

# Wykorzystanie strategii oligomerów antysensowych w badaniach nad regulacją fizjologicznych procesów krwiotworzenia

Mariusz Z. Ratajczak

Wojciech I. Kuczyński

Pracownia Hematologii Molekularnej Zakładu Patologii

Wydział Medyczny

Uniwersytet Pensylwania

Filadelfia

Zakład Patologii Komórki PAN

Szczecin

## 1. Wstęp

Celem pracy jest przedstawienie możliwości potencjalnego wykorzystania oligomerów antysensowych jako narzędzia badawczego ułatwiającego poznanie mechanizmów molekularnych, regulujących wytwarzanie komórek krwi. Wybiórcze blokowanie ekspresji poszczególnych genów w komórkach hemopoetycznych przy jednoczesnej obserwacji skutków biologicznych takiego postępowania umożliwia poznanie roli jaką poszczególne geny pełnią w hemopoezie. Zidentyfikowanie ich funkcji biologicznej ma nie tylko znaczenie poznawcze, ale jednocześnie może być pomocne w przyszłości przy opracowaniu nowych strategii terapeutycznych. Strategie takie wykorzystujące osiągnięcia współczesnej biotechnologii mają za zadanie swoistą ingerencję farmakologiczną w procesy wytwarzania komórek krwi w organizmie na poziomie genów i ich produktów białkowych (1,2).

Za pomocą oligomerów antysensowych można blokować ekspresję genów kodujących:

- a) cytokiny,
- b) białka receptorowe wiążące cytokiny o działaniu stymulującym lub hamującym proliferację,
- c) białka biorące udział w transdukcji sygnału z pobudzonych receptorów do jądra komórkowego,
- d) białka transkrypcyjne,
- e) białka regulujące bezpośrednio cykl komórkowy komórek hemopoetycznych na poziomie cyklin i ich kinaz,
- f) proteiny pełniące rolę molekuł adhezyjnych.

Wykorzystując strategię oligomerów antysensowych możemy blokować ekspresję genów na poziomie: transkrypcji genomowego DNA na komplementarny mRNA lub procesu translacji sekwencji nukleotydów tworzących cząsteczki mRNA na sekwencje aminokwasów białka kodowanego przez dany gen (2). W niektórych przypadkach ekspresję genu można blokować bezpośrednio na poziomie produktów białkowych genu — wykorzystując tzw. aptamery. Dwie pierwsze z wymienionych możliwości wynikają ze zdolności swoistej hybridyzacji oligomeru antysensowego do sekwencji sensu w podwójnej nici DNA bądź cząsteczce mRNA. Ostatnia jest natomiast wynikiem istnienia powinowactwa molekularnego niektórych białek wewnątrzkomórkowych do sekwencji nukleotydów zawartych w aptamerach.

Ze względu na możliwości niespecyficznego toksycznego działania stosowanych związków strategia oligomerów antysensowych budzi jeszcze nieco kontrowersji. Dlatego też w prezentowanej pracy chcielibyśmy zwrócić uwagę czytelnika na wyniki tych doświadczeń, w których zablokowanie funkcji poszczególnych genów w komórkach hemopoetycznych za pomocą oligomerów antysensowych pozwoliło na prawidłowe zidentyfikowanie roli jaką one pełnią w procesach krwiotworzenia (3,4,5,6,7,8,9). Wyniki doświadczeń, których przedmiotem jest prezentowana praca zostały bowiem następnie potwierdzone przy zastosowaniu innych metod badawczych, takich jak: otrzymanie za pomocą techniki homologicznej rekombinacji zwierząt doświadczalnych posiadających mutacje odpowiednich genów, zablokowanie funkcji produktów białkowych genów za pomocą przeciwciał monoklonalnych lub też w wyniku bezpośredniej analizy funkcjonalnej *in vitro* lub *in vivo* otrzymanego rekombinowanego produktu białkowego kodowanego przez interesujący nas gen (10,11,12,13,14).

W związku z tym skoncentrujemy się głównie na omówieniu funkcji jaką pełnią w regulacji procesów proliferacji i różnicowania ludzkich komórek hemopoetycznych produkty białkowe genów kodujących:

- a) czynnik transformacji nowotworów — beta (TGF -  $\beta$ ),
- b) receptory hemopoetyczne: c - kitR, STK - 1R, IGF - 1R, c - mplR,
- c) białko biorące udział w transdukcji sygnału: c - vav,
- d) białko regulujące procesy transkrypcji w jądrze komórkowym: c - myb.

Większość z prowadzonych badań identyfikujących rolę jaką pełnią wymienione geny w regulacji proliferacji komórek hemopoetycznych człowieka przeprowadzono pierwotnie w naszym laboratorium. Narzędziem badawczym, jak wspomniano, była analiza ich funkcji w oparciu na strategii oligomerów antysensowych.

## 2. Wykorzystanie strategii oligomerów antysensowych w badaniach nad proliferacją ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych

Wiadomo, że komórki krwi wytwarzane są w szpiku kostnym. Znajdująca się w mikrośrodowisku hemopoetycznym szpiku niewielka pula krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) zapewnia ciągłość produkcji komórek

krwi obwodowej. Zbliżamy się coraz bardziej do poznania pełnego wzoru antygenowego ludzkich KKM (15). Z chwilą, gdy to nastąpi będziemy w stanie izolować je z narządów hemopoetycznych za pomocą technik immunoabsorpcji.

Prawie wszystkie KKM ludzkiego szpiku kostnego znajdują się w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego. W danym momencie tylko znikomy ich odsetek proliferuje różnicując się w kierunku krwiotwórczych komórek ukierunkowanych (KKU) należących do poszczególnych linii krwiotwórczych (16). Do niedawna uważano, że przyczyną stanu spoczynkowego KKM jest to, że nie podlegają one wpływowi czynników wzrostowych stymulujących proliferację. W świetle najnowszych badań ten punkt widzenia okazał się jednak zbyt uproszczony. Stosując strategię oligomerów antysensowych udowodniono bowiem, że stan spoczynkowy ludzkich KKM jest nie tyle wynikiem braku ich stymulowania, lecz przede wszystkim rezultatem aktywnego hamowania proliferacji przez niektóre z cytokin, które negatywnie regulują cykl komórkowy. Niektóre z tych cytokin produkowane są przez KKU, a być może nawet przez same KKM (16,17).

Na podstawie uzyskanych z przeprowadzonych badań wyników pojawiła się koncepcja tłumacząca istnienie autokrynnej pętli hamującej proliferację KKM. Decydujący udział w jej funkcjonowaniu ma odgrywać m.in. nowotworowy czynnik transformujący beta (TGF -  $\beta$ ) (17). Okazało się, że wyłączenie ekspresji TGF -  $\beta$  w ludzkich KKM za pomocą oligomerów antysensowych lub swoistych, blokujących przeciwciał monoklonalnych w hodowlach *in vitro* powoduje, że większy odsetek wczesnych komórek hemopoetycznych po stymulacji krwiotwórczymi czynnikami wzrostowymi zaczyna proliferować (17). Uważa się, że zablokowanie w KKM autokrynnej pętli hamującej TGF -  $\beta$  za pomocą oligomerów antysensowych może znaleźć w przyszłości praktyczne zastosowanie w próbach namnażania KKM poza organizmem, np. dla celów transplantacyjnych. Warto nadmienić, że ostatnio zidentyfikowano szereg białek wewnątrzkomórkowych negatywnie regulujących cykl komórkowy poprzez interakcje z cyklinami bądź kinazami zależnymi od cyklin. Są to białka: p16, p21 i p27 (16). Strategia oligomerów antysensowych wydaje się szczególnie przydatna w badaniach oceniających ewentualny wpływ tych białek na hamowanie proliferacji ludzkich KKM i KKU. Badania takie podjęto już w naszym laboratorium.

Na podstawie przeprowadzonych własnych badań wynika, że stan proliferacji KKM i KKU występuje we wczesnych etapach ich namnażania i różnicowania — wypadkowa działania pętli stymulujących jak i hamujących cykl komórkowy. We frakcji komórek ludzkiego szpiku posiadającej zarówno antygen CD34 jak i receptory STK - 1 oraz c - kit, a zatem wzbogaconej w KKM i KKU — wykazaliśmy bowiem obecność ekspresji: ligandu receptora c - kit (KL) oraz ligandu receptora STK - 1 (STKL). Obecnie badamy wpływ zniesienia ekspresji genów kodujących wymienione ligandy na potencjał proliferacyjny w hodowlach *in vitro* ludzkich KKM i KKU.

### 3. Rola receptorów STK-1 (FLK2/FLT3), c-kit i IGF-1 w proliferacji ludzkich komórek hemopoetycznych

Receptory STK - 1 (FLK - 2/FLT3) oraz c - kit należą do receptorów posiadających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej. Ulegają one ekspresji na najwcześniejszych ludzkich komórkach hemopoetycznych (3,4,5,18,19). Swoiste ligandy produkowane są głównie w komórkach podścieliska szpiku kostnego. Wspomnieliśmy już, że posługując się techniką RT - PCR ekspresje tych ligandów wykryliśmy również we frakcji komórek szpiku ludzkiego wzbogaconej w KKM i KKU. W momencie, gdy wymienione receptory zostały zidentyfikowane i opisane, odpowiednie ligandy nie były jeszcze odkryte i sklonowane.

Pierwsze dane funkcjonalne dotyczące roli jaką pełnią wymienione receptory w regulacji hemopoezy człowieka zostały uzyskane dzięki strategii oligomerów antysensowych. W tym celu dysponując sekwencjami cDNA kodującymi odpowiednie receptory ustaliliśmy sekwencje nukleotydowe odpowiednich oligomerów antysensowych. Niektóre z nich okazały się biologicznie aktywne i swoiście hamowały w komórkach ekspresję mRNA dla tych białek receptorowych. Wykorzystując przygotowane oligomery zablokowaliśmy w ludzkich komórkach hemopoetycznych ekspresję swoistych cząsteczek mRNA kodujących receptory STK - 1 (FLK2/FLT3) lub c - kit. Wpływ zniesienia ekspresji odpowiednich receptorów na proliferację i różnicowanie komórek szpiku ocenialiśmy następnie w testach klonogennych *in vitro* (19,3).

Efekt zniesienia ekspresji receptora STK - 1 był najbardziej widoczny na poziomie komórek inicjujących hodowle długoterminowe szpiku (19). Są to jedne z najmłodszych ludzkich komórek hemopoetycznych — zbliżone czynnościowo do KKM. Zaburzenie w ekspresji receptora STK - 1 prowadziło do znacznego upośledzenia proliferacji tych komórek. Opierając się na wynikach przeprowadzonych przez nas własnych doświadczeń wysunęliśmy hipotezę, że receptor STK - 1 (FLK2/FLT3) jest niezwykle ważny w proliferacji najmłodszych ludzkich komórek układu krwiotwórczego (19).

Swoisty ligand receptora STK - 1 (FLK2/FLT3) został sklonowany dopiero przed kilkoma miesiącami. Okazało się, że zgodnie z tym jak przewidzieliśmy to za pomocą strategii oligomerów antysensowych — bierze on istotnie udział w regulacji namnażania najmłodszych ludzkich komórek krwiotwórczych (20,21).

Efekt zniesienia za pomocą oligomerów antysensowych w ludzkich komórkach hemopoetycznych ekspresji drugiego z badanych receptorów hemopoetycznych — receptora c - kit widoczny był z kolei w największym stopniu w ludzkich KKU układu czerwonokrwinkowego (3,4,5). Zmniejszenie ekspresji receptora c - kit prowadziło bowiem do około 70% zahamowania *in vitro* wzrostu klonogenego erytropoetycznych KKU. Prawidłowość uzyskanych przez nas wyników potwierdziła następnie inna grupa badawcza — blokując funkcję receptora c - kit na powierzchni ludzkich komórek hemopoetycznych za pomocą swoistych przeciwciał monoklonalnych (10). Ligand receptora c - kit

jest obecnie sklonowany i, jak wiadomo, będąc ważnym czynnikiem hemopoetycznym — odgrywa m.in. decydującą rolę w proliferacji ludzkich KKU układu czerwonych krwinek. Uważa się, że erytropoetyczne KKU człowieka są szczególnie wrażliwe na zaburzenia w interakcji: receptora c-kit ze swoim ligandem (KL).

Trzeci z receptorów — receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostowego typu I (IGF-I) należy również do rodziny receptorów posiadających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej. Do niedawna uważano, że IGF-I jest niezbędnym czynnikiem wzrostowym dla ludzkich komórek układu krwiotwórczego — szczególnie układu czerwonych krwinek (22). Oceniając rolę IGF-I w regulacji proliferacji komórek hemopoetycznych człowieka postanowiliśmy ponownie wykorzystać jako narzędzie badawcze strategię antysensową. Ku naszemu zaskoczeniu w przeprowadzonych badaniach wykazaliśmy, że zniesienie ekspresji receptora dla IGF-I w komórkach układu krwiotwórczego nie zmniejszało potencjału proliferacyjnego ludzkich KKU (6). Wyszliśmy wówczas na przypuszczenie, że rola IGF-I w proliferacji najwcześniejszych ludzkich komórek hemopoetycznych posiadających antygen CD34 jest przeceniana, a IGF-I być może odgrywa dopiero pewną rolę w końcowych etapach hemopoezy, np. w procesie terminalnego dojrzewania komórek hemopoetycznych (6). Obserwacja ta została ostatnio potwierdzona w modelu zwierzęcym (11). Myszy z wywołanymi doświadczalnie za pomocą techniki homologicznej rekombinacji mutacjami genów, które kodują IGF-I i jego swoisty receptor posiadają bowiem prawidłowo wykształcony układ krwiotwórczy. Inna z grup badawczych, posługując się z kolei modelem *in vitro*, udowodniła, że IGF-I faktycznie nie wpływa na proliferację wczesnych KKU układu czerwonych krwinek, lecz jedynie na proces terminalnego dojrzewania proerytroblastów oraz na samą już hemoglobinizację krwinek czerwonych (12). Korzystając z możliwości jakie niesie ze sobą strategia oligomerów antysensowych i tym razem udało się prawidłowo zidentyfikować rolę biologiczną kolejnego receptora hemopoetycznego.

#### **4. W jaki sposób strategia oligomerów antysensowych przyczyniła się do odkrycia megakariocytopoetyny**

Różnicowanie się KKM w kierunku megakariocytowym podlega precyzyjnym mechanizmom regulacyjnym. Megakariocyty są terminalnie zróżnicowanymi komórkami układu płytkotwórczego i występują w szpiku kostnym. W wyniku fragmentacji własnej cytoplazmy uwalniają do krwi płytki. Wiadomo, że biorą one ważny udział w regulacji procesów krzepnięcia. Od dawna wiadano, że żaden ze znanych do tej pory krwiotwórczych czynników wzrostowych nie jest tak efektywny w stymulowaniu w hodowlach *in vitro* wzrostu kolonii megakariocytowych, jak surowica lub frakcje białek uzyskane z moczu od pacjentów cierpiących na aplazję szpiku (23). Słusznie podejrzewano, że surowica tych pacjentów zawiera m.in. nie zidentyfikowany do tej pory czynnik

wzrostowy swoisty dla układu megakariocytowego. Prace nad izolacją tej swoistej megakariocytopoetyny rozpoczęto w wielu laboratoriach.

W tym samym czasie, gdy rozpoczęto poszukiwanie megakariocytopoetyny pojawiło się doniesienie o odkryciu nowego onkogenu, który występuje w materiale genetycznym wirusa wywołującego u myszy zespoły mieloproliferacyjne. Wkrótce okazało się, że gen ten koduje nowy receptor hemopoetyczny (7). Gen kodujący receptor, a co najważniejsze, analogiczny gen ludzki szybko znaleziono i sklonowano. Receptor ten nazwano w skrócie *c - mpl*. Chcąc poznać następnie jego funkcję biologiczną zastosowano i tym razem strategię antysensową. Okazało się, że zniesienie ekspresji genu kodującego ten receptor w ludzkich komórkach hemopoetycznych hodowanych *in vitro* powodowało wybiórcze upośledzenie wzrostu kolonii megakariocytowych. Wysunięto wówczas przypuszczenie, że *c - mpl* jest receptorem dla hipotetycznej megakariocytopoetyny (7).

Opierając się na wynikach wspomnianych badań kilka niezależnych zespołów badawczych podjęło prace nad znalezieniem ligandu dla tego receptora. Wysiłek został uwieńczony sukcesem i ligand receptora *c - mpl* został odkryty kilka miesięcy temu (13). Okazał się on faktycznie czynnikiem stymulującym wybiórczo wzrost kolonii megakariocytowych czyli od dawna poszukiwaną megakariocytopoetyną. Nie ulega wątpliwości, że wkrótce zostanie wprowadzony do kliniki jako lek efektywnie stymulujący produkcję płytek krwi.

## **5. Strategia antysensowa w badaniu białek biorących udział w transdukcji sygnału z receptorów do jądra oraz funkcji niektórych białek wewnątrzjądrowych**

Funkcje białek pełniących rolę receptorów powierzchniowych komórki lub odpowiednich cytokin można oceniać w warunkach *in vitro*, a nawet *in vivo* blokując ich czynność biologiczną za pomocą swoistych przeciwciał monoklonalnych. Strategii tej ze zrozumiałych względów nie można wykorzystać do badań czynnościowych, dotyczących białek, które znajdują się wewnątrz cytoplazmy lub w jądrze komórkowym.

W przypadkach tych szczególnie przydatna jest strategia oligomerów antysensowych. Oligomery antysensowe mogą bowiem penetrować do wnętrza żywych komórek i wybiórczo blokować ekspresję wybranych genów kodujących: białka biorące udział w transdukcji sygnału z pobudzonych receptorów do jądra lub białka regulujące transkrypcję genów w jądrze komórkowym. Efekt wyłączenia danego genu w żywych komórkach można następnie ocenić w odpowiednim modelu doświadczalnym *in vitro*, a nawet *in vivo*.

Oceniając w komórkach hemopoetycznych funkcje niektórych białek biorących udział w transdukcji sygnału z receptorów do jądra wykorzystaliśmy ponownie strategię oligomerów antysensowych. Na tej podstawie ocenialiśmy

m.in. rolę jaką pełni w transdukcji sygnału w ludzkich KKU białko kodowane przez protoonkogen *c - vav* (8). Upośledzenie ekspresji tego białka w komórkach hemopoetycznych człowieka prowadziło do zahamowania wzrostu kolonii mieszanych, tworzonych przez jedne z najwcześniejszych ludzkich KKU tzw. CFU - Mix (ang. *Colony Forming Units of Mixed Lineages*). Obserwowaliśmy również zahamowanie wzrostu kolonii układu czerwonokrwinkowego. Dane te wskazują na udział w ludzkich komórkach hemopoetycznych białka *c - vav* w transdukcji sygnału poprzez receptor *c - kit*.

Przykładem badania funkcji biologicznej genu regulującego procesy transkrypcji w jądrze komórkowym było zastosowanie tej strategii do oceny biologicznej funkcji protoonkogenu *c - myb*. Białko *c - myb* jest, jak wiadomo, czynnikiem transkrypcyjnym, pełniącym rolę aktywatora transkrypcji wielu ważnych genów (24). Swoista sekwencja nukleotydowa wiążąca białko *c - myb* występuje w promotorach wielu genów. W wykonanych doświadczeniach hamując za pomocą oligomerów antysensowych ekspresję mRNA kodującego białko *c - myb* obserwowaliśmy zahamowanie proliferacji ludzkich komórek hemopoetycznych należących do wszystkich linii układu krwiotwórczego. Uzyaliśmy w ten sposób dowód, że białko *c - myb* pełni główną rolę w regulacji proliferacji komórek hemopoetycznych (9). Wykazaliśmy również, że zniesienie ekspresji białka *c - myb* w komórkach szpiku kostnego zmniejszało równocześnie ekspresję receptora *c - kit*. Wysunęliśmy wówczas kolejną hipotezę, że białko *c - myb* jest niezbędne w aktywacji transkrypcji genu *c - kit* w komórkach hemopoetycznych (3,4,5).

Dane te uzyskane za pomocą strategii oligomerów antysensowych, zostały ostatnio potwierdzone w modelu doświadczalnym *in vivo* u myszy (14). U zwierząt tych ekspresję genu kodującego gen *c - myb* trwale zaburzono, stosując technikę tzw. homologicznej rekombinacji. Myszy, które w wyniku tej procedury nabyły mutacje genu kodującego białko *c - myb* giną wewnątrzmacicznie i wykazują objawy zahamowania dojrzewania komórek układu krwiotwórczego. Warto również nadmienić, że zablokowanie u mysich płodów prawidłowej czynności genu kodującego białko *c - myb* powodowało obraz kliniczny spotykany u zwierząt z wrodzonym defektem receptora *c - kit* (mutacja locus *w*). Świadczyłyby to o udziale białka *c - myb* w transaktywacji genu kodującego receptor *c - kit*.

Faktyczny udział białka *c - myb* w regulacji ekspresji receptora *c - kit* w ludzkich komórkach hemopoetycznych potwierdziliśmy ostatnio za pomocą badań czynnościowych oceniając regulację ekspresji promotora genu *c - kit* człowieka (25).

## Podsumowanie

W przedstawionej pracy staraliśmy się omówić aspekty praktyczne zastosowania strategii oligomerów antysensowych w ocenie funkcji biologicznej genów, które regulują namnażanie i różnicowanie ludzkich komórek hemopoe-

tycznych. Strategia ta pozwoliła na prawidłową ocenę i zidentyfikowanie roli biologicznej poszczególnych omówionych w pracy genów. Wyniki przytoczonych w pracy badań zostały już potwierdzone innymi metodami badawczymi. Świadczy to o tym, że strategia oligomerów antysensowych staje się uznaną metodą badawczą współczesnej hematologii molekularnej.

Poznanie fizjologicznych mechanizmów regulujących wytwarzanie w organizmie komórek krwi oraz ingerencja w nie za pomocą oligomerów antysensowych posiada ważny aspekt kliniczny. Jakie praktyczne zastosowanie w medycynie klinicznej znajdują oligomery antysensowe okaże najbliższy czas (26,27,28,29).

## Literatura

1. Karp J. E., Broder S., (1994), *Cancer Research*, 54, 653 – 665.
2. Ratajczak M. Z., Gewirtz A. M., (1994), in: *Nucleic Acids & Molecular Biology*, vol. VIII, Ed. Eckstein F., Springer Verlag, Berlin — Heidelberg, 298-326.
3. Ratajczak M. Z., Luger S. M., deRiel K., Abraham J., Calabretta B., Gewirtz A. M., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1710 – 1714.
4. Ratajczak M. Z., Luger S. M., Gewirtz A. M., (1992), *Int. J. Cell Clon.*, 10, 205 – 214.
5. Ratajczak M. Z., Gewirtz A. M., (1992), in: *Molecular Biology of Haematopoiesis*, vol. II, Eds. Abraham N., Konwalinka G., Marks P., Sachs L., Tavassoli M., Intercept Ltd, 449 – 456.
6. Ratajczak M. Z., Kuczynski W. I., Onodera K., Moore J., Ratajczak J., Kregenov A. A., deRiel K., Gewirtz A. M., (1994), *J. Clin. Invest.*, 94, 320 – 327.
7. Methia N., Louache F., Vainchenker W., Wendling F., (1993), *Blood*, 1395 – 1401.
8. Luger S. M., Ratajczak M. Z., diPaola R., Gewirtz A. M., (1993), *Blood*, 82, suppl. 1, 107a.
9. Gewirtz A. M., Calabretta B., (1988), *Science*, 242, 1303- 1306.
10. Broudy V. C., Lin N., Zsebo K. M., Birkett N. C., Smith K. A., Bernstein I. D., Papayannopoulou T., (1992), *Blood*, 79, 338-346.
11. Baker J., Liu J. P., Robertson E. J., Efstratiadis A., (1993), *Cell*, 75, 73 – 82.
12. Muta K., Krantz S. B., Bondurant M. C., Wickrema A., (1994), *J. Clin. Invest.*, 94, 34 – 43.
13. Metcalf D., (1994), *Nature*, 369, 519 – 520.
14. Mucenski M. L., McLain K., Kier A. B., Swerdlow S. H., Schweiner C. M., Miller T. A., Pietryga D. W., Scott W. J., Potter S. S., (1991), *Cell*, 65, 677 – 689.
15. Huang S., Testarppen W. M. M., (1993), *Nature*, 360, 745 – 749.
16. Ratajczak M. Z., (1994), *Acta Haematol Pol.*, 25, 41 – 49.
17. Cardoso A. A., Li M., Batard P., Hatzfeld A., Brown E. L., Levesque J.P., Sookdeo H., Panterne B., Sansilvestri P., Clark S. T., Hatzfeld J., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8707 – 8711.
18. Ratajczak M. Z., Gewirtz A. M., (1993), *Post. Biol. Kom.*, 3, 279 – 295.
19. Small D., Levenstein M., Kim E., Carow C., Amin S., Rockwell P., Witte L., Burrow Ch., Ratajczak M. Z., Gewirtz A. M., Civin C. I., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 459 – 463.
20. Hannum C., Culpepper J., Campbell D., McClanahan T., Żurawski S., Bazan J. F., Kastelen R., Hudak S., Wagner J., Mattson J., Luh J., Duda G., Martina N., Peterson D., Menon S., Shanafelt A., Muench M., Kelner G., Namikawa R., Rennick D., Roncarolo M., Zlotnik A., Rosnet O., Dubreull P., Birnbaum D., Lee F., (1994), *Nature*, 368, 643 – 648.



21. Lyman S. D., James L., Johnson L., Brasel K., deVries P., Escobar S. S., Downey H., Splett R. R., Beckmann M. P., McKenna H. J., (1994), *Blood*, 83, 2795-2801.
22. Sawada K., Krantz S. B., Dessypirys N., Koury S. T., Sawyer S. T., (1989), *J. Clin. Invest.*, 83, 1701 - 1709.
23. Ratajczak J., Kuczyński W. I., Ratajczak M. Z., (1994), *Pol. Arch. Med. Wew.*, 91, (w druku).
24. Gonda T. J., (1991), *Cancer Cells*, 3, 22 - 23.
25. Ratajczak M. Z., Gewirtz A. M., (1993), *Blood*, 82, suppl. 1, 229a.
26. Ratajczak M. Z., Hijiya N., Catani L., DeRiel K., Luger S. M., McGlave Ph., Gewirtz A., (1992), *Blood*, 79, 1956 - 1961.
27. Ratajczak M. Z., Kant J. A., Hijiya N., Luger S. M., Zhang J., Zon G., Gewirtz A. M., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11823 - 11827.
28. Szczylik C., Skórski T., Nicolaides N., Manzella L., Malaguarnera L., Venturelli D., Gewirtz A. M., Calabretta B., (1991), *Science*, 253, 562 - 565.
29. Skórski T., Nieborowska-Skórska M., Nicolaides N., Szczylik C., Iversen P., Iozzo R. V., Zon G., Calabretta B., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 4504 - 4508.

### The application of antisense oligodeoxynucleotides strategy in studies on molecular regulation of haematopoiesis

#### Summary

In this paper, different aspects of the application of antisense strategy in experimental haematology based on own experimental results are discussed. This strategy was successfully applied to study a role of the: c-kit, STK-1 (FLK2/FLT3), IGF-IR, c-mpl, c-vav and c-myb genes in the regulation of human haematopoiesis.

#### Key words:

antisense oligomers, haematopoiesis, haemopoietic receptors, stem cells.

#### Adres dla korespondencji:

Mariusz Z. Ratajczak, Department of Pathology, BRB - 1 Room 514, Curie Blvd. Philadelphia, PA 19 104.