

Received: 2012.12.02  
Accepted: 2014.03.10  
Published: 2014.05.08

## Interakcje szlaków sygnałowych proliferacji i różnicowania w miogenezie

### Interactions of proliferation and differentiation signaling pathways in myogenesis

Marta Milewska, Kamil Grabiec, Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk

Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### Streszczenie

Zaangażowanie komórek miogennych w różnicowanie mięśni szkieletowych wymaga wcześniejszego nieodwracalnego przerwania cyklu komórkowego. Na poziomie molekularnym rozpoznano kilka głównych regulatorów cyklu komórkowego: kinazy cyklinozależne i cykliny pobudzające postęp cyklu, a jego zatrzymanie jest uwarunkowane działaniem inhibitorów cdk (białka z rodziny Cip/Kip oraz rodzina INK) i rodziny białek kieszeniowych: Rb, p107 i p130. Biologiczna aktywność kompleksów cyklina/cdk umożliwia przechodzenie przez kolejne fazy cyklu komórkowego. Specjalizacja, różnicowanie i fuzja mioblastów wymagają działania miogennych czynników regulatorowych, do których należą MyoD, miogenina, Myf5 i MRF4. MyoD i Myf5 uczestniczą w specjalizacji komórek mięśniowych, miogenina kontroluje proces różnicowania, natomiast MRF4 jest związany z dojrzewaniem miotub. Zniesienie regulacji cyklu komórkowego wyzwala niekontrolowaną proliferację antagonizującą funkcje czynników miogennych, co wyjaśnia brak ekspresji genów swoistych dla różnicowania w dzielących się komórkach. Odwrotnie, czynnik miogenny MyoD wydaje się współdziałać z inhibitorami cyklu komórkowego na ścieżce prowadzącej do jego zahamowania i zaangażowania w proces różnicowania. Słabo ufosforylowana postać Rb i inhibitory cdk odgrywają znaczącą rolę w trwałym przerwaniu cyklu komórkowego w zróżnicowanych miotubach. Kompleksy cyklina/cdk nie tylko regulują podział komórki przez fosforylację różnych substratów, lecz mogą również kontrolować inne procesy komórkowe, takie jak transdukcja sygnałów, różnicowanie i apoptoza. Białka Cip/Kip, poza hamowaniem cyklu komórkowego, odgrywają ważną rolę w regulacji śmierci komórki, transkrypcji, determinowaniu losu komórek, migracji komórek i dynamice cytoszkieletu. W artykule przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczącej interakcji szlaków sygnałowych kontrolujących podstawowe etapy miogenezy płodowej i regeneracyjnej.

#### Słowa kluczowe:

cykl komórkowy • kinazy cyklinozależne • inhibitory kinaz zależnych od cyklin • miogeneza • miogenne czynniki regulatorowe

#### Summary

The commitment of myogenic cells in skeletal muscle differentiation requires earlier irreversible interruption of the cell cycle. At the molecular level, several key regulators of the cell cycle have been identified: cyclin-dependent kinases and their cyclins stimulate the cell cycle progress and its arrest is determined by the activity of cdk inhibitors (Cip/Kip and INK protein families) and pocket protein family: Rb, p107 and p130. The biological activity of cyclin/cdk complexes allows the successive phases of the cell cycle to occur. Myoblast specialization,

differentiation and fusion require the activity of myogenic regulatory factors, which include MyoD, myogenin, Myf5 and MRF4. MyoD and Myf5 play a role in muscle cell specialization, myogenin controls the differentiation process, whereas MRF4 is involved in myotube maturation. The deregulation of the cell cycle leads to uncontrolled proliferation, which antagonizes the functions of myogenic factors and it explains the lack of differentiation-specific gene expression in dividing cells. Conversely, the myogenic factor MyoD seems to cooperate with cell cycle inhibitors leading to inhibition of cell cycle progress and commitment to the differentiation process. The hypophosphorylated form of Rb and cdk inhibitors play an important role in permanent arrest of the cell cycle in differentiated myotubes. Furthermore, cyclin/cdk complexes not only regulate cell division by phosphorylation of several substrates, but may also control other cellular processes such as signal transduction, differentiation and apoptosis. Beyond regulating the cell cycle, Cip/Kip proteins play an important role in cell death, transcription regulation, cell fate determination, cell migration and cytoskeletal dynamics. The article summarizes current knowledge concerning the interactions of intracellular signaling pathways controlling crucial stages of fetal and regenerative myogenesis.

**Key words:** cell cycle • cyclin-dependent kinases • cyclin-dependent kinase inhibitors • myogenesis • myogenic regulatory factors

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1101617>

**Word count:** 4601

**Tables:** –

**Figures:** 2

**References:** 79

**Adres autorki:** dr hab. Katarzyna Grzelkowska-Kowalczyk, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: k\_grzel\_kow@poczta.fm

**Wykaz skrótów:** **Cdk** – kinazy cyklozależne (cyclin-dependent kinases); **CKI** – inhibitory kinaz zależnych od cyklin (cyclin-dependent kinase inhibitors); **GEF** – czynniki wymiany nukleotydów guaninowych (guanine-nucleotide exchange factors); **LEF-1** – limfatyczny czynnik wzmacniający 1 (lymphoid enhancing factor 1); **LIMK** – kinaza LIM (LIM kinase); **MEF2** – miogenny czynnik wzmacniający 2 (myogenic enhancer factor 2); **MHC** – ciężki łańcuch miozyny (myosin heavy chain); **MRF** – miogenny czynnik regulatorowy (myogenic regulatory factor); **Myf5** – czynnik miogenezy 5 (myogenic factor 5); **MyoD** – czynnik determinujący miogenezę (myoblast determination protein); **NF-κB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); **PAK** – kinaza aktywowana białkiem p21 (p21-activated kinase); **PI3K** – kinaza-3 fosfatydyloinozytolu (phosphoinositide 3-kinase); **PKNα** – kinaza białkowa Nα (protein kinase Nα); **P-TEFb** – pozytywny transkrypcyjny czynnik elongacyjny (positive transcription elongation factor); **PTEN** – homolog fosfatazy i tensyny (phosphatase and tensin homolog); **Rb** – białko retinoblastoma (retinoblastoma protein); **ROCK** – kinaza Rho (Rho-associated kinase); **TAD** – domena aktywiająca transkrypcję (transcriptional activation domain).

## WPROWADZENIE - ANTAGONIZM MIĘDZY CYKLEM KOMÓRKOWYM A RÓŻNICOWANIEM MIOBLASTÓW

Podczas rozwoju organizmu komórki somatyczne proliferują, podlegają różnicowaniu, wchodzi w stan spoczynkowy oraz giną na skutek działania mechanizmów homeostatycznych. Proliferyjną komórkę przechodzi proces zwany cyklem komórkowym, który dzieli się na cztery główne fazy: G1, S, G2 i M. Gdy komórka ulegnie podziałowi podczas mitozy (M), wchodzi w fazę G1. W fazie tej komórka zwykle rośnie i przygotowuje się do fazy

S, w której chromosomy ulegają duplikacji. Po zakończeniu tego procesu komórki przechodzą w fazę G2, w której kontynuują wzrost i przygotowują się do kolejnego podziału mitotycznego [6].

Cykl komórkowy jest regulowany przez wiele złożonych szlaków biochemicznych, co gwarantuje, że rozpoczęcie danego zdarzenia zależy od właściwego zakończenia wcześniejszych etapów ścieżki [14]. Zaangażowanie komórek miogennych w różnicowanie mięśni szkieletowych wymaga wcześniejszego nieodwracalnego przerwania

cyklu komórkowego. Wydaje się, że podjęcie decyzji o wejściu w nowy cykl podziałowy jest regulowane głównie przed przejściem z fazy G1 do fazy S. Na poziomie molekularnym rozpoznano kilka ważnych regulatorów cyklu komórkowego: kinazy cyklinozależne (cdk) i ich cykliny pobudzają postęp cyklu, podczas gdy jego zatrzymanie jest uwarunkowane działaniem inhibitorów cdk (CKI) i rodziny białek kieszeniowych: produktu genu podatności na siatkówczaka (białko Rb, retinoblastoma) i dwóch pokrewnych białek, p107 i p130.

Biologiczna aktywność kompleksów cyklina/cdk umożliwia przechodzenie przez kolejne fazy cyklu komórkowego. Cdk1, pierwsza opisana kinaza cyklinozależna, tworzy kompleksy z cyklinami A i B, które są niezbędne do przejścia z fazy G2 do fazy M [37]. Przejście z fazy G1 do fazy S podlega kontroli przez cyklinozależne kinazy, które są regulowane przez cykliny D (cdk4 i cdk6), E i A (cdk2). Jednym z najlepiej zbadanych białek docelowych dla cdk podczas przechodzenia z fazy G1 do S jest białko retinoblastoma. W słabo ufosforylowanej postaci Rb jest czynnikiem supresorowym wzrostu guzów, który oddziałuje przez interakcje z wieloma czynnikami transkrypcyjnymi i moduluje ich aktywność, w ten sposób tłumiąc transkrypcję genów niezbędnych do wejścia w fazę S. Najlepiej opisanymi białkami docelowymi dla wiązania Rb podczas fazy G1 są trzy czynniki transkrypcyjne z rodziny E2F (E2F1, E2F2 i E2F3). Kolejno następująca fosforylacja Rb z udziałem kompleksów cyklina-cdk fazy G1 (cdk4-cyklina D i cdk2-cyklina E) pobudza jego dysocjację od E2F, umożliwiając w ten sposób wejście komórek w fazę S. Kontrola postępu cyklu komórkowego podczas fazy G1 jest zatem w znacznym stopniu zależna od regulacji genów zależnych od Rb/E2F.

Podobne mechanizmy kontrolują cykl komórek miogennych, które przechodzą fazę aktywnej proliferacji przed zahamowaniem cyklu komórkowego i łączeniem się w miotuby. Specjalizacja, różnicowanie i fuzja mioblastów wymagają działania miogennych czynników regulatorowych (MRF). Rozpoznano cztery czynniki miogenne, są to: MyoD, miogenina, Myf5 i MRF4 [78]. Każdy z tych swoistych dla mięśni czynników transkrypcyjnych typu helisa-pętla-helisa (bHLH) wykazuje zdolność uruchamiania pełnego programu różnicowania mięśni szkieletowych, gdy ulegnie ekspresji w różnych typach komórek niemięśniowych. Cztery czynniki miogenne aktywniejszą transkrypcję swoistych dla mięśni genów przez tworzenie heterodimerów z wszechobecnymi białkami E i wiązanie zgodnej sekwencji E-box (CANNTG) w promotorach i wzmacniaczach genów mięśniowych. Miogenne czynniki transkrypcyjne podlegają ekspresji w określonej kolejności w komórkach miogennych: Myf5 i MyoD ulegają zazwyczaj ekspresji najwcześniej, następnie jest syntetyzowana miogenina, a jako ostatni MRF4 [58]. Ta kolejno następująca ekspresja czynników miogennych określa wczesne (Myf5/MyoD) i późne (miogenina/MRF4) etapy w życiu komórki mięśniowej. Jest to także związane z funkcjami, jakie pełnią te czynniki w rozwoju mięśni: MyoD i Myf5 odgrywają rolę w specjalizacji komórek

mięśniowych, miogenina kontroluje proces różnicowania, natomiast MRF4 jest związany z dojrzewaniem miotub.

Istnieją dowody, że zniesienie regulacji cyklu komórkowego prowadzi do niekontrolowanej proliferacji antagonizującej funkcje czynników miogennych, co wyjaśnia brak ekspresji genów swoistych dla różnicowania w dzielących się komórkach. Odwrotnie, czynnik miogeny MyoD wydaje się współdziałać z inhibitorami cyklu komórkowego, CKI i Rb, na ścieżce prowadzącej do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1 i zaangażowania w proces różnicowania. Słabo ufosforylowane postaci Rb i CKI odgrywają znaczącą rolę w trwałym przerwaniu cyklu komórkowego w zróżnicowanych miotubach [37].

#### AKTYWNOŚĆ REGULATORÓW CYKLU KOMÓRKOWEGO PODCZAS MIOGENEZY

Duża zawartość czynników mitogennych w środowisku zewnątrzkomórkowym stymuluje przejście mioblastów do fazy S i przeciwdziała ich zaangażowaniu w różnicowanie. Odwrotnie, trwałe wycofanie mioblastów z cyklu komórkowego wymaga, aby główne dodatnie regulatory cyklu komórkowego pozostały zahamowane, a to wiąże się z aktywacją inhibitorów cdk i białek z rodziny Rb [9].

Wiele dowodów wskazuje, że ekspresja i działanie aktywatorów cyklu komórkowego są hamowane podczas miogenezy. Ekspresja cdk4 i cdk2 pozostaje zwykle niezmienną podczas różnicowania komórek mięśniowych, jednak obniża się stężenie cdk1, cykliny A i cykliny D1. Wyjście mioblastów z cyklu komórkowego jest uwarunkowane osłabieniem aktywności cdk, a niezdolność komórek złośliwego mięsaka (*rhabdomyosarcoma*) do opuszczenia cyklu komórkowego jest związana z dużym stężeniem zarówno cykliny E, jak i cykliny A [40]. Nadekspresja cykliny D1 i A lub E związanych z cdk2 w proliferujących mioblastach powoduje zahamowanie aktywności MyoD i miogeniny i w konsekwencji uniemożliwia różnicowanie. Osłabienie miogennej aktywności transkrypcyjnej jest powszechną cechą działania cdk, na którą ma wpływ ścieżka zależna od Rb/E2F [39]. Ekspresja i działanie Rb i E2F zmienia się podczas miogenezy: akumulacja Rb występuje podczas rozwoju zarodkowego i różnicowania komórek, uczestniczy także w końcowym różnicowaniu różnych linii komórkowych [13]. Podczas miogennej różnicowania komórek C2, ekspresja genu Rb jest zwiększana przez MyoD za pośrednictwem mechanizmu, który jest odmienny od jego miogennej funkcji [42]. Miogeneza wymaga interakcji Rb w jego aktywnej ufosforylowanej postaci, z czynnikami miogennymi z rodziny MyoD i Rb współdziała z MyoD, w celu pobudzenia aktywności transkrypcyjnej MEF2 w różnicujących mioblastach [13].

Podczas różnicowania mięśni zmieniają się także funkcja i regulacja E2F [24]. Rodzina ta obejmuje sześć białek (E2F1-6), wykrywanych w różnych kompleksach nukleoproteinowych w proliferujących mioblastach, a nieobecnym w miotubach. E2F1 jest najlepiej zbadanym biał-

kiem E2F w miogenezie. Jego ekspresja jest hamowana podczas miogenezy, a miocyty wykazujące nadekspresję E2F1 nie opuszczają cyklu komórkowego, mimo warunków środowiska sprzyjających różnicowaniu. E2F1 hamuje transkrypcję zależną od MyoD i miogeniny, a represja ta wymaga udziału ścieżki Rb. Wykazano, że E2F4 i F2F5 biorą udział w hamowaniu fazy G1 [23] i są zaangażowane w stan postmitotyczny i różnicowanie przez kompleksy związane raczej z represją, niż z aktywacją transkrypcji [64]. Wiadomo np., iż kompleksy E2F4-p130 są związane ze stanem spoczynkowym G0. Badania zróżnicowanych komórek mięśniowych wykazały, że zmiany w subkomórkowym umiejscowieniu białek E2F (prawdopodobnie polegające na ich fosforylacji i łączeniu z różnymi kofaktorami) podtrzymują stan postmitotyczny w ostatecznie zróżnicowanych miotubach [24].

Ekspresja inhibitorów, zwłaszcza p21, ale także p27 i p18, jest pobudzana podczas miogenezy w rozwijających się mysich zarodkach oraz w miogennych liniach komórkowych tworząc mechanizm negatywnej regulacji cdk. Znanne są dwie rodziny CKI: CIP/KIP, do której należą białka p21, p27 i p57 oraz INK, która obejmuje białka p15, p16, p18 i p19 [3]. Rodzina inhibitorów INK wykazuje swoistość wobec kompleksów cdk4 i cdk6, hamując ich działanie przez wiązanie się z podjednostką cdk, w ten sposób zapobiegając ich wiązaniu z białkami z rodziny cykliny D. Klasa inhibitorów CIP/KIP jest bardziej różnorodna – mogą one hamować kompleksy wszystkich cdk, ale są słabiej działającymi inhibitorami, ponieważ wiążą tylko kompleksy cyklina-cdk, a aktywność hamującą wykazują jedynie homodimery [55]. Wiadomo, że MyoD indukuje ekspresję p21 podczas miogenezy. Wymuszona ekspresja p21 w mioblastach skutecznie hamuje cykl komórkowy w pożywce bogatej w mitogeny. Mechanizmy indukcji ekspresji p18, p27 i p57 podczas różnicowania mięśni szkieletowych nie są dokładnie poznane. Oprócz p21 i Rb, MyoD pobudza także ekspresję cykliny D3, przez mechanizm niezależny od syntezy białka i wymagający koaktywatora MyoD, p300 [9]. Cyklina D3 jest jedyną cykliną G1 (rodzina cyklin zwykle związanych z proliferacją), która jest pobudzana podczas miogenego różnicowania. Wpływa ona na nieodwracalne opuszczenie cyklu komórkowego przez mioblasty i uważa się, że jest całkowicie związana z cdk4 i nieufosforylowanym Rb w miotubach.

Wei i Paterson (2001) ustalili, że wzrost zawartości cdk4 wyraźnie zakłóca wiązanie zarówno homodimerów MyoD, jak i heterodimerów MyoD/E12 z DNA [72]. Co ważne, cdk4 nie utrudnia oddziaływania miogeniny lub kompleksów miogenina/białko E z DNA w tych samych warunkach. Zakłócenia wiązania MyoD z DNA nie wymagają aktywnej kinazy, ponieważ kinaza cdk4 sama może hamować interakcje z DNA. Ekspresja cdk4 jest podobna w mioblastach i miotubach [15], co sugeruje, że modulowanie funkcji MyoD przez cdk4 może być związane z jej komórkową lokalizacją. W dzielących się mioblastach cyklina D1 i cdk4 znajdują się w jądrze komórkowym, ale w uformowanych miotubach cyklina D1 jest nieobecna, a cdk4 występuje w przedziale cyto-

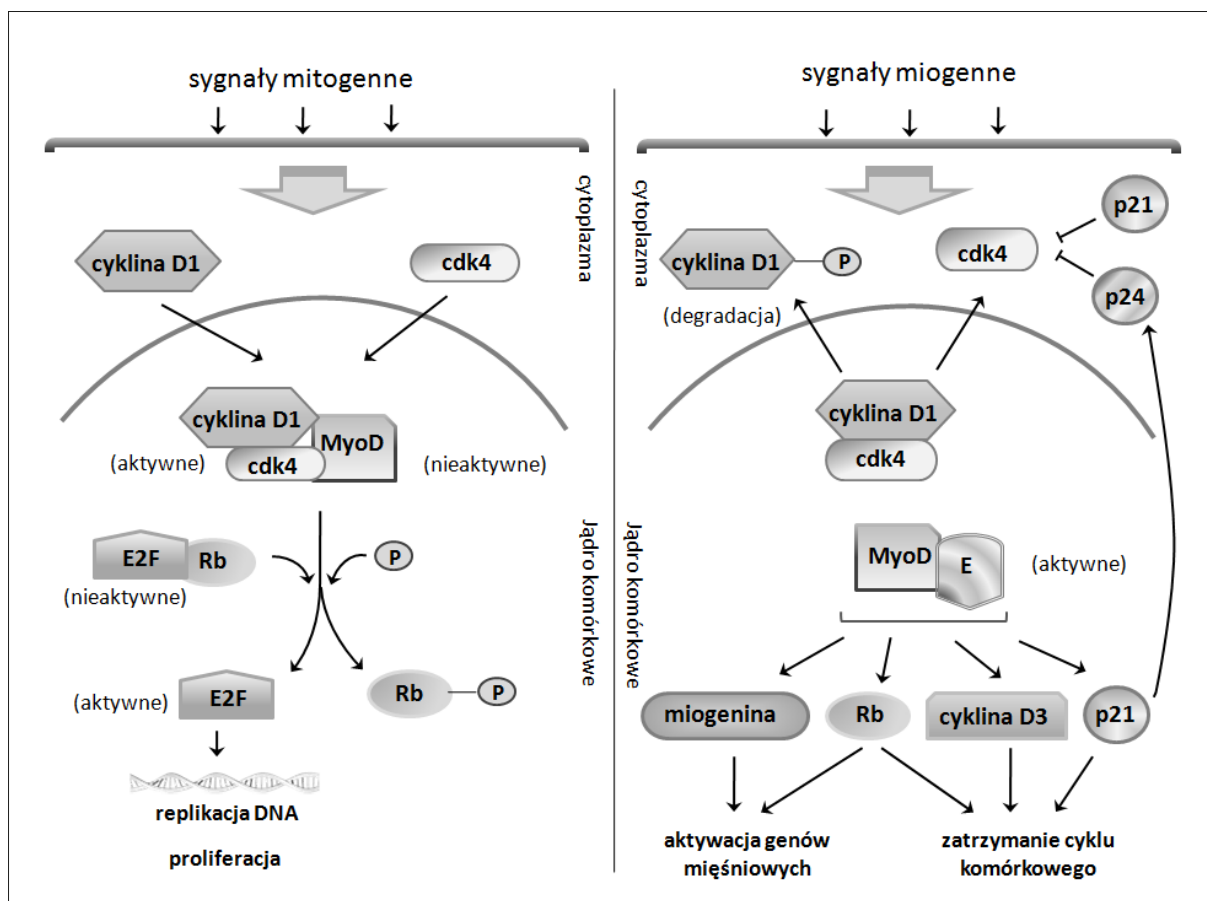
plazmatycznym różnicującego włókna mięśniowego. Cyklina D1 jest „czujnikiem mitogennym”, czynnikiem ograniczającym w tworzeniu aktywnych kompleksów cdk4/D1 i jest nieobecna w różnicujących miotubach [59]. Indukcja ektopowej ekspresji stabilnej cykliny D1 wywoływała jądrową dystrybucję cdk4 w miotubach, co potwierdza, że regulacja poziomu cykliny D1 przez mitogeny może mieć wpływ na jądrową funkcję MyoD, przez regulowanie komórkowej lokalizacji cdk4. Obserwacja ta łączy cykl komórkowy i miogenezę poprzez zależne od cykliny D1 interakcje między MyoD i cdk4 oraz wyjaśnia mechanizm utrzymujący nieaktywne MyoD w dzielących się mioblastach (ryc. 1). Swoiste interakcje MyoD-cdk4 w dzielących się mioblastach w połączeniu z zależnym od cykliny D1 jądrowym przemieszczeniem cdk4 stanowią wrażliwy na mitogeny mechanizm, dzięki któremu cyklina D1 może regulować funkcję MyoD i zapoczątkowanie miogenezy poprzez kontrolę komórkowej lokalizacji cdk4, zamiast stanu fosforylacji MyoD [79].

NF- $\kappa$ B jest pozytywnym mediatorem wzrostu komórki, wykazano jego udział w bezpośredniej regulacji promotora cykliny D1 w mioblastach C2C12 i zarodkowych fibroblastach [32]. Ekspresja NF- $\kappa$ B może hamować różnicowanie mioblastów przez bezpośrednio aktywując ekspresji cykliny D1, podczas gdy mioblasty z brakiem NF- $\kappa$ B wykazują osłabioną proliferację i szybsze wyjście z cyklu komórkowego, niż komórki kontrolne [27]. Zatem, zdolność NF- $\kappa$ B do kontrolowania proliferacji komórek i różnicowania są ściśle związane z regulacją genu kodującego cyklinę D1.

$\beta$ -katenina jest nie tylko elementem strukturalnym połączeń adherentnych, ale także kofaktorem aktywacji transkrypcyjnej w kompleksach z członkami rodziny czynników LEF-1 (lymphoid enhancing factor). W komórkach raka jelita grubego podwyższone stężenie  $\beta$ -kateniny spowodowane mutacją w genie kodującym  $\beta$ -kateninę lub białko coli gruczolaków, które reguluje degradację  $\beta$ -kateniny, skutkuje wzrostem formowania aktywnych transkrypcyjnie kompleksów  $\beta$ -katenina/LEF-1 [68], a wzmoczona transkrypcja genów docelowych prowadzi do niekontrolowanego wzrostu guza. Gen kodujący cyklinę D1 wskazuje się jako docelowy dla aktywacji przez kompleks  $\beta$ -katenina/LEF-1 [25]. Zatem cyklina D1 może stanowić ważne ogniwo w regulacji funkcji MyoD podczas rozwoju, w której pośredniczy ścieżka wingless/WNT [53] z  $\beta$ -kateniną, jako znanym elementem docelowym [1].

#### **AKTYWNOŚĆ MIOGENNYCH CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH PODCZAS CYKLU KOMÓRKOWEGO MIOBLASTÓW**

Ostateczne wyjście różnicujących mioblastów z cyklu komórkowego jest związane z bezpośrednim współdziałaniem MyoD z mechanizmami blokującymi postęp cyklu komórkowego, co wykazano przez związek między MyoD i indukcją p21, Rb i cykliną D3. MyoD hamuje cykl komórkowy przed fazą S niezależnie od wiązania z DNA i indukcji miogenego różnicowania, jeżeli podlega ektopowej ekspresji w wielu typach komórek [12].



**Ryc. 1.** Interakcje cykliny D1/cdk4 i czynnika MyoD w odpowiedzi na sygnały mitogenne i miogenne. Skrót: cdk4 – kinaza cyklozależna 4 (cyclin-dependent kinase 4), MyoD – czynnik determinujący miogenezę (myoblast determination protein), P – reszta fosforanowa, Rb – białko retinoblastoma (retinoblastoma protein); → stymulacja, —| hamowanie

W zsynchronizowanej kulturze mioblastów ekspresja dwóch miogennych czynników, Myf5 i MyoD, wykazuje odmienny wzorzec. Najwyższy poziom białka MyoD występuje we wczesnej fazie G1 i obniża się do minimum tuż przed fazą S [36]. MyoD i Myf5 wykazują także odmiennie wzorce ekspresji w mioblastach i w pierwotnych kulturach komórek satelitarnych indukowanych do różnicowania. Białko Myf5 jest nieobecne w różnicujących komórkach, które wykazują wysoki poziom MyoD i miogeniny, natomiast podlega ekspresji w mioblastach, które nie różnicują, lecz opuszczają swój cykl komórkowy przechodząc w stan spoczynkowy (G0) i nie zawierają ani MyoD, ani miogeniny [36]. Ta subpopulacja, wykazująca ekspresję Myf5 i brak MyoD, stanowi około 10% niezróżnicowanych mioblastów w stanie spoczynkowym, powstaje zawsze podczas indukcji różnicowania i reprezentuje pulę komórek „rezerwowych” [77]. Komórki te, jeśli zostaną pobudzone do wzrostu, namnażają się i po osiągnięciu odpowiedniej gęstości różnicują się i łączą w miotuby [36,77]. Subpopulacja „rezerwowych” komórek wykazuje swoisty wzrost stężenia białka kieszonowego p130, ale nie Rb lub p107 [8]. Okazuje się, że wymuszona ekspresja p130 w mioblastach nie tylko hamuje proliferację, jak

inne białka z rodziny Rb, ale w przeciwieństwie do pRb i p107 osłabia także ich miogenne różnicowanie. Hamujące działanie p130 na mioblasty odbywa się przez bezpośredni wpływ na ekspresję i działanie MyoD [8], wskazując na rolę p130 w ugruntowaniu stanu spoczynkowego „rezerwowych” mioblastów.

Oprócz regulacji na poziomie ekspresji zależnej od cyklu komórkowego, MyoD w rosnących mioblastach podlega fosforylacji, która zmniejsza się, gdy mioblasty różnicują w miotuby [38]. W rosnących mioblastach MyoD ulega fosforylacji przez cdk1 i cdk2, podczas gdy cdk4 i cdk5 nie mają zdolności fosforylowania tego czynnika [38]. Fosforylacja MyoD stanowi mechanizm regulujący obrót tego białka. Biorąc pod uwagę szybki spadek poziomu białka MyoD obserwowany w czasie przechodzenia mioblastów z fazy G1 do fazy S i znane konsekwencje fosforylacji zależnej od cdk w degradacji za pośrednictwem ubikwityny [71], jest prawdopodobne, że fosforylacja MyoD przez cdk2 bierze udział w zależnej od ubikwityny degradacji MyoD podczas przejścia G1-S. Ponieważ cyklina D1 jest niezbędna do indukcji cykliny E [60], rola kompleksu cdk2-cyklina E w fosforylacji MyoD, prowadząca do ubikwitynacji i degradacji tego czynnika miogenego, stano-

wi drugi, oprócz jej udziału w fosforylacji Rb, mechanizm wyjaśniający hamującą funkcję cykliny D1 w miogenezie.

Wiele dowodów z badań *in vitro*, a także z charakterystyki naturalnie występujących mutacji wskazuje, że Rb jest głównym regulatorem cyklu komórkowego oraz zdolności komórek do wejścia i pozostania w fazie G0 [29]. Status fosforylacji Rb i faza cyklu komórek są bezpośrednio skorelowane. Słaba fosforylacja Rb jest związana z brakiem wzrostu komórek, represją genów zaangażowanych w replikację DNA i różnicowaniem różnych typów komórek. Wysoki stopień fosforylacji Rb jest natomiast skorelowany ze wzrostem komórek. W komórkach Saos pozabawionych Rb(-/-) MyoD nie zatrzymuje proliferacji, jest to możliwe dopiero po dodaniu dzikiego typu Rb [26]. Na podstawie tych obserwacji wysunięto hipotezę, że MyoD i Rb działają przez tę samą ścieżkę regulacyjną. Badania *in vitro* z wykorzystaniem immunoprecypitacji wykazały interakcje MyoD-Rb, jest zatem prawdopodobne, że tworzenie kompleksu z MyoD blokuje fosforylację Rb i prowadzi do tłumienia wzrostu mioblastów, wyjścia z cyklu komórkowego oraz różnicowania. Badania wskazują, że Rb promuje miogenezę przez zahamowanie postępu cyklu komórkowego i współdziałanie z MyoD w aktywacji domeny aktywującej transkrypcję (TAD) czynnika MEF2. Mimo iż nie jest zrozumiałe, w jaki sposób MyoD aktywuje domenę TAD czynnika MEF2, proces ten wymaga Rb oraz fosforylacji TAD MEF2 w pozycji seryny 387 [50].

#### **EKSPRESJA I WEWNĄTRKOMÓRKOWE UMIEJSCOWIENIE MIOGENNYCH CZYNNIKÓW REGULATORYWYCH W CZASIE RÓZNICOWANIA**

Różnicowanie komórek mięśniowych jest złożonym procesem, który wymaga udziału kilku czynników transkrypcyjnych, działających w skoordynowany sposób w czasie i przestrzeni.

Białko MyoD ulega ekspresji zarówno w komórkach nieróżnicowanych, jak i zróżnicowanych. Czynniki te są negatywnym regulatorem transkrypcji niektórych genów w mioblastach przed indukcją różnicowania i przed zapoczątkowaniem przebudowy chromatyny, natomiast po rozpoczęciu różnicowania miogenego działa aktywnie na ekspresję genów [67]. Zatem MyoD jest aktywne przez cały czas różnicowania, wiążąc się bezpośrednio z elementami regulatorowymi genów ulegających ekspresji we wczesnym i późnym etapie programu miogeny [5]. Podczas postępu różnicowania MyoD reguluje ekspresję wczesnych genów kodujących cząsteczki adhezyjne i cząsteczki macierzy pozakomórkowej, genów pośrednich kodujących czynniki transkrypcyjne, a także genów późnych, odpowiedzialnych za powstawanie miofibryli i białek cytoszkieletu [67]. Na każdym etapie różnicowania MyoD jest umiejscowione w jądrze i nie jest wykrywalne w cytoplazmie, co sugeruje, że po syntezie czynniki te są szybko transportowane przez otoczkę jądrową i degradowane.

Zgodnie z jego rolą jako czynnika transkrypcyjnego, rozmieszczenie jądrowe MyoD jest niejednorodne; kon-

centruje się w aktywnych transkrypcyjnie obszarach interchromatyny. MyoD może zapoczątkować przebudowę chromatyny w miejscach wiązania ze wzmacniaczami genów mięśniowych, a następnie pobudzić aktywność transkrypcyjną w niemych wcześniej *loci*, pełniąc rolę genu „głównego przełącznika”, przekształcającego komórki wielu różnych linii komórkowych w komórki mięśniowe [67]. Stężenie białka MyoD znacznie wzrasta we wczesnym okresie różnicowania, co jest zgodne z jego rolą w indukcji tego procesu, wiążącej się z wycofaniem z cyklu komórkowego oraz ekspresją genów swoistych dla mięśni szkieletowych [30].

W przeciwieństwie do MyoD, stężenie białka Myf5 znacznie spada po indukcji różnicowania, a następnie utrzymuje stałe wartości podczas późnej fazy różnicowania. Odmienne kierunki zmian stężeń MyoD i Myf5 odpowiada hamowaniu ekspresji Myf5 przez MyoD i odzwierciedla zdolność Myf5 do pobudzania proliferacji mioblastów, w przeciwieństwie do roli MyoD w opuszczeniu cyklu komórkowego [30,34]. W nieróżnicowanych komórkach Myf5 występuje zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie. Po indukcji różnicowania, gdy poziom białka Myf5 znacząco spada, nadal jest ono obecne w cytoplazmie, lecz stopniowo koncentruje się i wchodzi do jądra. To przemieszczenie może być związane z jego aktywnością transkrypcyjną, a ściślej z tłumieniem transkrypcji genów mięśniowych, związanym z postępowaniem cyklu komórkowego i początkiem różnicowania. Podobnie do MyoD, Myf5 ma zdolność rekrutacji enzymów modyfikujących histony i przebudowujących chromatynę [67]. Czynniki te jednak są obecne w różnych mięśniowych komórkach prekursorowych i na podstawie ich ekspresji można wyodrębnić dwie populacje: komórki MyoD-pozytywne, które ulegną fuzji w miotuby oraz komórki Myf5-pozytywne, reprezentujące spoczynkowe komórki satelitarne, które nie przejdą różnicowania.

Stężenie miogeniny w hodowli komórkowej zwiększa się po usunięciu surowicy, gdy zahamowana zostaje aktywność proliferacyjna komórek. W odróżnieniu od Myf5, stężenie białka miogeniny znacząco wzrasta wkrótce po indukcji różnicowania, po czym następuje jego spadek w środkowej i późnej fazie różnicowania. Kierunek zmian stężeń miogeniny i MyoD jest podobny, co wskazuje, że czynniki te podlegają pętli pozytywnej regulacji. Potwierdzeniem takiej zależności jest indukcja ekspresji miogeniny przez MyoD i pojawienie się miogeniny jednocześnie lub wkrótce po zahamowaniu ekspresji Myf5, również wywołanym przez MyoD. Utworzenie pętli pozytywnej regulacji między MyoD a miogeniną może być decydujące dla zainicjowania programu miogenego i/lub zapewnienia końcowego różnicowania. Wyniki wskazujące, że zarówno białko MyoD, jak i miogenina mają krótki okres półtrwania są istotne dla wyjaśnienia ich autoregulacji i regulacji krzyżowej, a także mogą być interpretowane jako mechanizm, dzięki któremu te dwa białka precyzyjnie regulują swoją ekspresję [54]. Hipotezę tę potwierdzają obserwacje, że MyoD i miogenina kontrolują podobny zestaw genów docelowych, jednak mają odmienne funkcje

regulacyjne, a rolą miogeniny w końcowym różnicowaniu jest zwiększenie ekspresji podzbioru genów włączanych wcześniej przez MyoD, ponieważ miogenina nie wiąże się efektywnie z DNA bez MyoD [7]. Nagła indukcja ekspresji miogeniny i jej szybki wzrost po usunięciu mitogenów ze środowiska zewnątrzkomórkowego potwierdzają, że jest ona decydującym czynnikiem w indukcji różnicowania mioblastów w komórkach C2C12 [17,21]. Ekspresja miogeniny poprzedza końcowe różnicowanie zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* i reguluje syntezę białek tworzących aparat kurczliwy komórki mięśniowej [5]. Miogenina ulega ekspresji już w niezróżnicowanych komórkach, gdzie jest wykrywana głównie w cytoplazmie, natomiast po indukcji różnicowania podlega translokacji do jądra komórkowego. Cytoplazmatyczna retencja jest mechanizmem regulującym biologiczną aktywność tego białka: miogenina może być zatrzymywana w cytoplazmie w celu zapobieżenia różnicowaniu, dopóki nie ustają sygnały mitogenne. Po translokacji do jądra komórkowego miogenina przejawia aktywność transkrypcyjną wobec podzbioru miogennych promotorów i w ten sposób doprowadza do stanu całkowitego zróżnicowania, co koreluje z przeważającą lokalizacją miogeniny w jądrach miotub, w porównaniu z cytoplazmą [20].

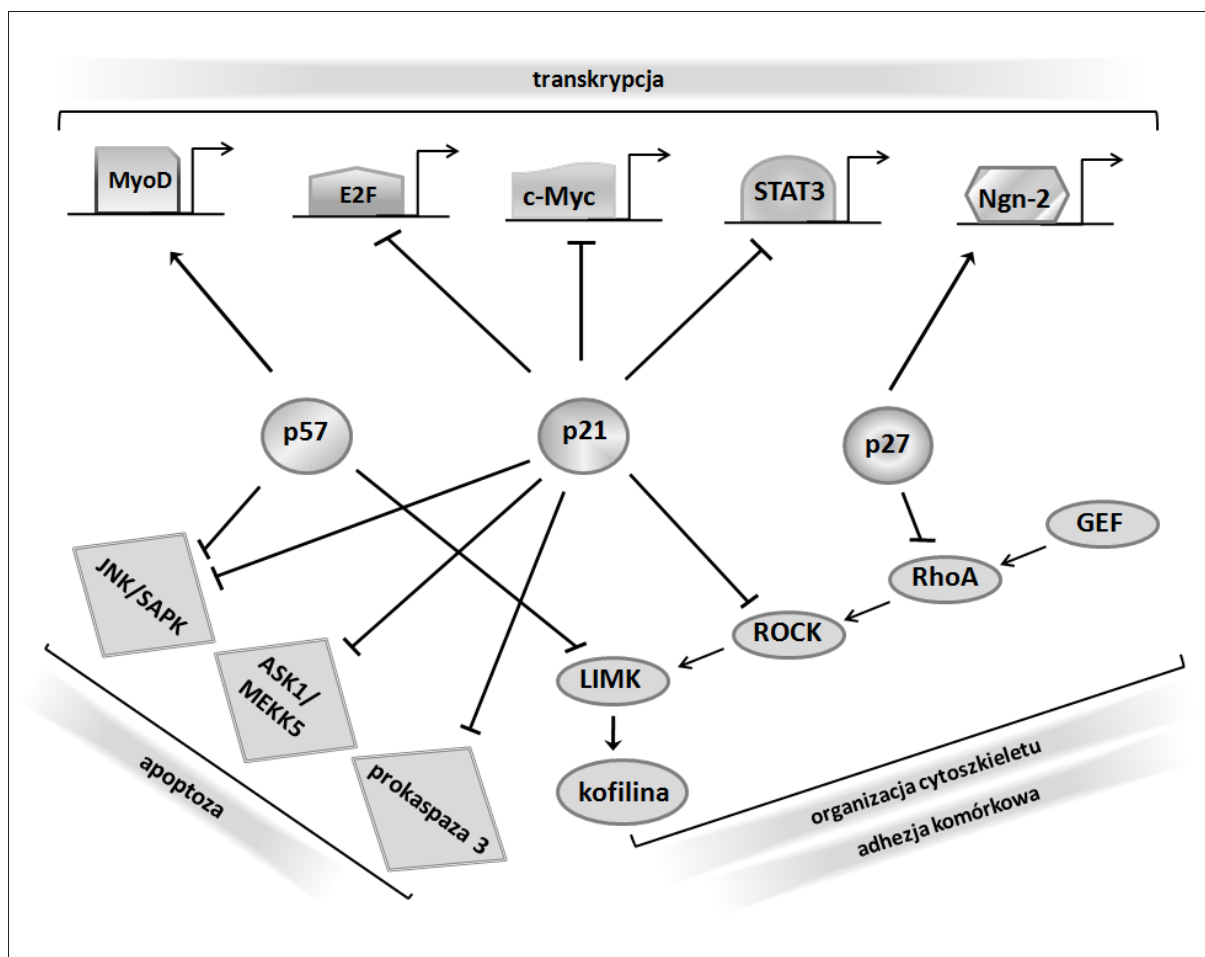
Ekspresja białka MRF4 znacznie wzrasta w środkowej i późnej fazie różnicowania, gdy następuje już fuzja mioblastów, co potwierdza jego rolę w dojrzewaniu miotub. W każdej fazie różnicowania białko MRF4 koncentruje się głównie w cytoplazmie. Jest ono rozmieszczone szczególnie w obszarze okołojądrowym, gdzie głównie następuje synteza białka. Jak założono wcześniej w przypadku miogeniny, przeważająca retencja cytoplazmatyczna MRF4 może być wymagana do dojrzewania miotub. Zgodnie z tą opinią, umiejscowienie miogeniny i MRF4 w miotubach wydaje się wzajemnie zmieniać: może to sugerować, że miogenina i MRF4 regulują różne podzbiory genów docelowych zaangażowanych w tworzenie i dojrzewanie miotub. Stężenie białka MRF4 znacznie wzrasta, gdy miogeniny zmniejsza się, zgodnie z hamowaniem ekspresji miogeniny przez MRF4. Ferri i wsp. (2009) stwierdzili, że stężenia mRNA MRF4 są porównywalne ze stężeniami *Myf5* [20]. Gen *MRF4* jest położony w tym samym *locus* co *Myf5*, a niedawne badania alleli wielu mutantów w *locus MRF4-Myf5* świadczą o tym, że oba geny pełnią rolę czynników determinujących na początku miogennego różnicowania [10]. Dane te potwierdzają nową hipotezę określającą relacje między miogennymi czynnikami regulacyjnymi i przedstawiającą *MRF4* jako gen determinujący: MyoD, *Myf5* i MRF4 określają mięśniową tożsamość multipotentjalnych komórek progenitorowych, a następnie MyoD, miogenina i MRF4 podtrzymują proces różnicowania tych komórek [33].

#### **FUNKCJE KINAZ ZALEŻNYCH OD CYKLIN (CDK) I ICH INHIBITORÓW (CKI) NIEWIĄZANE Z CYKLEM KOMÓRKOWYM**

Kompleksy cdk/cyklina nie tylko regulują podział komórki przez fosforylację różnych substratów, lecz mogą również kontrolować inne procesy komórkowe, takie jak trans-

dukcja sygnałów, różnicowanie i apoptoza [14]. Niektóre kompleksy cdk-cyklina, np.: cdk7-cyklina H, cdk8-cyklina C i cdk9-cyklina T regulują swoją aktywność w sposób niezależny od cyklu komórkowego i biorą udział w inicjacji lub elongacji transkrypcji [18]. Na przykład, kompleks cdk9-cyklina T, znany jako P-TEFb, został początkowo rozpoznany jako pozytywny transkrypcyjny czynnik elongacyjny u *Drosophila* [28]. Ludzki P-TEFb zawiera cyklinę T1 i T2, przy czym cyklina T2 występuje w dwóch postaciach, określanych jako T2a i T2b, które prawdopodobnie powstają w wyniku alternatywnego splicingu pierwotnego transkryptu [51]. Okazuje się, że cyklina T2a pełnej długości i N-końcowy region cdk9 oddziałują z domeną bHLH czynnika MyoD, co pozwala na tworzenie kompleksu pobudzającego transkrypcję określonych genów mięśniowych [63]. W kompleksie tym cyklina T2a wchodzi w bezpośrednie interakcje z MyoD, który jest ufosforylowany przez cdk9. Kompleks cdk9-cyklina T2a-MyoD pełni funkcje zarówno pozytywnych, jak i negatywnych sygnałów regulacyjnych [62]. Wykazano, że cdk9-cyklina T2a wiąże i fosforyluje C-końiec białka pRb [61], które jest niezbędnym kofaktorem podczas różnicowania miogennego. Aktywność kinazy cdk9-CycT2 ma prawdopodobnie znaczenie w podstawowej fosforylacji białka retinoblastoma i pRb współdziała z cdk9-CycT2 w celu podtrzymania miogennej transkrypcji kontrolowanej przez MyoD. W ostatnich latach w kilku badaniach potwierdzono, że cyklina T2a może mieć jednego lub więcej „partnerów” podobnych do cdk9 [11]. Jednym z nich jest PKN $\alpha$ , białkowa kinaza serynowo-treoninowa aktywowana przez kwasy tłuszczowe i białko Rho, mająca domenę katalityczną homologiczną do rodziny kinazy białkowej C [45]. Uważa się, że niektóre funkcje tej kinazy są związane z reorganizacją cytoszkieletu, ponieważ strukturalne lub regulacyjne elementy sieci mikrofilamentów, mikrotubuli i filamentów pośrednich są białkami docelowymi dla PKN $\alpha$ . PKN może oddziaływać z  $\alpha$ -aktynią mięśni szkieletowych [46], która jest głównym składnikiem linii Z w miofibrylach. Ponadto, przez próby lucyferazy przeprowadzone z wykorzystaniem promotora wrażliwego na MyoD, badacze wykazali, że sama PKN $\alpha$  zwiększa aktywność transkrypcyjną zależną od MyoD. Wykazano również, że nadekspresja zarówno cykliny T2a, jak i PKN $\alpha$  w komórkach C2C12 zwiększa i poprzedza ekspresję markerów miogennego różnicowania, takich jak miogenina i MHC podczas różnicowania wywołanego głodem. Wyniki te wskazują, że cyklina T2a wzmacnia transkrypcję zależną od MyoD i pobudza miogenne różnicowanie w interakcjach z cdk9 lub PKN $\alpha$ , które mogą działać synergistycznie lub antagonistycznie [11].

Białka Cip/Kip, poza regulowaniem cyklu komórkowego, odgrywają ważną rolę w apoptozie, regulacji transkrypcji, determinowaniu losu komórek, migracji komórek i dynamice cytoszkieletu (ryc. 2). Złożona sieć fosforylacji moduluje funkcje białek Cip/Kip przez zmianę ich subkomórkowej lokalizacji, oddziaływań białko-białko i stabilności. Funkcje te są niezbędne do utrzymania prawidłowej homeostazy komórek i tkanek w procesach związanych z rozwojem zarodkowym i hamowaniem nowotworzenia.



**Ryc. 2.** Udział białek z rodziny Kip/Cip w procesach niezwiązanych z cyklem komórkowym. Skróty: ASK1/MEKK5 – kinaza regulująca sygnał apoptozy 1/kinaza MEK 5 (apoptosis signal-regulating kinase 1/MEK kinase 5), GEF – czynniki wymiany nukleotydów guaninowych (guanine-nucleotide exchange factors), JNK/SAPK – kinaza c-Jun-N-końcowa/kinaza białkowa aktywowana stresem (c-Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase), LIMK – kinaza LIM (LIM kinase), MyoD – czynnik determinujący miogenezę (myoblast determination protein), Ngn-2 – neurogenina 2 (neurogenin 2), ROCK – kinaza Rho (Rho-associated kinase), STAT3 – transduktor sygnału i aktywator transkrypcji 3 (signal transducer and activator of transcription 3);  $\longrightarrow$  stymulacja,  $\longleftarrow$  hamowanie

Badania na drożdżach pierwsze wskazywały na bezpośredni związek funkcjonalny między inhibitorami cdk a regulatorami organizacji cytoszkieletu. U ssaków rodzina GTPaz Rho, złożona z co najmniej 20 członków, reguluje wielokierunkowe ścieżki sygnałowe i procesy komórkowe. Rho i jego efektor, kinaza Rho (ROCK) są najlepiej znane z roli w regulacji tworzenia włókien aktynowo-stresowych, formowania płytek przylegania i kurczliwości aktomiozyny [19]. Gromadzenie się włókien stresowych jest zależne od aktywacji kinazy LIM (LIMK) przez ROCK, która fosforyluje i inaktywuje czynnik depolimeryzacji aktyny, kofilinę, pobudzając tworzenie włókien stresowych. Jednak Rac i jego efektor, kinaza aktywowana białkiem p21 (PAK) powodują przegrupowanie aktyny, które kontroluje tworzenie lamelipodiów i nowych płytek przylegania na krawędziach komórki [56]. Migracja komórek wymaga ścisłej równowagi działania Rho i Rac, a dynamiczna aktywacja i hamowanie obu GTPaz są skoordynowane przestrzennie i czasowo. Niedobór Rho-GTP zahamuje mi-

grację zapobiegając osiągnięciu przez komórki poziomu lepkości i przyczepności potrzebnych do ruchu [49,75]. Odwrotnie, zbyt duża aktywność Rho zwiększa adhezję i zapobiega obrotowi płytek przylegania, powodując zahamowanie migracji komórek [57,69].

Wszystkie trzy białka Cip/Kip hamują ścieżkę sygnałową Rho/ROCK/LIMK/kofilina, chociaż działają na różnych poziomach [3]. W jądrze komórkowym białka te ograniczają aktywność kompleksów cykлина-cdk. W cytoplazmie p27 może się wiązać z RhoA, zapobiegając jego aktywacji przez czynniki wymiany nukleotydów guaninowych (guanine-nucleotide exchange factors – GEF), zmniejszając tworzenie aktynowych włókien stresowych i płytek przylegania oraz powodując zwiększoną migrację i inwazyjność różnych typów komórek. Indukcja cytoplazmatycznego umiejscowienia p27 przez PI3K-AKT uczestniczy także w hamowaniu aktywacji PTEN przez hamowanie szlaku RhoA-ROCK pod wpływem p27. p21 zlokalizowany w cytoplazmie może się wi-



zać z ROCK, hamując jej aktywność kinazową, osłabiając tworzenie aktywnych włókien stresowych. p57 obecny w cytoplazmie może się wiązać z LIMK i wywoływać jej translokację do jądra komórkowego, powodując utratę aktywnych włókien stresowych [2]. Rho może także negatywnie wpływać na stężenie białek p27 i p21 przez mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego [70]. Sieć interakcji między inhibitorami cdk a ścieżką sygnałową Rho stanowi zatem ważny mechanizm koordynujący funkcję cytoskieletu z podziałem komórki.

Odkryto, że p57 oddziałuje z LIMK1 nie hamując jej aktywności, a nadekspresja p57 jest odpowiedzialna za jądrowe umiejscowienie LIMK1 [76]. Jest to połączone z utratą włókien stresowych związanych z LIMK1 i świadczy, iż oddziaływanie p57-LIMK1 hamuje LIMK1 przez jej sekwestrację w jądrze komórkowym. W innym doniesieniu niewielkie stężenie p57 opóźniało migrację neuronów w płycie korowej podczas rozwoju u myszy, jednak nie zbadano, czy wynikało to z sekwestracji LIMK1 [31].

Badania potwierdzają rolę CKI w prawidłowym przebiegu neurogenezy. Białko p21 zlokalizowane w cytoplazmie wiąże się z kinazą Rho ROCK1 i hamuje jej działanie [41]. Inhibicja ROCK1 pod wpływem p21 pobudza wzrost neurytów komórek nerwiaka niedojrzałego i neuronów hipokampa *in vitro* [65]. Ponadto, u szczurów transdukcja białka fuzującego TAT-p21 w miejscu uszkodzenia rdzenia kręgowego pobudza regenerację aksonów i wpływa korzystnie na odzyskiwanie przez zwierzęta funkcji ruchowych [66].

Ruchliwość fibroblastów myszy z knockoutem genowym p27 była osłabiona z powodu wzrostu aktywności RhoA, a prawidłową migrację przywracało zahamowanie ROCK [4]. Komórki p27<sup>-/-</sup> mają zwiększoną liczbę włókien stresowych i płytek przylegania oraz podwyższony poziom Rho-GTP. Doświadczenia z nadekspresją ujawniły, że p27 oddziałuje z RhoA, zapobiegając aktywacji RhoA przez zakłócanie jego wiązania z GEF. Regulacja RhoA przez p27 ma decydujące znaczenie dla prawidłowej migracji neuronalnych komórek progenitorowych w rozwijającej się korze mózgowej myszy [35,48].

Powyższe obserwacje wskazują, że p27 reguluje migrację komórek przez zapobieganie aktywacji Rho. W różnych typach komórek zmiany poziomu p27 powodowały zarówno hamowanie, jak i pobudzenie odpowiedzi migracyjnej [2]. Wydaje się zatem, że skutek hamowania RhoA przez p27 jest komórkowoswoisty i może odzwierciedlać odmienne zapotrzebowanie na Rho i Rac w migracji. Białka Cip/Kip kontrolujące zarówno cykl podziału komórki, jak i strukturę cytoskieletu mogą niezależnie stanowić molekularne ogniwo umożliwiające skoordynowaną regulację obu tych procesów. Znane są przykłady przemienne występowania epizodów ruchu komórek i okresów ich proliferacji, takie jak migracja komórek grzebień nerwowego, która następuje bez towarzyszącego podziału komórek [52], golenie się

rany, podczas którego keratynocyty migrują najpierw do podstawy rany przed rozpoczęciem proliferacji [43] oraz gastrulacja, podczas której moment podziału komórki jest opóźniony przez przedłużenie cyklu komórkowego [47]. Migracja komórek i podział komórkowy często są aktywowane przez te same nadrzędne ścieżki sygnałowe [2,22], jednak mechanizmy decydujące o rozpoczęciu jednego lub drugiego procesu nie są dobrze poznane. CKI, bezpośrednio modulujące oba procesy i ich kontrolę przez bodźce mitogenne, mogą wpływać na wybór między ruchem komórek, a proliferacją. Na przykład, wysoki poziom p27 hamuje proliferację komórek, a pobudza ich migrację i odwrotnie: niski poziom p27 stymuluje proliferację i hamuje ruch komórek.

Funkcje inhibitorów kinaz zależnych od cyklin niezwiązane z cyklem komórkowym wykazano również w komórkach miogennych. Messina i wsp. badali mechanizm, za pośrednictwem którego gęstość komórek wpływa na miogenne różnicowanie *in vitro* [44]. Porównanie kultur mioblastów linii C2C12 o różnych gęstościach komórek wykazało, że gdy komórki występują nielicznie, niepowodzenie w przejściu końcowego różnicowania jest niezależne od kontroli cyklu komórkowego i odzwierciedla brak p27<sup>Kip1</sup> i MyoD w proliferujących mioblastach. Badacze stwierdzili, że zahamowanie ekspresji p27<sup>Kip1</sup> osłabia różnicowanie komórek linii C2C12 przy dużych gęstościach, podczas gdy egzogenny p27<sup>Kip1</sup> pozwala komórkom C2C12 hodowanym w małych gęstościach uruchomić program różnicowania poprzez regulację poziomu MyoD w niezróżnicowanych mioblastach. Okazało się również, że wczesna indukcja p27<sup>Kip1</sup> jest decydującym krokiem ścieżki sygnałowej zależnej od N-kadheryny biorącej udział w miogenezie. Obserwacje te potwierdziły czynną rolę p27<sup>Kip1</sup> w decyzji o zaangażowaniu mioblastów w końcowe różnicowanie, niezależną od kontroli proliferacji komórek, która może funkcjonować *in vivo* podczas miogenezy.

## PODSUMOWANIE

Prekursorowe komórki miogenne przechodzą fazę aktywnej proliferacji przed zahamowaniem cyklu komórkowego i łączeniem się w miotuby. Ich zaangażowanie w proces różnicowania wymaga wcześniejszego nieodwracalnego przerwania cyklu komórkowego. Zniesienie regulacji cyklu komórkowego prowadzi do niekontrolowanej proliferacji antagonizującej funkcje czynników miogennych. Osłabienie aktywności transkrypcyjnej miogennych czynników regulatorowych jest odpowiedzialne za zaburzenia funkcji mięśni szkieletowych związane z wiekiem [16], ponadto ulegają one wybiórczej ekspresji w przypadku ludzkich miopatii wrodzonych [74] i innych chorób mięśniowych, na przykład dystrofii mięśniowej Duchenne'a i Beckera oraz zapalenia wielomięśniowego. Badanie złożonej regulacji antagonistycznych procesów proliferacji i różnicowania, niezbędnej do prawidłowego przebiegu miogenezy, umożliwia lepsze poznanie podłoża chorób związanych z zaburzeniami rozwoju i naprawy mięśni szkieletowych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Bejsovec A.: Wnt pathway activation: new relations and locations. *Cell*, 2005; 120: 11-14
- [2] Besson A., Assoian R.K., Roberts J.M.: Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors? *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 948-955
- [3] Besson A., Dowdy S.F., Roberts J.M.: CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell*, 2008; 14: 159-169
- [4] Besson A., Gurian-West M., Schmidt A., Hall A., Roberts J.M.: p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.*, 2004; 18: 862-876
- [5] Blais A., Tsikitis M., Acosta-Alvear D., Sharan R., Kluger Y., Dynlacht D.: An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes Dev.*, 2005; 19: 553-569
- [6] Blomen V.A., Boonstra J.: Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2007; 64: 3084-3104
- [7] Cao Y., Kumar R.M., Penn B.H., Berkes C.A., Kooperberg C., Boyer L.A., Young R.A., Tapscott S.J.: Global and gene-specific analyses show distinct roles for Myod and Myog at a common set of promoters. *EMBO J.*, 2006; 25: 502-511
- [8] Carnac G., Fajas L., L'Honoré A., Sardet C., Lamb N.J., Fernandez A.: The retinoblastoma-like protein p130 is involved in the determination of reserve cells in differentiating myoblasts. *Curr. Biol.*, 2000; 10: 543-546
- [9] Cenciarelli C., De Santa F., Puri P.L., Mattei E., Ricci L., Bucci F., Felsani A., Caruso M.: Critical role played by cyclin D3 in the MyoD-mediated arrest of cell cycle during myoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 5203-5217
- [10] Chang T.H., Primig M., Had Chouel J., Tajbakhsh S., Rocancourt D., Fernandez A., Kappler R., Scherthan H., Buckingham M.: An enhancer directs differential expression of the linked Mrf4 and Myf5 myogenic regulatory genes in the mouse. *Dev. Biol.*, 2004; 269: 595-608
- [11] Cottone G., Baldi A., Palescandolo E., Manente L., Penta R., Paggi M.G., De Luca A.: PKN is a novel partner of cyclin T2a in muscle differentiation. *J. Cell Physiol.*, 2006; 207: 232-237
- [12] Crescenzi M., Fleming T.P., Lassar A.B., Weintraub H., Aaronson S.A.: MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1990; 87: 8442-8446
- [13] De Falco G., Comes F., Simone C.: pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription. *Oncogene*, 2006; 25: 5244-5249
- [14] De Luca A., De Falco M., Baldi A., Paggi M.G.: Cyclin T. Three forms for different roles in physiological and pathological functions. *J. Cell Physiol.*, 2003; 194: 101-107
- [15] De Santa F., Albini S., Mezzaroma E., Baron L., Felsani A., Caruso M.: pRb-dependent cyclin D3 protein stabilization is required for myogenic differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 7248-7265
- [16] Degens H.: Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 2007; 7: 246-252
- [17] Delgado I., Huang X., Jones S., Zhang L., Hatcher R., Gao B., Zhang P.: Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics*, 2003; 82: 109-121
- [18] Dynlacht B.D.: Regulation of transcription by protein that control the cell cycle. *Nature*, 1997; 389: 149-152
- [19] Etienne-Manneville S., Hall A.: Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 2002; 420: 629-635
- [20] Ferri P., Barbieri E., Burattini S., Guescini M., D'Emilio A., Biagiotti L., Del Grande P., De Luca A., Stocchi V., Falcieri E.: Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 108: 1302-1317
- [21] Figueroa A., Cuadrado A., Fan J., Atasoy U., Muscat G.E., Muñoz-Canoves P., Gorospe M., Muñoz A.: Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 4991-5004
- [22] Frey M.R., Golovin A., Polk D.B.: Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 44513-44521
- [23] Gaubatz S., Lindeman G.J., Ishida S., Jakoi L., Nevins J.R., Livingston D.M., Rempel R. E.: E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell*, 2000; 6: 729-735
- [24] Gill R.M., Hamel P.A.: Subcellular compartmentalization of E2F family members is required for maintenance of the postmitotic state in terminally differentiated muscle. *J. Cell Biol.*, 2000; 148: 1187-1201
- [25] Gougelet A., Colnot S.: A complex interplay between Wnt/ $\beta$ -catenin signalling and the cell cycle in the adult liver. *Int. J. Hepatol.* 2012; 2012: 816125
- [26] Gu W., Schneider J.W., Condorelli G., Kaushal S., Mahdavi V., Nadal-Ginard B.: Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell*, 1993; 72: 309-324
- [27] Guttridge D.C., Albanese C., Reuther J.Y., Pestell R.G., Baldwin A.S.Jr.: NF- $\kappa$ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 5785-5799
- [28] Hermann C.H., Mancini M.A.: The Cdk9 and cyclin T subunits of TAK/P-TEFb localize to splicing factor-rich nuclear speckle regions. *J. Cell Sci.*, 2001; 114: 1491-1503
- [29] Huh M.S., Parker M.H., Scimè A., Parks R., Rudnicki M.A.: Rb is required for progression through myogenic differentiation but not maintenance of terminal differentiation. *J. Cell Biol.*, 2004; 166: 865-876
- [30] Ishibashi J., Perry R.L., Asakura A., Rudnicki M.A.: MyoD induces myogenic differentiation through cooperation of its NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal regions. *J. Cell Biol.*, 2005; 171: 471-482
- [31] Itoh Y., Masuyama N., Nakayama K., Nakayama K.I., Gotoh Y.: The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 390-396
- [32] Joyce D., Albanese C., Steer J., Fu M., Bouzahzah B., Pestell R.G.: NF- $\kappa$ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001; 12: 73-90
- [33] Kassar-Duchossoy L., Gayraud-Morel B., Gomès D., Rocancourt D., Buckingham M., Shinin V., Tajbakhsh S.: Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*, 2004; 431: 466-471
- [34] Kataoka Y., Matsumura I., Ezoe S., Nakata S., Takigawa E., Sato Y., Kawasaki A., Yokota T., Nakajima K., Felsani A., Kanakura Y.: Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 44178-44187
- [35] Kawauchi T., Chihama K., Nabeshima Y., Hoshino M.: Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nat. Cell Biol.*, 2006; 8: 17-26
- [36] Kitzmann M., Carnac G., Vandromme M., Primig M., Lamb N.J., Fernandez A.: The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J. Cell Biol.*, 1998; 142: 1447-1459
- [37] Kitzmann M., Fernandez A.: Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001; 58: 571-579

- [38] Kitzmann M., Vandromme M., Schaeffer V., Carnac G., Labbé J.C., Lamb N.J., Fernandez A.: cdk1- and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 3167-3176
- [39] Knight J.D., Kothary R.: The myogenic kinome: protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis. *Skelet. Muscle*, 2011; 1: 29
- [40] Langley B., Thomas M., McFarlane C., Gilmour S., Sharma M., Kambadur R.: Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway. *Oncogene*, 2004; 23: 524-534
- [41] Lee S., Helfman D.M.: Cytoplasmic p21<sup>Cip1</sup> is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/Cofilin pathway. *J. Biol. Chem.*, 2003; 279: 1885-1891
- [42] Magenta A., Cenciarelli C., De Santa F., Fuschi P., Martelli F., Caruso M., Felsani A.: MyoD stimulates RB promoter activity via the CREB/p300 nuclear transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 2893-2906
- [43] Martin P.: Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997; 276: 75-81
- [44] Messina G., Blasi C., La Rocca S.A., Pompili M., Calconi A., Grossi M.: p27<sup>Kip1</sup> acts downstream on N-cadherin-mediated cell adhesion to promote myogenesis beyond cell cycle regulation. *Mol. Biol. Cell*, 2005; 16: 1469-1480
- [45] Mukai H.: The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic homologous to that of PKC. *J. Biochem.*, 2003; 133: 17-27
- [46] Mukai H., Toshimori M., Shibata H., Takanaga H., Kitagawa M., Miyahara M., Shimakawa M., Ono Y.: Interaction of PKN with alpha-actinin. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 4740-4746
- [47] Nance J., Priess J.R.: Cell polarity and gastrulation in *C. elegans*. *Development*, 2002; 129: 387-397
- [48] Nguyen L., Besson A., Heng J., Schurrmans C., Teboul L., Philpott A., Roberts J.M., Guillemot F.: p27Kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev.*, 2006; 20: 1511-1524
- [49] Nobes C.D., Hall A.: Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.*, 1999; 144: 1235-1244
- [50] Novitsch B.G., Spicer D.B., Kim P.S., Cheung W.L., Lassar A.B.: pRb is required for MEF2-dependent gene expression as well as cell-cycle arrest during skeletal muscle differentiation. *Curr. Biol.*, 1999; 9: 449-459
- [51] Peng J., Zhu Y., Milton J.T., Price D.H.: Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.*, 1998; 12: 755-762
- [52] Perris R.: The extracellular matrix in neural crest-cell migration. *Trends Neurosci.*, 1997; 20: 23-31
- [53] Petropoulos H., Skerjanc I.S.:  $\beta$ -catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 15393-15299
- [54] Puri P.L., Sartorelli V.: Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J. Cell Physiol.*, 2000; 185: 155-173
- [55] Reynaud E.G., Guillier M., Leibovitch M.P., Leibovitch S.A.: Dimerization of the amino terminal domain of p57Kip2 inhibits cyclin D1-cdk4 kinase activity. *Oncogene*, 2000; 19: 1147-1152
- [56] Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T., Horwitz A.F.: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 2003; 302: 1704-1709
- [57] Sahai E., Olson M.F., Marshall C.J.: Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J.*, 2001; 20: 755-766
- [58] Seale P., Rudnicki M.A.: A new look at the origin, function, and „stem cell” status of muscle satellite cells. *Dev. Biol.*, 2000; 218: 115-124
- [59] Shen X., Collier J.M., Hlaing M., Zhang L., Delshad E.H., Bristow J., Bernstein H.S.: Genome-wide examination of myoblast cell cycle withdrawal during differentiation. *Dev. Dyn.*, 2003; 226: 128-138
- [60] Sherr C.J.: G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 1994; 79: 551-555
- [61] Simone C., Bagella L., Bellan C., Giordano A.: Physical interaction between pRb and cdk9/cyclin T2 complex. *Oncogene*, 2002; 21: 4158-4165
- [62] Simone C., Giordano A.: New insight in CDK9 function: from Tat to MyoD. *Front. Biosci.*, 2001; 6: 1073-1082
- [63] Simone C., Stiegler P., Bagella L., Pucci B., Bellan C., De Falco G., De Luca A., Guanti G., Puri P.L., Giordano A.: Activation of MyoD-dependent transcription by cdk9/cyclin T2. *Oncogene*, 2002; 21: 4137-4148
- [64] Takahashi Y., Rayman J.B., Dynlacht B.D.: Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.*, 2000; 14: 804-816
- [65] Tanaka H., Yamashita T., Asada M., Mizutani S., Yoshikawa H., Tohyama M.: Cytoplasmic p21<sup>Cip1/Waf1</sup> regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J. Cell Biol.*, 2002; 158: 321-329
- [66] Tanaka H., Yamashita T., Yachi K., Fujiwara T., Yoshikawa H., Tohyama M.: Cytoplasmic p21<sup>Cip1/WAF1</sup> enhances axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neuroscience*, 2004; 127: 155-164
- [67] Tapscott S.J.: The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development*, 2005; 132: 2685-2695
- [68] Ungerback J., Elander N., Grünberg J., Sigvardsson M., Söderkvist P.: The Notch-2 gene is regulated by Wnt signaling in cultured colorectal cancer cells. *PLoS One*, 2011; 6: e17957
- [69] Vial E., Sahai E., Marshall C.J.: ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell*, 2003; 4: 67-79
- [70] Vidal A., Millard S., Miller J., Koff A.: Rho activity can alter the translation of mRNA and is important for Ras<sup>V12</sup>-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 16433-16440
- [71] Vlach J., Hennecke S., Amati B.: Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.*, 1997; 16: 5334-5344
- [72] Wei Q., Paterson B.M.: Regulation of MyoD function in the dividing myoblast. *FEBS Lett.*, 2001; 490: 171-178
- [73] Weinberg R.A.: Tumor suppressor genes. *Science*, 1991; 254: 1138-1146
- [74] Weise C., Dai F., Pröls F., Ketelsen U.P., Dohrmann U., Kirsch M., Brand-Saberi B.: Myogenin (Myf4) upregulation in trnas-differentiating fibroblasts from a congenital myopathy with arrest of myogenesis and defects of myotube formation. *Anat. Embryol.*, 2006; 211: 639-648
- [75] Worthylake R.A., Lemoine S., Watson J.M., Burridge K.: RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.*, 2001; 154: 147-160
- [76] Yokoo T., Toyoshima H., Miura M., Wang Y., Iida K.T., Suzuki H., Sone H., Shimano H., Gotoda T., Nishimori S., Tanaka K., Yamada N.: p57<sup>Kip2</sup> regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 52919-52923
- [77] Yoshida N., Yoshida S., Koishi K., Masuda K., Nabeshima Y.: Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J. Cell Sci.*, 1998; 111: 769-779
- [78] Zammit P.S., Partridge T.A., Yablonka-Reuveni Z.: The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem. Cytochem.*, 2006; 54: 1177-1191
- [79] Zhang J.M., Wei Q., Zhao X., Paterson B.M.: Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO J.*, 1999; 18: 926-933

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.