

# EGF-PODOBNE CZYNNIKI WZROSTOWE I ICH UDZIAŁ W PROCESACH REGENERACJI NASKÓRKA

## EGF-LIKE GROWTH FACTORS AND THEIR CONTRIBUTION IN EPIDERMIS REGENERATION

Andrzej KLEIN\*, Anna SIŃCZAK, Aleksandra JUREK

\*Zakład Biochemii Ogólnej, Instytut Biologii Molekularnej UJ, Kraków

*Streszczenie:* Jednym z ważniejszych obszarów działania czynników wzrostowych zaliczanych do rodziny EGF jest regulacja wzrostu i różnicowania komórek naskórka i nabłonka. Wzajemne oddziaływanie EGF-podobnych polipeptydów oraz ich receptorów (ErbB) są przedmiotem ogromnej liczby prac, opublikowanych w ostatnim dziesięcioleciu. Jednak nawet najnowsze doniesienia nie rozstrzygają ostatecznie, które czynniki EGF-podobne są istotne fizjologicznie oraz jaki jest mechanizm regulacji wzrostu, różnicowania i programowanej śmierci keratynocytów. Przedmiotem artykułu są wybrane zagadnienia dotyczące struktury ssaczych EGF-podobnych czynników wzrostowych, receptorów ErbB oraz ich współdziałania w stymulacji prawidłowego i patologicznego wzrostu komórek naskórka. (*Postępy Biologii Komórki 2001; supl. 16: 111–133*)

*Słowa kluczowe:* epidermalne czynniki wzrostowe, regeneracja naskórka

*Summary:* One of important activity areas of EGF growth factors activity is epidermal and epithelial cells differentiation and growth regulation. In recent ten years, there is a great deal of publications related to EGF-like polypeptides and their participation in specific receptors (ErbB) activation. Little, however, is known about physiological regulation of keratinocytes growth, differentiation and apoptosis by EGF-like peptides. Basic informations concerning structure and function of mammalian EGF-like growth factors, ErbB receptors and their cooperation in normal and pathological growth of epidermal cells are described. (*Advances in Cell Biology 2001; suppl. 16: 111–133*)

*Key words:* epidermal growth factors, epidermis regeneration

*Stosowane skróty:* **AR** – amfiregulina, **BTC** – beta cellulina, **cdk** – kinaza cyklino-zależna, **Cip** – białko oddziałujące z cdk, **EGF** – naskórkowy czynnik wzrostowy, **ER** – epiregulina, **ErbB** – komórkowy homolog białka transformującego ptasiej erytroblastoma, **ERK** – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo, **FGF** – fibroblastyczny czynnik wzrostowy, **GDS** – stymulator dysocjacji (nukleotydów) guaninowych, **Grb** – białko wiążące receptor (czynnika) wzrostu, **GRF** – czynnik wymiany (nukleotydów) guaninowych, **HB-EGF** – naskórkowy czynnik wzrostowy wiążący się z heparyną, **HGF** – czynnik

wzrostowy hepatocytów, **HGR/NGR** – heregulina/neuregulina, **IGF** – insulino-podobny czynnik wzrostowy, **INK** – inhibitor kinazy (cyklino-zależnej), **KGF** – czynnik wzrostowy keratynocytów, **Kip** – białko hamujące kinazę (cyklino-zależną), **MAP** – białko aktywowane mitogenem, **MAPK** – kinaza MAP, **MEK** – kinaza MAPK/ERK, **MHC** – główny układ zgodności tkankowej, **MMP** – metaloproteazy matryksu, **mSOS** (ang. *son of sevenless*) – myszy homolog drożdżowego czynnika wymiany nukleotydów, **PDGF** – płytkowy czynnik wzrostowy, **PI3K** – 3-kinaza fosfatidyloinozytolu, **PKB** – kinaza białkowa B, **pRb** – białko retinoblastomy, **PTB** – domena wiążąca fosfotyrozynę, **Ras** – małe białko wiążące nukleotydy guanylowe, kodowane przez gen *n-ras*, **SH2** – domena homologiczna do domeny 2 białka kodowanego przez gen *src*, **Shc** – (białko) zawierające domenę SH2, **STAM** – cząsteczka adaptorowa przenosząca sygnał, **TGF** – transformujący czynnik wzrostowy, **uPA** – urokinazowy aktywator plazminogenu, **VEGF** – czynnik wzrostowy komórek endotelialnych.

## WSTĘP

Naskórek jest wielowarstwowym płaskim rogowaciejącym nabłonkiem, w skład którego wchodzi komórki nabłonkowe pochodzenia ektodermalnego (keratynocyty) oraz w znacznie mniejszej liczbie melanocyty, komórki Langerhansa i neuroendokryne komórki Merkla. Grubość naskórka waha się w granicach od ok. 0,1 mm (powierzchnia tułowia) do ok. 1 mm (dłonie, podeszwy) [21, 57].

W naskórku można wyróżnić kolejne, licząc od błony podstawnej warstwy: podstawną, kolczystą, ziarnistą, świetlaną i warstwę zrogowaciałą. Warstwa podstawna (rozrodcza) zbudowana jest z jednego pokładu komórek kubicznych lub walcowatych. W tej warstwie znajdują się komórki, które w wyniku podziałów dają kolejne komórki rozrodcze oraz komórki różnicujące się. Tempo namnażania komórek zależy od grubości naskórka i wyraźnie wzrasta po zniszczeniu warstw powierzchniowych. Warstwa kolczysta składa się z kilku do kilkunastu pokładów wielobocznych komórek, połączonych ze sobą wieloma desmosomami. W warstwach kolczystej i podstawnej obecne są liczne tonofilamenty zbudowane z białek należących do grupy cytokeratyn. Warstwa ziarnista tworzona jest przez 3–5 pokładów komórek spłaszczonej, w przekroju wrzecionowatej, zawierających liczne ziarnistości (ziarna F, ziarna L i keratynosomy), ważne przy wytwarzaniu w naskórku bariery nieprzepuszczalnej dla wody. Warstwę świetlaną tworzy pasmo złożone z 2–3 pokładów spłaszczonych komórek, ułożonych mniej więcej równolegle do powierzchni naskórka. W komórkach tych obserwuje się zanik wielu organelli cytoplazmatycznych, a nawet jąder komórkowych. Warstwa zrogowaciała zawiera płytki rogowe, bezjądrzaste i martwe. Jej dolna część zawiera komórki utrzymujące się jeszcze w obrębie naskórka, a górna część to komórki podlegające złuszczeniu [21].

Melanocyty zlokalizowane są w obrębie warstwy podstawnej naskórka, zawierają melanicę, barwnik istotny dla ochrony organizmu przed promieniowaniem UV. Komórki Langerhansa wykazują na swojej powierzchni obecność antygenów MHC klasy II i receptorów dla fragmentu Fc przeciwciał oraz składnika C3 dopełniacza, co umożliwia im wychwytywanie antygenów skórnych, przetrzymywanie, a następnie

prezentację ich limfocytom. Natomiast komórki Merkla są prawdopodobnie swoistymi receptorami czuciowymi [21].

## KERATYNOCYTY

Keratynocyty są dominującym typem komórek występujących w naskórku. Funkcje biologiczne keratynocytów są wielostronne. Komórki te są m.in. odpowiedzialne za tworzenie bariery mechanicznej, immunologicznej obrony przeciw patogenom i innym czynnikom zewnętrznym oraz za zapobieganie utracie wody z organizmu. Keratynocyty są komórkami nabłonkowymi podlegającymi procesowi rogowacenia (keratynizacji), w wyniku którego żywe początkowo komórki ulegają przekształceniu w martwe rogowe płytki ulegające złuszczeniu. Ubytek komórek na powierzchni uzupełniany jest w wyniku podziałów komórek macierzystych, które są zlokalizowane w najgłębszej warstwie naskórka, a komórki z warstw najwyższych degenerują i obumierają. Cały cykl przemian od komórki dzielącej się do obumarłej jest różnej długości w zależności od grubości warstwy naskórkowej i trwa od 2 do 4 tygodni [21]. Poznanie mechanizmu regulacji proliferacji keratynocytów jest niezwykle ważne nie tylko z fizjologicznego punktu widzenia, ale także dlatego, że zaburzenia wzrostu keratynocytów są odpowiedzialne za patogenezę wielu powszechnych chorób skórnych, takich jak: łuszczyca, chroniczne zaburzenia w gojeniu ran skórnych i nowotwory skóry [91].

Cykl komórkowy keratynocytów jest zdeterminowany głównie trzema czynnikami: stopniem zróżnicowania komórek, adhezją do macierzy pozakomórkowej oraz równowagą w działaniu czynników wzrostowych i ich inhibitorów. Ostatecznie zróżnicowane keratynocyty, usytuowane w warstwie ponadpodstawnej nie proliferują, w przeciwieństwie do keratynocytów warstwy podstawnej, które można podzielić na dwie subpopulacje: komórki macierzyste i komórki przejściowo zaktywowane (*amplifying*). Komórki macierzyste posiadają duży potencjał rozrodczy (proliferacyjny), ale dzielą się rzadko, dlatego w prawidłowym naskórku szybkość proliferacji jest prawdopodobnie zdeterminowana przez populację keratynocytów przejściowo zaktywowanych. Keratynocyty te są bardziej dojrzałe niż komórki macierzyste i po przejściu kilku rund mitoz tworzą ostatecznie zróżnicowane komórki naskórka. Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za regulację wzrostu komórkowego są złożone i nie w pełni poznane. Nie ulega wątpliwości, że jednym z ważniejszych elementów tej regulacji są oddziaływania komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa [2, 25]. Oddziaływania międzykomórkowe są utrzymywane głównie za pośrednictwem odpowiednich połączeń i desmosomów. W ich skład wchodzi wiele białek m.in. kadheryny, desmogleiny, desmokoliny [25, 35, 40]. W oddziaływaniach komórek z macierzą zewnątrzkomórkową główną rolę odgrywają integryny [36, 37]. Tylko względnie mało zróżnicowane keratynocyty (komórki macierzyste i przejściowo zaktywowane) silnie przylegające do podłoża,

odpowiadają na swoiste czynniki wzrostowe. Doświadczenia prowadzone na hodowlach keratynocytów i na zwierzętach wykazały, że w regulację wzrostu i różnicowania keratynocytów *in vivo* zaangażowanych może być potencjalnie wiele różnych substancji, takich jak: czynniki wzrostowe, interleukiny, neurotransmitery, ceramidy, steroidy, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach i ich pochodne. Większość autorów jest jednak zgodna co do tego, że kluczową rolę w rozwoju tych komórek odgrywają EGF-podobne czynniki wzrostowe.

## RODZINA EPIDERMALNEGO CZYNNIKA WZROSTOWEGO

EGF-podobne czynniki wzrostowe (EGFs) są rodziną polipeptydów, którym przypisuje się istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych (embriogeneza, regulacja aktywności wydzielniczej, naprawa i regeneracja tkanek), jak i patologicznych (choroby nowotworowe, łuszczyca). Od czasu odkrycia protoplasty tej rodziny – epidermalnego czynnika wzrostowego przez S. Cohena w roku 1962 [22] scharakteryzowano kilka innych peptydów o strukturze III-rzędowej podobnej do EGF, działających przez homologiczne receptory o aktywności kinazy tyrozynowej. Do rodziny epidermalnego czynnika wzrostowego (tab. 1) zalicza się: transformujący czynnik wzrostowy typu  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), wiążący heparynę epidermalny czynnik wzrostowy (HB-EGF), amfiregulinę (AR), epiregulinę (ER), betacelulinę (BTC), he-regulinę (HRG) oraz czynniki wzrostowe wirusów: Vaccinia, Myxoma i Pox [89]. Wszystkie wymienione peptydy zawierają w swojej cząsteczce „jednostkę EGF” (rys. 1), sekwencję 35–50 reszt aminokwasowych, spiętą trzema mostkami disiarczkowymi, nadającymi im charakterystyczną strukturę przestrzenną trzech pętli aminokwasowych, odpowiedzialną za wiązanie z receptorem. W niniejszym opracowaniu pominięto dwa peptydy o ograniczonej homologii z EGF, określane

TABELA 1. Wybrane właściwości EGF-podobnych czynników wzrostowych ssaków

Czynnik wzrostowy	Masa cząsteczkowa [kDa]	Liczba aminokwasów	Glikozylacja	Komórki źródłowe*	Magazyn
EGF	6	53			Płytki krwi
TGF $\alpha$	5,5	50		K, M $\phi$	Płytki krwi
ER	5	47		M $\phi$	
AR	9,5	84		K, M $\phi$	Macierz z.k.
HB-EGF	19–23**	86	O-glikozylowany	K	Macierz z.k.
BTC	32**	80	O- i N-glikozyl.		Macierz z.k.
HRG $\alpha$	44**	240	O- i N-glikozyl	F	Macierz z.k.

\* – dotyczy wyłącznie komórek skóry; \*\* – oznaczana metodą SDS-PAGE

EGF	1	NSYPG	C	P	S	S	Y	D	G	Y	C	L	N	G	G	V	C	M	H	I	E	S			
ER	1	VQITK	C	S	S	D	M	D	G	Y	C	L	H	G	Q	-	C	I	Y	L	V	D			
TGF $\alpha$	3	...SHFNK	C	P	D	S	H	T	Q	Y	C	F	H	G	T	-	C	R	F	L	V	Q			
HB-EGF	30	...KKRDP	C	L	R	K	Y	K	D	Y	C	I	H	G	E	-	C	R	Y	L	Q	E			
BTC	33	...THFSR	C	P	K	Q	Y	K	H	Y	C	I	H	G	R	-	C	R	F	V	V	D			
AR	41	...KKKNP	C	N	A	E	F	Q	N	F	C	I	H	G	E	-	C	K	Y	I	E	H			
HRE $\alpha$	177	...PAIRL	C	G	P	E	G	D	G	Y	C	L	H	-	G	D	C	I	H	A	R	D			
EGF		LDSYT	C	N	C	V	I	G	Y	S	G	D	R	C	Q	T	R	D	L	R	W	W	E	L	R
ER		MREKF	C	R	C	E	V	G	Y	T	G	L	R	C	E	H	F	F	L	...					
TGF $\alpha$		E EKPA	C	V	C	H	S	G	Y	V	G	V	R	C	E	H	A	D	L	...					
HB-EGF		F R T P S	C	K	C	L	P	G	Y	H	G	H	R	C	H	G	L	T	L	...					
BTC		E Q T P S	C	I	C	E	K	G	Y	F	G	A	R	C	E	R	V	D	L	...					
AR		L E A V T	C	K	C	Q	Q	E	Y	F	G	E	R	C	G	E	K	S	M	...					
HRE $\alpha$		L SNPSRYL	C	K	C	Q	P	G	F	T	G	A	R	C	T	E	N	V	P	...					

RYSUNEK 1. Porównanie struktury I-rzędowej domeny EGF-podobnej peptydów ssaczyc zaliczanych do rodziny epidermalnego czynnika wzrostowego (wg [102] zmodyfikowane)

jako Cripto-1 [20] i Cryptic [86], ponieważ nie ma dowodów, że działają one przez receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych.

Wszystkie wymienione w tabeli 1 czynniki EGF-podobne syntetyzowane są w formie znacznie większego białka prekursorowego i wbudowywane w błonę cytoplazmatyczną. Prekursorowa, transbłonowa postać tych czynników może oddziaływać na komórki sąsiednie w sposób justakryny, ale podstawowe znacznie biologiczne mają rozpuszczalne formy EGF-podobnych czynników wzrostowych, wycinane enzymatycznie z zewnątrzkomórkowej części prekursora [16, 49]. Niektóre z omawianych czynników są zdolne do wiązania się z heparyną i siarczanem heparanu (HB-EGF, AR, HR, BTC) i dlatego zaliczane są do grupy czynników wzrostowych wiążących się z heparyną (HB-GF). Konsekwencje wiązania tych czynników z proteoglikanami macierzy zewnątrzkomórkowej lub błony komórkowej zawierającymi siarczan heparanu mogą być różnorodne. Wiązanie takie przede wszystkim: a) pozwala na magazynowanie znacznych ilości czynników wzrostowych i uwalnianie ich w formie aktywnej, z pominięciem etapu syntezy nowych białek, b) reguluje lokalne stężenie czynników wzrostowych i ułatwia ich wiązanie do swoistych receptorów błonowych.

Dojrzały epidermalny czynnik wzrostowy jest nieglikozylowanym polipeptydem o m. cz. 6 kDa, występującym powszechnie w wielu zwierzęcych i ludzkich tkankach i płynach ustrojowych [10]. Obecność tego peptydu stwierdzono w płucach, żołądku, nerkach, dwunastnicy, trzustce, skórze, tarczycy, jajnikach, macicy, łożysku, gruczołach ślinowych i przysadce mózgowej [7, 8, 10]. EGF wchodzi w skład wielu płynów ustrojowych, takich jak: krew, moc, płyn rdzeniowo-mózgowy, płyn na-

sienny, mleko, ślina, łzy i sok żołądkowy [7, 8, 10]. EGF stymuluje proliferację i różnicowanie wielu różnych komórek, głównie pochodzenia epidermalnego i epithelialnego [10, 49]. Peptyd ten jest także chemoatraktantem dla komórek epithelialnych i fibroblastów [10, 49]. Magazynem EGF w krwi ssaków są  $\alpha$ -granule płytek krwi, skąd wydzielany jest łącznie z innymi czynnikami wzrostowymi (PDGF, HGF, TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ ), zaangażowanymi m.in. w proces gojenia ran.

Transformujący czynnik wzrostowy typu  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) jest małym polipeptydem (50 reszt aa), podobnym strukturalnie i funkcjonalnie do EGF, syntetyzowanym głównie przez komórki embrionalne i nowotworowe [52]. W warunkach fizjologicznych ekspresję genu tego czynnika wykazano w nerkach, wątrobie, skórze, mózgu, łożysku oraz w komórkach stymulowanych makrofagów [52, 62]. TGF $\alpha$  stymuluje proliferację, migrację i różnicowanie komórek epithelialnych i mezenchymalnych [51].

Epiregulina (ER) jest nieglikozylowanym polipeptydem o m.cz. około 5 kDa, o umiarkowanym (24–50%) podobieństwie sekwencji aminokwasowej do innych czynników EGF-podobnych [102]. W warunkach fizjologicznych EP jest syntetyzowana głównie przez monocyty/makrofagi krwi obwodowej oraz przez komórki łożyska, a jej poziom wzrasta gwałtownie w wielu typach nowotworów nabłonkowych [101, 102]. Epiregulina jest mitogenem dla komórek epithelialnych, fibroblastów, hepatocytów i znacznie słabszym dla komórek mięśni gładkich [101, 102].

Amfiregulina jest polipeptydem zbudowanym z 84 reszt aminokwasowych, powstającym z 252 aminokwasowego prekursora transbłonowego drogą proteolizy [99]. AR jest syntetyzowana w wielu tkankach prawidłowych (piersi, okrężnica, nerki, wątroba, płuca, trzustka, jajniki, łożysko, śledziona, jądra, skóra) oraz przez komórki nowotworów piersi, trzustki, nerek, okrężnicy, jajników [48, 67]. AR jest mitogenem dla fibroblastów i keratynocytów [30] i autokrynnym czynnikiem wzrostowym dla keratynocytów, komórek nowotworowych piersi, okrężnicy i pęcherza [13].

Natywny wiążący heparynę epidermalny czynnik wzrostowy (HB-EGF) jest O-glikozylowanym polipeptydem o zbliżonej liczbie (86 reszt aa) i sekwencji aminokwasów do AR oraz umiarkowanym podobieństwie sekwencji aminokwasowej do EGF (w rejonie trzypętlowym wynosi ono 34%) [48]. HB-EGF jest syntetyzowany przez limfocyty T CD4+, keratynocyty i aktywowane makrofagi, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [7, 8, 32]. Peptyd ten jest mitogenem dla fibroblastów, keratynocytów, komórek mięśni gładkich i hepatocytów [8, 102] oraz autokrynnym czynnikiem wzrostowym dla keratynocytów i komórek nabłonka pęcherza (prawidłowych i nowotworowych) [32, 82].

Betacellulina (BTC) jest glikoproteina o m. cz. 32 kDa. Około 40% masy cząsteczkowej tego czynnika stanowią węglowodany. Powstaje z 178-aminokwasowego prekursora transbłonowego, po proteolitycznym odcięciu 80 aminokwasów N-końcowych [84]. Jej obecność wykazano przede wszystkim w trzustce i jelicie cienkim

[90]. BTC jest mitogenem dla naczyniowych komórek epitelialnych i fibroblastów oraz dla nowotworowych komórek beta trzustki [90].

Hereguliny/neureguliny (HRG/NRG) są rodziną polipeptydów powstających w drodze alternatywnego składania produktu transkrypcji jednego genu [17]. Wyróżnia się trzy typy tych czynników wzrostowych, oznaczane jako HRG/NRG (1, 2 i 3), z których dwa pierwsze mogą występować w dwóch formach ( $\alpha$  i  $\beta$ ) różniących się sekwencją aminokwasów w domenie EGF-podobnej [17, 105]. Różnice w wielkości dojrzałych form HRE nie wpływają na specyficzność wiązania z swoistymi receptorami [4].

## RECEPTORY EGF-PODOBNYCH CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH

Scharakteryzowano cztery różne receptory czynników EGF-podobnych, określane najczęściej jako ErbB1-ErbB4 [27]. Receptory te są białkami transbłonowymi o podobnej budowie cząsteczki, kodowanymi przez protoonkogeny z rodziny erbB. Receptor ErbB1 (rys. 2a) jest glikoproteiną zbudowaną z 1186 reszt aminokwasowych o m.c. około 170 kDa, z czego około 40 kDa stanowią N-glikozydowo przyłączone oligosacharydy [10, 49]. N-końcowa część zewnątrzkomórkowa (621 reszt aminokwasowych) zawiera domeny wiążące ligand i sekwencje odpowiedzialne za dimeryzację kompleksów ligand-receptor. Sekwencja aminokwasów 622-644 reprezentuje pojedynczy region transbłonowy (zakotwiczący receptor w błonie komórkowej), a sekwencja 645-1186 część wewnątrzkomórkową, zawierającą domenę kinazy tyrozynowej (reszty 694-937) oraz fragment C-końcowy, tzw. obszar autofosforylacji. Przyłączenie EGF do receptora powoduje dimeryzację kompleksów czynnik wzrostu-receptor, aktywację tyrozyno-swoistej kinazy, fosforylującej różne substraty wewnątrzkomórkowe, w tym także sam receptor (autofosforylacja). Obecność rodziny receptorów ErbB wykazano praktycznie u wszystkich gatunków ssaków i w bardzo wielu rodzajach komórek (oprócz komórek hematopoetycznych). Komórki prawidłowe mają  $10^4$ – $10^5$  receptorów ErbB1, komórki niektórych nowotworów mogą posiadać znacznie większą liczbę tych receptorów, w niektórych przypadkach (np. ustalona linia komórek A431) do  $2 \times 10^6$  [49].

Podstawowe znaczenie dla specyficzności przekazywania sygnału inicjowanego jednym ligandem ma zdolność ErbB do tworzenia homo- i heterodimerów [43]. Poszczególne receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych różnią się zarówno aktywnością kinazową, jak i swoistością wiązania przedstawicieli tej rodziny czynników wzrostowych. Receptor ErbB3 w odróżnieniu od wszystkich pozostałych ma upośledzoną zdolność do fosforylacji. Niektóre receptory EGFs wiążą większość ligandów omawianej grupy polipeptydów, inne tylko wybrane [43]. Szczególnym przypadkiem jest ErbB2 odkryty jako receptor swoisty dla neuregulin/heregulin.

Okazało się jednak, że receptor ten pośredniczy w działaniu EGF-podobnych czynników wzrostowych tylko pośrednio, poprzez heterodimeryzację z innymi białkami ErbB. W roku 1998 Tzahar E, Yarden Y [103] zaproponowali biwalencyjny model interakcji ErbBs-EGFs. Zgodnie z tą hipotezą każdy z EGF-podobnych czynników wzrostowych ma dwa miejsca wiążące receptor. Jedno miejsce wiązałoby receptor o niskim powinowactwie (np. ErbB2), a drugie receptor o wysokim powinowactwie (Erb1, ErbB3 lub ErbB4). Trudno powiedzieć dziś, czy hipoteza ta jest prawdziwa. Faktem jest, że homodimery ErbB2-ErbB2 i ErbB3-ErbB3 nie uczestniczą w przekazywaniu sygnału indukowanego EGFs, natomiast heterodimery zawierające ErbB2 i/lub ErbB3 pośredniczą w działaniu większości EGFs [103]. Swoistość wiązania EGF-podobnych czynników wzrostowych oraz przykłady homo- i heterodimeryzacji receptorów należących do rodziny ErbB przedstawia rysunek 2b. Istotnym problemem w wyjaśnieniu mechanizmu sygnalizacji transbłonowej jest swoistość odpowiedzi komórkowej na działanie różnych ligandów EGF-podobnych. Wiadomo, że różne czynniki wzrostowe działające przez ten sam receptor mogą inicjować odmiennie drogi przekazu sygnału. Z drugiej strony ten sam ligand może stymulować odmienną odpowiedź biologiczną zależnie od typu receptora, przez który działa [22, 43].

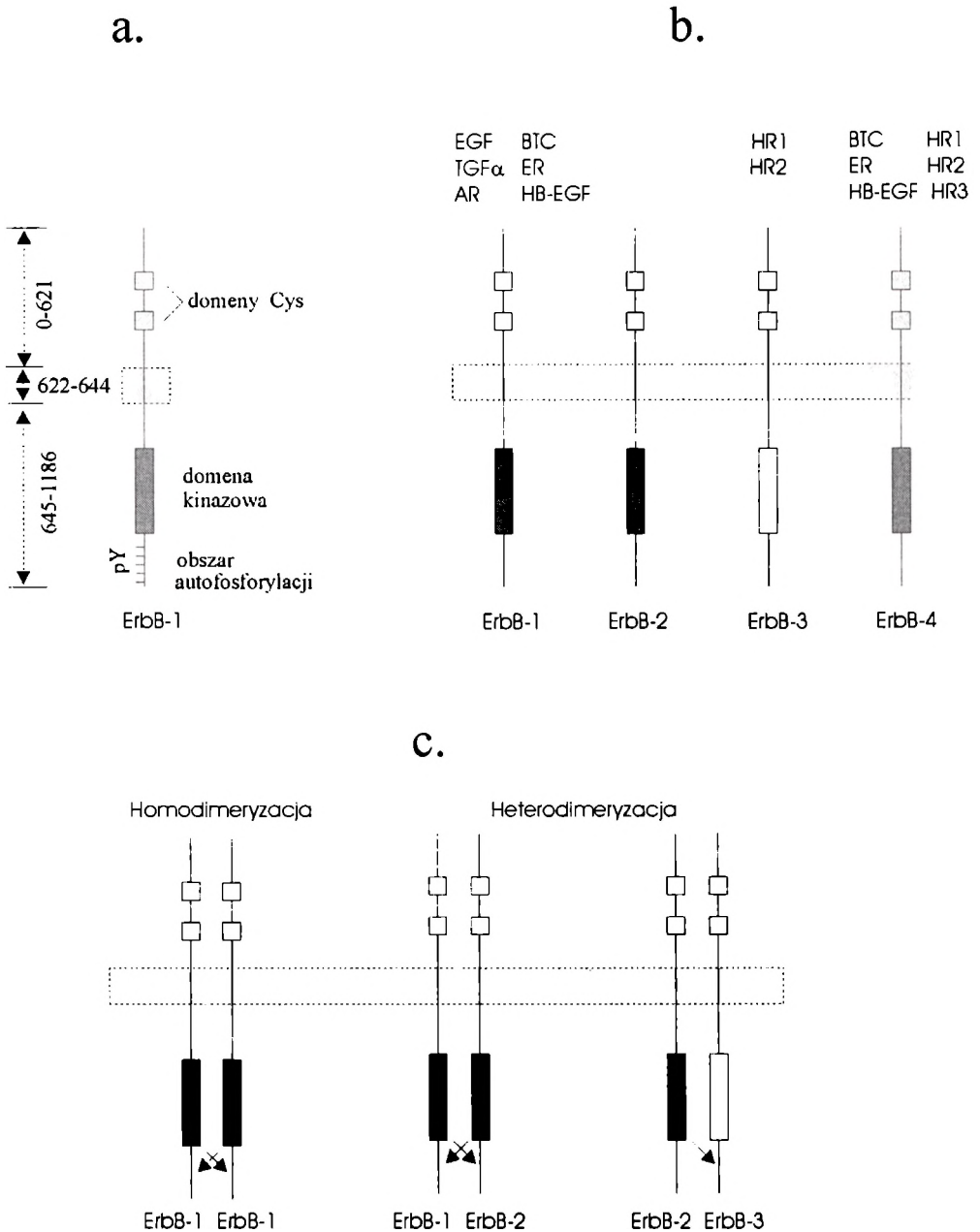
W trakcie ostatnich kilku lat pojawiły się dobrze udokumentowane informacje o istotnej roli heterodimeryzacji receptorów ErbB w różnicowaniu odpowiedzi biologicznej komórek na działanie czynników EGF-podobnych. Szczególną rolę w tym procesie przypisuje się receptorowi sierocemu ErbB-2 (rys. 2c), ponieważ receptor ten jest preferowanym partnerem w heterodimeryzacji innych receptorów tej rodziny [27]. Niezależnie od składu utworzonego heterodimeru każdy z tych kompleksów ma różny zestaw miejsc ulegających autofosforylacji, co pozwala na przyłączanie do nich odmiennych białek mających domeny SH2 i/lub PTB. Wielość ligandów EGF-podobnych i tworzenie heterodimerów pomiędzy różnymi receptorami ErbB wyjaśniają przynajmniej w części obserwowane różnice w odpowiedzi komórkowej indukowanej przez omawiane czynniki wzrostowe.

Istotnym uzupełnieniem wiadomości o mechanizmie przekazu sygnału inicjowanego przez receptory o aktywności kinazy tyrozynowej są doniesienia o transaktywacji receptorów ErbB przez receptory metabotropowe, jonotropowe i receptory asocjujące z kinazami tyrozynowymi niereceptorowymi [43].

## **HIPOTETYCZNY MECHANIZM REGULACJI WZROSTU KERATYNOCYTÓW STYMULOWANYCH EGF**

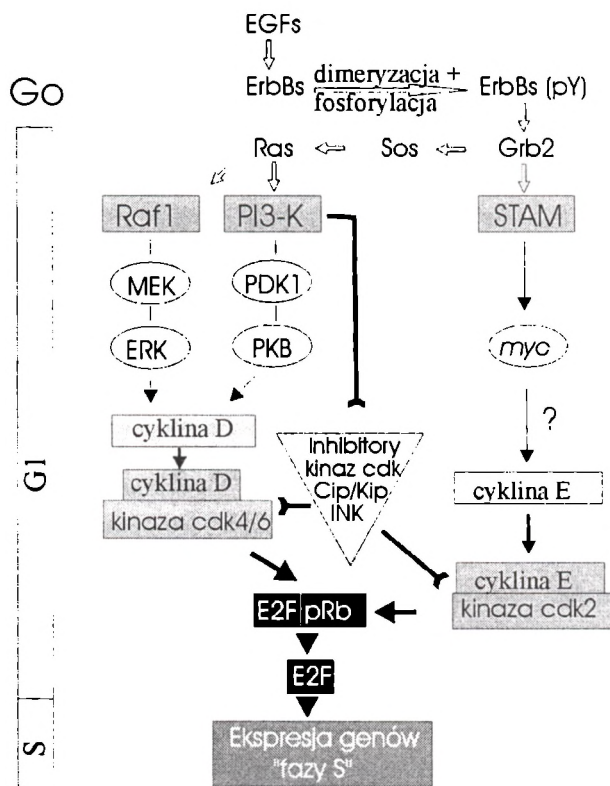
Kontrola proliferacji komórek somatycznych ssaków jest procesem bardzo złożonym. W świetle dotychczasowych wyników, kluczowe zdarzenia regulujące ten proces zachodzą w fazie G1 cyklu komórkowego. Głównymi uczestnikami tego procesu są: receptory czynników wzrostowych, małe białka wiążące nukleotydy





RYSUNEK 2. Receptory EGF-podobnych czynników wzrostowych. Schemat budowy ErbB1 (a), ligandy receptorów rodziny ErbB (b), przykładowe homo- i heterodimery receptorów ErbB (c)

guanylowe, cykliny D i E oraz cyklino-zależne kinazy białkowe: cdk4 lub cdk6 i cdk2 (rys. 3). Przyłączenie EGFs do swego receptora w błonie keratynocytów powoduje jego homo- lub heterodimeryzację i autofosforylację. Proces autofosforylacji receptorów modyfikuje kowalencyjnie receptor przez przyłączenie reszty



G2/M

**RYSUNEK 3.** Uproszczony schemat przekazu sygnału mitogenowego, indukowanego EGF-podobnymi czynnikami wzrostowymi: EGFs – EGF-podobne czynniki wzrostowe, ErbBs – receptory ErbB, Grb2 – białko adaptorowe Grb2, GRF – czynnik stymulujący wymianę nukleotydów guanylowych, Ras – białko p21<sup>Ras</sup>, Raf1 – kinaza białkowa serynowo/treoninowa stymulowana Ras, PI3K – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu, STAM – cząsteczka adaptorowa przenosząca sygnał, MEK/ERK – kinazy białkowe aktywowane mitogenami, PDK1 – zależna od PIP<sub>3</sub> kinaza białkowa 1, PKB – kinaza białkowa B, kinaza cdk4/6 – cyklino-zależne kinazy 4 i 6, kinaza cdk2 – cyklino-zależna kinaza 2, E2F – czynnik transkrypcyjny E2F, pRb – białko retinoblastoma

kwasu fosforowego do grupy -OH tyrozyny. Cząsteczki fosfotyrozyny (pY) mają unikalną zdolność do wiązania specyficznych sekwencji aminokwasowych: domen SH2 (ang. *Src-homology 2*) i PTB (ang. *phosphotyrosine-binding*) innych białek [10, 43]. Niektóre z tych białek są enzymami aktywowanymi w drodze fosforylacji reszt tyrozynowych (fosfolipaza C, 3-kinaza fosfatydylo-inozytolu, kinazy tyrozynowe niereceptorowe) [10]. Inne są białkami adaptorowymi (Shc, Grb2, Grb7, Nck) łączącymi receptor z dalszymi elementami przekazywania sygnału, zawierającymi domeny PTB (Shc) lub SH2 i SH3 (Grb2, Grb7 i Nck) [109]. Głównym miejscem wiążącym domenę PTB białka Shc jest pY1148, a domeny SH2 białka Grb2 jest pY 1068 receptora EGF [3,83]. Ufosforylowane białko Shc wiąże się przez pY317 z domeną SH2 białka Grb2 [81]. Niezależnie od tego, czy przekaz sygnału od receptora następuje z udziałem białka Shc czy bez jego udziału, białko Grb2 wiąże się swoimi domenami SH3 z jednym z białek stymulujących wymianę nu-

kleotydwów guanylowych (mSos, GRF, GDS), które aktywują białka Ras. Te z kolei mogą aktywować wiele różnych szlaków metabolicznych, między innymi te, które prowadzą do stymulacji cyklino-zależnych kinaz białkowych [59, 60]. Wykazano ponadto, że szereg innych białek może uczestniczyć w przekazaniu sygnału od białka Grb2, między innymi: białka STAM (ang. *signal transducing adaptor molecule*), którym przypisuje się stymulację genu c-myc i w kolejności aktywację cykliny E [97]. Hipotetyczny mechanizm regulacji aktywności kinaz cyklino-zależnych, stymulowanej działaniem EGF-podobnych czynników wzrostowych przedstawia rysunek 2. Przynajmniej dwie drogi przekazywania sygnału od białek Ras są niezbędne do stymulacji odpowiedzi mitogennej [59, 60]. Pierwsza, to stymulacja kaskady enzymatycznej kinaz MAP (ang. *mitogen activated protein*), a druga to aktywacja kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K). Stymulacja kaskady kinaz MAP jest niezbędna (ale niewystarczająca) do wejścia komórek w fazę S. Dodanie swojego inhibitora kinazy MEK (PD098059) do hodowli komórek spoczynkowych stymulowanych czynnikami wzrostowymi całkowicie hamuje syntezę DNA. Stymulacja kaskady kinaz MAP powoduje ekspresję genu cykliny D1, kluczowego regulatora syntezy DNA w komórkach keratynocytów [78]. Aktywacja PI3K powoduje z jednej strony degradację inhibitora p27Kip1, a z drugiej stymulację syntezy cykliny D, prawdopodobnie przez kolejną aktywację kinazy zależnej od fosfatydyloinozytolo-3-fosforanu i kinazy białkowej B. Stymulacja działania cdk's obejmuje: syntezę cyklina (D i E), tworzenie kompleksów cyklina-cdk, fosforylację kinaz cdk przez kinazy aktywujące (CAKs) i przemieszczenie kompleksów cyklina-cdk do jądra komórkowego [59]. Przyjmuje się obecnie, że procesem koniecznym do wyjścia komórek z fazy Go jest indukowana kinazami cyklino-zależnymi fosforylacja rodziny białek retinoblastomy (pRb, p130, 107), powodująca uwolnienie z kompleksu pRb-E2F czynnika transkrypcyjnego E2F (i innych białek jądrowych) [59, 60]. Zdarzenia te powodują wejście komórek w fazę S i umożliwiają dalsze etapy reakcji wewnątrzkomórkowych, które prowadzą do mitozy.

Hamowanie aktywności kinaz cyklino-zależnych zachodzi poprzez ich asocjację z swoistymi inhibitorami. Znane są dwie rodziny tych inhibitorów: Cip/Kip (p21Cip/Waf, p27Kip1 i p57Kip2) i INK4 (p15INK4A, p16INK4B, p18INK4C, p19INK4D) [87]. Inhibitory z rodziny INK4 działają wyłącznie na kinazy cdk4 i cdk6, a białka z rodziny Cip/Kip na wszystkie kinazy cdk, działające w fazie G1. Większość danych doświadczalnych wskazuje, że jedynym fizjologicznym inhibitorem wzrostu naskórka jest TGF $\beta$ . Przemawia za tym obecność TGF $\beta$ , w ponadpodstawnej warstwie naskórka, jak i zdolność do aktywacji inhibitorów cdk's w fazie G1 oraz do hamowania fosforylacji pRb [53, 77]. Udowodniono także, że nadekspresja TGF $\beta$  zapobiega indukowanej estrami forbolu hiperplazji naskórka [26].

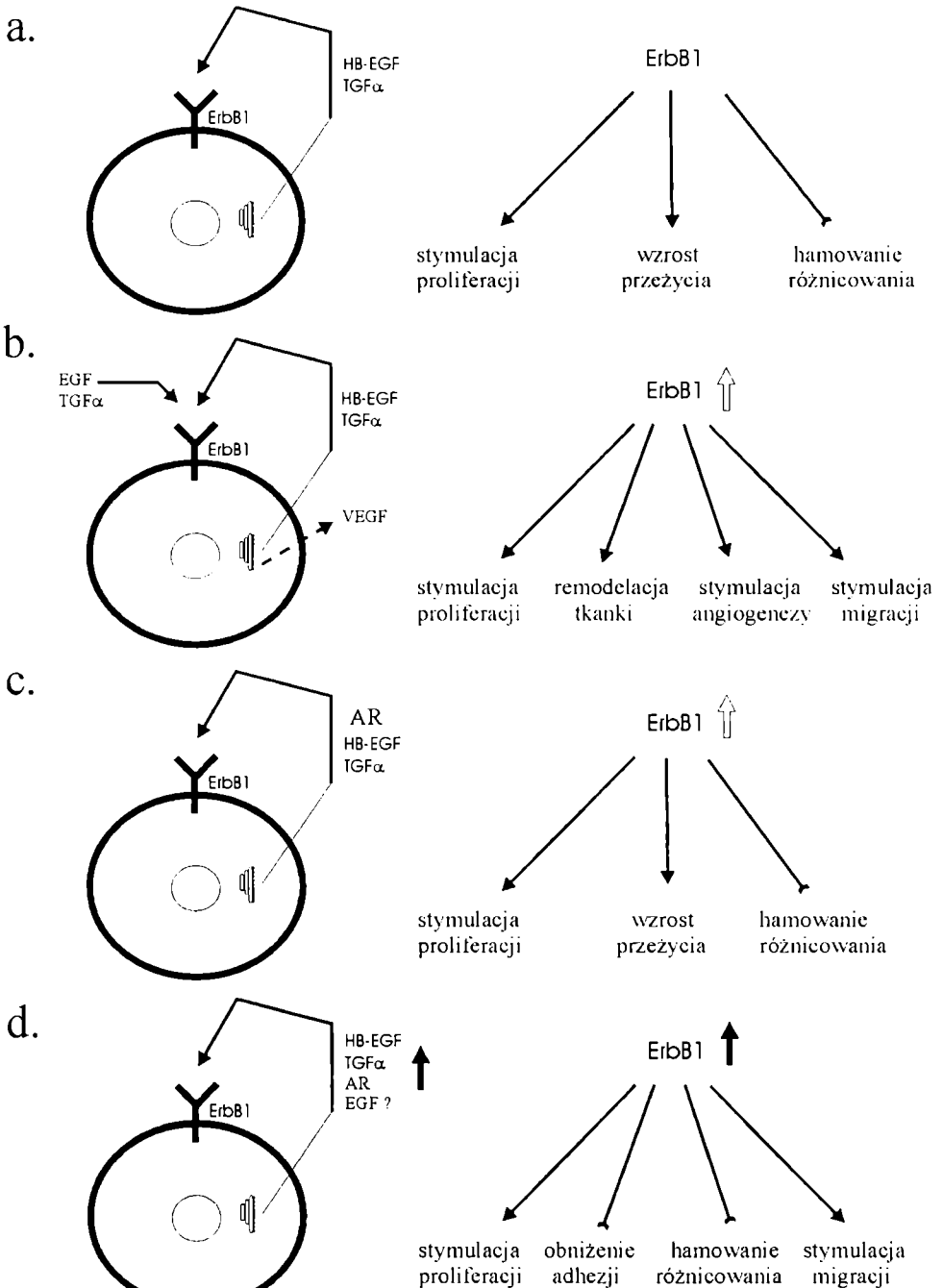
## ROLA EGF-PODOBNYCH CZYNNIKÓW WZROSTOWYCH W REGENERACJI NASKÓRKA

Peptydy zaliczane do rodziny EGF regulują bardzo wiele różnych procesów biologicznych, m.in. odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu i różnicowania keratynocytów. Regulacja ta uzależniona jest od dostępności czynników EGFs w naskórku oraz jakości i liczby ich receptorów w komórkach docelowych (keratynocytach). Jeśli chodzi o dostępność czynników wzrostowych, to inna będzie w prawidłowo regenerującym naskórku, inna w procesach gojenia ran, a jeszcze inna w patologicznej proliferacji keratynocytów, np. w łuszczycy lub nowotworach skóry (rys. 4). W stanach związanych ze wzmożoną proliferacją keratynocytów zmienia się również poziom ekspresji genów receptorów ErbB.

### Regeneracja naskórka

W naskórku obserwuje się ekspresję tylko trzech typów receptorów z rodziny ErbB: ErbB1, ErbB2 i ErbB3 [1, 58]. W prawidłowym naskórku, receptory te uczestniczą w autokrynnym wzroście odnawiającej się tkanki, supresji końcowego różnicowania, promocji przeżywania komórek i regulacji migracji komórek podczas morfogenezy. Naturalnym ligandem dla receptorów EGFs keratynocytów wydaje się TGF $\alpha$  (lub HB-EGF), ponieważ ani EGF, ani amfiregulina nie są syntetyzowane w prawidłowym naskórku w ilościach usprawiedliwiających ich udział w procesie fizjologicznej regeneracji naskórka. HB-EGF jest obecny zarówno w formie transbłonowej, jak i w formie rozpuszczalnej, chociaż w niskim stężeniu. Działanie TGF $\alpha$  w hodowli keratynocytów może być zastąpione przez inne czynniki wzrostowe, takie jak KGF (FGF7) lub IGFI [37], ale nie można wykluczyć, że ma to miejsce w drodze pośredniej stymulacji ErbB1. Wzmożona synteza amfireguliny lub TGF $\alpha$ , podobnie jak KGF i IGFI, indukuje hiperplazję naskórka [23, 42]. IGFI jest prawdopodobnie niedostępny dla keratynocytów w tkance prawidłowej, ponieważ jego głównym źródłem jest krew (a zastępczym fibroblasty skóry). Wykazano także, że myszy pozbawione genów TGF $\alpha$  i KGF nie wykazują zaburzeń zarówno w prawidłowej, jak i w indukowanej uszkodzeniu tkanki regeneracji naskórka [41].

Ponieważ keratynocyty mają zdolność do syntezy TGF $\alpha$ , AR i HB-EGF, nie można wykluczyć udziału wszystkich trzech czynników w regeneracji komórek naskórka, TGF $\alpha$  i HB-EGF w warunkach fizjologicznych, a amfireguliny w stanach patologicznych [38]. Jeśli tak, to jedynym (lub przynajmniej głównym) przekaznikiem sygnału przez błonę komórkową jest ErbB1 (patrz rys. 2). Potwierdzają to liczne fakty doświadczalne. Historyczne już dziś doświadczenia *in vivo* pokazały, że ErbB1 bierze udział w dojrzewaniu skóry oraz przyrastaniu jej na grubość [14]. Badania wykonane na myszach, z uszkodzonym receptorem ErbB1 wykazały, że powstały naskórek był cienki i nie wykształcony całkowicie. Dodatkowo obser-



RYSUNEK 4. Hipotetyczna rola EGF-podobnych czynników wzrostowych oraz zmiany w ekspresji receptora ErbB1 w: regeneracji prawidłowego naskórka (a), procesie gojenia ran (b), łuszczycy (c) i nowotworach skóry (d)

wowano także upośledzenie funkcji innych tkanek epitelialnych [66, 88, 100]. Autonomiczny wzrost keratynocytów jest zależny od obecności ErbB1. Autokrywny wzrost keratynocytów *in vitro* był w ponad 90% hamowany działaniem przeciwciał dla ErbB1 [30]. Wiele funkcji regulowanych przez ErbB1 jest istotnych dla utrzymania odpowiedniej równowagi pomiędzy proliferacją i różnicowaniem komórek naskórka [4, 29, 50]. Lokalizacja receptora EGF w naskórku jest konsekwencją jego przypuszczalnej roli we wzroście naskórka [50]. W normalnych, dojrzałych keratynocytach, ErbB1 jest zlokalizowany głównie na powierzchni dzielących się komórek bazalnych, a ekspresja genu tego receptora obniża się wraz z wzrostem zróżnicowania keratynocytów [50, 108]. Rola receptorów ErbB2 i ErbB3 w procesie regeneracji naskórka jest mniej zrozumiała. Można domniemywać, że główną rolą ErbB2 jest różnicowanie sygnału indukowanego czynnikami EGFs, poprzez heterodimeryzację z ErbB1 lub ErbB3. Natomiast podstawową funkcją ErbB3 wydaje się jego udział w stymulacji kinazy fosfatydyloinozytolu [15], enzymu uczestniczącego w aktywacji kinaz cyklino-zależnych. HRG $\beta$  działająca przez receptor ErbB3, stymuluje proliferację keratynocytów *in vitro*, ale trudno podać źródło tego czynnika w prawidłowym naskórku [58].

Od dawna wiadomo, że czynniki wzrostowe z rodziny EGF zwiększają przeżywalność keratynocytów *in vitro*. Obecnie próbuje się wyjaśniać bezpośrednią rolę ErbB1 w zapobieganiu apoptozie keratynocytów. Inhibicja tego receptora przy użyciu przeciwciał lub swoistych inhibitorów receptorowych kinaz tyrozynowych powodowała selektywną apoptozę keratynocytów [6, 79, 94], w odróżnieniu od innych typów komórek, takich jak fibroblasty czy melanocyty [80]. Prawdopodobnie, mechanizm tego zjawiska związany jest z wewnątrzkomórkowym poziomem białka Bcl-xl. Stymulacja ErbB1 zwiększa ekspresję genu bcl-xL i w ten sposób przyczynia się do wzrostu przeżywalności keratynocytów [45, 71].

Epidermalne czynniki wzrostowe nie tylko wpływają na przeżywalność, ale także na różnicowanie keratynocytów. *In vivo* zauważono odwrotną zależność pomiędzy ekspresją ErbB1 a różnicowaniem keratynocytów, jak również to, że w hamowaniu dojrzewania keratynocytów uczestniczy receptor ErbB1 [23]. W organotypowych modelach różnicowania się keratynocytów, EGF hamuje epidermalną morfogenezę, uwarstwianie i przede wszystkim zróżnicowanie fenotypowe [18, 75]. Po zadziałaniu czynnikiem EGF, wytwarzanie specyficznych markerów w procesie końcowego różnicowania keratynocytów, takich jak: filagryna, keratyna 1 i transglutaminaza keratynocytowa, jest znacznie ograniczone [67, 76], natomiast hamowanie aktywności kinazy tyrozynowej receptora ErbB1 wzmacnia ekspresję takich markerów różnicowania, jak keratyna 1 i 10 [72].

Wiele czynników z rodziny EGF jest chemoatraktantami dla komórek keratynocytów, a wiadomo, że regulacja migracji tych komórek jest istotna zarówno w procesie gojenia ran, jak i w procesach patologicznego wzrostu tej tkanki. Aktywacja receptorów EGF-podobnych czynników wzrostowych może modulować mi-

grację nie wpływając na tempo proliferacji keratynocytów. W hodowli prawidłowych ludzkich keratynocytów, TGF- $\alpha$  i EGF wywołują identyczną odpowiedź mitogenną, ale TGF- $\alpha$  daje znacznie silniejszy efekt mitogeny [4]. Jest to tym istotniejsze, że w prawidłowym naskórku EGF nie odgrywa istotnej roli, natomiast poziom TGF- $\alpha$  tak.

## REGENERACJA NASKÓRKA W PROCESIE GOJENIA RAN

Wiele czynników wzrostowych (PDGF, IGFI, FGF2, VEGF, TGF $\beta$ ) w tym EGF-podobne czynniki wzrostowe, odgrywają istotną rolę w procesie gojenia ran [6, 24]. Wykazano, że EGF przyspiesza gojenie ran powstałych w wyniku poparzeń, ran pooperacyjnych, uszkodzeń rogówkowo-nabłonkowych, wrzodów żołądkowych i żylnych. Badania na wielu modelach zwierzęcych pokazały, że egzogenne podanie czynnika EGF powoduje zwiększenie tworzenia się kolagenu, rozwój granulacji tkanek, odnawianie epitelium i odnowę unaczynienia w gojących się ranach [45, 91]. W zranionej skórze, liczba receptorów ErbB1 zwiększa się, przez co odgrywają one znaczącą rolę w stymulacji proliferacji i odnowy komórek nabłonka w ranie. Wykazano m.in., że EGF i TGF- $\alpha$  wzmagają nie tylko proliferację keratynocytów, ale również migrację tych komórek z obrzeży do wnętrza rany.

Wyniki publikowane w latach dziewięćdziesiątych dowodzą, że ErbB1 jest centralnym ogniwem, pośredniczącym we wczesnych etapach gojenia ran. Przede wszystkim dlatego, że:

- a) poziom tego receptora wzrasta i poprzedza odpowiedź hipertroficzną [95],
- b) synteza stymulatora przepuszczalności naczyniowej i angiogenezy mikronaczyniowych komórek epitelialnych VEGF jest stymulowana działaniem EGF i TGF $\alpha$  na keratynocyty [28],
- c) geny keratyny 6 i 16, silnie stymulowane podczas procesu gojenia ran, zawierają elementy regulatorowe zależne od aktywacji ErbB1 [70, 47],
- d) aktywator plazminogenu typu urokinazy (odpowiedzialny za lokalną aktywację kolagenazy typu IV), odmiennie od metaloproteinaz i TGF $\beta$  [96] jest silnie stymulowany w keratynocytach traktowanych EGF [46].

Keratynocyty wykazują mitogenną i chemotaktyczną odpowiedź na różne czynniki wzrostowe, które są obecne w gojących się ranach. Szczególne znaczenia w tym procesie przypisuje się receptorom ErbB, których ligandy są obecne w środowisku gojących się ran. Są to EGF i TGF $\alpha$  wydzielane z  $\alpha$ -granul płytek krwi oraz HB-EGF (i TGF $\alpha$ ) wytwarzane przez keratynocyty i makrofagi [61, 85]. Indukowany uszkodzeniem tkanki wzrost syntezy EGFs oraz ich receptorów przez keratynocyty, jednoznacznie wskazuje na istotny udział tych białek w procesie gojenia ran. Optymalne warunki odnowy nabłonka wymagają proliferacji i migracji bazalnych kera-

tyncytów w głąb zranionej powierzchni [61, 85]. Wiele procesów zachodzących w komórkach musi być odpowiednio modulowanych tak, aby umożliwić przemieszczanie się komórek w głąb rany: dynamiczne rozkładanie i składanie przylegających połączeń między komórkami, ponowne modelowanie matriks komórkowej, utrata polarności komórki i ukierunkowany ruch. Utrata ścisłej kontroli nad tymi procesami prowadzi do patologii np. inwazji komórek nowotworowych [9, 11, 31, 39, 55].

## PATOLOGICZNY WZROST KERATYNOCYTÓW

Zaburzenia wzrostu i różnicowania keratynocytów związane są z wieloma chorobami skóry. Nie ulega wątpliwości, że w hiperplastycznych chorobach skóry (łuszczyca, zapalne schorzenia alergiczne, chroniczne owrzodzenia itp.) keratynocyty realizują patologiczną drogę dojrzewania, manifestującą się wzmożonym tempem proliferacji, nienormalną lub wyolbrzymioną odpowiedzią na czynniki wzrostowe, upośledzonym różnicowaniem i zwiększoną zdolnością do migracji. Jednym z najlepiej udokumentowanych przykładów wpływu EGFs na patologiczną proliferację keratynocytów jest łuszczyca. W chorobie tej wykazano podwyższoną ekspresję genów TGF $\alpha$  i amfireguliny. [52, 73, 74]. Wiele receptorów EGF jest wytwarzanych w sposób ciągły w anormalnie różnicującej się warstwie zewnętrznej łuszczonego się naskórka. Również podwyższona ekspresja genu amfireguliny w bazalnych keratynocytach w naskórku daje w efekcie fenotyp podatny na łuszczenie się.

Podwyższona synteza receptorów ErbB jest charakterystyczna dla wielu nowotworów tkanek nabłonkowych [16, 33]. Zjawisku temu towarzyszy zazwyczaj wzmożony poziom syntezy wielu peptydów EGF-podobnych (TGF $\alpha$ , AR, HB-EGF, BTC) [33].

W przypadku nowotworów skóry, zauważa się zmienioną ekspresję lub aktywację ErbB1, co odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w progresji guza nowotworowego. Wiele procesów komórkowych, takich jak: zmieniona adhezja komórek, ekspresja białek degradujących matriks zewnątrzkomórkową i przemieszczanie się komórek, jest wspólnych dla keratynocytów zarówno w procesie gojenia ran, jak i w guzach metastatycznych. ErbB1 jest regulatorem każdego z tych procesów komórkowych i sugeruje się, że przejściowe i dynamiczne podwyższenie poziomu ErbB1 podczas procesu gojenia ran lub znacznej hiperekspresji w guzach nowotworowych, wskazuje na istotny udział tego białka w migracji i inwazyjnym potencjale keratynocytów [45]. Zaobserwowano także podwyższony poziom mRNA ErbB1 w późnym stadium brodawczaka u myszy, co sugeruje, że wzrost ekspresji genu tego receptora jest wczesnym sygnałem rozwoju przednowotworowych zmian keratynocytów [29]. Utrata integralności nabłonka jest obserwowana po zaktywowaniu receptora EGF [9, 12, 39, 44, 92, 98, 104] i fosforylacji tyrozyn białek połączeń komórkowych, co może reprezentować przykładowy mechanizm, przez który EGF reguluje adhezję komórkową [5, 107]. Interakcje w matriks komórkowej odbywają się poprzez pół-



desmosomy i kontakty zogniskowane, których transbłonowe części składają się receptorów integryn [34, 107]. Połączenie keratynocytów z błoną podstawną jest utrzymywane przez hemidesmosomy i integrynę  $\alpha 6 \beta 4$ . EGF rozrywa to połączenie [56]. Cały proces jest związany z fosforylacją tyrozyny podjednostki  $\beta 4$  integryny. Czynniki wzrostu mogą także wpływać na profil ekspresji integryn i rozmieszczenie na powierzchni komórki [63]. Zaobserwowano, że EGF powoduje wzrost ekspresji integryny  $\alpha 2 \beta 1$  w keratynocytach oraz że indukowana ligandem migracja może być zahamowana poprzez działanie przeciwciał dla integryny  $\alpha 2 \beta 1$  [19].

Zarówno inwazja komórek nowotworowych, jak i proces gojenia ran wymagają degradacji i powtórznego tworzenia zewnątrzkomórkowej matriks [9, 55, 93]. Procesy te są regulowane przez metaloproteinazy matriks i niektóre proteiny serynowe np. plazminę [106]. Proteiny serynowe i metaloproteinazy odgrywają znaczącą rolę w migracji i procesie gojenia ran [85]. EGF pełni tu rolę induktora ekspresji metaloproteinazy matriks (MMP)-9 i aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPA) w keratynocytach [11, 50, 54, 64], choć nie tylko EGF jest odpowiedzialny za wzrost poziomu ekspresji uPA [50].

Dowiedziano, że zwiększenie ekspresji receptorów EGF zmienia funkcjonowanie komórek keratynocytów normalnych i tumorogennych. Zarówno w komórkach normalnych, jak i neoplastycznych obserwuje się odwrotną zależność pomiędzy ekspresją receptora EGF a różnicowaniem [67]. Wiele zmian dotyczących funkcjonowania komórki jest związanych z nadekspresją ErbB1 i może się cofnąć częściowo lub całkowicie po obniżeniu poziomu tego receptora [34, 69]. Ponieważ nadprodukcja receptora ErbB1 jest skorelowana ze wzmocnieniem potencjału inwazji lub metastazy w SCC (ang. *squamous cell carcinoma*), istotne jest postawienie pytania, czy zmiana liczby tych receptorów jest istotna, aby doszło do zmiany poszczególnych funkcji w komórce. Przejściowa nadprodukcja ErbB1 podczas odnowy nabłonka [85] wskazuje, że odpowiednia regulacja ekspresji genu tego receptora ma istotne znaczenie w migracji keratynocytów. Sugeruje to, że odpowiedź komórkowa jest nie tylko modulowana na poziomie stężenia lub dostępności liganda, ale również znaczenie ma tu gęstość rozmieszczenia receptora. Aby potwierdzić tę hipotezę, wykonano odpowiednie doświadczenia na ludzkiej linii SCC i stwierdzono korelację pomiędzy migracją komórek zależną od EGF i ekspresją receptora EGF w normalnych keratynocytach i kilku liniach SCC [65].

Reasumując EGF-podobne czynniki wzrostowe wpływają na liczne procesy, istotne zarówno w odnowie, jak i w patologicznym wroście komórek naskórka. W warunkach fizjologicznych proliferacja keratynocytów jest regulowana bezpośrednio (w drodze autokrynej stymulacji wzrostu, głównie przez  $TGF\alpha$  lub HB-EGF) oraz w sposób pośredni poprzez supresję końcowego różnicowania i hamowanie apoptozy. Precyzyjna regulacja liczby odnawianych komórek jest niezbędna dla podtrzymania odpowiedniej struktury i funkcji naskórka. W procesach gojenia ran, regeneracja naskórka może być stymulowana również przez inne EGF-podobne

czynniki wzrostowe, magazynowane w płytkach krwi (EGF) lub syntetyzowane przez aktywowane komórki warstwy brodawkowej skóry (ER, HGR). Niewątpliwie, najważniejszą rolę w odbiorze sygnału indukowanego EGF-podobnymi czynnikami wzrostowymi odgrywa ErbB1, tak w odnowie tkanki prawidłowej, jak i zranionej, a jego heterodimeryzacja z ErbB2 i ErbB3 różnicuje sygnał i odpowiedź biologiczną komórki. Dobrze udokumentowane doświadczalnie są także hipotezy o korelacji pomiędzy hiperekspresją EGF-podobnych czynników wzrostowych i ich receptorów w chorobach związanych z patologiczną proliferacją komórek naskórka (łuszczyca, nowotwory nabłonkowe).

## PIŚMIENICTWO

- [1] AARONSON SA, RUBIN JS, FINCH PW, WONG J, MARCHESE C, FALCO J, TAYLOR WG, KRAUS MH. Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. *Am Rev Respi Dis* 1990; **142**: S7–10.
- [2] BARTH AI, NATHKE IS, NELSON WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeleton complexes and signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 690–693.
- [3] BATZER AG, ROTIN D, URENA JM, SKOLNIK EY, SCHLESSINGER J. Hierarchy of binding sites for Gbr2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 5192–5201.
- [4] BEERLI R, HYNES N. Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 1996; **271**: 6071–6076.
- [5] BEHRENS J, VAKAET L, FRIIS R, WINTERHAGER E, VAN ROY F, MAREEL MM, BIRCHMEIER W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/catenin complex in cells transformed with temperature sensitive v-src gene. *J Cell Biol* 1993; **120**: 757–766.
- [6] BELLO YM, PHILLIPS TJ. Recent advances in wound healing. *JAMA* 2000; **283**: 716–718.
- [7] BENNETT NT, SCHULTZ GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surgery* 1993; **165**: 728733.
- [8] BENNETT NT, SCHULTZ GS. Growth factors and wound healing. part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surgery* 1993; **166**: 74–81.
- [9] BIRCHMEIER C, MEYER D, RIETHMACHER D. Factors controlling growth, motility, and morphogenesis of normal and malignant epithelial cells. *Int Rev Cytol* 1995; **160**: 221–266.
- [10] BOONSTRA J, RIJKEN Ph, HUMBEL B, CREMERS F, VERKLEIJ A, VAN BERGEN EN HENEGOUWEN P. The epidermal growth factor. *Cell Biol Intern* 1995; **19**: 413–430.
- [11] BOYD D. Invasion and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1996; **15**: 77–89.
- [12] BOYER B, THIERY JP. Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity. *APMIS* 1993; **101**: 257–268.
- [13] BURGESS AW, THUMWOOD CM. Growth factors and their receptors: new opportunities for cancer treatment. *Pathology* 1994; **26**: 453–463.
- [14] CARPENTER G, COHEN S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 1979; **48**: 193–216.
- [15] CARRAWAY KL, CANTLEY LC. A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell* 1994; **78**: 5–8.
- [16] CASCI T, FREEMAN M. Control of EGF receptor signalling: Lessons from fruitflies. *Cancer Metast Rev* 1999; **18**: 181–201.
- [17] CHANG H, RIESE DJ, GILBERT W, STERN DF, MCMAHAN UJ. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 1997; **387**: 509–512.

- [18] CHEN CS, LAVKER PM, RODECK U, RISSE B, JENSEN PJ. Use of a serum-free epidermal culture model to show deleterious effects of epidermal growth factor on morphogenesis and differentiation. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 107–112.
- [19] CHEN JD, KIM JP, ZHANG K., SARRET Y, WYNN KC, KRAMER, RH, WOODLEY DT. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Exp Cell Res* 1993; **209**: 216–223.
- [20] CICCODICOLA A, DONOR R, OBICI S, SIMEONE A, ZOLLO M, PRESICO MG. Molecular characterization of gene of the EGF family expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. *EMBO J* 1989; **8**: 1987–1991.
- [21] CICHOCKI T, LITWIN JA, MIRECKA J. Kompendium histologii. WUJ 1998; 212–225.
- [22] COHEN S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in new born animal. *J Biol Chem* 1962; **237**: 1555–1562.
- [23] COOK P., PIEPKORN M., CLEGG CH, PLOWMAN GD, DEMAY JM, BROWN JR, PITTELKOW MR. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2286–2294.
- [24] COOPER DM. Wound healing: new understandings. *Nurse Practitioner Forum* 1999; **10**: 74–86.
- [25] COWIN P, BURKE B. Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 56–65.
- [26] CUI W, FOWLIS DJ, COUSINS FM, DUFFIE E, BRYSON S, BALMAIN A, AKHURST RJ. Concerted action of TGF and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes Dev* 1995; **9**: 945–955.
- [27] DALY RJ. Take your partners, please – signal diversification by the ErbB family of receptor tyrosine kinases. *Growth factors* 1999; **16**: 255–263.
- [28] DETMAR M., YEO KT, NAGY J, VAN DE WATER L, BROWN BR, BERSE BR, LEDBETTER S, DVORAK H. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 44–50.
- [29] DiGIOVANNI J. Role of transforming growth factor- $\alpha$  and the epidermal growth factor receptor in multistage mouse skin carcinogenesis. [w] H. Mukhtar [red.] *Skin Cancer: Mechanisms and Human Relevance*. CRC Press, Boca Raton, 1995: 181–197.
- [30] DOWNING MT, BRIGSTOCK DR, LUQUETTE MH, CRISSMAN-COMBS M, BESNER GE. Immunohistochemical localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in normal skin and skin cancers. *Histochem J* 1997; **29**: 735–744.
- [31] ECCLES SA, MODJTAHEDI H, BOX G, COURT W, SANDLE J, DEAN CJ. Significance of the c-erbB family of receptor tyrosine kinases in metastatic cancer and their potential as targets for immunotherapy. *Invas Metast* 1995; **14**: 337–348.
- [32] FREEMAN MR, YOO JJ, RAAB G, SOKER S, ADAM TM, SCHNECK FX, RENSHAW AA, KLAGSBRUN M, ATALA A. Heparin binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for human urothelial cells and is synthesized by epithelial and smooth muscle cells in the human bladder. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1028–1036.
- [33] FERNANDES AM, HAMBURGER AW, GERWIN BI. Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells. *Cancer Lett* 1999; **142**: 55–63.
- [34] FUJII K. Ligand activation of overexpressed epidermal growth factor receptor results in loss of epithelial phenotype and impaired RGD-sensitive integrin function in HSC-1 cells. *J Invest Dermatol* 1996; **107**: 195–202.
- [35] GARROD DR. Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 30–40.
- [36] GINACOTTI FG, RUOSLAHTI E. Integrin signaling. *Science* 1999; **285**: 1028–1032.
- [37] GNIADECKI R. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its 20-epi analogues (MC 1288, MC 1301, KH 1060), on clonal keratinocyte growth: evidence for differentiation of keratinocyte

- stem cells and analysis of the modulatory effects of cytokines. *Br J Pharmacol* 1997; **120**: 1119–1127.
- [38] GNIADOCKI R. Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmacol* 1998; **30**: 619–622.
- [39] GRANDIS JR, TWEARDY DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993a; **53**: 3579–3584.
- [40] GREEN KJ, STAPPENBECK TS. The desmosomal plaque: role in attachment of intermediate filaments to the cell surface. In: *Molecular Mechanisms of Epithelial Junctions: From Development to Disease*. S. Citi, ed. Austin, TX, R.G. Landes Co. 1994; pp 157–171.
- [41] GUO L, DEGENSTEIN L, FUCHS E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 1996; **10**: 1165–175.
- [42] GUO L, YU QC, FUCHS E. Targeting expression of keratinocyte growth factor to keratinocytes elicits sticking changes in epithelial differentiation in transgenic mice. *EMBO J* 1993; **12**: 973–986.
- [43] HACKEL PO, ZWICK E, PRENZEL N, ULLRICH A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 1999; **11**: 184–189.
- [44] HAZAN RB, NORTON L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; **273**: 90778–90784.
- [45] HUDSON LG, McCAWLEY LJ. Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microsc Res Tech* 1998; **43**: 444–455.
- [46] JENSON PJ, RODECK U. Autocrine/paracrine regulation of keratinocyte urokinase plasminogen activator through the TGF-alpha/EGF receptor. *J Cell Physiol* 1993; **155**: 333–339.
- [47] JIANG CK, MAGNALDO T, OHTSUKI M, FREEDBERGVIM, BERNERD F, BLUMBERG M. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 6786–6790.
- [48] KARNES WE Jr, WELLER SG, ADJEI PN, KOTTKE TJ, GLENN KS, GORES GJ, KAUFMANN SH. Inhibition of epidermal growth factor receptor kinase induces protease-dependent apoptosis in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 1998; **114**: 930–939.
- [49] KHAZAJE K, SCHIRRMACHER V, LICHTER RB. EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1993; **12**: 255–274.
- [50] KING LE Jr., GATES RE, STOSCHECK CM, NANNEY LB. The EGF/TGF alpha receptor in skin. *J Invest Dermatol* 1990; **94** (Suppl): 164S–170S.
- [51] LEE DC, CHAN KW, CHAN SY. Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in adult polycystic kidney disease. *J Urology* 1998; **159**: 291–296.
- [52] LEE DC, LUETTEKE VC, QIU TH, CHEN X, BERKOWITZ EA. Transforming growth factor-alpha. Its expression, regulation, and role in transformation. [w] RC Tsang, JA Lemons i WF Balisren [red.] *Growth factors in perinatal development*. Raven Press, New York: 1993: 21–38.
- [53] LI JM, HU PP, SHEN X, YU Y, WANG XF. E2F4-Rb and E2F4-p1107 complexes suppress gene expression by transforming growth factor through E2F binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4948–4953.
- [54] LYONS JG, BIRKEDAL-HANSEN B, PIERSON MC, WHITELOCK JM, BIRKEDAL-HANSEN H. Interleukin-1 beta and transforming growth factor-alpha/epidermal growth factor induce expression of Mr 95,000 type IV collagenase/gelatinase and interstitial fibroblast-type collagenase by rat mucosal keratinocytes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 19143–19151.
- [55] MacDOUGALL JR, MATRISIAN LM. Contributions of tumor and stromal matrix metalloproteinases to tumor progression, invasion and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1995; **14**: 351–362.

- [56] MAINIERO F, PEPE A, YEON M, REN Y, GIANCOTTI F. The intracellular functions of 64 integrin are regulated by EGF. *J Cell Biol* 1996; **134**: 241–253.
- [57] MAREWICZ E. Hodowle skóry w transplantologii i biotechnologii. *Post Biol Kom* 1994; **21** (supl. nr 3): 73–87.
- [58] MARIKOVSKY M, LAVI S, PINKAS-KRAMARSKI R, KARUNAGRAN D, LIU N, WEN D, YARDEN Y. ErbB-3 mediates differential mitogenic effects of NDF/heregulin isoforms on mouse keratinocytes. *Oncogene* 1995; **10**: 1403–1411.
- [59] MARSHALL CJ. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11**: 732–736.
- [60] MARSHALL CJ. Small GTPases and cell cycle regulation. *Biochem Soc Transactions* 1999; **27**: 363–370.
- [61] MARTIN P. Wound Healing: Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; **276**: 75–81.
- [62] MASSAQUE J. Transforming growth factor. *J Biol Chem* 1990; **265**: 21393–21396.
- [63] MATSUMOTO K, ZIOBER BL, YAO CC, KRAMER RH. Growth factor regulation of integrin mediated motility. *Cancer Metast Rev* 1995; **14**: 205–217.
- [64] McCAWLEY LJ, OBRIEN P, HUDSON LG. Epidermal growth factor (EGF) and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol* 1998; **176**: 255–265.
- [65] McCAWLEY LJ, O'BRIEN P, HUDSON LG. Overexpression of the EGF receptor contributes to enhanced ligand-mediated motility in keratinocytes. *Endocrinology* 1997; **138**: 1–7.
- [66] MIETTINEN PJ, BERGER JE, MENESES J, PHUNG Y, PEDERSEN RA, WERB Z, DERYNCK R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995; **376**: 337–341.
- [67] MONZON R, MCWILLIAMS N, HUDSON LG. Suppression of cornified envelope formation and Type I transglutaminase by epidermal growth factor (EGF) in neoplastic keratinocytes. *Endocrinology* 1996; **137**: 1727–1734.
- [68] MODJTAHEDI H, ECCLES S, SANDLE J, BOX G, TITLEY J, DEAN C. Differentiation or immune destruction: two pathways for therapy of squamous cell carcinomas with antibodies to the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 1994; **54** (7): 1695–1701.
- [69] MORONI MC, WILLINGHAM MC, BEGUINOT L. EGF-R antisense RNA blocks expression of the epidermal growth factor receptor and suppresses the transforming phenotype of a human carcinoma cell line. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2714–2722.
- [70] PALADINI RD, TAKAHASHI NS, BRAVO NS, COULOMBE PA. Onset or re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound healing edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 1996; **132**: 381–397.
- [71] PENA JC, FUCHS E, THOMPSON CB. Bcl-x expression influences keratinocyte survival but not terminal differentiation. *Cell Growth Differ* 1997; **8**: 619–629.
- [72] PEUS D, HAMACHER L, PITTELKOW MR. EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 1997; **109**: 751–756.
- [73] PIEPKORN M, UNDERWOOD RA, HENNEMAN C, SMITH LT. Expression of amphiregulin is regulated in cultured human keratinocytes and in developing fetal skin. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 802–809.
- [74] PIEPKORN M. Overexpression of amphiregulin, a major autocrine growth factor for cultured human keratinocytes, in hyperproliferative skin diseases. *Am J Dermatopathol* 1996; **18**: 165–171.
- [75] PONEC M, GIBBS S, WEERHEIM A, KEMPENAAR J, MULDER A, MOMMAAS AM. Epidermal growth factor and temperature regulate keratinocyte differentiation. *Arch Dermatol Res* 1997; **289**: 317–326.

- [76] POUMAY Y, PITTELKOW MR. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 271–276.
- [77] REYNIDOTTIR I, POLYAK K, IAVARONE A, MASSAQUE J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF. *Genes Dev* 1995; **9**: 11831–1845.
- [78] ROBLES AI, LARCHER F, WHLIN RB, MURILLAS R, RICHI E, GIMENEZ-CONTI IB, JORCANO JL, CONTI CJ. Expression of cyclin D1 in epithelial tissues of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and severe thymic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7634–7638.
- [79] RODECK U, JOST M, DUHADAWAY J, KARI C, JENSEN PJ, RISSE B, EWERT DL. Regulation of Bcl-xL expression in human keratinocytes by cell-substratum adhesion and the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997a; **94**: 5067–5072.
- [80] RODECK U, JOST M, KARI C, SHIH DT, LAVKER PM, EWERT DL, JENSEN PJ. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 1997b; **110**: 113–121.
- [81] ROZAKIS-ADCOCK M, FERNLEY R, WADE J, PAWSON T, BOWTELL D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 1993; **363**: 83–85.
- [82] RUCK A, PAULIE S. EGF, TGF, AR and HB-EGF are autocrine growth factors for human bladder carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 1998; **18**:1447–1452.
- [83] SAKAGUCHI K et al. Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells. *Mol Endocrinol* 1998; **12**: 536–543.
- [84] SASADA R, ONO Y, TANIYAMA Y, SHING Y, FOLKMAN J, IGARISHI K. Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **190**: 1173–1179.
- [85] SCHAFFER CJ, NANNEY LB. Cell biology of wound healing. *Int Rev Cytol* 1996; **169**: 151–181.
- [86] SHEN MM, WANG H, LEDER P. A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. *Development* 1997; **124**: 429–442.
- [87] SHERR CJ, ROBERTS JM. Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; **13**: 1501–1512.
- [88] SIBILIA M, WAGNER EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995; **269**: 234–238.
- [89] SIEGFRIED JM. Strategies for identification of peptide growth factors. *Pharmac Ther* 1992; **56**: 233–245.
- [90] SHING YG, CHRISTOFORI D, HANAHAN Y, ONO R, SASADA K, IGARASHI K, FOLKMAN J. Betacellulin a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 1993; **259**: 1604–1607.
- [91] SINGER AJ, CLARK RAF. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999; **341**: 738–746.
- [92] SOLIC N, DAVIES DE. Differential effects of EGF and amphiregulin on adhesion molecule expression and migration on colon carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1997; **234**: 465–476.
- [93] STETLER-STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S, LIOTTA LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol* 1993; **9**: 541–573.
- [94] STOLL SW, BENEDICT M, MITRA R, HINIKER A, ELDER JT, NUNEZ G. EGF receptor signaling inhibits keratinocyte apoptosis: evidence for mediation by Bcl-XL. *Oncogene* 1998; **16**: 1493–1499.
- [95] STOSCHECK CM, NANNEY LB, KING LE Jr. Quantitative determination of EGF-R during epidermal wound healing. *J Invest Dermatol* 1992; **99**: 645–649.

- [96] TAIPALE JKK, KESKI-OJA J. Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25378–25384.
- [97] TANAKA N et al Possible involvement of a novel STAM-associated molecule AMSH in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19129–19135.
- [98] THIERY JP, BOYER B. The junction between cytokines and cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 782–792.
- [99] THOMPSON SA, HARRIS A, HOANG D, FERRER M, JOHNSON GR. COOH-terminal extended recombinant ampiregulin with bioactivity comparable with naturally derived growth factor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17927–17931.
- [100] THREADGILL DW, DLUGOZ AA, HANSEN LA, TENNENBAUM T, LICHTI U., YEE D, LAMANT C, MOURTON T, HERRUP K, HARRIS RC, BARNARD JA, YUSPA SH, COFFEY RJ, MAGNUSON T. Targeted disruption of mouse EGF receptor: Effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; **269**: 230–234.
- [101] TOYODA H, KOMURASAKI T, UCHIDA D, MORIMOTO S. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 1997; **326**: 69–75.
- [102] TOYODA H, KOMURASAKI T, UCHIDA D, TAKAYAMA Y, ISOBET, OKUYAMA T, HANADA K. Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 7495–7500.
- [103] TZAHAR E, YARDEN Y. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochem Biophys Acta* 1998; **1377**: M25–37.
- [104] WATABE M, MATSUMOTO K, NAKAMURA T, TAKEICHI M. Effect of hepatocyte growth factor on cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cell Struct Funct* 1993; **18**: 117–124.
- [105] WEN D, PELES E, CUPPLES R, SUGGS SV, BACUS SS, LUO Y, TRIAL G, HU S, SILBINGER SM, LEVY RB, KASKI RA, LU HS, YARDEN U. Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 1992; **69**: 559–572.
- [106] WERB Z. ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell* 1997; **91**: 439–442.
- [107] YAMADA KM, GEIGER B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 76–85.
- [108] YATES RA, NANNEY LB, GATES RE, KING LE Jr. Epidermal growth factor and related growth factors. *Int J Dermatol* 1991; **30**: 687–694.
- [109] ZOZULA S, LIOUBIN M, HILL RJ, ABRAM C, GISHIZKY ML. Mapping signal transduction pathways by phage display. *Nature Biotechnol* 1999; **17**: 1193–1198.

Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków  
E-mail: klein @ mol.uj.edu.pl

