILCEK J, SEHGAL PB. *Cell* 1986; **45**: 659–666.
- [84] MAY LT, YORCIA G, COZZOLINO F, RAY A, TATTER SB, SANTHANAM U, SEHGAL PB, STERN D. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **159**: 991–998.
- [85] SATOH T, NAKAMURA S, TAGA T, MATSUDA T, HIRANO T, KISHIMOTO T, KAZIRO Y. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 3546–3549.
- [86] WOLOSKI BM, SMITH EM, MEYER WJ, FULLER GM, BLALOCK JE. *Science* 1985; **230**: 1035–1037.
- [87] NAITOH Y, FUKATA J, TOMINAGA T, NAKAI Y, TAMAI S, MORI K, IMURA H. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **155**: 1459–1463.
- [88] HEIRICH PC, CASTELL JV, ANDUS T. *Biochem J* 1990; **256**: 621–636.
- [89] CASTELL JV, GOMEZ-LECHON MJ, DAVID M, HIRANO T, KISHIMOTO T, HEINRICH PC. *FEBS Lett* 1988; **232**: 347–350.
- [90] KOJ A, GAULDIE J, BAUMANN H. (W:) *Biological Perspectives of Cytokine and Hormone Network*. 1993 (w druku)
- [91] CASTELL JV, GOMEZ-LECHON MJ, DAVID M, ANDUS T, GEIGER T, TRULLENQUE R, FABRA R, HEINRICH PC. *FEBS Lett* 1989; **242**: 237–239.
- [92] ANDERSSON U, MATSUDA T. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 1157–1160.
- [93] SIMPSON RJ, MORITZ RL, RUBIRA MR, VAN SNICK J. *Eur J Biochem* 1988; **176**: 187–197.
- [94] VAN SNICK J, CAYPHAS S, SZIKORA J-P, RENAULD J-C, VAN ROOST E, BOON T, SIMPSON RJ. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 193–197.
- [95] YAMASAKI K, TAGA T, HIRATA Y, YAWATA H, KAWANISHI Y, SEED B, TANIGUCHI T, HIRANO T, KISHIMOTO T. *Science* 1988; **242**: 825–828.
- [96] WHITLOCK CA, ZIEGLER SF, WITTE ON. *Mol Cell Biol* 1983; **3**: 596–604.
- [97] WATSON JD, MORRISSEY PJ, NAMEN AE, COLON PJ, WIDMER MB. *J Immunol* 1989; **143**: 1215–1219.
- [98] MORRISSEY PJ, GOODWIN RG, NORDAN RP i in. *J Exp Med* 1989; **169**: 707–712.
- [99] WELCH PA, NAMEN AE, GOODWIN RG, ARMITAGE R, COOPER MD. *J Immunol* 1989; **143**: 3562–3567.
- [100] WIDMER MB, MORRISSEY PJ, GOODWIN RG, GRABSTEIN KH, PARK LS, WATSON JD, KINCADE PW, COLON PJ, NAMEN AE. *Int J Cell Cloning* 1990; **8**: 168–172.
- [101] VENKITARAMAN AR, COWLING RJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 12083–12087.
- [102] TILL JE, MCCULLOCH EA. *Radiat Res* 1961; **14**: 213–222.
- [103] BACER AJ, MCCULLOCH EA, TILL JE. *Nature* 1963; **197**: 452–454.
- [104] SIMINOVITCH L, MCCULLOCH EA, TILL JE. *J Cell Comp Physiol* 1963; **62**: 327–336.

- [105] TABBARA IA, ROBINSON BE. *Anticancer Res* 1991; **11**: 81–90.
- [106] CLARK SC, KAMEN R. *Science* 1987; **236**: 1229–1237.
- [107] METCALF D. *Blood* 1986; **67**: 257–267.
- [108] NICOLA NA, VADAS M. *Immunol Today* 1984; **5**: 76–80.
- [109] METCALF D, NICOLA NA. *J Cell Physiol* 1983; **116**: 198–205.
- [110] STANLEY C, GUILBERT LJ, TUSHINSKI RJ, BARTELMEZ SH. *J Cell Biochem* 1983; **21**: 151–159.
- [111] BURGESS AW, METCALF D. *Experimental Hematology*, S.T. Brown i G.D. Landney (red.) Springer, New York 1977; 135–140.
- [112] OGATA K, ZHANG Z-G, ABE K, MURPHY MJ. *Int J Cell Cloning* 1990; **8**: 103–120.
- [113] MAZUR EM, COHEN JL. *Clin Pharm Therap* 1989; **46**: 250–256.
- [114] PHILLIPS N, JACOBS S, STOLLER R, EARLE M, PRZEPIORKA D, SHADDUCH R. *Blood* 1989; **74**: 26–34.
- [115] ANTMAN KS, GRIFFIN JD, ELIAS A, SOCINSKI MA, RYAN L, CANNISTRA SA, OETTE D, WHITLEY M, FREI E, SCHNIPPER LE. *N Engl J Med* 1988; **319**: 593–598.
- [116] NEMUNAITIS J, SINGER JW, BUCKNER CD, HILL R, STORB R, THOMAS ED, APPELBAUM FR. *Blood* 1988; **72**: 834–836.
- [117] NEGRIN RS, HAEUBER DH, NAGLER A, OLDS LC, DONLON T, SOUZA LM, GREENBERG PL. *Ann Int Med* 1989; **110**: 976–984.
- [118] GLASPY JA, BALDWIN GC, ROBERTSON PA, SOUZA L, VINCENT M, AMBERSLEY J, GOLDE DW. *Ann Int Med* 1988; **109**: 789–795.
- [119] MIYAKE T, KING CKH, GOLDWASSER E. *J Biol Chem* 1977; **242**: 5558–5564.
- [120] LIN FK, SUGGS S, LIN CH i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7580–7585.
- [121] JACOBS K, SHOEMAKER L, RUDERDORF R i in. *Nature* 1985; **313**: 806–810.
- [122] KOURY MJ, BONDURANT MC. *Eur J Biochem* 1992; **210**: 649–663.
- [123] LACOMBE C, DA SIVA JL, BRUNÉVAL P, FOURNIER JG, WENDLING F, CASADERALL N, CAMILLERI P, BARIETY J, VARET B, TAMBOURIN P. *J Clin Invest* 1988; **81**: 620–623.
- [124] JEKLMANN W, MARIENHOFF N, GIESSELMANN S, BUSCH L. *Blut* 1988; **57**: 317–321.
- [125] KOURY MJ, SAVYER ST, BONDURANT MC. *J Cell Physiol* 1984; **121**: 526–532.
- [126] CASETI S, PASSERINI P, CAMPISE MR, GRAZIANI G, CESANA B, PERISIC M, PONTICELLI C. *Brith Med J* 1987; **295**: 1017–1020.
- [127] WINEARLS CG, OLIVER DO, PIPPARD MJ, REID C, DOWNING MR, COTES PM. *Lancet* 1986; **ii**: 1175–1178.
- [128] ZSEBO KM, WYPYCH J, MCNIECE IK i in. *Cell* 1990; **63**: 195–202.
- [129] MARTIN FH, WYPYCH J, MCNIECE IK i in. *Cell* 1990; **63**: 203–211.
- [130] MCNIECE IK, ZSEBO KM. *Exp Hematol* 1989; **19**: 226–231.
- [131] LANGLEY KE, ZSEBO KM. *J Immunol* 1990; **146**: 3785–3790.
- [132] NOCKA K. *Sigma ImmunoNotes* 1992; **8**: 1–3.

## VI. CZYNNIKI NEKROZY NOWOTWORU (TNFs)

Nazwa czynnik nekrozy nowotworu została wprowadzona przez klinicystów ze względu na obserwowane nieliczne przypadki regresji nowotworów u pacjentów poddanych jego działaniu. Na przełomie XIX i XX stulecia, amerykański chirurg Wiliam Coley wprowadził do terapii nowotworowej nieoczyszczoną mieszaninę toksyn bakteryjnych u niektórych pacjentów z nieoperowalnymi i metastatycznymi rakami i mięsakami [1]. "Rosół" bakteryjny był stosowany w leczeniu nowotworów do roku 1930, kiedy to został zastąpiony przez bardziej skuteczne i sprawdzalne metody chemio- i radioterapii.

Zdolność toksyn bakteryjnych do indukcji nekrozy nowotworu została potwierdzona na modelach zwierzęcych [2]. W roku 1962 O'Malley i wsp. [3] wykazali, że "aktywność nekrozy nowotworu" może być przenoszona przez surowicę zwierząt traktowanych endotoksynami, a w roku 1975 stwierdzono, że czynnik surowiczy odpowiedzialny za nekrozę jest produkowany przez komórki gospodarza (prawdopodobnie monocyty) w odpowiedzi na działanie toksyn bakteryjnych [4]. Dziewięć lat później gen dla TNF- $\alpha$  został sklonowany, a jego ekspresja w *E. coli* pozwoliła na uzyskanie ilości wystarczających dla prowadzenia szeroko zakrojonych badań jego właściwości [5].

### STRUKTURA I SEKRECJA TNFs

Na krótszym ramieniu ludzkiego chromosomu 6 znajdują się dwa geny kodujące cytokiny o bardzo podobnych właściwościach chemicznych i biologicznych: kachektynę i limfotoksynę [6]. Obie cytokiny są indukowane przez endotoksyny, promotory wirusowe, mitogeny oraz inne cytokiny, takie jak: IFN- $\gamma$ , IL-1 czy CSFs [7]. Obie wykazują podobne działanie cytotoksyczne, ograniczoną homologię sekwencji aminokwasowej (ok. 30%) i działają przez ten sam receptor komórkowy [5,8,9]. Na tej podstawie zaproponowano, aby te dwa podobne peptydy zaliczyć do jednej grupy "czynników nekrozy nowotworu" (ang. – *Tumor Necrosis Factors*) i nazwać odpowiednio: TNF- $\alpha$  (kachektyna) i TNF- $\beta$  (limfotoksyna).

Różnice pomiędzy czynnikami nekrozy nowotworu typu  $\alpha$  i  $\beta$  dotyczą głównie odmiennej regulacji ekspresji ich genów oraz sposobu obróbki proteolitycznej białek prekursorowych. Dojrzały ludzki TNF- $\alpha$  jest zbudowany ze 157, a TNF- $\beta$  ze 171 reszt aminokwasowych [10]. Po denaturacji, masy cząsteczkowe tych peptydów wynoszą odpowiednio 17 i 25 kDa [11,12]. Różnica w masie cząsteczkowej dojrzałych TNFs wynika nie tylko z obecności w TNF- $\beta$  dodatkowych 14 aminokwasów, ale także z odmiennego stopnia glikozylacji obu peptydów. Aktywne biologicznie czynniki nekrozy nowotworu występują w postaci trimerów o masach cząsteczkowych 45 kDa (TNF- $\alpha$ ) i 65 kDa (TNF- $\beta$ ) [13,14].

TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  różnią się także sposobem sekrecji. Cząsteczka prekursorowa TNF- $\beta$  ma 34-aminokwasową sekwencję hydrofobową, podobną do sekwencji sygnałowej innych białek sekrecyjnych [15]. Natomiast, prekursor TNF- $\alpha$  ma długą (76 reszt aminokwasowych) se-

kwencję zawierającą zarówno region hydrofilowy, jak i hydrofobowy, który umożliwia zakotwiczenie białka w błonie cytoplazmatycznej [16]. Z części zewnątrzkomórkowej (po wbudowaniu prekursora w błonę) odcinany jest proteolitycznie dojrzały TNF- $\alpha$ , prawdopodobnie działaniem proteinazy serynowej [17].

Wiele różnych rodzajów komórek, takich jak: monocyty/makrofagi, limfocyty T i B, komórki NK, neutrofile, astrocyty, komórki endotelialne i komórki mięśni gładkich są zdolne do syntezy TNFs [18,19].

### RECEPTORY TNFs

W roku 1990 określono strukturę I-rzędową dwóch różnych receptorów czynników nekrozy nowotworu o masach cząsteczkowych 55 i 75 kDa [20,21]. Akceptorowa część tych białek jest bardzo podobna, natomiast nie znaleziono homologii w części efektorowej obu receptorów, co wskazuje, że mogą się różnić mechanizmem sygnalizacji transbłonowej. Każdy z tych receptorów wiąże TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  z podobnym, wysokim powinowactwem [20]. Liczba poszczególnych typów receptorów dla TNFs w błonach komórkowych może się znacznie różnić. Niektóre linie komórkowe mają tylko jeden typ receptora (np. HepG2 tylko receptor o m.c. 55 kDa), podczas gdy większość komórek wykazuje obecność obu typów, chociaż w różnych proporcjach [20,21]. Synteza omawianych receptorów jest regulowana niezależnie [20,22], aczkolwiek nie wykazano dotychczas różnic w mechanizmie ich funkcjonowania. Nie wykazano także, aby efektorowa część receptorów TNFs miała aktywność stymulowanej ligandem kinazy tyrozynowej. Wielokierunkowość działania TNFs wskazuje, że wiele alternatywnych dróg przenoszenia sygnału może pośredniczyć w odpowiedzi biologicznej komórek indukowanej tymi czynnikami [23].

### AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  ma właściwości typowe dla cytokin, będąc plejotropowym białkiem regulatorynym, którego aktywność zależy od rodzaju komórek docelowych i obecności innych czynników regulacyjnych. Tak więc, TNF- $\alpha$  może pełnić rolę czynnika wzrostu, cytotoksyny, czynnika cytotatycznego lub stymulatora różnicowania [7,18]. Cytokina ta jest także ważnym mediatorem stanu zapalnego, regulującym aktywność neutrofilii, eozynofili i limfocytów T i B oraz czynnikiem modulującym właściwości endotelium naczyniowego [7]. Wszystkie te właściwości mogą odgrywać rolę w zdolności TNF- $\alpha$  do indukowania nekrozy zwierzęcych nowotworów doświadczalnych. Natomiast, potencjalna rola TNF- $\alpha$  w terapii nowotworów ludzkich jest jak narazie dyskusyjna.

Znaczną część plejotropowego działania TNF- $\alpha$  można tłumaczyć jego zdolnością do aktywacji ogromnej liczby genów w komórkach docelowych. Niekompletną liczbę tych genów przedstawia tabela 12. Nawet tak ograniczona lista uświadamia obszar działania TNF- $\alpha$  i trudne do przewidzenia efekty działania tego czynnika w warunkach *in vivo*.

W warunkach *in vitro* TNF- $\alpha$  stymuluje wzrost prawidłowych fibroblastów ludzkich (diploidalnych) i niektórych linii komórek nowotworowych [41,42]. Jest to działanie synergistyczne z innymi mitogenami, takimi jak: EGF, PDGF czy insulina [42]. Współdziałanie z EGF może być tłumaczone, przynajmniej częściowo indukowaną przez TNF- $\alpha$  ekspresją genu receptora EGF. TNF- $\alpha$  jest także zdolny do indukcji niektórych genów kompetencyjnych i czynników transkrypcyjnych (patrz tab. 12), co potwierdza możliwość bezpośredniej inicjacji procesów wzrostu. Z drugiej strony, udział TNF- $\alpha$  w regulacji ekspresji genów innych

peptydów regulacyjnych wskazuje na możliwość pośredniej stymulacji (synteza czynników wzrostowych) bądź inhibicji (synteza interferonów) wzrostu komórkowego. Wykazano m. in., że TNF- $\alpha$  stymuluje komórki endotelialne do produkcji PDGF i IL-1 [43,44], które z kolei mogą działać na inne komórki lub modulować funkcję komórek macierzystych. Przykładowo, IL-1 oddziałuje na komórki endotelialne w drodze autokrynej, zmieniając ich właściwości prokoagulacyjne [45] i stymulując syntezę inhibitora aktywatora plazminogenu [46].

TABELA 12. Wybrane geny aktywowane działaniem TNF $\alpha$ 

Rodzaj czynnika	Aktywowany gen	Piśmiennictwo
Czynniki wzrostowe	PDGF	24
	GM-CSF	25
	M-CSF	26
	IL-1 ( $\alpha$ i $\beta$ )	27,28
	IL-6	29
	IL-8	30
	TNF $\alpha$	31
Interferony	INF- $\beta$	32
Receptory czynników wzrostowych	R-EGF	33
	R-IL-2	34
Protoonkogeny	<i>c-fos</i>	35
	<i>c-myc</i>	36
	<i>c-jun</i>	37
Czynniki transkrypcyjne	IRF 1	35
	IRF 2	38
Mediatory stanu zapalnego	kolagenaza	37
	stromielizyna	39
Białka ostrej fazy	$\alpha_1$ -kwaśny glikoproteid	40
	komplement C3	40
	haptoglobina	40

TNF- $\alpha$  jest aktywatorem neutrofilii, stymulującym ich adhezję do komórek endotelialnych, fagocytozę, wybuch oddechowy i degranulację [47–49]. TNF- $\alpha$  ma także wpływ immunoregulacyjny na aktywowane limfocyty T. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że czynnik ten stymuluje ekspresję antygenów MHC klasy I, zależną od IL-2 proliferację limfocytów T i produkcję interferonu  $\gamma$  [50]. TNF- $\alpha$  jest prawdopodobnie zaangażowany w funkcjonalną regulację limfocytów B jako kostymulator ich proliferacji i sekrecji immunoglobulin [51]. TNF- $\alpha$  jest silną cytotoksyną dla niektórych rodzajów komórek prawidłowych i nowotworowych, szczególnie jeśli są one zahamowane metabolicznie przez inhibicję syntezy RNA lub białka [7]. Działanie cytotoksyczne TNF- $\alpha$  może przebiegać różnymi sposobami i zależy od rodzaju komórek docelowych i współdziałania z innymi cytokinami. Przypuszczalnie TNF- $\alpha$  jest także, przynajmniej w części odpowiedzialny za aktywność cytotoksyczną makrofagów. Trzy różne przesłanki wskazują, że TNF- $\alpha$  jest bezpośrednio zaangażowany w niszczenie komórek nowotworowych przez aktywowane makrofagi [52]:

(a) wyraźna korelacja pomiędzy podatnością badanych linii komórkowych na działanie aktywowanych makrofagów a ilością wydzielanego TNF- $\alpha$ ,

(b) zależność pomiędzy efektem cytotoksycznym działania makrofagów a wstępną inhibicją syntezy RNA w komórkach docelowych,

(c) inhibicja cytotoksycznej aktywności makrofagów działaniem przeciwciał monoklonalnych dla TNF- $\alpha$ .

Doświadczenia *in vivo* prowadzone w drugiej połowie lat osiemdziesiątych wykazały, ograniczoną aktywność przeciwnowotworową TNF- $\alpha$  [7,52,53,54]. Nie umniejszając wartości dotychczas uzyskanych wyników i nadziei zawartej w nazwie tej cytokiny zastosowanie TNF- $\alpha$  (lub jego agonistów) w terapii przeciwnowotworowej wymaga jeszcze wielu badań.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] COLEY NH, FOWLER GA, BOGATKO FH. *Acta Med Scand* (Suppl.)1953; 247-277,29-97.
- [2] SHER MF, PERRAULT A. *JNCI* 1944; 29: 461-476.
- [3] O'MALLEY WE, ACHINSTEIN B, SHER MF. *JNCI* 1962; 44: 1169-1175.
- [4] CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RJ, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3666-3670.
- [5] PENNICA D, NEDWIN GE, HAYFLICK JS i in. *Nature* 1984; 312: 724-729.
- [6] SPIES T, MORTON CC, NEDOSPASOV SA, FIERS W, PIOUS D, STROMINGER JL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 8699-8702.
- [7] BLAKWILL FR. *Br Med Bull* 1989; 45: 389-400.
- [8] GRAY AW, AGGARWAL BB, BENTON CV i in. *Nature* 1984; 312: 721-723.
- [9] AGGARWAL BB, EESSALU TE, HASS PE. *Nature* 1985; 318: 665.
- [10] FIERS W. (W:) Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action, B.B. Aggarwal i J. Vilcek (red.) Marcel Dekker Inc., 1991; 79-92.
- [11] AGGARWAL BB, MOFFAT B, HARKINS RN. *J Biol Chem* 1984; 259: 686-691.
- [12] AGGARWAL BB, KOHR WJ, HASS PE i in. *J Biol Chem* 1985; 260: 2345-2354.
- [13] JONES EY, STUART DL, WALKER NPC. *Nature* 1989; 338: 225.
- [14] ECK M, SPRANG SR. *J Biol Chem* 1989; 264: 17595-17605.
- [15] NEDWIN GE, NAYLOR SL, SAKAGUCHI AY, SMITH D, JARRET-NEDWIN J, PENNICA D, GOEDEL DV, GRAY PW. *Nucleic Acid Res* 1985; 13: 6361-6373.
- [16] PEREZ C, ALBERT I, DE FAY K, ZACHARIANES N, GOODING L, KRIEGLER M. *Cell* 1990; 63: 251-258.
- [17] SCUDERI P. *J Immunol* 1989; 143: 168-173.
- [18] VILCEK J, LEE TH. *J Biol Chem* 1991; 266: 7313-7316.
- [19] WARE CF, CROWE PD, GRAYSON MH, ANDROLEWICZ MJ, BROWNING JL. *J Immunol* 1992; 149: 3881-3888.
- [20] SMITH CA, DAVIS T, ANDERSON D, SOLAM L, BECKMANN MP, JERZY R, DOWER SK, COSMAN D, GOODWIN RG. *Science* 1990; 248: 1019-1023.
- [21] DEMBIC Z, LOETSCHER H, GUBLER W, PAN Y-CE, LAHM H-W, GENTZ R, BROCKHAUS M, LESSLAUER W. *Cytokine* 1990; 2: 231-237.
- [22] THOMA B, GRELL M, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. *J Exp Med* 1990; 172: 1019-1023.
- [23] KRONKE M, SCHUTZE S, SCHEURICH P, MEICHLE A, HENSEL G, THOMA B, KRUPPA G, NIZEMEIER K. *Cellular Signalling* 1990; 2: 1-8.
- [24] HAJJAR K.A, HAJJAR DP, SILVERSTEIN RL, NACHMAN RL. *J Exp Med* 1987; 166: 235-245.
- [25] BROUDY VC, KAUSHANSKY K, SEGAL GM, HARLAN JM, ADAMSON JW. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7467-7471.
- [26] OSTER W, LINDEMANN A, HORN S, MERTELSMANN R, HERRMANN F. *Blood* 1987; 70: 1700-1703.
- [27] TURNER M, CHANTRY D, BUCHAN G, BARRETT K, FELDMANN M. *J Immunol* 1989; 143: 3556-3561.
- [28] LE J, VILCEK J. *Lab Invest* 1987; 56: 234-248.
- [29] KOHASE M, HENRIKSEN-DESTEFANO D, MAY LT, VILCEK J, SEHGAL PB. *Cell* 1986; 45: 659-666.
- [30] MUKAIDA N, MAHE Y, MATSUSHIMA K. *J Biol Chem* 1990; 265: 21128-21133.
- [31] KRONKE M, SCHUTZE S, SCHEURICH P, PFIZENMAIER K. (W:) Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action, B.B. Aggarwal i J. Vilcek (red.) Marcel Dekker Inc., 1991; 189-216.
- [32] JACOBSEN H, MESTAN J, MITTNACHT S, DIEFFENBACH CW. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3037-3042.

- [33] PALOMBELLA VJ, YAMASHIRO DJ, MAXFIELD FR, DECKER SJ, VILCEK J. *J Biol Chem* 1987; **262**: 1950–1954.
- [34] LOWENTHAL JW, BALLARD DW, BOHNLEIN E, GREENE WC. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2331–2335.
- [35] FUJITA T, REIS LFL, WATANABE N, KIMURA Y, TANIGUCHI T, VILCEK J. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 9936–9940.
- [36] LIN J-X, VILCEK J. *J Biol Chem* 1987; **262**: 11908–11911.
- [37] BRENNER DA, O'HARA M, ANGEL P, CHOJKIER M, KARIN M. *Nature* 1989; **337**: 661–663.
- [38] REIS LFL, FUJITA T, LEE TH, TANIGUSHI T, VILCEK J. (W:) *Molecular and Cellular Biology of Cytokines*, J. J. Oppenheim, M.M. Powanda, M.J. Kluger, C.A. Dinarello, (red.) Wiley-Liss, New York 1990; 1–6.
- [39] LEE TH, LEE GW, ZIFF EB, VILCEK J. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 1982–1988.
- [40] GAULDIE J, RICHARDS C, NOTHEMAN W, FEY G, BAUMANN H. *Ann NY Acad Sci* 1989; **557**: 46–59.
- [41] BEUTLER B, CERAMI A. *Annu Rev Biochem* 1988; **57**: 505–518.
- [42] VILCEK J, PALOMBELLA VJ, ZHAGY, LIN JX, FEINMAN R, REIS LFL, LEE J. *Ann Inst Pasteur/Immunol* 1988; **139**: 307–311.
- [43] NAWROTH PP, BANK I, HANDLEY D i in. *J Exp Med* 1986; **163**: 1363–1375.
- [44] SUGARMAN BJ, LEWIS GD, EESSALU TE, AGGRAWAL BB, SHEPARD HM. *Cancer Res* 1987; **47**: 780–786.
- [45] BEVILACQUA MP, POBER JS, MAJEAU GR i in. *J Exp Med* 1984; **160**: 618–620.
- [46] MEDCALF RL, KRUTHOF EKO, SCHLEUNING WD. *J Exp Med* 1988; **168**: 751–759.
- [47] SHALABY MR, AGGARWAL BB, RINDREKNECHT E, SVEDERSKY LP, FINKLE BS, PALLADINO MA. *J Immunol* 1985; **135**: 2069–2073.
- [48] FIGARI LS, MORI NA, PALLADINO MA. *Blood* 1987; **70**: 979–984.
- [49] GAMBLE JR, HARLAN JM, KLEBANOFF SJ i in. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8667–8671.
- [50] SCHEURICH P, THOMA B, UCER U, PFIZENMAIER K. *J Immunol* 1987; **138**: 1786–1790.
- [51] KEHRL JH, MILLER A, FAUCI AS. *J Exp Med* 1987; **166**: 786–791.
- [52] BALKWILL FR. *Cytokines in Cancer Therapy*, F.R. Balkwill (red.) Oxford University Press, Oxford 1988,
- [53] ASHER A, MULE JJ, REICHERT CM i in. *J Immunol* 1987; **138**: 963–974.
- [54] HAVELL EA, FIERS W, NORTH RJ. *J Exp Med* 1988; **167**: 1067–1085.

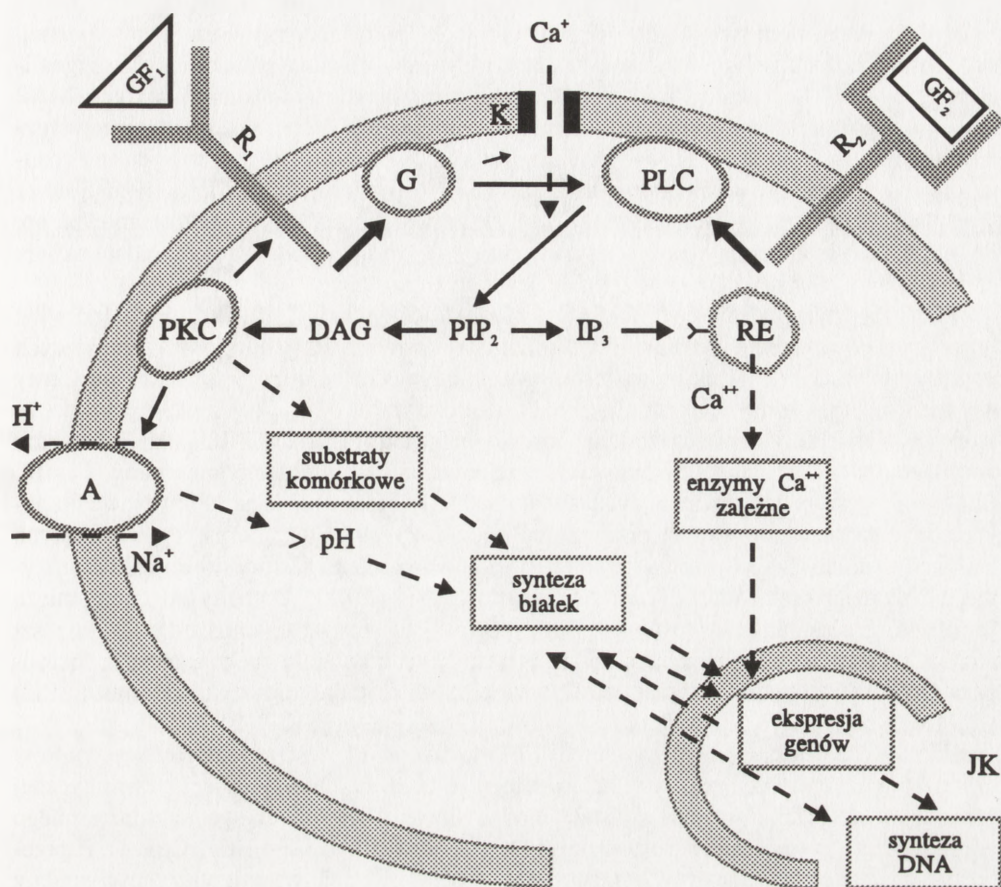


## VII.MECHANIZM DZIAŁANIA CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

Jednym z najbardziej intrygujących zagadnień związanych z działaniem czynników wzrostowych jest sposób przenoszenia sygnału mitogennego od receptora błonowego do jądra komórki. Mimo że wszystkie peptydy regulacyjne inicjują odpowiedź komórkową przez podobny mechanizm receptorowy (patrz rozdział I), to wewnątrzkomórkowe drogi przenoszenia sygnału mogą być różne. Zasadnicza różnica między hormonami (neurohormonami) a czynnikami wzrostowymi polega na tym, że te ostatnie inicjują wiele niezależnych sygnałów wewnątrzkomórkowych, których ostateczny wynik (synteza DNA) jest bardzo odległy w czasie (kilkanaście godzin od związania czynnika z receptorem). Jest zrozumiałe, że liczba reakcji chemicznych prowadzących do odpowiedzi mitogennej jest olbrzymia i nieporównywalna z szybką odpowiedzią komórki na stymulację hormonalną. Najtrudniejsze jest określenie sekwencji reakcji inicjowanych przyłączeniem czynnika wzrostowego i wyjaśnienie funkcjonalnej integracji szlaków przenoszenia informacji wewnątrz komórki, składających się na efekt końcowy.

Porównanie właściwości receptorów różnych czynników wzrostowych wskazuje, że nie istnieje jeden, wspólny mechanizm sygnalizacji mitogennej, a różnice rozpoczynają się już na poziomie aktywacji układu efektorowego. Przyjmijmy dla uproszczenia, że dwa receptory różniące się właściwościami części efektorowej (jeden ma, a drugi nie ma aktywności kinazy tyrozynowej) stymulują ten sam układ efektorowy – fosfolipazę C. Można z góry założyć, że sposób aktywacji tego enzymu będzie odmienny i prawdopodobnie różne izoformy tego białka będą odpowiadać na różne drogi jego aktywacji. Jeśli ponadto przyjmiemy, że jeden enzym efektorowy może stymulować tworzenie kilku wtórnych przekazników informacji (np. IP<sub>3</sub>, DAG, kwasu arachidonowego), to pojawi się wiele niezależnych sygnałów wewnątrzkomórkowych, których funkcjonalna integracja będzie decydować o biologicznej odpowiedzi komórki. Stopień komplikacji układu wzrośnie niepomieranie, jeśli ten sam receptor będzie stymulował więcej niż jeden układ efektorowy. Dlatego, w niniejszym opracowaniu ograniczono się do omówienia jednej drogi inicjowania sygnału mitogennego z udziałem fosfatydylinozytoli.

Hipotetyczny model sygnalizacji mitogennej przedstawia rysunek 16. Schemat uwzględnia alternatywny (pośredni i bezpośredni) mechanizm aktywacji fosfolipazy C i dwojaki sposób regulacji cytoplazmatycznego poziomu wapnia (zewnątrz- i wewnątrzkomórkowy)



Rys. 16. Wewnątrzkomórkowy układ przenoszenia sygnału mitogennego indukowany działaniem czynników wzrostowych: GF – czynnik wzrostowy, R – receptor GF, G – białko G, PLC – fosfolipaza C, PKC – kinaza białkowa C, A – antyport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{PIP}_2$  – fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan,  $\text{IP}_3$  – 1,4,5-trifosforan inozytoli, DAG – 1,2-diacylglicerol, RE – retikulum endoplazmatyczne, JK – jądro komórkowe

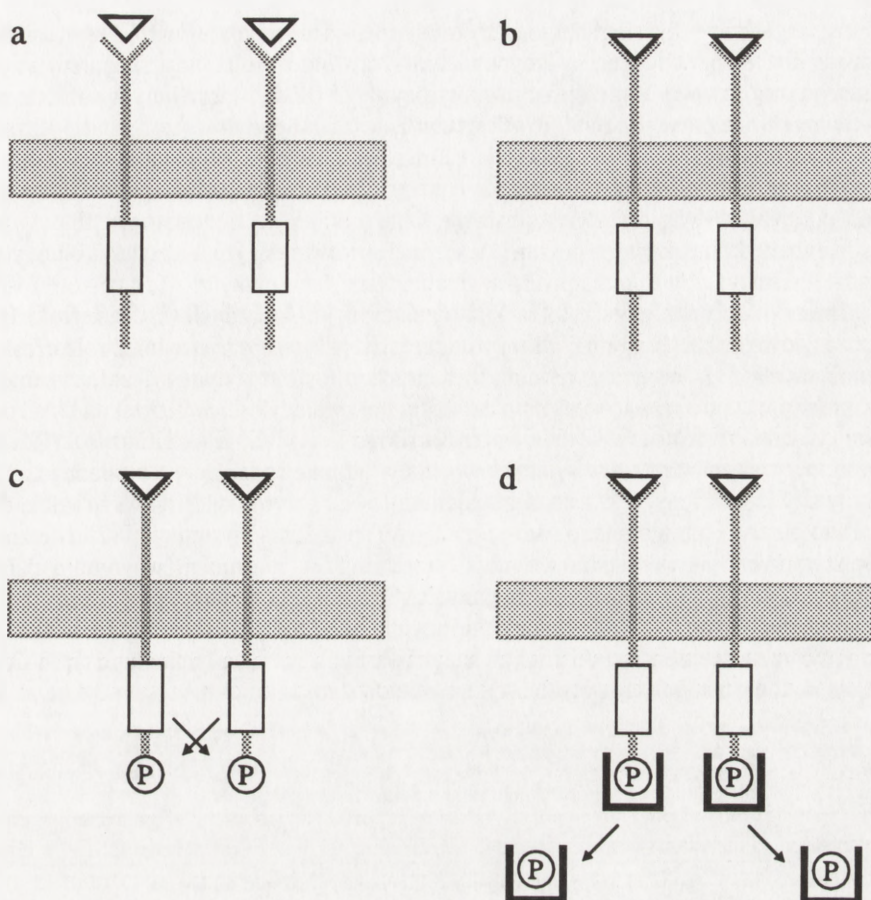
### TYROZYNO-SWOISTE KINAZY BIAŁKOWE RECEPTORÓW CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

Mechanizm bezpośredniej aktywacji układów efektorowych w przeciwieństwie do omówionej w rozdziale I aktywacji białek G związany jest ze stymulowaną przyłączeniem liganda aktywacją kinazy tyrozynowej zlokalizowanej w wewnątrzkomórkowej części receptora. Większość z poznanych dotychczas receptorów czynników wzrostowych ma domenę kinazową o charakterystycznej sekwencji aminokwasowej. Jednakże, mimo wielu lat badań, sposób przeniesienia sygnału z udziałem tego typu receptorów jest nadal dyskusyjny. Powodem są

trudności z ustaleniem fizjologicznych substratów dla kinaz receptorowych. Tym niemniej, stale rośnie liczba białek fosforylowanych na tyrozynie, które mogą pośredniczyć w sygnalizacji mitogennej. Przykładowo, fosforylacja tyrozyny na białkach określanych skrótem MAP (ang. – *mitogen-activated proteins* lub *microtubule-associated proteins*) jest charakterystyczna dla stymulowanych EGF, PDGF, NGF i insuliną [1–6] komórek spoczynkowych i niezbędna dla ich ponownego wejścia w cykl komórkowy. Co więcej, białka te podlegają także stymulacji ligandami, których receptory mają aktywność kinazy serynowo/treoninowej, np. PMA [7], lub nie mają aktywności enzymatycznej, np. trombina [8], i są przykładem układu efektorowego integrującego różne sygnały zewnątrzkomórkowe.

Podobna sytuacja ma miejsce także w przypadku fosfolipazy C (PLC) enzymu, który jak dotychczas powszechnie uważano jest układem efektorowym wielu hormonów działających poprzez białka G [9]. W rzeczywistości, sposób aktywacji fosfolipazy C zależy od formy cząsteczkowej tego enzymu (poznano dotąd osiem izozymów PLC) [10]. I tak, wykazano, że izozymy  $\alpha$  i  $\beta$  są aktywowane pośrednio poprzez białka Gq [11,12,13]. PLC  $\gamma$  ulega aktywacji w drodze fosforylacji reszt tyrozynowych w odpowiedzi na stymulację mitogenną [14–18]. PLC- $\gamma$  należy do białek zawierających tzw. domeny SH 2 (sekwencje aminokwasowe homologiczne do domen kodowanych przez region 2 genu *src*) [19]. Charakterystyczną cechą tych białek jest zdolność do tworzenia trwałych asocjacji z białkami fosforylowanymi na tyrozynie, m.in. z receptorami wielu czynników wzrostowych [19,20,21]. Domeny SH 2 uczestniczą w interakcji tych białek z fosfotyrozyną z pewną swoistością, zależną od rodzaju reszt aminokwasowych otaczających fosfo-Tyr. Przykładowo, trzy różne białka tego typu: fosfolipaza C  $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ), białko aktywujące GTP-azę (GAP) i fosfatydyloinozytolo-3-kinaza (PI3) wiążą się z odmiennymi regionami fosforylowanego receptora PDGF [20].

Zdolność białek zawierających domeny SH 2 do asocjacji z częścią efektorową receptorów czynników wzrostowych oraz wynikająca z tego stymulacja ich aktywności enzymatycznej w drodze fosforylacji stworzyły podstawy nowej hipotezy transdukcji sygnału mitogennego indukowanego czynnikami wzrostowymi (PDGF, EGF, IGF I, FGFs, HGF, CSF-1). Hipotetyczny mechanizm działania tych czynników (rys. 17) zakłada, że po związaniu liganda z receptorem błonowym następuje dimeryzacja kompleksów ligand-receptor, aktywacja kinazy tyrozynowej, transautofosforylacja receptorów, a w jej wyniku asocjacja z białkami zawierającymi domeny SH 2. Te ostatnie są z kolei fosforylowane na tyrozynie, co inicjuje dalsze etapy przenoszenia sygnału mitogennego. Ten model sygnalizacji jest zupełnie różny od klasycznego mechanizmu aktywacji kinaz serynowo/treoninowych i tłumaczy jednocześnie niezrozumiały dotąd fakt autofosforylacji receptorów czynników wzrostowych (patrz rozdział I.2). Fosfolipaza C- $\gamma$  zawiera dwie sekwencje SH 2 [22, 23] wiążące się z regionem fosfotyrozynowym autofosforylowanego receptora czynnika wzrostowego [19, 24]. W przypadku R-EGF są to tyrozyny 992,1069 i 1073, R-PDGF – tyrozyny 1009 i 1021, a R-FGF – tyrozyna 766 [26]. Zachodząca w następstwie tego fosforylacja PLC- $\gamma$  powoduje aktywację tego enzymu i wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wtórnych przekaźników sygnału diacyloglicerolu (DAG) i inozytolotrójfosforanu (IP<sub>3</sub>). Wysoki poziom fosforylacji PLC- $\gamma$ , rzędu 1 mol fosfo-Tyr/1 mol białka [14–17] oraz doskonała korelacja fosforylacji z obrotem fosfatydyloinozytoli *in vivo* [18,25,27] wskazują, że enzym ten jest fizjologicznym substratem kinaz białkowych wielu receptorów czynników wzrostowych.



Rys. 17. Mechanizm przenoszenia sygnału mitogennego z udziałem receptorów czynników wzrostowych o aktywności kinazy tyrozynowej: a – związanie czynnika z receptorem i aktywacja kinazy tyrozynowej, b – dimeryzacja receptorów, c – transfosforylacja receptorów, d – asocjacja ufosforylowanych receptorów z białkami mającymi domeny SH2 i ich fosforylacja

### UDZIAŁ FOSFOINOZYTYDÓW W SYGNALIZACJI MITOGENNEJ

Już 40 lat temu Hokinowie [28] zwrócili uwagę na fakt, że aktywacja receptorów cholinergicznycch stymuluje metabolizm fosfolipidów w komórkach trzustki. Jednak brak odpowiednich metod ekstrakcji i rozdzielu fosforanów fosfatydyloinozytoli opóźnił znacznie wyjaśnienie tego problemu. Dopiero Durell i wsp. [29] wskazali na potencjalną rolę metabolizmu fosfoinozytydów w przenoszeniu sygnału zewnątrzkomórkowego, a Michell [30] powiązał ten efekt z mobilizacją wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia.

Fosfatydyloinozytol, fosfatydyloinozytolo-4-monofosforan i fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan są obecne we wszystkich komórkach eukariotycznych i stanowią 2–8% lipidów ich błon komórkowych. Polarną częścią tych lipidów jest mioinozytol, a przy węglu  $\beta$  glicerolu

związany jest estrowo kwas arachidonowy (80% fosfoinozytydów). Fosfoinozytydy ulegają hydrolizie do 1,2-diacylglicerolu i odpowiednich fosfoinozytoli pod działaniem swoistej, zależnej od jonów wapnia fosfolipazy – fosfolipazy C (PLC). Pierwotnym substratem dla aktywowanej wiązaniem liganda fosfolipazy C jest fosfatydylo-inozytolo-4,5-difosforan (PIP<sub>2</sub>). W wyniku hydrolizy PIP<sub>2</sub> powstają 1,2-diacylglicerol (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforan (IP<sub>3</sub>), z których każdy może pełnić rolę "drugiego posłańca", przekazując sygnał dwoma odrębnymi drogami. DAG aktywuje kinazę białkową C, natomiast IP<sub>3</sub> stymuluje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. Hydroliza enzymatyczna fosfoinozytydów prowadzi także do powstania innych niecyklicznych (np. inozytolo-1,3,4,5-tetrafosforan, który przechodzi szybko w inozytolo-1,3,4-trifosforan) i cyklicznych (np. inozytolo 1:2-cykliczny-4,5-trifosforan) fosforanów inozytoli, którym przypisuje się również rolę cząsteczek informacyjnych [31]. Jednym z produktów degradacji fosfoinozytydów jest kwas arachidonowy, który może powstawać w wyniku działania lipazy diacylglicerolowej na DAG oraz w wyniku działania fosfolipazy A<sub>2</sub> na kwas fosfatydowy (PA) lub na fosfoinozytol (PI). Kwas arachidonowy jest substratem w syntezie związków o funkcji regulacyjnej, takich jak prostaglandyny czy leukotrieny, a te z kolei mogą modulować aktywność PLC na zasadzie dodatniego (leukotrieny) lub ujemnego (prostaglandyny) sprzężenia zwrotnego [32]. Metabolizm fosfoinozytydów oraz tworzenie wtórnych przekazywaczy informacji w wyniku działania fosfolipazy C (a także fosfolipazy A<sub>2</sub> i lipazy DAG) ilustruje rysunek 18.

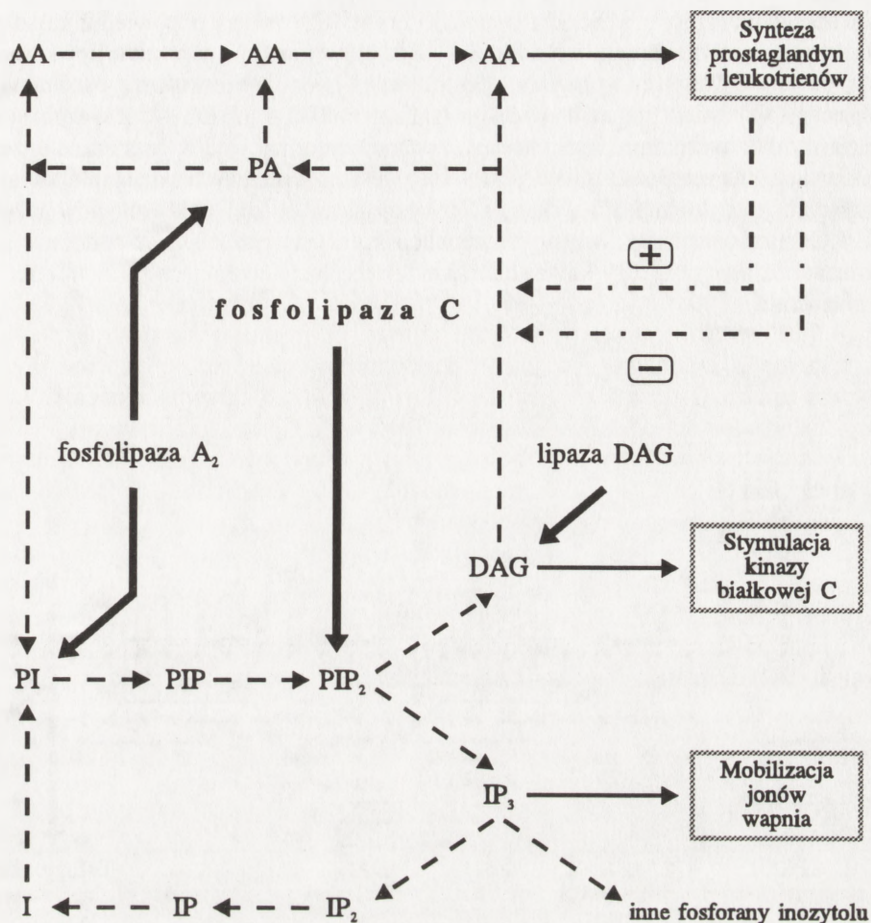
Stymulacja obrotu fosfatydyloinozytoli i uwalnianie DAG i IP<sub>3</sub> jest układem zaangażowanym w przenoszenie sygnału inicjowanego wieloma różnymi ligandami [33–35], co wskazuje na funkcjonalną uniwersalność tego układu (tab. 13).

TABELA 13. Czynniki stymulujące powstawanie inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP<sub>3</sub>) i 1,2-diacylglicerolu (DAG) z fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu (PIP<sub>2</sub>)

Typ czynnika	Przykłady
Neurohormony	gonadoliberyna, tyreoliberyna, kortykoliberyna, somatoliberyna
Hormony	parathormon, tytropina, neurotensyna, cholecystokina, serotonina, epinefryna, angiotensyna, wazopresyna
Neurotransmitery	acetylocholina, dopamina, substancja P
Czynniki wzrostowe	PDGF, FGF, IL-2, IL-3
Prostaglandyny	PGH <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub>
Lektyny	fitohemaglutynina, konkanawalina A
Różne	peptyd chemotaktyczny, ATP, antygeny, toksyny bakteryjne, stymulacja elektryczna, szok cieplny

## MECHANIZM AKTYWACJI KINAZY BIAŁKOWEJ C

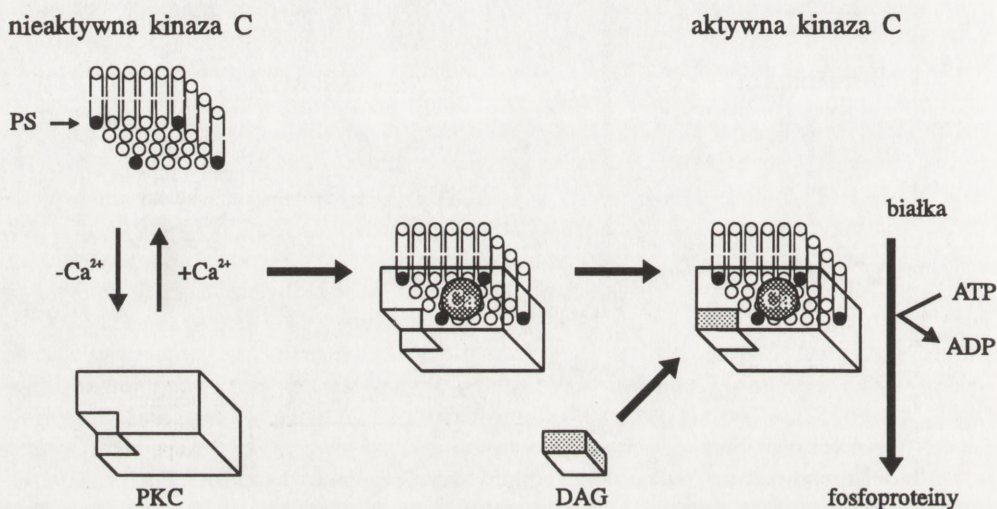
Kinaza białkowa C (PKC) jest zależną od fosfolipidów i jonów wapnia, treonino- i seryno-swoistą kinazą, szeroko rozpowszechnioną w tkankach ssaków [36]. Przynajmniej 7 rodzajów PKC [14] zostało dotychczas zidentyfikowanych ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\phi$ ). Większość komórek zawiera więcej niż jeden rodzaj PKC, np. limfocyty syntetyzują trzy rodzaje PKC:



Rys. 18. Schemat metabolizmu fosfatydyloinozytoli i tworzenia wtórnych przekazników informacji biologicznej: 1,4,5-trifosfoinozytoli (IP<sub>3</sub>), 1,2-diacylglicerolu (DAG) i kwasu arachidowego (AA)

$\alpha$ ,  $\beta$ I i  $\beta$ II. W tkance mózgowej duża część PKC jest zasocjowana z błonami synaptycznymi, w innych tkankach enzym ten jest obecny głównie w cytozolu. Kinazy białkowe C są trudno rozróżnialne w sensie właściwości katalitycznych, dlatego przyjmuje się narazie wspólny model działania tych kinaz. Fizjologicznym regulatorem aktywności PKC jest DAG, powstający w wyniku stymulowanej fosfolipazą C hydrolizy PIP<sub>2</sub> [35–38]. Badania *in vitro* wskazują, że aktywacja kinazy C następuje po translokacji nieaktywnego enzymu z cytozolu do wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. PKC wiąże się z fosfolipidami błony komórkowej, prawdopodobnie nie penetrując hydrofobowej warstwy błony. Wiązanie enzymu z fosfolipidami błony zależy od obecności jonów wapnia, a skład fosfolipidów decyduje o poziomie aktywacji PKC. Prawdopodobny mechanizm aktywacji PKC przedstawia rysunek 19. Zgodnie

z tym schematem, cztery cząsteczki fosfatydyloseryny (PS) tworzą odpowiedni układ przestrzenny na wewnętrznej powierzchni błony i wiążą jeden jon  $\text{Ca}^{2+}$  poprzez grupy karboksylowe seryny [39]. Następnie przyłącza się kinaza C tworząc nieaktywny enzymatycznie kompleks PKC-4PS- $\text{Ca}^{2+}$ , łatwy do rozbicia działaniem EDTA lub EGTA. Związanie jednej cząsteczki DAG z tym kompleksem inicjuje zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu i jego aktywację. Kompleks DAG-PKC-4PS- $\text{Ca}^{2+}$  jest niewrażliwy na działanie związków chelatujących jony wapnia, co wskazuje na bezpośredni udział tych jonów w wiązaniu DAG-PKC. Stechiometria i swoistość aktywacji kinazy C przez DAG, podobnie jak w przypadku oddziaływań cAMP-kinaza białkowa A są cechami charakterystycznymi dla "drugich posłańców".



Rys. 19. Schemat aktywacji kinazy białkowej C: DAG – diacyloglicerol, PKC – kinaza białkowa C, PS – fosfatyloseryna

Postulowano udział PKC w kontroli wielu procesów metabolicznych. W doświadczeniach *in vitro* ustalono, że substratami dla tego enzymu jest bardzo wiele różnych białek komórkowych zaangażowanych w: regulację aktywności receptorowej, transport jonów i metabolitów przez błonę komórkową, reorganizację cytoszkieletu, regulację aktywności enzymatycznej i innych [40,41].

#### AKTYWACJA ANTYPORTU $\text{Na}^+/\text{H}^+$

Kinaza białkowa C stymuluje także m.in. usytuowany w błonie komórkowej układ wymiany jonów  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  [35]. Układ ten wykorzystuje skierowany do wnętrza komórki gradient jonów sodowych do aktywnego wypychania protonów na zewnątrz komórki i odgrywa podstawową rolę w homeostazie wewnątrzkomórkowego pH [42,43]. Wynikiem działania czynników wzrostowych jest m.in. przejściowy wzrost cytoplazmatycznego pH o

0,2–0,3 jednostki [44,45]. Doświadczenia prowadzone na mutantach z upośledzonym antypotrem  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  oraz eksperymenty z zastosowaniem swoistego inhibitora tego układu amiloridu nie pozostawiają wątpliwości co do bezpośredniego wpływu podniesienia pH na wzrost i proliferację komórkową [46]. Wiele procesów wewnątrzkomórkowych zależnych jest od pH, wydaje się prawdopodobne, że istotną rolę w sygnalizacji mitogennej odgrywa stymulowana podniesieniem pH inicjacja syntezy białek [47,48], zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego.

### STYMULOWANE $\text{IP}_3$ PODNIESIENIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO POZIOMU WAPNIA

Kluczowym procesem, w którego regulację zaangażowany jest  $\text{IP}_3$ , jest podniesienie cytoplazmatycznego poziomu jonów wapnia, poprzez uwalnianie go z zapasów wewnątrzkomórkowych [49]. Początkowo sądzono, że wapń jest uwalniany z mitochondriów lub granul sekrecyjnych. Obecnie wiadomo, że wzrost cytoplazmatycznego poziomu wapnia w wyniku stymulacji hormonalnej spowodowany jest uwalnianiem wapnia z retikulum endoplazmatycznego [50]. Ilość wapnia wewnątrz retikulum, w komórkach spoczynkowych odzwierciedla równowagę pomiędzy biernym wypływem a aktywnym dopływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , regulowanym zależną od ATP pompą wapniową  $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ . Wzrost cytoplazmatycznego poziomu wapnia może wynikać zarówno z podniesienia wypływu wapnia z retikulum, działaniem na odpowiednie kanały jonowe, jak i z zahamowania działania pompy wapniowej. Stwierdzono, że zarówno zablokowanie pompy wapniowej wanadanem, jak i usunięcie ATP nie wpływa na uwalnianie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego [51]. Dane te sugerują, że  $\text{IP}_3$  działa raczej na kanał jonowy niż na pompę wapniową. Prawdopodobnie, istnieje specyficzne białko G ( $G_s$ ) regulujące funkcjonowanie kanału wapniowego w błonach retikulum endoplazmatycznego [52]. Aktywacja tego białka zachodzi poprzez receptor swoisty dla  $\text{IP}_3$ , zlokalizowany w błonie retikulum [53]. Wykazano, że związki pokrewne do  $\text{IP}_3$ , takie jak: inozytol, inozytolo-1-monofosforan, inozytolo-2-monofosforan, inozytolo-1,4-difosforan (produkt defosforylacji  $\text{IP}_3$ ), czy inozytolo-1,3,4,5-tetrafosforan (produkt fosforylacji  $\text{IP}_3$ ) są biologicznie nieaktywne. Warunkiem koniecznym aktywności pochodnych inozytoli jest obecność reszty fosforanowych w pozycjach 4 i 5, a obecność reszty fosforanowej w pozycji 1 wznaga aktywność trifosforanu [54]. W ciągu kilkudziesięciu sekund po stymulacji inozytolo-1,4,5-trifosforanem ok. 50% zapasów wapnia zgromadzonych w retikulum zostaje wyrzucone do cytoplazmy. Podniesienie cytoplazmatycznego poziomu wapnia aktywuje szereg enzymów zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$ , których spektrum działania jest bardzo szerokie [55–58].

Pozytywne współdziałanie szlaków metabolicznych angażujących kinazę białkową C i jony wapnia wydaje się istotne w indukowanej czynnikami wzrostowymi kontroli ekspresji genów [59,60].

### STYMULACJA EKSPRESJI GENÓW

Przejściu komórek spoczynkowych w fazę  $G_1$  towarzyszy synteza wielu białek, w tym także białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego. Działanie czynników wzrostowych powoduje drastyczne podniesienie poziomu informacyjnych kwasów rybonukleinowych, nawet stukrotnie przewyższające poziom mRNA w komórkach spoczynkowych [61,62]. Mimo stale rosnącej liczby informacji na temat genów pośredniczących w przeniesieniu sygnału mitogennego, wyjaśnienie całości problemu jest jeszcze odległe. Wśród genów,



których ekspresja następuje w okresie przedreplikacyjnym wyróżnia się zazwyczaj geny kompetencyjne (lub geny wczesnej odpowiedzi) i geny progresywne (lub geny późnej odpowiedzi komórkowej). Przymuszczenie, każda z tych grup obejmuje kilkadziesiąt różnych genów, aktywowanych kolejno w trakcie mitogenezy. Typowymi genami wczesnej odpowiedzi komórkowej są geny *c-fos*, *JE* i *Krox-20* [63–66]. Podniesienie poziomu ekspresji tych genów na działanie czynników wzrostowych nie wymaga wcześniejszej syntezy białka i wynika z gwałtownego wzrostu szybkości transkrypcji. Ekspresja genu *c-fos* jest niewykrywalna w komórkach proliferujących, co wskazuje, że produkt tego genu jest niezbędny do wyjścia komórek z fazy  $G_0$  [67,68]. W przeciwieństwie do genu *c-fos*, gen *c-myc* jest transkrybowany ciągle, chociaż poziom jego ekspresji zależy od obecności egzogennych czynników wzrostowych [67,69,70]. Wyniki te wskazują, że produkt genu *c-myc* jest raczej zaangażowany w przejście komórek przez fazę  $G_1$  i ich wejście w fazę  $S$  [71,72] niż wyjście z fazy  $G_0$ . Synteza szeregu innych białek (p53, p21, cyliny, dywidyny, progresyny) wzrasta gwałtownie w fazach  $G_1/S$  cyklu komórkowego [73–75], ale ich udział w przeniesieniu sygnału mitogennego jest jeszcze nie w pełni wyjaśniony.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] L'ALLEMAIN G, STURGILL TW, WEBER MJ. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 1002–1008.
- [2] CAMPOS-GONZALES R, GLENNEY JR. *Cell Regul* 1991; **2**: 663–673.
- [3] COOPER J. *Mol Cell Biol* 1991; **9**: 3143–3147.
- [4] POSADA J, SANGHERA J, PELECH S, AEBERSOLD R, COOPER J. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 2517–2528.
- [5] GOMEZ N, COHEN P. *Nature* 1991; **353**: 170–173.
- [6] BALLOU LM, LUTHER H, THOMAS G. *Nature* 1991; **349**: 348–350.
- [7] MEIER KE, LICCARDI KA, HAYSTEAD TAJ, KREBS EG. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1914–1920.
- [8] L'ALLEMAIN G, POUYSSEGUR J, WEBER M.J. *Cell Regul* 1991; **2**: 675–684.
- [9] BIRNBAUMER L, ABRAMOWITZ J, BROWN AM. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1031**: 163–224.
- [10] CAMPS M, CAROZZI A, SCHNABEL P, SCHEER A, PARKER PJ, GIERSCHIK P. *Nature* 1992; **360**: 684–686.
- [11] WU DQ, KATZ A, LEE CH, SIMON MI. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25798–25802.
- [12] TAYLOR SJ, CHEA HZ, RHEE SG, EXTON JH. *Nature* 1991; **350**: 516–518.
- [13] PARIS S, POUYSSEGUR J. *EMBO J* 1986; **5**: 55–60.
- [14] WHAL MI, DANIEL TO, CARPENTER G. *Science* 1988; **241**: 968–970.
- [15] MEISENHELDER J, SUH P, RHEE SG, HUNTER T. *Cell* 1989; **57**: 1109–1120.
- [16] MARGOLIS B, RHEE SG, FELDER S, MERVIC M, LYALL R, LEVITZKI A, ULLRICH A, ZILBERSTEIN A, SCHLESSINGER J. *Cell* 1989; **57**: 1101–1107.
- [17] WHAL M, CARPENTER G. *Bioessays* 1991; **13**: 107–113.
- [18] SULTZMAN I, ELLIS C, LIN L-L, PAWSON T, KNOPF J. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 2018–2025.
- [19] KOCH CA, ANDERSON D, MORAN MF, ELLIS C, PAWSON T. *Science* 1991; **252**: 668–674.
- [20] MORAN MF, KOCH CA, ANDERSON D, ELLIS C, ENGLAND L, MARTIN GS, PAWSON T. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 8622–8626.
- [21] GLENNEY JR. *Biochem Biophys Acta* 1992; **1134**: 113–127.
- [22] STAHL ML, FERENZ CR, KELLEHER KL, KRIZ RW, KNOPF J. *Nature* 1988; **332**: 269–272.
- [23] MAYER BJ, HAMAGUCHI M, HANAFUSA H. *Nature* 1988; **332**: 272–275.
- [24] MARGOLIS B, BELLOTF, HONEGGER AM, ULLRICH A, SCHLESSINGER J, ZILBERSTEIN A. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 435–441.
- [25] MARGOLIS B, ZILBERSTEIN A, FRANKS C, FELDER S, KREMMER S, ULLRICH A, RHEE SG, SKORECKI K, SCHLESSINGER J. *Science* 1990; **248**: 607–610.
- [26] SCHLESSINGER J, ULLRICH A. *Neuron* 1992; **9**: 380–391.
- [27] KIM HK, KIM JW, ZILBERSTEIN A, MARGOLIS B, KIM JG, SCHLESSINGER J, RHEE SG. *Cell* 1991; **65**: 435–441.
- [28] HOKIN MR, HOKIN LE. *J Biol Chem* 1953; **209**: 549–558.
- [29] DURELL J, GARLAND JT, FRIEDEL RO. *Science* 1969; **165**: 862–866.

- [30] MICHELL RH. *Biochim Biophys Acta* 1985; **415**: 81–147.
- [31] MAJERUS PW, CONNOLLY TM, DECKMYN H, ROSS TS, BROSS TE, ISHII H, BANSAL VS, WILSON DB. *Science* 1986; **234**: 1519–1526.
- [32] RUBIN RP. (W:) *Phosphoinositides and Receptor Mechanism*, J.W.Putney (red.) Alan R.Liss Inc., New York 1986; 149–162.
- [33] LITOSCH J. *Life Sci* 1987; **41**: 251–258.
- [34] NAKAMURA T, UI M. *J Biol Chem* 1985; **260**: 3584–3593.
- [35] NISHIZUKA Y. *Nature* 1984; **308**: 693–698.
- [36] KIKKAWA U, NISHIZUKA Y. *Enzymes* 1986; **17**: 167–189.
- [37] NISHIZUKA Y. *Nature* 1988; **334**: 661–665.
- [38] NISHIZUKA Y. *Science* 1984; **225**: 1365–1370.
- [39] BELL RM. *Cell* 1986; **45**: 631–632.
- [40] KWIATKOWSKA J. *Post Biochem* 1989; **35**: 253–263.
- [41] NISHIZUKA Y. *Science* 1986; **233**: 305–312.
- [42] BORON W. *J Membr Biol* 1983; **72**: 1–6.
- [43] FRELIN C, VIGNE P, LAZDUNSKI M. (W:) *Hormone and Cell Regulation*, J.Dumont, B.Hamprecht J.Nunez (red.) INSERM 1985; **9**: 259–268.
- [44] BURNS CP, ROZENGURT E. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **116**: 931–938.
- [45] L'ALLEMAIN G, FRANCHI A, CRAGOE E, POUYSSEGUR J. *J Biol Chem* 1984; **259**: 4313–4319.
- [46] POUYSSEGUR J. *Trends Biochem Sci* 1985; **10**: 453–455.
- [47] POUYSSEGUR J, CHAMBARD JC, FRANCHI A, PARIS J, VAN OBBERHEN-SCHILLING E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 3935–3939.
- [48] YARDEN Y, ULLRICH A. *Biochemistry* 1988; **27**: 3113–3119.
- [49] PUTNEY JW, TAKEMURA H, HUGHES AR, HORSTMAN DA, THASTRUP O. *FASEB J* 1989; **3**: 1899–1905.
- [50] BERRIDGE MJ, IRVINE RF. *Nature* 1984; **312**: 315–321.
- [51] BERRIDGE MJ. *Exp Biol* 1986; **124**: 323–335.
- [52] DOLPHIN AC. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 53–57.
- [53] SPAT A, FABIATO A, RUBIN RP. *Biochem J* 1986; **233**: 929–932.
- [54] IRVINE RF, BROWN KD, BERRIDGE MJ. *Biochem J* 1984; **221**: 269–272.
- [51] KHANNA NC, TOKUDA M, WAISMAN DM. (W:) *Hormones and Their Actions*, B.A. Cooke, R.J.B. King i H.J. van der Molen (red.) Elsevier, Amsterdam, 1988; cz. II: 63–92.
- [56] CASE RM. *Cell Calcium* 1980; **1**: 1–5.
- [57] CARAFOLI E. *J Mol Cell Cardiol* 1985; **17**: 203–212.
- [58] RASMUSSEN H, BARRETT PQ. (W:) *Hormones and Their Actions*, B.A. Cooke, R.J.B. King i H.J. van der Molen (red.) Elsevier, Amsterdam, 1988; cz. II: 93–111.
- [59] PERSON DA, WILLINSON WO, BELL RM, FINN OJ. *Cell* 1988; **52**: 447–458.
- [60] CONNOLLY TM, LAWING JF, MAJERUS PW. *Cell* 1986; **46**: 951–958.
- [61] STILES CD. *Cancer Res* 1985; **45**: 5215–5218.
- [62] COCHRAN BH, REFFEL AC, STILES CD. *Cell* 1983; **33**: 939–947.
- [63] CORTNER J, FARNHAM PJ. *Cell Growth Different* 1991; **2**: 465–473.
- [64] CHAVRIER P, ZERIAL M, LEMAIRE P, ALMENDRAL J, BRAVO R, CHARNAY P. *EMBO J* 1988; **7**: 29–35.
- [65] GREENBERG ME, ZIFF EB. *Nature* 1984; **311**: 433–438.
- [66] ROLLINS B, MORRISON ED, STILES CD. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3738–3742.
- [67] BRAVO R, BURCKHARDT J, CURRAN T, MULLER R. *EMBO J* 1986; **5**: 695–700.
- [68] NISHIKURA K, MURRAY JM. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 639–649.
- [69] HANN SR, THOMPSON CB, EISENMAN RN. *Nature* 1985; **314**: 366–369.
- [70] THOMPSON CB, CHALLONER PB, NEIMANN PE, GROUDINE M. *Nature* 1985; **314**: 363–366.
- [71] HEIKKILA R, SCHWAB G, WICKSTROM E, LOBE SL, PLUZNICK DH, WATT R, NECKERS LM. *Nature* 1987; **328**: 445–449.
- [72] IGUCHI-ARIGA SM, ITANI MT, KYI Y, ARIGA H. *EMBO J* 1987; **6**: 2365–2371.
- [73] REICH NC, LEVINE AJ. *Nature* 1984; **308**: 199–201.
- [74] CAMPISI J, GRAY HE, PARDEE AB, DEAN M, SONENSHEIN GE. *Cell* 1984; **36**: 241–247.
- [75] CELIS JE, MADSEN P, NIELSEN SU, GESSER B, NIELSEN HV, PETERSEN-RATZ G, LAURIDEN JB, CELIS A. *Cancer Cells* 1988; **6**: 289–295.

## VIII. AUTOKRYNNA REGULACJA WZROSTU

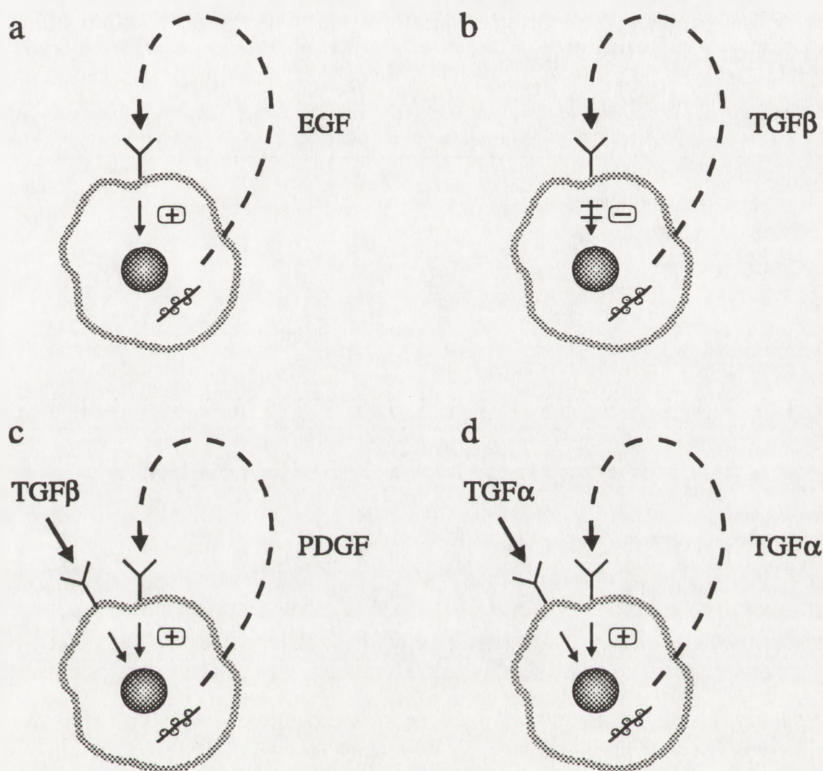
Możliwość autoregulacji wzrostu komórkowego została zaproponowana na podstawie różnic obserwowanych we wzroście komórek prawidłowych i nowotworowych w hodowlach *in vitro*. Uniezależnianie się komórek nowotworowych od fizjologicznej kontroli wzrostu było teoretycznie możliwe wskutek "fałszywej" aktywacji różnych etapów przenoszenia sygnału mitogennego będącej następstwem transformacji nowotworowej. Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników można wyróżnić trzy grupy czynników wpływające na zaburzenia fizjologicznej kontroli wzrostu przez:

- (a) produkcję własnych czynników wzrostowych, zastępujących czynniki egzogenne,
- (b) syntezę receptorów czynników wzrostowych o zmienionych właściwościach i/lub funkcji efektorowej,
- (c) aktywację postreceptorowej drogi przenoszenia sygnału mitogennego (synteza polipeptydów o aktywności białek G, stymulacja syntezy lub uwalniania tzw. drugich przekazników, hiperekspresja genów cyklu komórkowego itp..).

Produkty białkowe wielu onkogenów i protoonkogenów mają aktywność sugerującą ich ingerencję w szlak przenoszenia sygnału mitogennego. Przykładowo, protoonkogen *c-sis* (odpowiednik onkogenu małpiego wirusa mięsaka – SSV) koduje łańcuch B płytkowego czynnika wzrostowego [1]. Białko transformujące kodowane przez onkogen *erb-B* jest zmienioną formą receptora EGF, a produkt onkogeny *fms* jest odpowiednikiem receptora CSF-1 [2,3]. Białka p21 kodowane przez onkogeny z rodziny *ras* są strukturalnie i funkcjonalnie podobne do białek G [4,5], natomiast białko p60<sup>src</sup> stymuluje fosforylację fosfatydyloinozytolo do fosfatydylo-inozytolo-4- fosforanu [6]. Podwyższoną ekspresję protoonkogenów *c-myc* i *c-fos* stwierdzono w wielu typach komórek transformowanych nowotworowo [7–9].

Jednym z szeroko badanych rodzajów autostymulacji wzrostu jest stymulacja autokrynna. Wiele typów komórek nowotworowych hodowanych *in vitro* wykazuje znacznie mniejsze zapotrzebowanie na egzogenne czynniki wzrostowe zawarte w surowicy w porównaniu do komórek prawidłowych [10–12]. Wy tłumaczeniem tego zjawiska mogła być synteza własnych czynników wzrostowych przez komórki transformowane nowotworowo. Doświadczenia przeprowadzone na komórkach fibroblastów transformowanych wirusem mięsaka myszy (MSV) pozwoliły DeLarco i Todaro [13] na sformułowanie hipotezy autokrynnej regulacji wzrostu komórkowego. Opierała się ona na założeniu, że komórki nowotworowe syntetyzują i wydzielają do otoczenia czynniki wzrostowe, na których działanie odpowiadają za pomocą swoistych dla tych czynników receptorów błonowych (rys. 20a). Produkcja własnych czynników wzrostowych prowadziłaby do uniezależnienia się komórek neoplastycznych od fizjologicznej kontroli proliferacji, a w następstwie tego do nowotworowego wzrostu tkanki [14,15]. Początkowo sądzono, że komórki nowotworowe produkują swoiste, charakterystyczne dla danego typu nowotworu czynniki wzrostowe. Dlatego, pierwsze scharakteryzowane

przez Todaro i DeLarco czynniki autokryne nazwane zostały czynnikami wzrostu mięsaka SGFs (ang. – *Sarcoma Growth Factors*). Później wykazano, że większość komórek syntetyzuje i wydziela peptydy należące do znanych rodzin czynników wzrostu (EGF/TGF $\alpha$ , PDGF, IGFs, FGFs, TGF  $\beta$ ). Na podstawie doniesień z ostatnich 3–4 lat, można śmiało stwierdzić, że komórki transformowane nowotworowo syntetyzują i wydzielają wszystkie znane typy czynników wzrostowych (tab. 14).



Rys. 20. Możliwe mechanizmy autokrynej regulacji wzrostu: a – bezpośrednia stymulacja autokrynną, b – utrata zdolności do odpowiedzi na autokryne inhibitory wzrostu, c – pośrednia stymulacja autokrynną, d – amplifikacja stymulacji autokrynej przez dodatnie sprzężenie zwrotne

Synteza i sekrecja określonych czynników wzrostowych nie jest równoznaczna z ich udziałem w autokrynej regulacji wzrostu komórek macierzystych. Wiele z tych czynników może regulować wzrost innych komórek w drodze para- lub endokrynej. O tym, który z czynników syntetyzowanych przez dany rodzaj komórek jest dla nich autokrynnym czynnikiem wzrostowym, decyduje obecność swoistych dla tego czynnika receptorów w błonie komórek macierzystych. Jednym z najlepiej udokumentowanych przykładów udziału peptydowych czynników wzrostowych w autokrynej regulacji wzrostu jest TGF $\alpha$ . Wykazano, że produkcja tego peptydu związana jest z wieloma rodzajami ludzkich nowotworów (rak piersi,

rak płuc, rak żołądka, rak trzustki). Ponadto, komórki transformowane temperaturo-wrażliwymi mutantami mysiego wirusa mięsaka Kirstena [Ki-MSV] lub Moloneya (Mo-MSV) produkują TGF $\alpha$  tylko w temperaturze permissywnej dla transformacji [33]. Wreszcie, użycie przeciwciał monoklonalnych przeciwko TGF $\alpha$  powoduje zahamowanie wzrostu nowotworowych linii komórkowych produkujących ten czynnik [18, 21]. Transformacja komórek gryzoni wirusami Moloneya, Harveya lub Kirstena powoduje dodatkowo uwalnianie innych (poza TGF $\alpha$ ) czynników wzrostowych, głównie z rodzin: TGF $\beta$  i PDGF [34,35]. Powiązanie transformacji wirusowej z wydzielaniem tych peptydów jest trudne, chociaż wiadomo, że fenotypowa transformacja prawidłowych komórek nerki szczurzej (NRK) wymaga współdziałania TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  i PDGF [36].

TABELA 14. Wybrane czynniki wzrostowe syntetyzowane przez komórki transformowane nowotworowo oraz przez komórki prawidłowe

Rodzaj komórek	Typ czynnika	Piśmiennictwo
<b>Transformowane:</b>		
rak piersi	IGF I, IGF II, PDGF, TGF $\beta$	16
drobnokomórkowy rak płuc	IGF I, IGF II, TGF $\alpha$	17,18
rak trzustki	IGF I, TGF $\alpha$	19
rak prostaty	TGF $\beta$	20
rak przewodu pokarmowego	EGF (TGF $\alpha$ )	21
neuroblastoma 2A	PDGF, TGF $\beta$	22
czerniaki	TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PDGF-AA	23
glejaki	aFGF, bFGF, TGF $\beta$	24
Hep G2	IGF I, IGF II, TGF $\beta$	25
<b>Prawidłowe:</b>		
embrionalne blastocyty	PDGF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$	26
embrionalne komórki macierzyste	PDGF, IGF II, TGF $\beta$	27
aktywowane makrofagi	TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , bFGF, PDGF, TNF $\alpha$	28,29
naczyniowe komórki endotelialne	bFGF	30
eozynofile	TGF $\alpha$	31
keratynocyty	TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , bFGF	32

Dalsze fakty doświadczalne potwierdzające hipotezę autokrynną stymulacji wzrostu komórek nowotworowych przynosi opisane wcześniej (rozdział III.1) porównanie struktury PDGF i białka transformującego p28<sup>SV40</sup> wirusa mięsaka małpiego SSV. Syntezę PDGF-podobnych peptydów wykazano w komórkach ludzkiego raka kości [37], w ludzkich glejakach [38], a także w różnych ustalonych liniach komórek transformowanych wirusem SV40 [35,39]. Wiele spośród komórek produkujących te peptydy ma także receptory dla PDGF [35,40,41], a przeciwciała dla tego czynnika hamują syntezę DNA w komórkach 3T3 lub NRK transformowanych SSV [39]. Co więcej, komórki transformowane SSV wszczepione myszom transgenicznym różnią się tumorigennością, która koreluje z ilością wydzielanego PDGF [39].

Nowe spojrzenie na autokrynną regulację wzrostu przyniosły informacje o pierwszym, dobrze scharakteryzowanym peptydowym inhibitorze wzrostu, jakim jest dla większości komórek TGF $\beta$ . Właściwości tego czynnika (omówione w rozdziale IV) wskazywały, że może on reprezentować nową klasę czynników autokrynnych, hamujących wzrost komórek macierzystych. Było to zgodne z wcześniejszymi sugestiami [42,43] o syntezie swoistych, endogennych inhibitorów wzrostu przez komórki prawidłowe. Ostatecznym dowodem na istnienie

takich związków było stwierdzenie, że komórki nerki małpiej produkują TGF $\beta$ , który z kolei może hamować ich wzrost w hodowli tkankowej [44,45]. Było prawdopodobne, że transformacja nowotworowa prowadzi nie tylko do syntezy autokrynnych stymulatorów wzrostu, ale także może powodować utratę zdolności komórek transformowanych do syntezy, sekrecji lub odpowiedzi na autokrynnne inhibitory wzrostu (rys.20b). Taka właśnie, rozszerzona hipoteza autokrynnej regulacji wzrostu komórek nowotworowych, zaproponowana przez Sporna i Roberts [46] jest szczególnie interesująca zarówno dla zrozumienia mechanizmu deregulacji wzrostu neoplastycznego, jak i w kontekście terapii przeciwnowotworowej. Ostatnie doniesienia [47] o wpływie TGF $\beta$  na wzrost różnych klonów linii komórkowej HT29 ludzkiego raka okrężnicy wykazały, że ten sam czynnik może działać jako: autokrynnny stymulator lub autokrynnny inhibitor wzrostu w zależności od stopnia zróżnicowania badanych komórek. W tym miejscu należy przypomnieć (patrz rozdział IV), że TGF $\beta$  może także stymulować wzrost niektórych rodzajów komórek w drodze pośredniej, poprzez indukcję ekspresji genu PDGF. Prawdopodobna jest więc autokrynna stymulacja wzrostu przez TGF $\beta$  pod warunkiem, że komórki macierzyste mają receptory zarówno dla TGF $\beta$ , jak i dla PDGF (rys.20c).

Podobnie jak to ma miejsce w przypadku nowotworów komórek somatycznych proponuje się również autokrynną regulację wzrostu nowotworowych komórek krwi [48]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano udział IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , G-CSF, GM-CSF i IL-6 w autokrynnej stymulacji wzrostu komórkowego wielu typów białaczek ostrych [49–53]. W odróżnieniu od postaci ostrej, komórki chronicznej białaczki mieloidalnej syntetyzują i wydzielają do medium TNF $\alpha$ , który hamuje wzrost tych komórek [54]. Przypuszcza się, że autokrynna inhibicja wzrostu może być odpowiedzialna za obserwowaną w chronicznej formie nowotworu, fazę stacjonarną, trwającą średnio 3,5 roku (od kilku miesięcy do 20 lat). Jeśli tak, to interakcja autokrynnnych stymulatorów i inhibitorów wzrostu komórkowego może leżeć u podstaw różnic obserwowanych pomiędzy ostrą i chroniczną formą nowotworu.

Należy jednak podkreślić, że produkcja autokrynnnych czynników wzrostowych nie jest wyłączną domeną komórek nowotworowych. Pierwsze wskazówki o autokrynnej regulacji wzrostu komórkowego *in vitro* związane są z wyprowadzaniem tzw "nieśmiertelnych" linii komórkowych. W roku 1968 H.Coon wyprowadził poprzez klonowanie komórek szczurzej wątroby linię komórek BRL3A zdolną do wzrostu i namnażania w płynach hodowlanych pozbawionych białek i hormonów [55]. Pięć lat później Dulak i Temin [56] wyizolowali z środowiska hodowlanego komórek BRL 3A frakcję stymulującą wzrost tych komórek nazwaną MSA (ang. – *multiplication stimulating activity*). W latach osiemdziesiątych udowodniono, że frakcja ta zawiera autokrynnny czynnik wzrostu, różniący się od ludzkiego IGF II tylko pięcioma resztami aminokwasowymi [57]. Ostatecznym dowodem na autokrynną regulację wzrostu dorosłych komórek prawidłowych są doświadczenia nad syntezą i sekrecją TGF $\alpha$  przez keratynocyty ludzkie [58]. Przede wszystkim dlatego, że czynnik ten był powszechnie uważany za typowy autokrynnny stymulator wzrostu komórek nowotworowych. Co więcej wykazano [58], że dodatek egzogenego TGF $\alpha$  do hodowli keratynocytów stymuluje sekrecję endogenego TGF $\alpha$ , sugerując nowy mechanizm autostymulacji wzrostu w drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego (rys.20d). Okazało się także, że mechanizm autostymulacji wzrostu prawidłowych komórek epitelialnych jest różny od obserwowanego w komórkach transformowanych [59]. Zaburzenia tego typu autoregulacji wzrostu mogą być szczególnie niebezpieczne i przypuszcza się, że patologiczna nadprodukcja TGF $\alpha$  przez keratynocyty jest przyczyną podwyższonej proliferacji tych komórek, obserwowanej w łuszczycy [60].

Prowadzone w Instytucie Biologii Molekularnej UJ badania autoregulacji wzrostu także wskazują, że wzrost wielu transformowanych komórek zwierzęcych regulowany jest w drodze autokrynej [61–63]. Zarówno komórki transformowane chemicznie, jak i wirusowo syntetyzują i wydzielają do płynu hodowlanego peptydy o właściwościach typowych dla autokrynych czynników wzrostowych [64,65].

Podsumowując, przyjmuje się obecnie, że regulacja autokryna komórek prawidłowych obejmuje dwa istotne fizjologicznie procesy: kontrolę wzrostu i różnicowania komórek embrionalnych oraz stałą odnowę tkanek dojrzałych. Nieprawidłowa synteza i/lub sekrecja autokrynych czynników wzrostowych mogą być przyczyną wielu chorób wynikających z patologicznej proliferacji komórek.

### PIŚMIENNICTWO

- [1] DOOLITTLE RF, HUNKAPILER MW, HOOD LE, DEVARE SG, ROBBINS KC, AARONSON SA., ANTONIADES HN. *Science* 1983; **221**: 275–277.
- [2] DOWNWARD J, YARDEN Y, MAYES E, SCARCE G, TOTTY N, STOCKWELL P, ULLRICH A, SCHLESINGER J, WATERFIELD MD. *Nature* 1984; **307**: 521–527.
- [3] DOWNING JR, RETTENMIER CW, SHERR CJ. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 1795–1799.
- [4] BERRIDGE MJ. *Biochem Biophys Acta* 1987; **907**: 33–45.
- [5] BOS JT. *Mutation Res* 1988; **195**: 255–271.
- [6] SUGIMOTOY, WHITMAN M, CANTLEY LS, ERICSON RL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 2117–2121.
- [7] WATSON JV, STEWART J, COX H, SIKORA K, EVAN GI. *Mol Cell Probes* 1987; **1**: 151–157.
- [8] TRAINER DL, KLINE T, MCCABE FL i in. *Int J Cancer* 1988; **41**: 287–296.
- [9] FRAUMAN AG, MOSES AC. *Endocrinol Metab Clin N A* 1990; **19**: 479–493.
- [10] PAUL D, LIPTON A, KLINGER I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 645–648.
- [11] DUBROW R, RIDDLE VGH, PARDE AB. *Cancer Res* 1979; **39**: 2718–2726.
- [12] KAPLAN RL, ANDERSON M, OZANNE B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 485–489.
- [13] DELARCO JE, TODARO GJ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 4001–4005.
- [14] SPORN MB, TODARO GJ. *N Engl J Med* 1980; **303**: 878–880.
- [15] TODARO GJ, DELARCO JE, FRYLING C, JOHANSON PA, SPORN MB. *J Supramolec Struct Cell Biochem* 1981; **15**: 287–301.
- [16] LIPPMAN ME, DICKSON RB. *Recent Progr Horm Res* 1989; **45**: 383–440.
- [17] JAQUES G, HAVEMANN K. (w:) *Molecular and cellular biology of insulin-like growth factors and their receptors*. Plenum Publ. Corp., New York 1988; 247–259.
- [18] YAMAGUCHI K, IMANISHI KI, MARUNO K, MIJAKE Y, SHIMOSATO Y, ABE K. *CHEST* 1989; **96**: 29S–31S.
- [19] OHMURA E, OKADA M, ONODA N, KAMIYA Y, MARAKAMI H, TSUSHIMA T, SHIZUME K. *Cancer Res* 1990; **50**: 103–107.
- [20] STEINER MS, BARRACK ER. *Molec Endocrinol* 1992; **6**: 15–25.
- [21] YOSIDA K, KYO E, TSUJINO T, SANO T, NIIMOTO M, TAHARA E. *Jpn J Cancer Res* 1990; **81**: 43–51.
- [22] VAN DEN EIJNDEN-VAN RAAIJ AJM, KOORNNEEF I, VAN OOSTWAARD TMJ, FEYEN A, KRUIJER W, DE LAAT SW, VAN ZOELLEN EJJ. *Biochem J* 1989; **257**: 375–382.
- [23] LIZONOVA A, BIZIK J, GROFOVA M, VAHERI A. *J Cell Biochem* 1990; **43**: 315–325.
- [24] TAKAHASHI JA, MORI H, FUKUMOTO M, IGARASHI K, JAYE M, ODA Y, KIKUCHI H, HATANAKA M. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5710–5714.
- [25] ZVIBEL I, HALAY E, REID LM. *Molec Cell Biol* 1991; **11**: 108–116.
- [26] RAPPOLEC DA, BRENNER CA, SCHULTZ R, MARK D, WERB Z. *Science* 1988; **241**: 1823–1825.
- [27] MUMERY CL, VAN DEN EIJNDEN-VAN RAAIJ AJM. *Cell Differentiation and Development* 1990; **30**: 1–18.
- [28] PIERCE GF. *Am J Resp Cell Molec Biol* 1990; **2**: 233–234.
- [29] WITSELL AL, SCHOOK LB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4754–4758.
- [30] D'AMORE PA. *Cancer and Metastasis Rev* 1990; **9**: 227–238.
- [31] WONG DTW, WELLER PF, GALLI SJ i in. *J Exp Med* 1990; **172**: 673–681.
- [32] COOK PW, PITTELKOW MR, SHIPLEY GD. *J Cell Physiol* 1991; **146**: 277–289.
- [33] OZANE B, FULTON RJ, KAPLAN PL. *J Cell Physiol* 1980; **105**: 163–180.

- [34] ANZANO MA, ROBERTS AB, DELARCO JE, WAKEFIELD LM, ASSOIAN RK, ROCHE NS, SMITH JM, LAZARUS JE, SPORN MB. *Molec Cell Biol* 1985; **5**: 242–247.
- [35] BOWEN-POPE DF, VOGEL A, ROSS R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 2396–2400.
- [36] ASSOIAN RK, GROTENDORST GR, MILLER DM, SPORN MB. *Nature* 1984; **309**: 804–806.
- [37] HELDIN C, WESTERMARK B, WASTESON A. *J Cell Physiol* 1980; **105**: 235–246.
- [38] NISTER M, HELDIN C, WASTESON A, WESTERMARK B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 926–930.
- [39.] DICKER P, POHJANPELTO P, PETTICAN P, ROZENGURT E. *Exp Cell Res* 1981; **135**: 221–227.
- [40] OWEN AJ, PANTAZIS P, ANTONIADES HN. *Science* 1984; **225**: 54–56.
- [41] HUANG JS, HUANG SS, DEUEL TF. *Cell* 1984; **39**: 79–87.
- [42] BULLOUGH WS. *Cancer Res* 1965; **25**: 1683–1727.
- [43] POTTER VR. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1983; **29**: 161–173.
- [44] HOLLEY RW. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 5989–5992.
- [45] TUCKER RF, SHIPLEY GD, MOSES HL, HOLLEY RW. *Science* 1984; **226**: 705–707.
- [46] SPORN MB, ROBERTS AB. *Nature* 1985; **313**: 747–751.
- [47] HAFEZ MM, INFANTE D, WINAWER S, FRIEDMAN E. *Cell Growth Different* 1990; **1**: 617–626.
- [48] JASMIN C, GEORGOULIAS V, SMADJA-JOFFE F, BOUCHEIX C, LE BOUSSE-KERDILES C, ALLOUCHE M, CIBERT CH, AZZARONE B. *Leukemia Res* 1990; **14**: 689–693.
- [49] COZZOLINO F, RUBARTELLI A, ALDINUCCI D, SITIA R, TORCIA M, SHAW A, DI GUGLIELMO R. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2369–2373.
- [50] DIANE C, GRIFFIN Y, YOUNG DC. *Blood* 1986; **68**: 1178–1182.
- [51] MUROHASHI I, TOHDA S, SUZUKI T, NAGATA K, YAMASHITA Y, NARA N. *Blood* 1989; **74**: 35–39.
- [52] SAKAI K, HATTORI T, MATSUOKA M, ASOU N, YAMAMOTO S, SAGAWA K, TAKATSUKI K. *J Exp Med* 1987; **66**: 1597–1602.
- [53] KAWANO M, HIRANO T, MATSUDA T i in. *Nature* 1988; **332**: 83–85.
- [54] DUNCOMBE AS, HESLOP HE, TURNER M, MEAGER A, PRIEST R, EXLEY T, BRENNER MK. *J Immunol* 1989; **143**: 3828–3834.
- [55] NISSLEY SP, SHORT PA, RECHLER MM, PODSKALNY JM, COON HG. *Cell* 1977; **11**: 441–446.
- [56] DULAK NC, TEMIN HM. *J Cell Physiol* 1973; **81**: 153–160.
- [57] MARQUARDT H, TODARO GJ, HENDERSON LE, OROSZLAN S. *J Biol Chem* 1981; **256**: 6859–6863.
- [58] COFFEY RJ, DERYNCK R, WILCOX JN, BRINGMAN TS, GOUSTIN AS, MOSES HL, PITTELKOW MR. *Nature* 1987; **328**: 817–820.
- [59] COFFEY RJ, GRAVES-DEAL R, DEMPSEY PJ, WHITEHEAD RH, PITTELKOW MR. *Cell Growth Different* 1992; **3**: 347–354.
- [60] WEINSTEIN GD, MCCULLOUGH JL, ROSS PA. *J Invest Dermat*. 1985; **85**: 579–583.
- [61] KLEIN A, KOSZ-VNENCHAK M, MADEJA Z., SZUSTER A. *Folia Histochem Cytobiol* 1989; **27**: 11–18.
- [62] GUZIK K, KLEIN A. *Int J Cancer* 1990; **46**: 145–150.
- [63] MADEJA Z, KLEIN A. *Folia Histochem Cytobiol* 1990; **28**: 203–210.
- [64] GUZIK K, KLEIN A. *Cancer Lett* 1990; **54**: 51–56.
- [65] MADEJA Z, KLEIN A. *Folia Histochem Cytobiol* 1992; **30**: 97–102.



---

Wydawca: Fundacja Szkoły Zdrowia Publicznego  
Uniwersyteckie Wydawnictwo Medyczne „Vesalius” w Krakowie  
Druk i oprawa: Drukarnia Narodowa w Krakowie

---

<http://rcin.org.pl>

## 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). Następną stroną 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] HNILICA 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*. *Expil 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 nadtętek.

## SPIS TREŚCI

Od Autora	1
I. Peptydy jako nośniki informacji biologicznej	3
II. Czynniki wzrostowe – nowa rodzina peptydów regulacyjnych	12
III. Czynniki wzrostowe komórek somatycznych	18
1. Płytkowy czynnik wzrostowy (PDGF)	18
2. Epidermalny czynnik wzrostowy (EGF)	25
3. Insulino-podobne czynniki wzrostowe (IGFs)	34
4. Fibroblastyczne czynniki wzrostowe (FGFs)	44
5. Czynniki wzrostowe hepatocytów (HGF)	50
IV. Transformujące czynniki wzrostowe typu $\beta$ (TGF $\beta$ )	54
V. Czynniki wzrostu i różnicowania komórek krwi	63
1. Interleukiny	65
2. Czynniki hematopoetyczne	68
VI. Czynniki nekrozy nowotworu (TNFs)	75
VII. Mechanizm działania czynników wzrostowych	80
VIII. Autokrylna regulacja wzrostu	90

**Indeks 369705**