

Received: 2005.07.06  
Accepted: 2006.01.19  
Published: 2006.02.06

## Reorganizacja cytoszkieletu a różnicowanie się komórek linii ludzkich białaczek HL-60 i K-562

### The cytoskeleton reorganization and differentiation of HL-60 and K-562 human leukemia cell lines

Magdalena Izdebska, Alina Grzanka, Maciej Ostrowski

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu

#### Streszczenie

Mikrofilamenty, mikrotubule i filamenty pośrednie tworzą cytoszkielet. Odgrywają one ważną rolę w ruchu komórki, podziałach, transporcie, apoptozie, proliferacji, transformacji nowotworowej oraz różnicowaniu. Wspomniane procesy są związane ze zmianą kształtu komórki, w którym aktywny udział biorą białka cytoszkieletu. W komórkach mięśniowych aktyna jest podstawowym białkiem mikrofilamentów, tubulina – mikrotubul, natomiast wimentyna jest jednym z białek charakterystycznych dla filamentów pośrednich. Różnicowanie komórek jest procesem nierozzerwalnie związanym z powstawaniem tkanek i organów. Natomiast indukcja różnicowania komórek nowotworowych może się stać jednym ze sposobów leczenia, zwłaszcza chorób rozrostowych krwi. W badaniach dotyczących różnicowania komórek linii białaczek ludzkich naukowcy stosują cytokiny, retinoidy, a także estry forbolu oraz witaminę D<sub>3</sub>. Z ich badań wynika, że szlaki transdukcji sygnałów z udziałem tych cząsteczek są różne. Retinoidy i witamina D<sub>3</sub> wpływają na transkrypcję genów głównie poprzez receptory jądrowe, a cytokiny przez receptory obecne na powierzchni komórki. Wyniki badań wyraźnie wskazują na reorganizację aktyny, tubuliny i wimentyny podczas różnicowania komórek białaczki, ale ciągle nie wiadomo czy zmiany te są przyczyną czy następstwem tego procesu.

Słowa kluczowe:

cytoszkielet • komórki białaczek ludzkich HL-60 i K-562 • różnicowanie

#### Summary

Microfilaments, microtubules, and intermediate filaments form the cytoskeleton. These substructures play a significant role in cell motility, transport, divisions, differentiation, tumor transformation, and apoptosis. These processes are related with changes in cell shape, in which cytoskeletal proteins take an active part. In non-muscle cells, actin is an essential constituent of microfilaments, tubulin forms microtubules, and vimentin is one of the characteristic proteins of intermediate filaments. The differentiation of cells is associated inseparably with tissue and organ formation, and the induction of malignant cell differentiation can be a method of treatment, especially in hematopoietic stem cell disease therapy. In studies on tumor cell differentiation, agents such as cytokines, retinoids, forbol esters, and vitamin D<sub>3</sub> are the most commonly used, and results show these substances may participate in different pathways of signal transduction. Retinoids and vitamin D<sub>3</sub> mostly affect gene transcription via nuclear receptors, whereas cytokines act through membrane receptors. The results of studies show actin, tubulin, and vimentin reorganization during the differentiation of leukemia cells, but it remains unknown whether the observed changes are the cause or the result of the differentiation process.

Key words:

cytoskeleton • human leukemia cells HL-60 and K-562 • differentiation

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_60/8693.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8693.pdf)**Word count:** 3076**Tables:** –**Figures:** 1**References:** 67**Adres autorki:** mgr Magdalena Izdebska, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK w Toruniu, ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz; e-mail: mizdebska@cm.umk.pl**Wykaz skrótów:** **ABP's** – białka wiążące aktynę; **ADF** – czynnik depolimeryzujący aktynę; **ATP** – adenozyntroójfosforan; **ATRA** – kwas całkowicie trans retinowy; **DAG** – diacylglicerol; **DMSO** – dwumetylosulfotlenek; **fMLP** – formylo-metionyloleucynylofenyloalanina; **G-CSF** – czynnik stymulujący kolonie granulocytów; **GM-CSF** – czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe; **IL-8** – interleukina 8; **IP<sub>2</sub>** – inozytolo-(4,5) bisfosforan; **MAP** – białka związane z mikrotubulami; **mRNA** – informacyjny RNA; **MT** – mikrotubule; **NBT** – błękit nitrotetrazolowy; **PDTC** – ditiokarbaminian piroolidyny; **PKC** – kinaza białkowa C; **PLSCR1** – izoforma 1 skramblazy fosfolipidowej; **PMA** – 12-octan-13-mirystynianoforbolu; **PMN** – leukocyty polimorfonuklearne; **RAR** – receptor kwasu retinowego; **ROCK** – kinazy białek Rho; **RXR** – receptor retinoidów; **TNF** – czynnik martwicy nowotworu; **TPA** – 13-octan-12-O-tetradekanoiloforbolu; **TRAF** – receptor związany z TNF.

## 1. WSTĘP

Komórki nowotworowe charakteryzują się upośledzonym mechanizmem apoptozy, a ich niekontrolowane podziały powodują powstawanie guzów. Zróżnicowanie tych anomalnych komórek umożliwia wprowadzenie ich na drogę programowanej śmierci, a więc jest jedną ze strategii terapii przeciwnowotworowej [12,24,39,41]. W latach 70. XX w. badania Frienda i wsp. [17] ujawniły możliwość różnicowania komórek białaczki w normoblasty, które utraciły zdolność do podziałów. W następstwie tego procesu dochodzi do ekspresji części genomu zmieniającej fenotyp komórki. Na podstawie badań stwierdzono, że związki chemiczne, takie jak retinoidy czy cytokiny kierują komórki na drogę różnicowania. Retinoidy jako poliizoprenowe pochodne witaminy A są związkami o naturze hydrofobowej i podobnie jak steroidy (hormony gonad, kory nadnerczy, witamina D) czy tyroidy (hormony tarczycy) regulują metabolizm komórki przez oddziaływanie na proces transkrypcji. Receptorami tych związków są rozpuszczalne białka znajdujące się wewnątrz komórki. Wiążąc retinoid ulegają dimeryzacji i tworzą hetero- lub homodimery pełniące funkcje czynników regulujących transkrypcję. Rodzaj dimeryzacji decyduje o charakterze oddziaływań z DNA. Jądrowe receptory retinoidów funkcjonują w dwu postaciach – RAR (retinoic acid receptor) i RXR (receptor kwasu 9-*cis* retinowego). Pierwszy z nich jest białkiem wiążącym ATRA, kwas 9-*cis* retinowy i kwas 13-*cis* retinowy. Omawiany receptor tworzy wyłącznie heterodimery z receptorem RXR i jako taki oddziałuje z elementami odpowiedzi na retinoidy w DNA. Ligandem RXR w odróżnieniu od RAR jest tylko 9-*cis* RA. Receptor ten ulega hetero- i homodimeryzacji. Partnerami RXR w heterodimerach są receptory RAR, receptory hormonów tarczycy, a także witaminy D oraz receptory czynnika proliferacji peroksyosomów [38]. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na możliwość wspólnego regulowania ekspresji genów przez dwie różne cząsteczki sygnałowe. Okazało się również, iż RAR tworzy kompleksy także z izoformą delta kinazy białkowej C i w tej postaci oddziałuje z elementami odpowiedzi retinoidowej w DNA [65]. Kwas retinowy mo-

dukuje transkrypcję wielu genów, m.in. wpływa na syntezę mRNA wimentyny i tymozyny – komponentów cytoszkieletu. Indukuje również ekspresję białka F52/Mac Marck, będącego substratem kinazy białkowej C podczas tworzenia struktur cytoszkieletu [45]. Ponadto izomery kwasu retinowego mogą oddziaływać na komórkę nie tylko przez regulację ekspresji genów, ale również modulując aktywność niektórych enzymów np. izoform kinazy białkowej C delta i zeta (PKC $\delta$ , PKC $\zeta$ ) [37]. ATRA stymuluje fosforylację PKC $\delta$  umożliwiając tym samym jej późniejsze połączenie z izoformą  $\alpha$  receptora RAR [31].

Różnicowanie linii komórek ludzkich białaczek wywołują także TPA i PMA. TPA podobnie jak PMA jest jednym z estrów forbolu – pierścieniowych hydrofobowych cząsteczek, będących silnymi aktywatorami kinazy białkowej C (PKC). Kinaza ta należy do białek funkcjonujących w szlakach transdukcji sygnałów odbieranych przez receptory błony komórkowej. Naturalnym aktywatorem PKC jest diacylglicerol (DAG) – cząsteczka glicerolu zestyfikowana resztami nasyconego i nienasyconego kwasu tłuszczowego. DAG jest produktem aktywności fosfolipazy C (PLC), enzymu degradującego jeden z błonowych fosfoinozytoli. Estrы forbolu jako związki syntetyczne są aktywniejsze niż DAG przez to wywołują znacznie silniejsze efekty w komórce. Aktywna PKC fosforyluje kolejne białka substratowe, do których zaliczane są m.in. kinazy MAP (mitogen activated protein) regulujące cykl komórkowy. Estrы forbolu znane są jako czynniki aktywujące proliferację komórek nowotworowych. PKC reprezentują wiele izoform, jedną z nich jest izoforma  $\delta$  (PKC $\delta$ ). Liczne badania wskazują na dwójaki charakter tej kinazy. PKC $\delta$  ufosforylowana przez kinazę tyrozynową, będącą receptorem insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF) katalizuje transfer fosforanu na kolejne białka regulujące aktywność kinaz MAP, powodując tym samym ich aktywację i stymulację proliferacji. Co ciekawe, PKC $\delta$  nie jest wymagana w proliferacji komórek prawidłowych. TPA może zarówno stymulować podziały komórkowe, jak i przyczyniać się do ubikwitynozależnej degradacji PKC $\delta$  także promującej rozwój nowotworu [26]. Estrы forbolu nie tylko indukują powstanie i rozwój nowo-

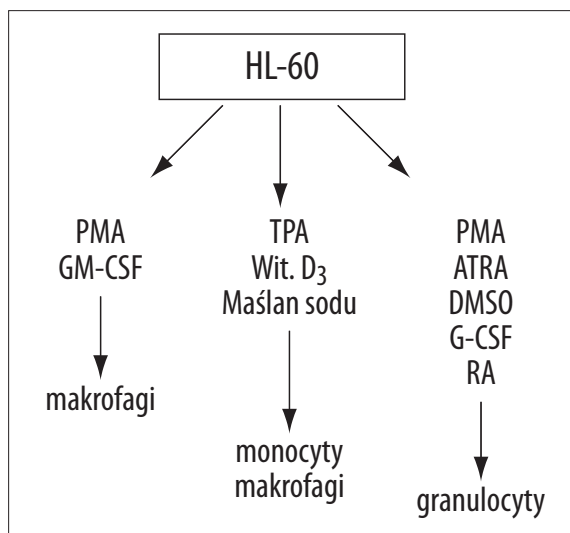
tworów, ale również mogą hamować te procesy i wprowadzać komórki w procesy różnicowania i apoptozy. Jest to możliwe dzięki różnym izoformom kinaz PKC oraz plejotropowym efektem działań innych czynników. ATRA i PMA powodują fosforylację PKC $\delta$ . Z kolei kinaza ta indukuje ekspresję izoformy 1 skramblazy fosfolipidowej (PLSCR1 – phospholipid scramblase 1) – enzymu katalizującego wymianę lipidów w obrębie obu warstw błony komórkowej. Ekspozycja fosfatydylseryny w zewnętrznej warstwie błony jest nieodzownym elementem procesu apoptozy i wymaga aktywności PLSCR1. Apoptoza, jak już wcześniej stwierdzono, jest integralnym elementem procesu różnicowania. W kontekście wspomnianych badań ciekawa wydaje się informacja o umiejscowieniu skramblazy w jądrze komórkowym. Ben-Efraim i wsp. [4] wskazują na rolę PLSCR1 jako czynnika transkrypcyjnego podczas różnicowania komórek ostrej białaczki promielocytarnej (APL). Godnym odnotowania jest to, że zarówno DMSO, jak i witamina D<sub>3</sub> nie powodowały fosforylacji PKC $\delta$  i nie wpływały na zahamowanie rozwoju guzów z udziałem opisanego szlaku [65].

Cytoszkieleł stanowi elastyczny i dynamiczny układ białkowych włókien o zróżnicowanej strukturze. Złożony jest z mikrofilamentów, filamentów pośrednich oraz mikrotubul, które wraz z białkami im towarzyszącymi tworzą sieć łączącą jądro komórkowe, organella oraz błonę cytoplazmatyczną [21]. Cytoszkieleł warunkuje utrzymanie kształtu oraz ruch organelli i całej komórki [60]. Wpływa także na przekazywanie sygnałów oraz zmiany morfologiczne zachodzące podczas proliferacji, różnicowania i transformacji. Każda z klas włókien wchodzących w skład cytoszkieletu różni się morfologią oraz składem chemicznym [19,21].

Regulacja struktur cytoszkieletu odbywa się z udziałem białek towarzyszących, takich jak ABP, ADF czy MAP. W warunkach apoptozy indukowanej różnymi czynnikami zaobserwowano zmiany w strukturach białek cytoszkieletu spowodowane m.in. aktywnością kaspaz [10].

## 2. REORGANIZACJA AKTYNY POD WPŁYWEM RETINOIDÓW I CYTOKIN

Aktyna jest jednym z głównych białek cytoszkieletu. W organizmach eukariotycznych występuje w komórkach zarówno mięśniowych jak i niemięśniowych. W komórkach ludzkich wyróżniamy 6 postaci aktyny, kodowanych przez 6 różnych genów [51]. Ze względu na różnice w sekwencji aminokwasowej, opisuje się 6 postaci aktyny m.in. 4 postaci  $\alpha$ -aktyny, występujące w mięśniach poprzecznie prążkowanych oraz  $\beta$  i  $\gamma$ , charakterystyczne dla komórek mięśni gładkich oraz niemięśniowych. Rozróżnia się także  $\gamma$ -aktynę charakterystyczną dla *Acanthamoeba* [57]. Od strony morfologicznej obserwuje się dwie postaci aktyny: monomeryczną G-aktynę (globularną) oraz fibrylarną F-aktynę. Związanie z G-aktyną ATP zapewnia jej odpowiednią konformację, umożliwiającą oddziaływanie monomerów w procesie polimeryzacji. Aktyna umiejscowiona jest głównie w części korowej komórki. Filamenty aktynowe mogą być również zorganizowane w uporządkowane, równoległe wiązki zwane włóknami naprężeniowymi. Najczęściej jednak występują w postaci krótkich włókienek w warstwie korowej tworząc siateczkę mikrofilamentów [19,21,28].



Ryc. 1. Schemat różnicowania komórek linii HL-60 pod wpływem różnych czynników. **ATRA** – kwas całkowicie trans retinowy, **DMSO** – dwumetylosulfotlenek, **G-CSF** – czynnik stymulujący kolonie granulocytów, **GM-CSF** – czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe, **PMA** – 12-octan-13-mirystynianoforbolu, **RA** – kwas retinowy, **TPA** – 13-octan-12-O-tetradekanoiloforbolu

W interfazowych komórkach HL-60 obserwowanych w mikroskopie fluorescencyjnym, aktyna jest widoczna w postaci krótkich, cienkich wiązek umiejscowionych w przestrzeni między błoną cytoplazmatyczną a jądrem [67]. W komórkach, które przyczepiają się do podłoża przybiera postać sztywnych włókien, rozciągających się przez całą komórkę, z których część jest zakotwiczona do błony komórkowej [25]. Natomiast w neutrofilach polimorfonuklearnych (PMN), aktyna istnieje w postaci krótkich cytoplazmatycznych filamentów, wiążących na końcach gelsolinę oraz jako trójwymiarowa sieć związana z innymi białkami wiążącymi aktynę (ABP's) [64].

Po zadziałaniu kwasu retinowego i dwumetylosulfotlenku (DMSO) naukowcy obserwowali reorganizację aktyny [40,47]. Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, że w komórkach linii ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60 i K-562 różnicowanie w granulocyty wywołują ATRA, DMSO oraz GM-CSF, natomiast dyferencjację w makrofagi powoduje PMA i GM-CSF. Witamina D<sub>3</sub>, maślan sodu oraz TPA stymulują różnicowanie monocytowo/makrofagowe [8,16, 23,30,32,43,44,47,52,53, 61] (ryc.1).

Kwas retinowy (RA) pobudza do różnicowania w neutrofile nie tylko komórki linii HL-60, ale także prawidłowe komórki progenitorowe szpiku oraz komórki ostrej białaczki promielocytowej (NB4) [9,63]. Badania Veselskiej i wsp. [62] wykazały wpływ kwasu kawowego na różnicowanie się komórek HL-60 w granulocyty. Obecność kwasu kawowego w stężeniach 13  $\mu$ M lub 52  $\mu$ M w hodowli zawierającej RA, zwiększała liczbę zróżnicowanych komórek. Olins i wsp. [47] wykazali, że RA w komórkach HL-60 indukuje ich dojrzewanie, podczas którego następują zmiany w strukturze zarówno jądra jak i cytoplazmy. Komórki podczas tego procesu nabywają cech charakterystycznych dla granulocytów, m.in. zdolność migracji i apoptozy.

Komórki linii HL-60, podobnie jak neutrofile, podczas różnicowania granulocytowego wykazują rozpad jądra na płyty, wzmożoną ekspresję antygenu CD11b, zdolność redukcji NBT oraz możliwość fagocytozy. Po chemicznie indukowanej dyferencjacji, komórki linii HL-60, w porównaniu z neutrofilami wykazują większy odsetek niedojrzałych morfologicznie jąder [47].

Różnicowanie komórek prowadzi do wzrostu całkowitej ilości aktyny oraz białek z grupy ABP [47,64]. Badania z zastosowaniem techniki immunoblotingu wykazały wzrost poziomu frakcji F-aktyny o prawie 50% w komórkach poddanych działaniu kwasu retinowego. Apoptoza występowała po pięciu dniach od wzbogacenia hodowli w kwas retinowy. Komórki linii HL-60 w czasie procesu różnicowania miedoidalnego wywołanego DMSO, nabyły prawdopodobnie na skutek syntezy aktyny *de novo*, zdolność ruchu towarzyszącą wzrostowi ilości tego białka [27]. Natomiast po potraktowaniu komórek HL-60, ATRA i PMA dochodziło w nich do spadku ilości aktyny. Zmiany te były prawdopodobnie spowodowane wzrostem ilości ciałek apoptotycznych, świadczących o zaawansowaniu procesów prowadzących do śmierci komórki [63].

Olins i wsp. [47] badając wpływ fMLP na komórki linii HL-60 obserwowali polimeryzację aktyny oraz wzrost jej ilości w części korowej cytoplazmy. Komórki niezróżnicowane nie wykazywały znaczących zmian w wyniku działania fMLP. Sham i wsp. [54,55] na podstawie swoich badań stwierdzili, że komórki linii HL-60 nie były zdolne do polimeryzacji aktyny ani do chemotaksji po potraktowaniu fMLP i IL-8. Natomiast te same komórki poddane działaniu ATRA i DMSO uzyskiwały zdolność polimeryzacji aktyny w odpowiedzi na wyżej wymienione czynniki.

Podczas badań z zastosowaniem czynników należących do rodziny cytokin – GM-CSF, G-CSF oraz TNF zauważono spadek fluorescencji F-aktyny, co odpowiadało jej depolimeryzacji towarzyszącej reorganizacji cytoszkieletu aktynowego podczas różnicowania [15,36]. Związki te łączą się z receptorami na powierzchni komórek, które należą do klasy receptorów cytokin i nie mają aktywności kinazy tyrozynowej [1,3,13,59]. Ligandami tego receptora są także hematopoetyna oraz interleukiny 2,5,7,9 i 15. Za wiązanie tych czynników odpowiada izoforma receptora IA, charakteryzująca się obecnością w domenie zewnątrzkomórkowej fragmentu fibronektynopodobnego typu III, zawierającego konserwatywne reszty WS (tryptofan-seryna). Segment wewnątrzkomórkowy ma zdolność oddziaływania z cytoplazmatycznymi kinazami tyrozynowymi. Istnieje kilka dróg transdukcji sygnału z udziałem wspomnianych białek. Na nich opiera się aktywacja kinaz Jak (kinazy Janusa), które fosforylują białka z grupy Stat (signal transducer and activator of transcription) [7]. Ufosforylowany czynnik Stat dimeryzuje i trafia do jądra komórkowego, gdzie powoduje transaktywację wybranych genów np. kodujących podjednostkę receptora Fcγ. Receptory niemające własnej aktywności kinazowej pobudzają ekspresję genów *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* z udziałem kinaz Syk lub LcK zaliczanych do grupy c-Src. W podobny sposób na komórkę wpływa TNF. Po związaniu liganda receptor ulega trimeryzacji, a proces ten zachodzi z udziałem dwóch białek towarzyszących receptorowi: TRAF 1 i TRAF 2. Aktywacja tego receptora stymuluje szlak sфингомиелиnowy. Aktywność sфингомиелиназы

prowadzi do powstania ceramidu regulującego funkcje fosfatyzacji i kinazy aktywowanych ceramidem. Oba enzymy odpowiadają za modulację aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB indukując tym samym różnicowanie komórki. Aktywacja fosfolipazy D (PLD) przez ceramid wprowadza komórkę w proces apoptozy [45]. Chodniewicz i Zhelev [11] w toku swoich doświadczeń zaobserwowali polimeryzację aktyny w ludzkich neutrofilach stymulowaną GM-CSF lub insuliną. Autorzy zaproponowali model, w którym przekazanie sygnału z powierzchni komórki wiedzie przez dwa niezależne szlaki kinazy Src, Rho, ROCK i PKA lub kinazę białkową C wymagającą hydrolizy IP<sub>2</sub>.

Veselska i wsp. [62,63] oceniali dynamikę zmian cytoszkieletu w komórkach linii HL-60 inkubowanych w obecności ATRA i PMA na podstawie intensywności fluorescencji F-aktyny. Obserwowali przekształcanie się regularnej sieci mikrofilamentów aktynowych w skupiska aktyny, które w późniejszych etapach tworzyły w cytoplazmie sieć długich włókien. Autorzy ci uważają, że te struktury odgrywają rolę w powstawaniu pączków apoptotycznych i mają wpływ na dezintegrację komórek w ciała apoptotyczne. Podczas różnicowania w granulocyty i makrofagi cytoszkielet aktynowy nie podlegał żadnym znaczącym zmianom strukturalnym w komórkach obecnych w zawieszynie, jednakże nieprzyczepionych do podłoża. Natomiast w komórkach, które na skutek różnicowania przyczepiły się do podłoża, zaobserwowano charakterystyczną przebudowę filamentów aktynowych. W tym wypadku aktyna formowała bardzo regularną sieć z dużą ilością drobnych skupień, tworząc w niektórych komórkach większe agregaty. Jądra komórek różnicujących się pod wpływem ATRA wykazywały cechy apoptozy. Sieć aktynowa w tych komórkach była całkowicie zniszczona, jednakże komórki nie rozpadały się na ciała apoptotyczne.

### 3. ZMIANY W STRUKTURZE FILAMENTÓW POŚREDNICH PODCZAS RÓŻNICOWANIA KOMÓREK

Filamenty pośrednie zostały zaobserwowane w połowie lat 60 ub.w. [5]. Uzyskały swoją nazwę ze względu na wymiar ich poprzecznego przekroju, który mieści się pomiędzy średnicą mikrofilamentów i mikrotubul. Filamenty pośrednie wydają się pod względem morfologicznym jednorodnym systemem, jednakże biorąc pod uwagę ich skład chemiczny wykazują dużą różnorodność. U ludzi co najmniej 65 genów koduje białka wchodzące w skład filamentów pośrednich [48]. Ze względu na rozmieszczenie tkankowe oraz skład białkowy filamenty pośrednie dzielimy na: keratynowe (cytokeratyny), desminowe, wimentynowe, glejowe oraz neurofilamenty. Pierwsze z nich występują w komórkach nabłonkowych pochodzenia ekto- i endodermalnego. Filamenty desminowe zaobserwowano zarówno w komórkach mięśniowych jak i niemięśniowych, natomiast struktury wimentynowe tylko w komórkach niemięśniowych pochodzenia mezodermalnego. Filamenty glejowe to struktury obecne w komórkach glejowych pochodzenia neuroektodermalnego, a neurofilamenty wykryto tylko w neuronach. Do wielogenowej rodziny białek należą także m.in. lamininy (główny składnik blaszki jądrowej), nestyny (cewa nerwowa) oraz peryferyny (neurony obwodowe) i interneksyny (ośrodkowy układ nerwowy) [6]. Zmiany w organizacji filamentów pośrednich mogą być związane ze zmianą funkcjonowania komórki, połączeniami pomiędzy filamentami pośrednimi oraz stanem chorobowym [34].

System filamentów pośrednich jest ściśle powiązany z pozostałymi białkami cytoszkieletu [49]. Zapadanie się filamentów wimentynowych w regionie okołojądrowym podczas działania na komórki mezenchymatyczne kolchicyną, sugeruje ich ścisły związek z systemem mikrotubul [2].

Zmiany ekspresji wimentyny oraz innych białek wchodzących w skład cytoszkieletu, były opisywane podczas badań z użyciem linii komórkowych różnicujących się zarówno w kierunku granulocytów, jak i monocytów [9,47].

W komórkach linii HL-60 wimentyna wykazuje niski poziom ekspresji i znaczne rozproszenie [19]. W wyniku działania kwasu retinowego rozproszona w komórkach kontrolnych wimentyna organizuje się w sieć filamentów [40]. Przeprowadzone kilka lat później badania Olinsa i wsp.[47] wskazują, że działanie RA na linię komórek HL-60/S4 (klon wrażliwy na RA) przez okres 4 dni spowodowało drastyczny spadek (około 95%) ilości wimentyny. Analiza obecności tego białka z zastosowaniem immunoblotingu potwierdziła wyniki uzyskane w immunofluorescencji [47]. Takahashi [58] badając wpływ RA na komórki HL-60 wykrył frakcję filamentów wimentynowych rozpuszczalną w buforze z dodatkiem Tritonu, sugerując silne połączenie laminy B z badanym białkiem. Przeprowadzone w latach późniejszych badania ujawniły korelację dwóch filamentów pośrednich: wimentyny i laminy. Po zadziaaniu kwasem retinowym następuje spadek ilości zarówno lamin A, B1, C, jak i wimentyny [46]. Wyniki tych prac pozwalają na wysunięcie wniosku, że RA powoduje degradację wimentyny oraz wpływa na jej organizację w sieć filamentów, głównie w pobliżu jądra komórkowego.

W czasie doświadczenia z użyciem TPA zaobserwowano w komórkach linii białaczek ludzkich rozwój sieci włókien o podobnym układzie jak w monocytach i makrofagach. Dellagi [14] badając wpływ TPA na komórki linii HL60 oraz U937 zauważył bogatą sieć podobną do sieci w prawidłowych monocytach. TPA powodował wzrost funkcjonalnego transkryptu, natomiast spadek ekspresji mRNA był uzależniony od stężenia ATRA. Wzrost ilości wimentyny pod wpływem działania TPA zaobserwował także w swoich badaniach Olins i wsp. [46]. Tak jak i w przypadku opisywanego wcześniej działania RA na ilość wimentyny i laminy tak i po zadziaaniu TPA widać zależność między tymi białkami. Jednakże pod wpływem estrów forbolu zarówno ilość wimentyny jak i lamin A, B1 i C gwałtownie rośnie [46].

Badania ekspresji genu wimentyny w komórkach linii HL-60, a także NB4 podczas różnicowania indukowanego RA wskazują na obniżoną jego ekspresję, natomiast w wyniku działania estrami forbolu poziom ekspresji genu zwiększał się [50]. Doświadczenia ostatnich lat ujawniły jednak, że preinkubacja komórek linii HL-60 z PDTC (ditiokarbaminian pirolidyny) powoduje zahamowanie działania TPA. Miejsce wiążące NFκB jest umiejscowione w regionie promotora genu kodującego wimentynę, a więc ekspresja wimentyny jest regulowana z udziałem NFκB. Aktywność NFκB jest regulowana przez status oksydacyjno-redukcyjny komórki zależny od jonów metali. Koordynacyjne związanie Fe<sup>2+</sup> przez PDTC blokuje transkrypcyjną funkcję NFκB, co z kolei wpływa na obniżenie syntezy mRNA wimentyny [66].

Ekspresję genu wimentyny badano również w innych liniach komórkowych. W cytoplazmie komórek K-562 nie-tractowanych czynnikami pobudzającymi różnicowanie, występowały typowo skręcające się spiralnie wiązki wimentyny i cytokeratyny (keratyny). Po trzech dniach hodowli w obecności TPA ilość wimentyny i cytokeratyny znacznie wzrastała, a oba białka występowały w postaci dużych sferycznych agregatów oraz włókien [29]. ATRA wpływał na gęstość sieci i kierunkowość włókien. Komórki NB4 inkubowane z ATRA wykazywały wzrost zdolności do migracji. Badania te wskazują, że reorganizacja sieci wimentynowej i ekspresja tych białek jest ściśle kontrolowana przez regulację właściwości mechanicznych tych komórek podczas różnicowania neutrofilii [9]. Opisaną tendencję nie zaobserwowano podczas różnicowania w erytrocyty [42].

#### 4. WPŁYW CZYNNIKÓW RÓŻNICUJĄCYCH NA MIKROTUBULE

Głównym białkiem budującym mikrotubule jest tubulina. Wraz z pozostałymi elementami cytoszkieletu dynamicznie uczestniczy w przestrzennej organizacji cytoplazmy, jest także ważnym białkiem wrzeciona mitotycznego. Podjednostką strukturalną mikrotubul jest heterodimer zbudowany z cząsteczek α i β tubuliny. Dimery te następnie tworzą długie protofilamenty budujące ściany mikrotubuli. Mikrotubule są strukturami bardzo wrażliwymi na działanie takich alkaloidów, jak kolchicyna, winblastyna i winkrystyna. [18,20,22,35].

W komórkach interfazowych sieć mikrotubul ma swój początek w okołojądrowym regionie MTOC (microtubule organizing center). Włókna, w zależności od typu komórki, mogą być pojedyncze lub tworzące równoległe wiązki ułożone wzdłuż długiej osi wypustek cytoplazmatycznych. W cytoplazmie zaobserwowano także pojedynczo rozproszone tubule [47]. W komórkach linii HL-60 wyznakowana tubulina wykazywała niewielką fluorescencję i była równomiernie rozproszona w cytoplazmie. W niezróżnicowanych komórkach HL-60, mikrotubule były zorganizowane w charakterystyczną sieć rozpościerającą się pod błoną komórkową. Sieć ta była zbudowana z bardzo długich włókien rozchodzących się z MTOC. Podczas mitozy wrzeciono podziałowe pozostawało niezmienione [20,22].

W komórkach linii HL-60 po indukcji różnicowania granulocytowego kwasem retinowym nastąpił wzrost liczby wiązek tubuliny [47]. W celu wykazania, że przebudowa składników cytoszkieletu jest związana z różnicowaniem, a nie z działaniem RA zastosowano analizę porównawczą rozkładu białek cytoszkieletu w komórkach HL-60, HL-60/S4 (klon wrażliwy na RA) oraz HL-60/R3 (klon o obniżonej wrażliwości na RA). W komórkach linii HL-60/S4 tubulina, podobnie jak w komórkach niezróżnicowanych, widoczna była w okolicach jądra. Po dodaniu do hodowli RA, mikrotubule ulegały wydłużeniu, a region centrosomalny układał się dystalnie względem jądra podzielonego na płyty. W komórkach niezróżnicowanych α-tubulina występowała w postaci owalnej sieci mikrotubularnej rozciągającej się od jądra do proksymalnie położonego obszaru centrosomalnego [47]. W makrofagach przyczepionych do podłoża mikrotubule miały wygląd sieci równomiernie rozmieszczonych wiązek w cytoplazmie, skumulowanych głównie w regionie perinuklearnym [63].

TPA odpowiedzialny za różnicowanie komórek białaczki w monocyty, powodował fosforylację jednej z reszt tyrozyny w cząsteczce tubuliny. Następtwem tej reakcji była reorganizacja mikrotubul [33].

Veselska i wsp.[63] opisali przebudowę mikrotubul podczas apoptozy w komórkach linii HL-60 pobudzonych ATRA i PMA do różnicowania granulocytowego. Zaobserwowano, iż różnicom intensywności fluorescencji odpowiadała przebudowa strukturalna mikrotubul. Zauważono także wzrost liczby komórek apoptotycznych oraz spadek liczby komórek o prawidłowych rozmiarach. Podobnie jak w wypadku aktyny, w końcowo zróżnicowanych komórkach zaobserwowano rozpad tubuliny podczas apoptozy.

Apoptoza w badanych komórkach była procesem towarzyszącym różnicowaniu. Wśród komórek ulegających apoptozie można wyróżnić trzy typy rozmieszczenia mikrotubul w komórce:

- sporadycznie widziane komórki o zachowanej strukturze mikrotubul i zawierające jądro z cechami apoptozy,
- komórki z zupełnie zdepolimeryzowanymi mikrotubulami, o jądrze apoptotycznym i nietkniętą błoną cytoplazmatyczną oraz cytoplazmą,

- komórki o słabym równomiernym lub punktowym sygnale fluorescencji tubuliny w cytoplazmie [63].

## 5. PODSUMOWANIE

Plastyczność białek cytoszkieletu decyduje o ich podatności na czynniki promujące różnicowanie komórek. Owe czynniki cechuje zróżnicowanie chemiczne oraz odmienne szlaki transdukcji sygnałów. Zmiana fenotypu komórki nowotworowej jest jedną z możliwości terapii. Przeznaczeniem zróżnicowanych komórek jest zainicjowanie procesu apoptozy. W toku wspomnianych prac niejednokrotnie obserwowano morfologiczne i/lub biochemiczne cechy programowanej śmierci komórek. Badania nad reorganizacją cytoszkieletu podczas różnicowania stymulowanego różnymi związkami chemicznymi były podejmowane wielokrotnie. Rezultatem tych badań są dobrze udokumentowane obserwacje zmian w strukturze trzech głównych komponentów cytoszkieletu komórki. Jednak wciąż kwestią otwartą pozostaje problem, na którym etapie dyferencjacji, obserwowane zmiany w strukturze cytoszkieletu są swoiste dla komórki zróżnicowanej.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Al-Shami A., Mahanna W., Naccache P.H.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak 2, Stat 3, and Stat 5b. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 1058–1063
- [2] Baker S.K., Goodwin S., Sur M., Tarnopolsky M.A.: Cytoskeletal myotoxicity from simvastatin and colchicines. *Muscle Nerve.*, 2004; 30: 799–802
- [3] Basu S., Dunn A., Ward A.: G-CSF: function and modes of action. *Int. J. Mol. Med.*, 2002; 10: 3–10
- [4] Ben-Efraim I., Zhou Q., Wiedmer T., Gerace L., Sims P.J.: Phospholipid scramblase 1 is imported into the nucleus by a receptor mediated pathway and interacts with DNA. *Biochemistry*, 2004; 43: 3518–3526
- [5] Biberfeld P., Ericsson J.L., Perlmann P., Raftell M.: Increased occurrence of cytoplasmic filaments in *in vitro* propagated rat liver epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, 1965; 39: 301–305
- [6] Bloemendal H., Pieper F.R.: Intermediated filaments: known structure, unknown function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989; 1007: 245–253
- [7] Borish L.C., Steinke J.W.: Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003; 111 (Suppl.2): S460–S475
- [8] Brackman D., Lund-Johansen F., Aarskog D.: Expression of cell surface antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, retinoic acid and DMSO. *Leuk Res.*, 1995; 19: 57–64
- [9] Bruel A., Paschke S., Jainta S., Zhang Y., Vassy J., Rigaut J.P., Beil M.: Remodeling of vimentin cytoskeleton correlates with enhanced motility of promyelocytic leukemia cells during differentiation induced by retinoic acid. *Anticancer Res.*, 2001; 21: 3973–3980
- [10] Byun Y., Chen F., Chang R., Trivedi M., Green K.J., Cryns V.L.: Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2001; 8: 443–450
- [11] Chodniewicz D., Zhelev D.V.: Novel pathways of F-actin polymerization in the human neutrophil. *Blood*, 2003; 102: 2251–2258
- [12] Czyż M., Szulawska A.: Indukowane różnicowanie komórek białaczkowych linii K562. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 82–97
- [13] Danova M., Aglietta M.: Cytokine receptors, growth factors and cell cycle in human bone marrow and peripheral blood hematopoietic progenitors. *Haematologica*, 1997; 82: 622–629
- [14] Dellagi K., Brouet J.C.: Alteration of vimentin intermediate filaments expression during differentiation of HL60 and U937 human leukemic cell lines. *Leuk. Res.*, 1984; 8: 611–616
- [15] Fabian I., Halperin D., Lefter S., Mittelman L., Altstock R.T., Seaton O., Tsarfaty I.: Alteration of actin organization by jaspamide inhibits ruffling, but not phagocytosis or oxidative burst, in HL-60 cells and human monocytes. *Blood*, 1999; 93: 3994–4005
- [16] Fabian I., Lass M., Kletter Y., Golde D.W.: Differentiation and functional activity of human eosinophilic cells from an eosinophil HL-60 subline: response to recombinant hematopoietic growth factors. *Blood*, 1992; 80: 788–794
- [17] Friend C., Scher W., Holland J.G., Sato T.: Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cell *in vitro*: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971; 68: 378–382
- [18] Gigant B., Wang C., Ravelli R.B., Roussi F., Steinmetz M.O., Curmi P.A., Sobel A., Knossow M.: Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, 2005; 435: 519–522
- [19] Grzanka A.: Wpływ wybranych cytostatyków na reorganizację białek cytoszkieletu linii komórek białaczek ludzkich K-562 i HL-60. Rozprawa habilitacyjna, Wydawnictwo uczelniane Akademii Medycznej im. L. Rydygiera, Bydgoszcz, 2002
- [20] Grzanka A., Grzanka D.: The influence of etoposide on the distribution of tubulin in human leukemia cell line HL-60. *Med. Sci. Monit.*, 2003; 9(1): BR66–BR69
- [21] Grzanka A., Grzanka D., Orlikowska M.: Cytoskeletal reorganization during process of apoptosis induced by cytostatic drugs in K-562 and HL-60 leukemia cell lines. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 1611–1617
- [22] Grzanka A., Grzanka D., Orlikowska M., Żuryn A., Grzanka A.: Estimation of taxol influence on changes in tubulin and vimentin systems in K-562 and HL-60 cell lines by immunofluorescence microscopy. *Neoplasma*, 2005; 52: 193–198
- [23] Herrera R., Hubbell S., Decker S., Petruzzelli L.: A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K-562 cells. *Exp. Cell Res.*, 1998; 238: 407–414
- [24] Huang S., Ingber D.E.: Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp. Cell Res.*, 2000; 261: 91–103
- [25] Huo X., Xu X.J., Chen Y.W., Yang H.W., Piao Z.X.: Filamentous-actins in human hepatocarcinoma cells with CLSM. *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10: 1666–1668
- [26] Jackson D.N., Foster D.A.: The enigmatic protein kinase Cδ: complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J.*, 2004; 18: 627–636
- [27] Jacob C., Lepoint M., Szilagy C., Allen J.M., Bertrand C., Lagente V.: DMSO-treated HL60 cells: a model of neutrophil-like cells mainly expressing PDE4B subtype. *Int. Immunopharmacol.*, 2002; 2: 1647–1656
- [28] Janmey P.A.: Creating a niche in the cytoskeleton: Actin reorganization by a protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 14745–14747

- [29] Jarvinen M., Andersson L.C., Virtanen J.: K562 erythroleukemia cells express cytokeratins 8, 18, and 19 and epithelial membrane antigen that disappear after induced differentiation. *J. Cell Physiol.*, 1990; 143: 310–320
- [30] Ji Y., Studzinski G.P.: Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 370–377
- [31] Kambhampati S., Li Y., Verma A., Sassano A., Majchrzak B., Deb D.K., Parmar S., Gafis N., Kalvakolanu D.V., Rahman A., Uddin S., Minucci S., Tallman M.S., Fish E.N., Platanias L.C.: Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 32544–32551
- [32] Kanayasu-Toyoda T., Yamaguchi T., Uchida E., Hayakawa T.: Commitment of neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells coincides with expression of transferrin receptor. Effect of granulocyte colony stimulating factor on differentiation and proliferation. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 25471–25480
- [33] Katagiri K., Katagiri T., Kajiyama K., Yamamoto T., Yoshida T.: Tyrosine-phosphorylation of tubulin during monocytic differentiation of HL-60 cells. *J. Immunol.*, 1993; 150: 585–593
- [34] Klymkowsky M.W.: Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1995; 7: 46–54
- [35] Krebs A., Goldie K.N., Hoenger A.: Structural rearrangements in tubulin following microtubule formation. *EMBO Rep.*, 2005; 6: 227–232
- [36] Kutsuna H., Suzuki K., Kamata N., Kato T., Hato F., Mizuno K., Kobayashi H., Ishii M., Kitagawa S.: Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004; 286: C55–C64
- [37] Kwiatkowska D., Kwiatkowska-Korczyk J.: Kwas retinowy: jego metabolizm i mechanizm działania. *Post. Biol. Kom.*, 1999; 26: 579–592
- [38] Kwiatkowska D., Kwiatkowska-Korczyk J.: Heterodimeryczne receptory jądrowe. I. Receptory witamin i hormonów. *Post. Biochem.*, 2000; 46: 125–129
- [39] Leszczyniecka M., Roberts T., Dent P., Grant S., Fisher P.B.: Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacol. Ther.*, 2001; 90: 105–156
- [40] Leung M.F., Sokoloski J.A., Sartorelli A.C.: Changes in microtubules, microtubule-associated proteins, and intermediate filaments during the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res.*, 1992; 52: 949–954
- [41] Malinowska I.: Rola apoptozy w patogenezie i leczeniu nowotworów układu hematopoetycznego. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2004; 58: 548–559
- [42] Marazzi L., Parodi M.T., Di Martino D., Ferrari S., Tonini G.P.: Coordinate change of c-myc, transferrin receptor and H3 gene expression precedes induction of haemoglobin-producing cells of the leukaemia K562 cell line treated with cis-diamminedichloroplatinum (II). *Anticancer Res.*, 1991; 11: 947–952
- [43] Matsuhisa T., Mori Y.: Mode of differentiation of human promyelocytic leukemia cell line, HL-60, by 1α,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Blood Cells Mol. Dis.*, 1995; 21: 42–48
- [44] Munshi C.B., Graeff R., Lee H.C.: Evidence for a causal role of CD38 expression in granulocytic differentiation of human HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 49453–49458
- [45] Nowak J.Z., Zawilska J.B. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnałów. PWN Warszawa 2004
- [46] Olins A.L., Herrmann H., Lichter P., Kratzmeier M., Doenecke D., Olins D.E.: Nuclear envelope and chromatin compositional differences comparing undifferentiated and retinoic acid- and phorbol ester-treated HL-60 cells. *Exp. Cell Res.*, 2001; 268: 115–127
- [47] Olins A.L., Herrmann H., Lichter P., Olins D.E.: Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. *Exp. Cell Res.*, 2000; 254: 130–142
- [48] Omary M.B., Coulombe P.A., McLean W.H.: Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351: 2087–2100
- [49] Oshima R.G.: Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ.*, 2002; 9: 486–492
- [50] Owen P.J., Johnson G.D., Lord J.M.: Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp. Cell Res.*, 1996; 225: 366–373
- [51] Pollard T.D.: Genomics, the cytoskeleton and motility. *Nature*, 2001; 409: 842–843
- [52] Rocchi P., Ferreri A.M., Magrini E., Perocco P.: Effect of butyrate analogues on proliferation and differentiation in human neuroblastoma cell lines. *Anticancer Res.*, 1998; 18: 1099–1103
- [53] Ryves W.J., Dimitrijevic S., Gordge P.C., Evans F.J. HL-60 cell differentiation induced by phorbol- and 12- deoxyphorbol esters. *Carcinogenesis*, 1994; 15: 2501–2506
- [54] Sham R.L., Phatak P.D., Belanger K.A., Packman C.H.: Functional properties of HL60 cells matured with all-trans-retinoic acid and DMSO: differences in response to interleukin-8 and fMLP. *Leuk. Res.*, 1995; 19: 1–6
- [55] Sham R.L., Phatak P.D., Belanger K.A., Packman C.H.: The effect of dexamethasone on functional properties of HL60 cells during all-trans retinoic acid induced differentiation. Are there implications for the retinoic acid syndrome? *Blood Cells Mol. Dis.*, 1996; 22: 139–149
- [56] Simoni D., Rondanin R., Baruchello R., Roberti M., Rossi M., Grimaudo S., D' Alessandro N., Invidiata F.P., Tolomao M.: Retinoic acid and analogues as potent inducers of differentiation and apoptosis. New promising chemopreventive and chemotherapeutic agents in oncology. *Pure. Appl. Chem.*, 2001; 73: 1437–1444
- [57] Skalli O., Gabbiani G., Babai F., Seemayer T.A., Pizzolato G., Schurch W.: Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. II Rhabdomyosarcomas. *Am. J. Pathol.*, 1988; 130: 515–531
- [58] Takahashi N., Breitman T.R.: Retinoylation of vimentin in the human myeloid leukemia cell line HL60. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 5913–5917
- [59] Testa U., Torelli G.F., Riccioni R., Muta A.O., Miliati S., Annino L., Mariani G., Guarini A., Chiaretti S., Ritz J., Mandelli F., Peschle C., Foa R.: Human acute stem cell leukemia with multilineage differentiation potential via cascade activation of growth factor receptors. *Blood*, 2002; 99: 4634–4637
- [60] Toivola D.M., Tao G.Z., Habtezion A., Liao J., Omary M.B.: Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends. Cell Biol.*, 2005; 15: 608–617
- [61] Ujihara M., Nomura K., Yamada O., Shibata N., Kobayashi M., Takano K.: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ensures macrophage survival and generation of the superoxide anion: a study using a monocytic-differentiated HL60 subline. *Free Radic Biol Med.*, 2001; 31: 1396–1404
- [62] Veselska R., Zitterbart K., Auer J., Neradil J.: Differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells induced by all-trans retinoic acid is enhanced in combination with caffeic acid. *Int. J. Mol. Med.*, 2004; 14: 305–310
- [63] Veselska R., Zitterbart K., Jelinkova S., Neradil J., Svoboda A.: Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncol. Rep.*, 2003; 10: 1049–1058
- [64] Watts R.G.: Role of gelsolin in the formation and organization of triton-soluble F-actin during myeloid differentiation of HL-60 cells. *Blood*, 1995; 85: 2212–2221
- [65] Zhao K.W., Li X., Zhao Q., Huang Y., Li D., Peng Z.G., Shen W.Z., Zhao J., Zhou Q., Chen Z., Sims P.J., Wiedmer T., Chen G.Q.: Protein kinase Cdelta mediates retinoic acid and phorbol myristate acetate-induced phospholipid scramblase 1 gene expression: its role in leukemic cell differentiation. *Blood*, 2004; 104: 3731–3738
- [66] Zheng M., Son M.Y., Park C., Park J.I., Jo E.K., Yoon W.H., Park S.K., Hwang B.D., Lim K.: Transcriptional repression of vimentin gene expression by pyrroline dithiocarbamate during 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-dependent differentiation of HL-60 cells. *Oncol. Rep.*, 2005; 14: 713–717
- [67] Zitterbart K., Veselska R.: Effect of retinoic acid on the actin cytoskeleton in HL-60 cells. *Neoplasma*, 2001; 48: 456–461