

Received: 2004.12.30
 Accepted: 2005.07.06
 Published: 2005.09.13

Rola TGF- β w regulacji cyklu komórkowego*

The role of TGF- β in cell cycle regulation

Liliana Stalińska, Tomasz Ferenc

Zakład Biologii i Genetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie

TGF- β jest białkiem wielofunkcyjnym, które oddziałuje na wiele białek uczestniczących w regulacji cyklu komórkowego, wpływając w ten sposób na wzrost i różnicowanie komórek. TGF- β wykazuje właściwości stymulujące podziały komórek mezenchymalnych lub hamujące podziały komórkowe, m.in. komórek epitelialnych, limfatycznych i hematopoetycznych, a także komórek endotelialnych. TGF- β może także regulować wejście komórek na szlak apoptozy. TGF- β odgrywa istotną rolę w procesie angiogenezy, stymulowaniu syntezy białek macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym kolagenu typu I, w gojeniu się ran i w procesach naprawczych. Dodatkowo TGF- β indukuje przemianę komórek epitelialnych w mezenchymalne. TGF- β przekazuje sygnały za pośrednictwem receptorów – kinaz serynowo-treoninowych, które bezpośrednio regulują wewnątrzkomórkowy szlak Smad. Białka Smad stanowią unikalną rodzinę cząsteczek przewodzących sygnał, które mogą przekazywać sygnał bezpośrednio z receptorów znajdujących się na powierzchni komórki do jądra komórkowego, gdzie regulują transkrypcję poprzez oddziaływanie z białkami wiążącymi się z DNA, a także z transkrypcyjnymi koaktywatorami i korepresorami. Zaburzenia ekspresji TGF- β zanotowano w wielu procesach chorobowych, w tym w nowotworach. Mutacje w genach TGF- β , jego receptorów lub cząsteczek zaangażowanych w wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnału za pośrednictwem TGF- β również odgrywają istotną rolę w patogenezie chorób, zwłaszcza nowotworowych.

Słowa kluczowe:

transformujący czynnik wzrostowy β • regulacja cyklu komórkowego • zablokowanie cyklu komórkowego • kinazy cyklinozależne • pRb • c-myc

Summary

TGF β is a multifunctional protein which affects many proteins taking part in cell cycle regulation and, thanks to this, it influences cell growth and differentiation. TGF β can stimulate the proliferation of mesenchymal cells, but it can also act as a growth – inhibitory factor for epithelial, lymphatic, hematopoietic, and endothelial cells. TGF β may also regulate cell entry to the apoptosis pathway. TGF β plays an important role in angiogenesis, the stimulation of extracellular matrix synthesis, including collagen I, as well as in tissue repair and healing processes. Additionally, TGF β induces epithelial to mesenchymal transition in epithelial cell phenotypes. TGF β transmits signals through transmembrane Ser–Thr kinase receptors that directly regulate the intracellular Smad pathway. Smad proteins are a unique family of signal transduction molecules that can transmit signals directly from cell surface receptors by interacting with DNA binding partners as well as with transcriptional coactivators and corepressors. Abnormalities in TGF β expression are very common in many disease processes including tumors. Mutations in the genes for TGF β , its receptors, or intracellular signaling molecules associated with TGF β are also important in the pathogenesis of disease, particularly cancer.

Key words:

transforming growth factor β • cell cycle regulation • cell cycle arrest • cyclin-dependent kinase • pRb • c-myc

*Praca finansowana z funduszu projektu badawczego KBN nr 3P05A 033 24

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8112.pdf
Word count:	4376
Tables:	–
Figures:	3
References:	101

Adres autorki: mgr Liliana Stalińska, Zakład Biologii i Genetyki Uniwersytetu Medycznego, pl. Hallera 1, 90-647 Łódź; e-mail: lstalinska@poczta.fm

Stosowane skróty: **CDK** – kinazy cyklinozależne (cyclin – dependent kinases); **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostowy β (transforming growth factor β); **LAP** – peptyd związany z latencją (latency associated peptide); **LTBP** – latentne białko wiążące TGF-β (latent TGFβ-binding protein); **PCNA** – jądrowy antygen komórek proliferujących (proliferating cell nuclear antigen); **EMT** – przemiana komórek epitelialnych w mezenchymalne (epithelial to mesenchymal transition); **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix); **BMP** – białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein)

MECHANIZMY REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

Homeostaza organizmu zależy od równowagi pomiędzy komórkami dzielącymi się i umierającymi. Komórki dzielące się mitotycznie wchodzą ze stadium międzypodziałowego w fazę podziału komórki, czyli mitozy (M). Po zakończeniu mitozy komórki mogą ponownie włączyć się w aktywny cykl komórkowy lub przejść pod wpływem sygnałów hamujących dalsze podziały, do stadium spoczynkowego (G0). Z kolei śmierć komórek może być, podobnie jak ich podziały, procesem aktywnym, charakteryzującym się indukcją wielu genów i sekwencją pewnych zdarzeń biochemicznych i wtedy jest nazwana śmiercią fizjologiczną, programowaną lub apoptozą [12,24,51,87].

Prawidłowy cykl komórkowy u eukariontów jest procesem bardzo złożonym, a w jego regulacji uczestniczy wewnętrzny mechanizm składający się z trzech głównych grup białek. Do tych grup zalicza się: kinazy białkowe zależne od cyklin (cyclin – dependent kinases – CDK), ich endogenne regulatory należące do rodzin białek INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}) i rodziny białek CIP/KIP (p21^{WAF1}, p27^{KIP2}) oraz cykliny (A, B, C, D, E, H) (ryc. 1) [12,24,33,69].

Mechanizmy regulujące podziały mitotyczne są wrażliwe na sygnały, jakie komórki otrzymują ze środowiska oraz ze swojego wnętrza. Sygnałami zewnątrzkomórkowymi mogą być m.in. czynniki wzrostowe, hormony, cytokiny [1,88]. Z kolei sygnałami wewnątrzkomórkowymi mogą być np. uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem jonizującym, ultrafioletowym, związkami chemicznymi bądź innymi przyczynami, które wywołują tzw. stres komórkowy (cellular stress) [41,75]. Działanie różnych mitogenów, np. czynników wzrostowych na powierzchnię komórki będącej w aktywnym cyklu komórkowym oraz ich interakcja z odpowiednimi receptorami, powoduje uruchomienie kaskady genetycznych i biochemicznych zdarzeń, które prowadzą do powstania dwóch potomnych komórek [66,87,88]. Sygnał mitogenowy niezależnie od szlaku przekazywania, musi być przeniesiony do cytoplazmy, a następnie do jądra komórkowego. W jądrze komórkowym dochodzi do aktywacji swoistych czynników transkrypcyjnych, które z kolei aktywują promotory genów związanych z uruchomieniem cyklu komórkowego [66].

Zdarzenia zachodzące w kolejnych fazach niezaburzonego cyklu komórkowego są zorganizowane w taki sposób, że inicjacja każdego etapu jest możliwa dopiero po prawidłowym zakończeniu etapu poprzedzającego. Istotnym elementem regulacji tego mechanizmu jest obecność tzw. wewnętrznych punktów kontrolnych (cell cycle checkpoints), a ich przejście komórka realizuje poprzez ekspresję swoistych genów [12,24,33]. Szczególne znaczenie ma prawidłowa regulacja cyklu komórkowego na granicy faz G1/S i faz G2/M, a także podczas mitozy przy tworzeniu wrzeciona kariokinetycznego i rozdzieleniu chromatyd do komórek potomnych [24,33].

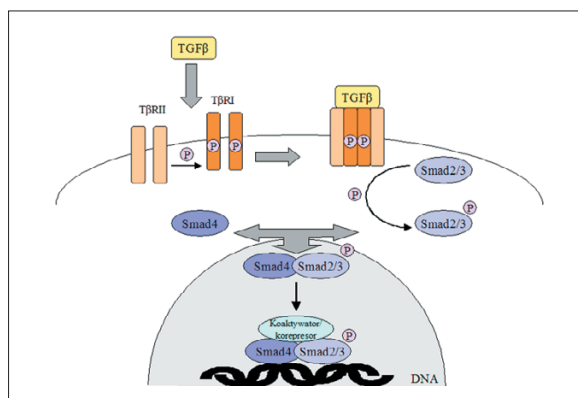
W prawidłowym przejściu komórek eukariotycznych przez te krytyczne fazy cyklu komórkowego dużą rolę odgrywają wspomniane już cyklinozależne kinazy białkowe, ich endogenne białkowe regulatory, podjednostki regulatorowe tych kinaz – cykliny, a także produkty kilku genów supresorowych, takich jak: pRb, p16 i P53 [12,24,69]. Następujące kolejno po sobie procesy aktywacji poszczególnych kinaz cyklinozależnych (CDK) przez odpowiednie dla danej fazy cykliny i wynikająca z tego enzymatyczna fosforylacja i defosforylacja właściwych substratów, takich jak: białka strukturalne (np. histon H1, laminy, wimentyna i inne białka tworzące cytoszkielet), białka enzymatyczne i białka regulatorowe (np. kalmodesmon), promują uporządkowany przebieg cyklu komórkowego (ryc. 1) [33,64].

TGF-β

Do czynników mających wpływ na przebieg cyklu komórkowego i mogących zaburzać naturalny rytm następujących po sobie faz cyklu należy transformujący czynnik wzrostowy β (transforming growth factor β – TGF-β), który ma m.in. zdolność hamowania cyklu w komórkach epitelialnych i epidermalnych, keratynocytach, a także prekursorowych komórkach krwi [7,9,28,34,57,65]. Do rodziny TGF-β oprócz transformującego czynnika wzrostowego β należą też m.in. aktywiny, czynnik wzrostu i różnicowania (growth and differentiation factor – GDF) i białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein – BMP) [84].

TGF-β jest czynnikiem wielofunkcyjnym, który ma bardzo różnorodny wpływ na wzrost i różnicowanie komór-





Ryc. 1. Schemat mechanizmu przekazywania sygnału za pośrednictwem TGF-β w komórce (wg [86] zmodyfikowano)

rek. TGF-β wykazuje właściwości stymulujące podziały komórek mezenchymalnych np. fibroblastów lub hamujące podziały komórkowe m.in. komórek epitelialnych skóry, płuc, wątroby, śledziony, prostaty i jajników, komórek limfatycznych i hematopoetycznych, a także komórek endotelialnych [7,54,86]. TGF-β może także regulować wejście komórek na szlak apoptozy. TGF-β odgrywa istotną rolę w procesie angiogenezy, stymulowaniu syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym kolagenu typu I, naprawy tkanek i gojeniu się ran [17]. Ponadto TGF-β należy do istotnych czynników regulujących odpowiedź immunologiczną [38]. TGF-β stanowi przedmiot licznych badań z zakresu biologii komórki i patomechanizmów różnych procesów chorobowych, w tym nowotworowych [13,57,61].

U kręgowców zidentyfikowano pięć genów kodujących TGF-β, ale tylko trzy z nich są obecne u ssaków (TGF-β1, TGF-β2 i TGF-β3) [54]. Wszystkie rodzaje czynników TGF-β wykazują prawie 70% homologii sekwencji aminokwasowej [44]. Są to białka homodimeryczne o masie cząsteczkowej (m. cz.) 25 kDa zbudowane z dwóch podjednostek o m. cz. 12,5 kDa, zawierających 112 aminokwasów. Podjednostki tych cząsteczek są połączone mostkami disiarczkowymi [25,44,89]. TGF-β jest syntetyzowany jako białko prekursorowe o długości 390-414 reszt aminokwasowych, a głównym jego źródłem są płytki krwi [2,14,53].

Najlepiej poznanym i najszerzej opisanym białkiem z tej grupy jest białko TGF-β1. Gen TGF-β1 (*locus* 19q13.1-q13.3) składający się z 7 eksonów koduje cząsteczkę prekursorową składającą się z 390 reszt aminokwasowych, która zawiera peptyd sygnałowy, LAP (latency associated peptide) oraz w rejonie C-końcowym aktywną postać tej cząsteczki [17,23,25]. Cząsteczka prekursorowa TGF-β ma m. cz. około 110 kDa [44]. Po enzymatycznym usunięciu peptydu sygnałowego (reszty aminokwasowe 1–29), w czym udział może brać wiele enzymów m.in. plazmina, trombina, transglutaminaza osocza, trombospondyna 1 czy endoglikozyłazy, następuje proteolityczne rozdzielanie między dwiema resztami argininy w pozycjach 278 i 279 i powstaje dojrzały funkcjonalnie TGF-β1 (reszty 279–390) oraz LAP (reszty 30–278) [4,22,44,71,89]. Zanim wydzieli się dojrzały funkcjonalnie TGF-β, homodimer TGF-β niekowalently połączony z homodimerem LAP tworzy tzw. mały latentny kompleks TGF-β1 [31]. Kompleks ten dodatkowo jest połączony wiązaniem kowalencyjnym z białkiem

o m. cz. 125-160 kDa, zwanym latentnym białkiem wiążącym TGF-β (latent TGFβ-binding protein – LTBP), tworząc w ten sposób duży kompleks latentny. Duży kompleks latentny jest uwalniany z płytek krwi do krążenia z udziałem plazminy [42,44]. TGF-β jest także wytwarzany przez makrofagi, neutrofile i limfocyty [38]. Niektóre komórki syntetyzują i uwalniają TGF-β w postaci nieaktywnego kompleksu o m. cz. 110 kDa [52].

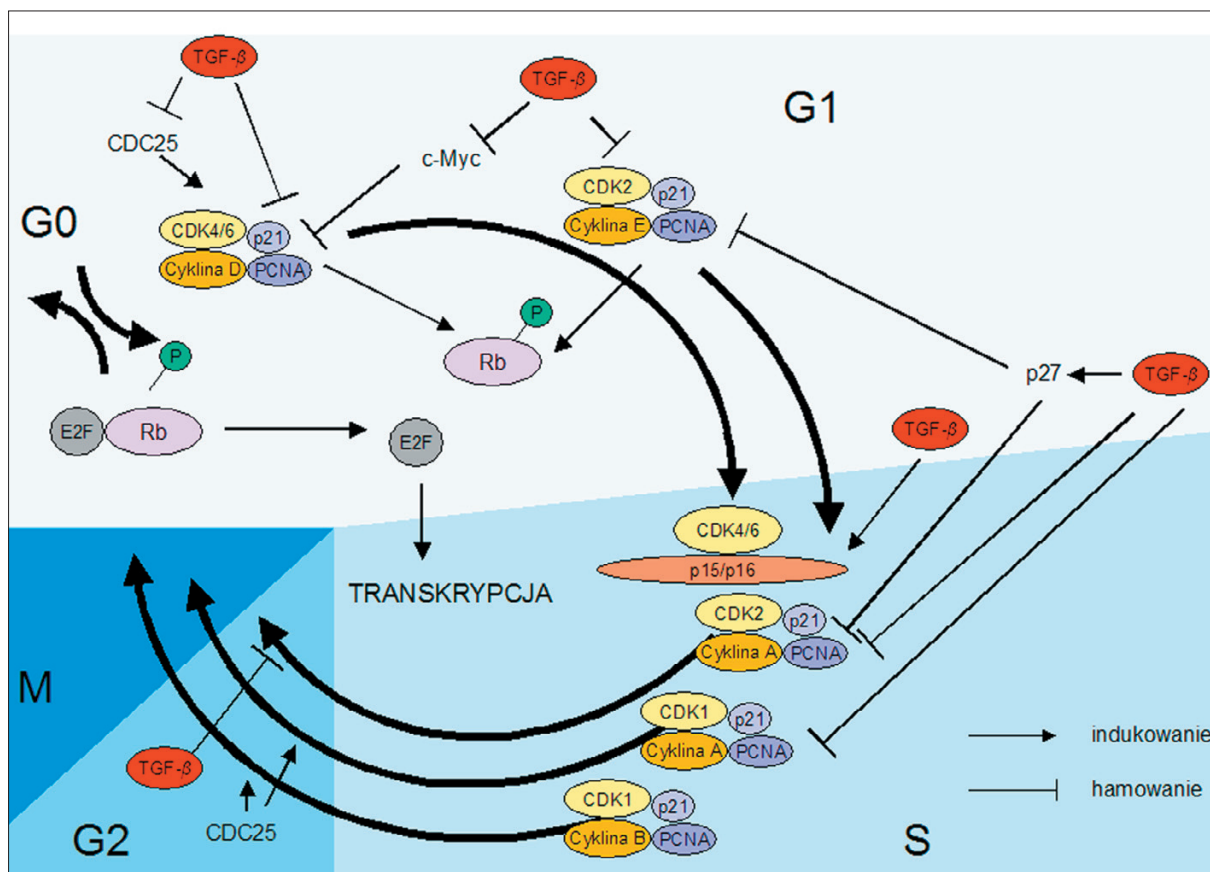
PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU ZA POŚREDNICTWEM TGF-β

W przekazywaniu sygnału z udziałem transformującego czynnika wzrostowego β udział biorą dwa typy receptorów błonowych TβRI (m. cz. 65 kDa) i TβRII (m. cz. 85-110 kDa) i białka Smad [86]. Oba typy receptorów są zbudowane z około 500 reszt aminokwasowych. Mają one N-terminalną domenę wiążącą ligand, region transbłonowy oraz domenę C-końcową o aktywności kinazy serynowo-treoninowej [84,98]. TGF-β wykazuje duże powinowactwo do receptora typu II, ale brak jest takiego powinowactwa do TβRI [55]. Dlatego też na początku ligand wiąże się z TβRII, co pozwala następnie na przyłączenie receptora typu I. W ten sposób powstaje duży kompleks ligand-receptor składający się z dimeru białka TGF-β oraz dwóch cząsteczek TβRI i dwóch TβRII (ryc. 2) [84]. Dzięki takiemu połączeniu dochodzi do fosforylacji reszt seryny i treoniny w domenie GS (sekwencja aminokwasowa SGSGSG) receptora TGF-β I typu przez typ II, co powoduje jego aktywację. Zaktywowany receptor typu I transdukuje sygnał do cytoplazmy przez fosforylację białek R-Smad, co zwiększa powinowactwo tych ostatnich do białka Smad4. Istnieje jeszcze trzeci typ receptora – TβRIII o m. cz. ok. 600 kDa, zbudowany z proteoglikanu i glikoproteiny, który pełni podzgodną rolę w stosunku do dwóch pozostałych przez ułatwianie dostępu liganda do TβRI i TβRII [61].

Rodzina białek Smad (nazwa pochodzi od nazw dwóch białek homologicznych Sma oraz MAD występujących odpowiednio u *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*) [16] dzieli się na trzy grupy: białka aktywowane przez receptor (R-Smad), do których należą Smad1, 2, 3, 5 i 8; białko współpośredniczące Smad4 (Co-Smad) oraz białka inhibitorowe (I-Smad) Smad6 i Smad7 [84].

Białka R-Smad wykazują podobną budowę domenową. Zbudowane są z dwóch globularnych domen MH wykazujących homologię do białka Mad (Mad homology), oddzielonych od siebie fragmentem łącznikowym. N-końcowa domena MH1 wykazuje aktywność wiązania DNA, natomiast C-końcowa domena MH2 odpowiada za oddziaływanie z innymi białkami (ryc. 3).

Fosforylacja białek R-Smad przez TβRI dotyczy dwóch reszt seryny w konserwatywnym motywie SS(M/V)S znajdującym się w rejonie C-końcowym [58,59]. Smad2 i Smad3 są rozpoznawane przez receptory TGF-β i aktywiny, podczas gdy receptory BMP rozpoznają białka Smad1, 5 i 8 [59,94]. Aktywny kompleks białek Smad jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie w połączeniu z innymi jądrowymi białkami kofaktorowymi reguluje proces transkrypcji określonych genów. Mechanizm transportu jądrowo-cytoplazmatycznego białek Smad nie jest jeszcze do końca poznany. Wiadomo jednak, że w tym procesie istotną rolę odgrywają interakcje pomiędzy nukleoporyna-



Ryc. 2. Schemat udziału TGF-β w regulacji cyklu komórkowego (wg [33] zmodyfikowano)

mi CAN/Nup214 i Nup153 a białkiem Smad2 [96], a także sekwencja lokalizacji jądrowej NLS, obecna w domenie MH1 białka Smad3 [95]. Białka I-Smad negatywnie regulują przesyłanie sygnału przez TGF-β poprzez współzawodnictwo z R-Smad o połączenie z receptorem lub Smad4, bądź przez wyznaczanie receptorów do proteolitycznej degradacji [29,84]. Smad7 rekrutuje do receptorów TGF-β ligazę ubikwitynową Smurf2, co prowadzi do proteosomalnej i lizosomalnej degradacji kompleksów TβRI –TβRII oraz Smad7 i Smad2 [43,70]. Przy braku przekazywania sygnału białka R-Smad są umiejscowione głównie w cytoplazmie, białka I-Smad w jądrze komórkowym, natomiast białko Smad4 w cytoplazmie i jądrze komórkowym [84]. Po aktywacji receptora, ufosforylowane białka R-Smad są transportowane do jądra, gdzie pozostają tylko na czas stymulacji komórki przez TGF-β [6,86,90]. Wolne białka Smad charakteryzują się słabą swoistością wiązania się z DNA, dlatego muszą one współdziałać ze sobą, bądź z innymi białkami wiążącymi DNA w celu wygenerowania odpowiedniej odpowiedzi transkrypcyjnej [84]. Czynniki współdziałające z białkami Smad mają charakter aktywatorów lub represorów i od nich zależy, czy dojdzie do aktywacji czy zahamowania ekspresji danego genu [86]. Zakłada się, że zaktwowane białka Smad oddziałują z genami docelowymi, które w regionach promotorowych mają jedną lub kilka kopii sekwencji CAGAC. Dotyczy to białek Smad4 i R-Smad z wyjątkiem Smad2 [83]. Białka Smad zapewniają rekrutację transkrypcyjnych koaktywatorów, takich jak np. białka p300, bądź korepresorów np. białka p107 w zależności od typu komórki, w której odbywa się proces i ro-

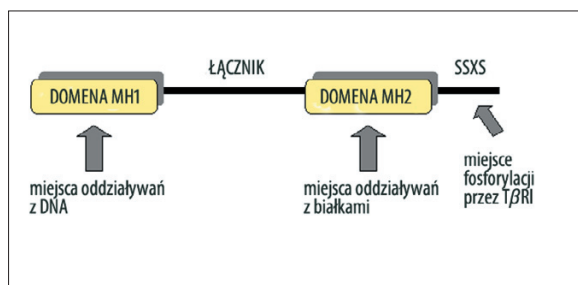
dzu aktywowanego genu (ryc. 2) [7,56,59,84]. Do czynników negatywnie regulujących funkcje białek Smad należą m.in. jądrowe onkoproteiny c-Ski i c-Sno, które wiążąc się zarówno z Smad4, jak i R-Smad, zapobiegają powstawaniu aktywnych kompleksów R-Smad-Co-Smad [94]. Za zakończenie procesu przekazywania sygnału za pośrednictwem białek Smad odpowiedzialne są dwa mechanizmy: defosforylacja aktywnych białek R-Smad z udziałem niezidentyfikowanej jeszcze fosfatazy [76] oraz ich ubikwitynacja i proteosomalna degradacja, w czym udział bierze białko Smad7 [84]. Białka Smad uczestniczą również w kontroli ekspresji genu *CDKN2B* kodującego p15, *CDKN1A* kodującego p21, *c-myc*, *ID1* i *ATF3* [86].

Mimo że przekazywanie sygnału za pośrednictwem TGF-β odbywa się głównie z udziałem białek Smad, to istnieją także inne, alternatywne drogi przekazywania sygnału. Mogą w nich uczestniczyć kinazy MAP, takie jak: JNK, p38 czy ERK1, ERK2 [57,86].

ZNACZENIE BIAŁKA PRB W REGULACJI CYKLU KOMÓRKOWEGO

Białkiem odgrywającym istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego jest białko pRb (retinoblastoma protein). Białko pRb (105-110 kDa) może wykazywać zróżnicowane ufosforylowanie, co wiąże się ze zmianą jego aktywności [19,34]. W postaci nieufosforylowanej pRb wiąże się z różnymi czynnikami transkrypcyjnymi niezbędnymi do łączenia się polimeraz RNA: I, II, III z DNA i rozpoczęcia transkrypcji [82]. Jednym z takich czynników jest





Ryc. 3. Schemat struktury domenowej białek R-Smad

czynnik transkrypcyjny E2F, który ma krytyczne znaczenie w przejściu komórki przez punkt kontrolny na granicy faz G1/S oraz wpływa na aktywację genów fazy S [46]. Aktywność białka pRb regulowana jest przez cyklinozależne kinazy CDK, które fosforylują białko pRb w czasie trwania fazy G1. Białko pRb ma kilkanaście miejsc fosforylacji przez kinazy cyklinozależne [30]. Na początku i w trakcie trwania fazy G1 za proces fosforylacji pRb odpowiadają kinazy CDK4 i CDK6, które oddziałując z cyklina D (D1, D2, D3) tworzą aktywny kompleks zdolny do przyłączenia reszt fosforanowych do pRb. Następnie proces fosforylacji pRb przejmuje kompleks CDK2 – cyklina E, który jest aktywny pod koniec trwania fazy G1. Podczas fazy S i przejścia z fazy G2 do M aktywność wykazuje cyklina A w kompleksie z CDK1 oraz CDK2, natomiast w fazie M cykлина B i kinaza CDK1 [21,50,57,67,79]. W postaci ufosforylowanej białko pRb traci zdolność do wiązania się z czynnikiem transkrypcyjnym E2F, co umożliwia transkrypcję genów fazy S i przejście komórki z fazy G1 do S. Niedawno wykazano, że białko pRb bierze również udział w wychodzeniu komórki z fazy spoczynkowej G0 i wchodzeniu w fazę G1. Aby mogło dojść do tego zdarzenia, pRb musi zostać ufosforylowane przez kompleks CDK3 – cyklina C [77].

Białko pRb funkcjonuje jako aktywny represor transkrypcji przez przyłączenie się do promotorów różnych genów za pośrednictwem czynnika E2F [5,34,91,92]. Autorzy wskazują istnienie dwóch mechanizmów represji. Pierwszy zakłada, że pRb oddziałuje z innymi czynnikami transkrypcyjnymi znajdującymi się w sąsiedztwie docelowego genu, takimi jak c-Myc, Elf-1, PU.1, przez co blokuje ich interakcje z kompleksem transkrypcyjnym [91,92]. Zgodnie z drugim modelem, przez wiązanie się z promotorem za pośrednictwem czynnika E2F, pRb może rekrutować deacetylazę histonową HDAC, przez co stymuluje formowanie nukleosomów, a to z kolei blokuje innym czynnikiem transkrypcyjnym dostęp do promotorów [5]. Fosforylacja białka pRb przez kinazy cyklinozależne fazy G1 prowadzi do zmian konformacyjnych tego białka, które uniemożliwiają wiązanie z HDAC [30]. Dane te nasuwają wniosek, że miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego E2F z DNA mogą funkcjonować jako transkrypcyjne „wyciszacze”, kiedy zwiąże się z nimi kompleks pRb – E2F [92]. Fakt ten zdają się także potwierdzać dane przedstawione przez Zhanga i wsp. [101] wskazujące, że nagromadzenie nieufosforylowanego białka pRb w komórce powoduje zablokowanie cyklu komórkowego w fazie G1 poprzez formowanie represyjnych kompleksów pRb – E2F na promotorach genów zaangażowanych w cykl komórkowy, m.in. genu kodującego cyklina E [19], a nie przez bezpo-

średnie blokowanie transkrypcyjnej aktywności czynnika E2F. Wykazano także, że pRb musi oddziaływać z E2F, aby zablokować cykl komórkowy, gdyż sama nadekspresja białka pRb jest niewystarczająca do wywołania tego efektu [101].

WPLYW TGF- β NA AKTYWNOŚĆ pRb I p16

Aktywność biologiczna pRb jest regulowana przez wiele czynników, m.in. przez białko p16 oraz TGF- β [21]. Czynniki te wywołują blokadę cyklu komórkowego w fazie G1 przez promowanie oddziaływań represorowego kompleksu pRb-E2F z promotorami genów regulujących przebieg cyklu [101]. Co więcej, pomiędzy białkami pRb i p16 istnieje jeszcze inny rodzaj zależności. Białko p16 jest swoistym inhibitorem kinaz CDK4 i CDK6, które fosforylują pRb [19]. Z kolei TGF- β 1 znacznie obniża ekspresję CDK4, CDK2, CDK1, cykлина A, D2 i D3 w ludzkich komórkach białaczki szpikowej linii MV4-11 i HaCaT [19,21] oraz hamował proces fosforylacji kilku reszt seryny i treoniny białka pRb, w tym Ser249/Thr252, Thr373, Ser 780, Ser795 i Ser 807/811 w komórkach linii MV4-11 [34]. Jak wykazano za fosforylację reszt serynowych i treoninowych, a jednocześnie za inaktywację pRb odpowiadają w różnym stopniu kinazy CDK2, CDK4/CDK6 i CDK1 [60,62,72]. Proces defosforylacji pRb zbiega się w czasie z obniżeniem ekspresji wyżej wymienionych kinaz i cytokin. Geng i Weinberg [21] wykazali, iż TGF- β hamuje pojawianie się w komórce zarówno mRNA, jak i białka cykлина E, ale tylko wtedy gdy TGF- β działa na komórkę przed rozpoczęciem ekspresji cykлина E. Kiedy proces transkrypcji genu kodującego cyklina E rozpocznie się, TGF- β traci zdolność wpływania na ekspresję tej cykлина. Jednocześnie z utratą zdolności hamowania ekspresji tego genu, TGF- β przestaje także blokować przejście komórki z fazy G1 w fazę S cyklu komórkowego [21].

WPLYW TGF- β NA AKTYWNOŚĆ p15

TGF- β może także zablokować cykl komórkowy w fazie G1 poprzez białko p15, które swoiście wiąże się z kinazami CDK4 i CDK6 (ryc. 1), ale nie ma zdolności wiązania się z CDK1, CDK2 czy CDK5 [28]. Białko p15 wiążąc się z kinazą CDK4 bądź CDK6 blokuje ich aktywność katalityczną i zapobiega powstawaniu nowych kompleksów CDK4/6–cyklina D z puli nieaktywnych składowych tych kompleksów [57]. Potraktowanie ludzkich keratynocytów linii HaCaT transformującym czynnikiem wzrostowym β spowodowało prawie 30-krotny wzrost poziomu mRNA białka p15 oraz wzrost syntezy tego białka, a co za tym idzie, zwiększyła się liczba kompleksów białka p15 z CDK4 i CDK6. Następstwem tego był spadek aktywności kinaz cyklinozależnych [28]. Jest to częściowo związane ze zdolnością TGF- β do indukcji promotora genu białka p15 [47]. Podobne wyniki uzyskano w badanych komórkach płuc, tyrocytach, ssaczycy komórkach epitelialnych i astrocytach [57].

WPLYW TGF- β NA AKTYWNOŚĆ BIAŁKA p27

Kompleks CDK-cyklina D wspomaga przebieg cyklu komórkowego nie tylko swoją aktywnością katalityczną, ale także sekwestracją inhibitora kinaz cyklinozależnych – białka p27 [8,33,45,57,78]. Inhibitory grupy CIP/KIP, do

której oprócz p27 należą jeszcze p21 i p57, mogą oddziaływać z kompleksami CDK4/6 – cyklina D, CDK2 – cyklina E i CDK2 – cyklina A. Wykazano, że białko p27 działa jako inhibitor kompleksów CDK2 – cyklina E oraz CDK2 – cyklina A, ale nie wywiera hamującego wpływu na aktywność kompleksu CDK4/6 – cyklina D1 [57]. W komórkach proliferujących większość białka p27 występuje w połączeniu z kompleksem CDK4/6 – cyklina D1, przez co nie wpływa hamująco na aktywność kinaz CDK2 [57,81]. Jednakże gdy na komórkę zadziała TGF- β powodując wzrost ekspresji białka p15, interakcje pomiędzy CDK4/6 i p27 ulegają zahamowaniu. Białko p15 stymuluje przeniesienie białka p27 z kompleksu CDK4/6 – cyklina D1 na CDK2 – cyklina E, hamując tym samym aktywność tego kompleksu (ryc. 1) [33,78,100]. Zatem przez spowodowanie wzrostu poziomu jednego inhibitora kinaz cyklinozależnych (p15), TGF- β hamuje aktywność dwóch klas kinaz CDK fazy G1. TGF- β powoduje również pośrednio wzrost poziomu białka p27 w komórce poprzez obniżenie poziomu mRNA i białka Id-1 (inhibitor of differentiation) [48].

WPLYW TGF- β NA AKTYWNOŚĆ FOSFATAZ CDC25

Innym czynnikiem, poprzez który TGF- β może wpływać na przebieg cyklu komórkowego, jest fosfataza treonino-tyrozynowa CDC25A [35]. Fosfatazy rodziny CDC25 stymulują przebieg cyklu komórkowego działając antagonistycznie w stosunku do kinaz Wee1 i Mik1. Fosfatazy te defosforylują reszty tyrozyny i treoniny (T14, Y15) znajdujące się w centrach katalitycznych kinaz cyklinozależnych, co powoduje ich aktywację [26,68]. TGF- β obniża poziom CDC25A w ssaczych komórkach epitelialnych linii MCF-10A, co prowadzi do wzrostu poziomu fosforylacji reszt tyrozynowych kinaz CDK4 i CDK6, a w efekcie braku ich aktywności [57]. Zmutowane postaci fosfataz CDC25 pozbawione reszty tyrozyny podatnej na fosforylację są odporne na hamujące działanie TGF- β .

Zaobserwowano, że TGF- β obniża także ekspresję CDC25A w keratynocytach [36]. Obniżona ekspresja CDC25A spowodowana jest również formowaniem represyjnego kompleksu transkrypcyjnego złożonego z czynnika E2F, białka p130 i deacylazy histonowej HDAC1. Związanie się takiego kompleksu z miejscem wiązania się czynnika E2F w obrębie promotora genu CDC25A wywołuje represję ekspresji tego genu.

WZAJEMNA REGULACJA CYKLU KOMÓRKOWEGO PRZEZ BIAŁKA P53 I TGF- β

Białko P53 jest kolejnym ważnym czynnikiem regulującym przejście komórki przez fazę G1. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA dochodzi do akumulacji prawidłowego (dzikiego) białka P53, czego skutkiem jest m.in. zaindukowanie transkrypcji białka p21, będącego inhibitorem kinaz cyklinozależnych [19,20,93]. Akumulacja białka P53 nie jest wynikiem transkrypcji genu *de novo*. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA dochodzi do aktywacji kaskady kinaz i innych białek, m.in. ATM, ATR, Chk1, Chk2, CDC25C, a także wzajemnego oddziaływania białka P53 z Mdm2 [26,82]. Skutkiem tego jest osłabienie degradacji białka P53, a przez to wzrost poziomu tego białka w komórce. Zahamowanie aktywności kinaz fazy G1 powoduje aku-

mulację nieufosforylowanego białka pRb, a to z kolei wywołuje zablokowanie cyklu komórkowego. Jak wykazały badania przeprowadzone przez Ewena [19], poddanie komórek działaniu TGF- β powodowało spadek aktywności CDK4, choć poziom mRNA tej kinazy nie ulegał zmianie. Nasuwa to więc wniosek, że TGF- β hamuje ekspresję CDK4 na poziomie translacji. Ten sam autor udowodnił, że w jednej z dróg blokowania cyklu komórkowego w fazie G1 przez TGF- β uczestniczy białko P53, gdyż jedynie w komórkach wytwarzających dziki typ białka P53 cykl może zostać zahamowany pod wpływem TGF- β . W komórkach, w których występuje zmutowana postać białka P53, nie obserwuje się obniżenia syntezy CDK4, jak i zahamowania aktywności kompleksu CDK2–cyklina E pod wpływem TGF- β [19]. Co więcej, białko p21 formuje kompleksy z jądrowym antygenem proliferacyjnym (proliferating cell nuclear antigen – PCNA), który jest białkiem pomocniczym polimerazy DNA δ i ϵ [97], co zapobiega dalszej syntezie DNA i umożliwia rozpoczęcie procesu naprawy uszkodzeń (ryc. 1) [19]. Tak więc białko P53 jest głównym czynnikiem zapobiegającym powielaniu uszkodzonego DNA. Cordenonsi i wsp. [11] wykazali, iż prawidłowe białko P53 ma istotny wpływ na efekt antyproliferacyjny wywołany przez TGF- β w hodowlach embrionalnych fibroblastów.

WPLYW TGF- β NA EKSPRESJĘ GENU *c-MYC*

Opublikowane dane wskazują, iż wpływ TGF- β na ekspresję protoonkogenu *c-myc* może być jednym z głównych zjawisk wywołujących zahamowanie wzrostu komórki w odpowiedzi na transformujący czynnik wzrostowy β [1,9,65], gdyż TGF- β powoduje gwałtowne obniżenie poziomu zarówno mRNA jak i białka *c-Myc* (ryc. 1) [6,7,10,36,80,98]. Skutkiem tego nie dochodzi do kaskady wielu zjawisk, które są wymagane do wejścia komórki w kolejny etap cyklu komórkowego, a które są regulowane przez produkt białkowy genu *c-myc* [1]. Hipotezę tę mogą potwierdzać doniesienia, iż białko *c-Myc* reguluje ekspresję cyklin fazy G1, w tym cykliny D1 i E [39,73,85]. Udokumentowano, że białko *c-Myc* ma zdolność do obniżenia poziomu ekspresji cykliny D1, a nadekspresja cykliny D1 może zablokować wyjście niektórych typów komórek w fazę S [73]. Tak więc utrata ekspresji białka *c-Myc* pod wpływem TGF- β powoduje ekspresję cykliny D1 na poziomie wyższym od prawidłowego, co jest wystarczające do zablokowania przejścia komórki w fazę S cyklu.

Chen i wsp. [6] badali mechanizm odpowiedzialny za obniżenie poziomu ekspresji genu *c-myc* przez transformujący czynnik wzrostowy β . Wykazali oni, że stymulowanie komórek linii HaCaT czynnikiem TGF- β prowadzi do gwałtownej akumulacji kompleksów białek Smad (Smad3–Smad4), które swoiście rozpoznają elementy regulowane negatywnie przez TGF- β w obrębie promotora genu *c-myc*, co powoduje zablokowanie jego ekspresji. Do swoistego wiązania z proksymalnym regionem promotora genu *c-myc* dochodzi już po 1 godz. od zadziałania TGF- β [7]. W oddziaływaniach tych biorą udział dodatkowe czynniki transkrypcyjne E2F4, E2F5 i białko p107, które w cytoplazmie tworzą kompleks z białkiem Smad3 (Smad3 – E2F4/5 – p107). W przypadku obecności TGF- β w środowisku komórkowym, kompleks ten łączy się ze Smad4 i jest transportowany do jądra komórkowego [7].



Autorzy wskazują też, iż zahamowanie cyklu komórkowego pod wpływem TGF-β przez obniżenie ekspresji genu *c-myc*, może być również związane z pozytywną regulacją ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego, takich jak p21, p27, czyli ze wzrostem poziomu tych białek w komórce [1,80]. Taka zależność została wykazana przez Claassena i Hanna [9], którzy dzięki uzyskaniu ektopowej ekspresji białka c-Myc zablokowali hamujący wpływ TGF-β na komórki linii HaCaT. Zablokowanie aktywności TGF-β przez białko c-Myc było wynikiem represji ekspresji p21. W tej samej pracy dowiedziono także, że represja promotora p21 przez c-Myc jest swoista i nie wymaga aktywności deacylazy histonowej.

Pietenpol i wsp. [74] zaproponowali hipotezę mówiącą, że mechanizm hamowania wzrostu komórkowego wywołany przez TGF-β, opiera się na syntezie lub modyfikacji białek, które mogą oddziaływać ze swoistymi elementami w regionie regulatorowym 5' genu *c-myc*, a to przyczynia się do zablokowania inicjacji transkrypcji tego genu.

Wpływ TGF-β na przejście komórki z fazy G2 do M

Wyniki eksperymentu przeprowadzonego przez Zhanga i wsp. [101] sugerują, iż TGF-β może zaburzać cykl komórkowy nie tylko na granicy faz G1/S, ale także G2/M. Autorzy ci sugerują, że może się tak dziać na skutek spadku aktywności kinazy CDK2, co zaobserwowano podczas ekspozycji komórek na działanie TGF-β. Hipotezę tę czynią bardziej prawdopodobną dane dotyczące *Xenopus*, z których wynika, że CDK2 jest niezbędna do wzrostu aktywności CDK1 i rozpoczęcia mitozy (M) [27], oraz że kompleks CDK2 – cykliny E jest niezbędny do powstania centrosomów [32].

Jednak, jak wspomniano wcześniej, TGF-β może regulować pośrednio cykl komórkowy na etapie fazy G1 poprzez białko P53. Z kolei dzięki białko P53, którego poziom wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenie DNA i blokuje wejście komórki w fazę S cyklu za pośrednictwem białka p21, nadzoruje także punkt kontrolny fazy G2 [37]. Innocente i wsp. [37] wykazali, że P53 zapobiega przejściu komórki z fazy G2 do fazy M przez obniżenie poziomu cykliny B1 i osłabienie aktywności promotora genu tego białka, które w kompleksie z kinazą CDK1 jest niezbędne do rozpoczęcia mitozy (M).

Zaburzenia ekspresji TGF-β w wybranych procesach rozrostowych

Mimo iż TGF-β wywiera hamujący wpływ na podziały komórkowe komórek epitelialnych i epidermalnych, to w licznych pracach wskazuje się na utratę przez komórki nowotworowe wrażliwości na supresyjne działanie TGF-β [17,86]. Cui i wsp. [13] wykazali, że rola TGF-β w procesie nowotworzenia może się zmieniać w kolejnych jego etapach.

Piśmiennictwo

- [1] Alexandrow M.G., Moses H.L.: Transforming growth factor β and cell cycle regulation. *Cancer Res.*, 1995; 55: 1452–1457
- [2] Assoian R.K., Komoriya A., Meyers C.A., Miller D.M., Sporn M.B.: Transforming growth factor-β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 7155–7160

Wiele nowotworów występujących u ludzi, zarówno dziedzicznych jak i sporadycznych, wiąże się z mutacjami dotyczącymi białek uczestniczących w szlaku przekazywaniu sygnału za pośrednictwem TGF-β. Przykładowo mutacje receptora TβRII często występują w nowotworach okrężnicy, żołądka i glejakach. Z kolei mutacje TβRI spotykane były w przypadkach nowotworów jajnika, piersi czy trzustki oraz chłoniaka wywodzącego się z limfocytów T. Także mutacje białek Smad obserwowano w przypadku wielu chorób nowotworowych, a w szczególności w nowotworach przewodu pokarmowego, w tym w młodzieńczej polipowatości rodzinnej oraz w nowotworach płuc [57,61].

Do wzrostu wytwarzania mRNA TGF-β, TGF-β i liczby receptorów TβRI i TβRII dochodzi także w fibroblastach wyizolowanych z takich nowotworów jak włókniakowatość naciekowa (aggressive fibromatosis, desmoid) [49,63]. W nowotworze tym obserwuje się również różnice w ilości deponowanych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, które w przypadku desmoidu są znacznie większe w porównaniu do zdrowej tkanki [49]. Ponadto TGF-β jest jednym z czynników stymulujących angiogenezę i chemotaksję komórek zrębu we włókniakowatości naciekowej [63].

TGF-β stymuluje także transformację fibroblastów w miofibroblasty, których obecność obserwuje się w wielu typach nowotworów, m.in. w nowotworach okrężnicy, sutka, wątroby, płuc, prostaty oraz trzustki [40]. Uważa się, że pojawienie się miofibroblastów poprzedza stadium inwazyjne nowotworów [15]. Poza tym TGF-β jest stymulatorem przemiany komórek epitelialnych w mesenchymalne (epithelial to mesenchymal transition – EMT) [86,99]. Przemiana ta wiąże się z utratą typowego dla nabłonka obłego kształtu komórek i przyjęciu kształtu wrzecionowatego, charakterystycznego dla miofibroblastów. Ponadto w komórkach tak stransformowanych pojawia się ekspresja wimentyny, która jest markerem komórek mezenchymalnych oraz fibronektyna i kolagen typu I. Zjawisko EMT odgrywa istotną rolę w patogenezie śródmiąższowego włóknienia nerek [99]. TGF-β oddziałując na fibroblasty, reguluje wzrost i potencjał proliferacyjny sąsiadujących z nimi komórek epitelialnych [3].

Wzrost ekspresji TGF-β zaobserwowano także w więzadkach macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix – ECM) otaczających komórki wyizolowane z limfangiolejomiozatozy (lymphangioliomyomatosis – LAM), która to choroba charakteryzuje się nietypową proliferacją komórek mięśni gładkich płuc [18]. Wzrostowi poziomu TGF-β towarzyszył także wzrost ilości fibronektyny deponowanej w ECM. W oparciu o udowodniony wpływ TGF-β i fibronektyny na komórki mezenchymalne, autorzy sugerują, że wzrost poziomu TGF-β może promować progresję limfangiolejomiozatozy [18].

- [3] Bhowmick N.A., Chytil A., Plith D., Gorska A.E., Dumont N., Shappell S., Washington M.K., Neilson E.G., Moses H.L.: TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*, 2004; 303: 848–851

- [4] Blobel G.C., Schiemann W.P., Lodish H.F.: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 342: 1350-1358
- [5] Brehm A., Miska E.A., McCance D.J., Reid J.L., Bannister A.J., Kouzarides T.: Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, 1998; 391: 597-601
- [6] Chen C.R., Kang Y., Massague J.: Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of transforming growth factor β growth arrest program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 992-999
- [7] Chen C.R., Kang Y., Siegel P.M., Massague J.: E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF β receptor to c-myc repression. *Cell*, 2002; 110: 19-32
- [8] Ciszak L., Wołowicz D., Kosmaczewska A., Boćko D., Frydecka I.: Białko p27: budowa, funkcje biologiczne oraz udział w patomorfogenezie procesów rozrostowych. *Post. Biol. Kom.*, 2000; 27: 481-503
- [9] Claassen G.F., Hann S.R.: A role for transcriptional repression of p21^{CP1} by c-Myc in overcoming transforming growth factor β -induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 9498-9503
- [10] Coffey R.J. Jr., Bascom C.C., Sipes N.J., Graves-Deal R., Weissman B.E., Moses H.L.: Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor β . *Mol. Cell. Biol.*, 1988; 8: 3088-3093
- [11] Cordenonsi M., Dupont S., Maretto S., Insinga A., Imbriano C., Piccolo S.: Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF- β gene responses by cooperating with Smads. *Cell*, 2003; 113: 301-314
- [12] Cordon-Cardo C.: Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am. J. Pathol.*, 1995; 147: 545-560
- [13] Cui W., Fowles D.J., Bryson S., Duffie E., Ireland H., Balmain A., Akhurst R.J.: TGF β 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*, 1996; 86: 531-542
- [14] Derynck R., Jarrett J.A., Chen E.Y., Eaton D.H., Bell J.R., Assoian R.K., Roberts A.B., Sporn M.B., Goeddel D.V.: Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, 1985; 316: 701-705
- [15] de Wever O., Mareel M.: Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.*, 2003; 200: 429-447
- [16] Downing J.R.: TGF- β signaling, tumor suppression, and acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351: 528-530
- [17] Ewan K.B., Henshall-Powell R.L., Ravani S.A., Pajares M.J., Arteaga C., Warters R., Akhurst R.J., Barcellos-Hoff M.H.: Transforming growth factor- β 1 mediates cellular response to DNA damage in situ. *Cancer Res.*, 2002; 62: 5627-5631
- [18] Evans S.E., Colby T.V., Ryu J.H., Limper A.H.: Transforming growth factor- β 1 and extracellular matrix-associated fibronectin expression in pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Chest*, 2004; 125: 1063-1070
- [19] Ewen M.E.: p53-dependent repression of cdk4 synthesis in transforming growth factor- β -induced G1 cell cycle arrest. *J. Lab. Clin. Med.*, 1996; 128: 355-360
- [20] Flores E.R., Tsai K.Y., Crowley D., Sengupta S., Yang A., McKeon F., Jacks T.: p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, 2002; 416: 560-564
- [21] Geng Y., Weinberg R.A.: Transforming growth factor β effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 10315-10319
- [22] Gentry L.E., Lioubin M.N., Purchio A.F., Marquardt H.: Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor beta to the mature polypeptide. *Mol. Cell. Biol.*, 1988; 8: 4162-4168
- [23] Gentry L.E., Webb N.R., Lim G.J., Brunner A.M., Ranchalis J.E., Twardzik D.R., Lioubin M.N., Marquardt H., Purchio A.F.: Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1987; 7: 3418-3427
- [24] Gillett C.E., Barnes D.M.: Cell cycle. *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 1998; 51: 310-316
- [25] Grande P.G.: Role of transforming growth factor- β in tissue injury and repair. *PSEBM*, 1997; 214: 27-40
- [26] Grzelakowska-Sztabert B.: Punkty kontrolne cyklu komórkowego: czy znamy ich molekularne podłoże? *Post. Biol. Kom.*, 2002; 29: 157-175
- [27] Guadagno T.M., Newport J.W.: Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell*, 1996; 84: 73-82
- [28] Hannon G.J., Beach D.: p15^{INK4B} is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 1994; 371: 257-261
- [29] Hanyu A., Ishidou Y., Ebisawa T., Shimanuki T., Imamura T., Miyazono K.: The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor- β signaling. *J. Cell Biol.*, 2001; 155: 1017-1027
- [30] Harbour J.W., Luo R.X., Dei Santi A., Postigo A.A., Dean D.C.: Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, 1999; 98: 859-869
- [31] Harpel J.G., Metz C.N., Kojima S., Rifkin D.B.: Control of transforming growth factor-beta activity: latency vs. activation. *Prog. Growth Factor Res.*, 1992; 4: 321-335
- [32] Hinchcliffe E.H., Li C., Thompson E.A., Maller J.L., Sluder G.: Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science*, 1999; 283: 851-854
- [33] Hiramata T., Koeffler H.P.: Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood*, 1995; 86: 841-854
- [34] Hu X., Zuckerman K.S.: Cell cycle and transcriptional control of human myeloid leukemic cells by transforming growth factor beta. *Leuk. Lymphoma*, 2000; 38: 235-246
- [35] Iavarone A., Massague J.: Repression of the CDK activator Cdc25A and the cell-cycle arrest by cytokine TGF- β in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature*, 1997; 387: 417-422
- [36] Iavarone A., Massague J.: E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 916-922
- [37] Innocente S.A., Abrahamson J.L.A., Cogswell J.P., Lee J.M.: p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 2147-2152
- [38] Jakóbsiak M., Gołąb J., Zagożdżon R.: Cytokiny. W: *Immunologia*, red. Jakóbsiak M., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, 263-286
- [39] Jansen-Durr P., Meichle A., Steiner P., Pagano M., Finke K., Botz J., Wessbecher J., Draetta G., Eilers M.: Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 3685-3689
- [40] Jarmuz T., Roser S., Rivera H., Gal A., Roman J.: Transforming growth factor- β 1, myofibroblasts, and tissue remodeling in the pathogenesis of tracheal injury: potential role of gastroesophageal reflux. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 2004; 113: 488-497
- [41] Jaruga E.: Udział telomerów w regulacji podziałów komórkowych i starzeniu. *Kosmos*, 1999; 243: 255-264
- [42] Kanzaki T., Olofsson A., Moren A., Wernstedt C., Hellman U., Miyazono K., Claesson-Welsh L., Heldin C.H.: TGF-beta 1 binding protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell*, 1990; 61: 1051-1061
- [43] Kavsak P., Rasmussen R.K., Causing C.G., Bonni S., Zhu H., Thomsen G.H., Wrana J.L.: Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol. Cell*, 2000; 6: 1365-1375
- [44] Klein A.: Peptydowe czynniki wzrostowe. Rodzina hormonów plejotropowych. IV. Transformujące czynniki wzrostowe typu β (TGF β). *Post. Biol. Kom.*, 1993; 20 (Suplement 1): 54-62
- [45] Lamb J., Ramaswamy S., Ford H.L., Contreras B., Martinez R.V., Kittrell F.S., Zahnow C.A., Patterson N., Golub T.R., Ewen M.E.: A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer. *Cell*, 2003; 114: 323-334
- [46] Leone G., DeGregori J., Jakoi L., Cook J.G., Nevins J.R.: Collaborative role of E2F transcriptional activity and G1 cyclin-dependent kinase activity in the induction of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 6626-6631
- [47] Li J.M., Nichols M.A., Chandrasekharan S., Xiong Y., Wang X.F.: Transforming growth factor β activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15^{INK4B} through an Sp1 consensus site. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 26750-26753
- [48] Ling M.T., Wang X., Tsao S.W., Wong Y.C.: Down-regulation of Id-1 expression is associated with TGF β 1-induced growth arrest in prostate epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1570: 145-152
- [49] Locci P., Bellocchio S., Lilli C., Marinucci L., Cagini L., Baroni T., Giustozzi G., Balducci C., Becchetti E.: Synthesis and secretion of transforming growth factor- β 1 by human desmoid fibroblast cell line and its modulation by toremifene. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2001; 21: 961-970
- [50] Lundberg A.S., Weinberg R.A.: Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 753-761



- [51] Lundberg A.S., Weinberg R.A.: Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer*, 1999; 35: 531–539
- [52] Lyons R.M., Keski-Oja J., Moses H.L.: Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.*, 1988; 106: 1659–1665
- [53] Marquardt H., Lioubin M.N., Ikeda T.: Complete amino acid sequence of human transforming growth factor type beta 2. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 12127–12131
- [54] Massague J.: The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1990; 6: 597–641
- [55] Massague J.: TGF-β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 753–791
- [56] Massague J.: How cells read TGF β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000; 14: 169–178
- [57] Massague J., Blain S.W., Lo R.S.: TGFβ signaling in growth control, cancer and heritable disorders. *Cell*, 2000; 103: 295–309
- [58] Massague J., Chen Y.G.: Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.*, 2000; 14: 627–644
- [59] Massague J., Wotton D.: Transcriptional control by the TGF-β/Smad signaling system. *EMBO J.*, 2000; 19: 1745–1754
- [60] Matsushima H., Quelle D.E., Shurtleff S.A., Shibuya M., Sherr C.J., Kato J.Y.: D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1994; 14: 2066–2076
- [61] Mehra A., Wrana J.L.: TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem. Cell Biol.*, 2002; 80: 605–622
- [62] Meyerson M., Harlow E.: Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell. Biol.*, 1994; 14: 2077–2086
- [63] Mills B.G., Frausto A., Brien E.: Cytokines associated with the pathophysiology of aggressive fibromatosis. *J. Orthop. Res.*, 2000; 18: 655–662
- [64] Morgan D.O.: Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995; 374: 131–134
- [65] Moses H.L., Yang E.Y., Pietenpol J.A.: TGF-β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 1990; 63: 245–247
- [66] Muller R., Mumberg D., Lucibello F.C.: Signals and genes in the control of cell – cycle progression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993; 1155: 151–179
- [67] Murray A.W.: Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 2004; 116: 221–234
- [68] Nilsson I., Hoffmann I.: Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog. Cell Cycle Res.*, 2000; 4: 107–114
- [69] Nobori T., Miura K., Wu D.J., Lois A., Takabayashi K., Carson D.A.: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994; 368: 753–756
- [70] Ohashi N., Yamamoto T., Uchida C., Togawa A., Fukasawa H., Fujigaki Y., Suzuki S., Kitagawa K., Hattori T., Oda T., Hayashi H., Hishida A., Kitagawa M.: Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF-beta. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 2557–2563
- [71] Olson E.N., Sternberg E., Hu J.S., Spizz G., Wilcox C.: Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *J. Cell Biol.*, 1986; 103: 1799–1805
- [72] Pagano M., Pepperkok R., Lukas J., Baldin V., Ansorge W., Bartek J., Draetta G.: Regulation of the cell cycle by the CDK2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 1993; 121: 101–111
- [73] Philipp A., Schneider A., Vasrik I., Finke K., Xiong Y., Beach D., Alitalo K., Eilers M.: Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol. Cell. Biol.*, 1994; 14: 4032–4043
- [74] Pietenpol J.A., Holt J.T., Stein R.W., Moses H.L.: Transforming growth factor β 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 3758–3762
- [75] Prives C., Hall P.A.: The p53 pathway. *J. Pathol.*, 1999; 187: 112–126
- [76] Randall R.A., Germain S., Inman G.J., Bates P.A., Hill C.S.: Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined praline-rich motif. *EMBO J.*, 2002; 21: 145–156
- [77] Ren S., Rollins B.J.: Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 2004; 117: 239–251
- [78] Reynisdottir I., Massague J.: The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.*, 1997; 11: 492–503
- [79] Roberts J.M.: Evolving ideas about cyclins. *Cell*, 1999; 98: 129–132
- [80] Seane J., Le H.V., Massague J.: Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, 2002; 419: 729–734
- [81] Sherr C.J.: The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.*, 2000; 60: 3689–3695
- [82] Sherr C.J.: Principles of tumor suppression. *Cell*, 2004 116: 235–246
- [83] Shi Y.: Structural insights on Smad function in TGFβ signaling. *Bioessays*, 2001; 23: 223–232
- [84] Shi Y., Massague J.: Mechanism of TGF-β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003; 113: 685–700
- [85] Shibuya H., Yoneyama M., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K., Taniguchi T.: IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc. *Cell*, 1992; 70: 57–67
- [86] Siegel P.M., Massague J.: Cytostatic and apoptotic actions of TGF-β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 807–821
- [87] Sikora E.: Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki. *Post. Biochem.*, 1996; 42: 108–113
- [88] Tezelman S.T., Siperstein A.E.: Signal transduction in thyroid neoplasms. W: *Textbook of Endocrine Surgery*. Red.: Orlo H. Clark, Quan-Yang Duh. W.B. Saunders Company, Philadelphia: 1997; 214–227
- [89] Verrecchia F., Mauviel A.: Transforming growth factor-β signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.*, 2002; 118: 211–215
- [90] Watanabe M., Masuyama N., Fukuda M., Nishida E.: Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep.*, 2000; 1: 176–182
- [91] Weintraub S.J., Chow K.N., Lou R.X., Zhang S.H., He S., Dean D.C.: Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature*, 1995; 375: 812–815
- [92] Weintraub S.J., Prater C.A., Dean D.C.: Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature*, 1992; 358: 259–261
- [93] Widlak P.: Wpływ uszkodzeń DNA na regulację cyklu komórkowego. *Post. Biochem.*, 1997; 43: 85–90
- [94] Wu J.W., Krawitz A.R., Chai J., Li W., Zhang F., Luo K., Shi Y.: Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell*, 2002; 111: 357–367
- [95] Xiao Z., Liu X., Henis Y.I., Lodish H.F.: A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 7853–7858
- [96] Xu L., Kang Y., Col S., Massague J.: Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell*, 2002; 10: 271–282
- [97] Xue W.C., Khoo U.S., Ngan H.Y., Chan K.Y., Chiu P.M., Tsao S.W., Cheung A.N.: Minichromosome maintenance protein 7 expression in gestational trophoblastic disease: correlation with Ki67, PCNA and clinicopathological parameters. *Histopathology*, 2003; 43: 485–490
- [98] Yagi K., Furuhashi M., Aoki H., Goto D., Kuwano H., Sugamura K., Miyazono K., Kato M.: c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 854–861
- [99] Yang J., Liu Y.: Dissection of key events in tubular Epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 2001; 159: 1465–1475
- [100] Yoon G., Kim H.J., Yoon Y.S., Cho H., Lim I. K., Lee J.H.: Iron chelation-induced senescence-like growth arrest in hepatocyte cell lines: association of transforming growth factor β1 (TGF-β1)-mediated p27^{Kip1} expression. *Biochem. J.*, 2002; 366: 613–621
- [101] Zhang H.S., Postigo A.A., Dean D.C.: Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFβ, and contact inhibition. *Cell*, 1999; 97: 53–61