

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

**TOM 23 1996**

Suplement nr 7

**Redaktor Jacek Kuźnicki**

**Mechanizmy regulacji ekspresji  
genów eukariotycznych**

# Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Maciej KAWALEC (biologia, immunologia i immunoterapia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,

Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,

Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel. 340 344, fax 340470.*

---

© Copyright by Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

*Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.*

---

Ark. wyd. 6,0. Ark. druk. 5,0. Oddano do składu we wrześniu 1996 r. Podpisano do druku w październiku 1996 r. Druk ukończono w listopadzie 1996 r.

---

## WPROWADZENIE

W siódmym suplemencie Postępów Biologii Komórki znajdują Państwo sześć artykułów napisanych przez wykładowców konferencji zatytułowanej "Mechanizmy regulacji ekspresji genów eukariotycznych" zorganizowanej przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz Redakcji Postępów Biologii Komórki. Zagadnienia poruszone w artykułach stanowią tylko mały wycinek wiedzy na ten temat i odzwierciedlają przede wszystkim zainteresowania badawcze autorów. Poniższy zbiór artykułów nie powinien zatem być traktowany jako próba całościowego przedstawienia problemu regulacji ekspresji genów eukariotycznych, a jedynie jako omówienie fragmentu tego zagadnienia.

Poziom ekspresji genów u *Eukaryota* to nie tylko problem regulacji transkrypcji, ale również regulacji dojrzewania, transportu i stabilności mRNA, a także syntezy, modyfikacji potranslacyjnych, stabilności i degradacji białek. I choć inicjacja transkrypcji jest niewątpliwie kluczowym etapem, na którym dokonuje się regulacja ekspresji genów, to należy pamiętać o tym, że obecność i aktywność białek w poszczególnych typach komórek i okresach życia organizmu to efekt wieloetapowego i złożonego procesu. W procesie tym ważna jest nie tylko szybkość i ilość tworzonego transkryptu, dojrzewanie mRNA i synteza łańcucha białkowego, ale i tempo degradacji każdej z tych substancji. Stosowane przez autorów słowo "ekspresja" należy więc traktować odpowiednio szeroko, nie tylko jako ekspresję genu związaną z pojawianiem się określonego transkryptu, ale jako sumę wspomnianych powyżej procesów. Ponadto określenie to jest odnoszone również do sytuacji *in vitro* i odpowiada np. syntezie gromadzących się w próbówce produktów określonego genu.

Zbiór artykułów otwiera praca Andrzeja Jerzmanowskiego, w której autor opisuje, w jaki sposób struktura chromatyny może determinować ekspresję niektórych genów. Następnie Jan Fronk przedstawia wpływ metylacji DNA na aktywność transkrypcyjną niektórych obszarów genomu. Monika Puzianowska-Kuźnicka w swoim artykule opisuje jeden z popularnych modeli do wybranych badań regulacji transkrypcji – *Xenopus laevis*. Jacek Kuźnicki i Wiesława Leśniak przedstawiają niektóre mechanizmy regulacyjne odpowiedzialne za komórkowo specyficzną ekspresję genów. Artykuł Bożeny Kamińskiej dotyczy czynników transkrypcyjnych, których aktywacja ulega zmianie w odpowiedzi na bodźce zewnątrzkomórkowe. Zeszyt zamyka artykuł Ewy Bartnik i Roberta Kucharskiego, w którym omawiają oni udział Białka Wiążącego TATA-box w aktywności eukariotycznej polimerazy RNA.

*Jerzy Kawiak, Jacek Kuźnicki*

W październiku 1996 r.



## STRUKTURA CHROMATYNY A REGULACJA EKSPRESJI GENÓW

### CHROMATIN STRUCTURE AND THE REGULATION OF GENE EXPRESSION

ANDRZEJ JERZMANOWSKI

Pracownia Biologii Molekularnej Roślin, Uniwersytet Warszawski  
i Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

*Streszczenie.* Obecność nukleosomów w rejonach DNA zawierających sekwencje regulatorowe promotorów genów stanowi przeszkodę dla transkrypcji *in vitro*. Genetyczna i biochemiczna analiza mechanizmu transkrypcji *in vivo* wskazuje, że integralnym składnikiem aparatu transkrypcyjnego są wielkie kompleksy białkowe zdolne do reorganizacji strukturalnej nukleosomów. Dotychczasowe dane o funkcji histonu H1 w regulacji transkrypcji wskazują, że nie pełni on roli globalnego represora transkrypcji bierze natomiast udział w specyficznej regulacji niektórych genów.

*Słowa kluczowe:* nukleosomy, transkrypcja

*Summary.* The presence of nucleosomes on DNA containing the regulatory sequences of gene promoters impedes transcription in the *in vitro* systems. Genetic and biochemical analysis of the mechanism of cellular transcription indicates that the transcriptional apparatus contains, as its integral element, the large multiprotein complexes capable of inducing the structural reorganization of nucleosomes. Available data on the transcriptional role of histone H1 indicate that it is not a global transcriptional repressor but it may specifically regulate certain types of genes.

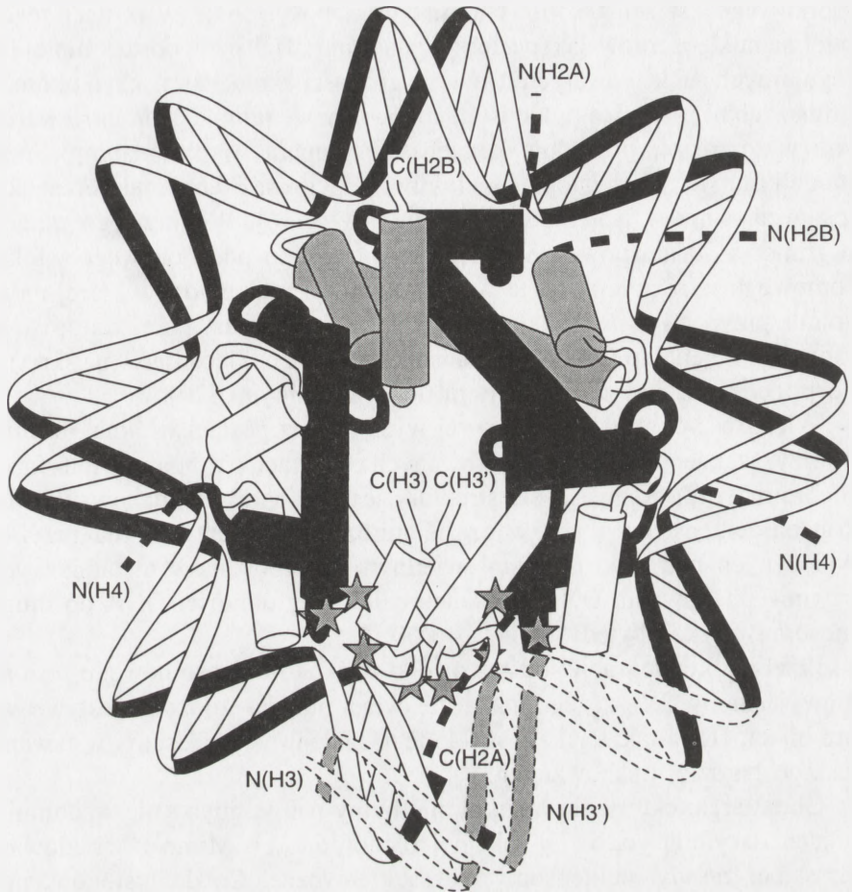
*Key words:* nucleosomes, transcription

## ARCHITEKTURA CHROMATYNY

W 1994 r. minęło dwadzieścia lat od odkrycia nukleosomu (rys. 1), podstawowej jednostki strukturalnej chromosomów eukariotycznych [8]. Odkrycie to, datujące się jeszcze sprzed "ery biologii molekularnej", było punktem zwrotnym w badaniach

chromatyny. Skomplikowane i na ogół niezbyt jasne modele przedstawiające organizację DNA i histonów w chromosomach ustąpiły miejsca prostemu i zrozumiałemu obrazowi identycznych paciorków na sznurku. Paciorkami są oczywiście nukleosomy, z których każdy w rzeczywistości składa się z liczącego około 200 par zasad odcinka DNA owiniętego blisko dwukrotnie wokół białkowego rdzenia utworzonego przez osiem cząsteczek histonów. W skład białkowego oktameru wchodzi po dwie cząsteczki każdego z czterech rodzajów histonów: H2A, H2B, H3 i H4, zwanych histonami rdzeniowymi. DNA i oktamer histonowy tworzą cząstkę rdzeniową nukleosomu. Kompletny nukleosom zawiera jeszcze jedną cząsteczkę białka zaliczanego do rodziny histonów. Jest to cząsteczka histonu H1, zwanego też histonem łącznikowym (ang. *linker histone*), ponieważ oddziałuje także z DNA łączącym cząstki rdzeniowe sąsiadujących nukleosomów. Ułożenie H1 w stosunku do DNA jest zupełnie inne niż ułożenie histonów rdzeniowych. Leży on na zewnątrz cząstki rdzeniowej w miejscu, w którym heliks DNA wchodzi i schodzi z powierzchni białkowego rdzenia. Takie ułożenie czyni z H1 kluczowy element stabilizujący pozycję końców DNA na powierzchni oktameru histonowego. Regularność budowy nukleosomowych cząstek rdzeniowych umożliwiła uzyskanie preparatów krystalicznych nadających się do rentgenograficznej analizy strukturalnej. Dzięki temu wiemy dziś, że rdzeń histonowy jest trójczęściowy i składa się z dwóch heterodimerów H2A–H2B przylegających z przeciwległych stron do centralnego tetrameru (H3–H4)<sub>2</sub> zbudowanego z dwóch heterodimerów H3–H4. DNA może się owijać wokół szpulki, jaką tworzy histonowy oktamer dzięki charakterystycznemu ukształtowaniu powierzchni kompleksu białkowego (rys. 1). Znajdują się na niej miejsca silnie wiążące DNA, a także regularnie rozmieszczone rowki i bruzdy ułatwiające ściśle przyleganie podwójnego heliksu do powierzchni białka. Powstawanie regularnej struktury rdzenia białkowego związane jest ze zdolnością cząsteczek histonów rdzeniowych do tworzenia heterodimerów. Histony zawdzięczają ją motywowi zwanemu "zwinięciem histonowym" (ang. *histone fold*), który umożliwia dwóm cząsteczkom tworzącym heterodimer ściśle dopasowanie do siebie, podobne do dopasowania dwóch dłoni w uścisku. Zwinięcie histonowe jest bardzo charakterystycznym i konserwowanym ewolucyjnie motywem przestrzennym. Występuje w cząsteczkach histonów pochodzących z różnych organizmów i różniących się od siebie znacznie strukturą pierwszorzędową. O znaczeniu ewolucyjnym tego motywu przestrzennego świadczy fakt, że zidentyfikowano go również w histonopodobnych białkach archebakterii. Być może jest to jeden z najstarszych i najbardziej podstawowych motywów umożliwiających dimeryzację cząsteczek białek zasadowych i tworzenie struktur służących do organizacji przestrzennej DNA [1].

Motyw zwinięcia histonowego nie występuje jednak w cząsteczce histonu H1. Wbrew swojej nazwie zatem, H1 nie należy do tej samej prastarej rodziny białkowej co histony rdzeniowe. Globulama część H1 zawiera za to domenę przestrzenną, która jest uderzająco podobna do domeny wiążącej się z DNA czynnika trans-



Rys. 1 Schemat ułożenia DNA na powierzchni cząstki rdzeniowej nukleosomu: gwiazdki oznaczają mutacje w cząsteczkach histonów rdzeniowych powodujące zniesienie efektów mutacji w genach *Swi/Snf*; na rysunku oznaczone zostały N- i C-końcowe fragmenty cząsteczek histonów (wg [21])

krypcyjnego HNF-3 [12]. W cząsteczkach obu białek jest to wiązka trzech odcinków  $\alpha$ -helikalnych przytwierdzonych do antyrównolegle przebiegających łańcuchów potrójnej  $\beta$ -kartki. Nie wykluczone, że H1 jest bliżej spokrewniony z czynnikami transkrypcyjnymi niż z typowymi histonami.

Zarówno cząsteczki histonów rdzeniowych, jak i cząsteczka H1, oprócz części globularnej mają jeszcze słabo zestruturalizowane "ogony". W histonach rdzeniowych ogon stanowi N-końcowy fragment cząsteczki. W H1 zarówno N-, jak i C-końcowe fragmenty peptydowe tworzą niezestruturalizowane ogony. Ułożenie histonowych ogonów w stosunku do DNA, podobnie jak ich funkcja w chromatinie, są wciąż słabo poznane.

W środowisku komórkowym, to jest w warunkach fizjologicznego, zewnątrzko-

mórkowego stężenia soli, chromatyna nie występuje w postaci rozciągniętego włókna nukleosomowego (paciorków na sznurku), lecz w postaci mniej lub bardziej regularnych pałeczkowatych struktur o grubości około 30 nm, czyli około trzykrotnie grubszych niż średnica nukleosomu. Również w warunkach *in vitro* wzrost stężenia soli w roztworze powoduje kondensację preparatów chromatyny. Spośród kilku modeli tłumaczących budowę i właściwości włókna 30 nm, najszerzej akceptowany jest wciąż model "solenoidu" [Thoma i wsp. 16]. Według tego modelu włókno o grubości 30 nm powstaje na skutek spiralizacji podstawowego włókna nukleosomowego w regularną pustą w środku cewkę (solenoid), w której na jeden skok spirali przypada 6 nukleosomów. Jednak postulowana przez autorów stałość parametrów solenoidu (grubość, skok spirali, liczba nukleosomów na skręt) jest trudna do pogodzenia z wieloma danymi doświadczalnymi [20].

Większość chromatyny jądrowej występuje w postaci włókna 30 nm. W czasie mitozy, a także w silnie skondensowanych obszarach chromatyny interfazowej (heterochromatynie) pojawiają się struktury jeszcze bardziej upakowane. Maksymalna kondensacja osiągnana jest w czasie mitozy, kiedy chromatyna przybiera postać widocznych pod mikroskopem świetlnym chromosomów metafazowych. Współczynnik upakowania DNA (stosunek całkowitej długości DNA do długości chromosomu) wynosi wtedy około 10 000.

Przebieg kondensacji podstawowego włókna nukleosomowego pozostaje wciąż niewyjaśniony. W szczególności nie wiadomo, jak ułożony jest we włóknie 30 nm histon H1, a także jaka jest rola tego histonu w procesie powstawania struktur jeszcze bardziej upakowanych.

Obraz architektury chromatyny nie byłby pełny, gdyby nie wspomnieć o czynnikach decydujących o jej lokalnej różnorodności. Mimo iż zbudowane według tej samej zasady, nukleosomy nie są identyczne. Co do histonów, po pierwsze u większości organizmów wykazują one znaczną zmienność niealleliczną, np. u ssaków w jednej komórce może występować 6–9 różnych wariantów sekwencyjnych histonu H1, po drugie ulegają w komórce różnorodnym modyfikacjom. Wydaje się, że rozkład w chromatynie zarówno wariantów sekwencyjnych, jak i modyfikowanych form histonów jest nierównomierny. Co do DNA, różne jego sekwencje różnią się znacznie podatnością na zginanie. Zbyt duża sztywność podwójnego heliksu znacznie utrudnia owijanie się DNA wokół oktameru histonowego. Z drugiej strony, niektóre naturalnie występujące sekwencje DNA wykazują wyraźną preferencję do formowania nukleosomu. Zwykle, sekwencje takie stabilizują nukleosom w konkretnym miejscu DNA. Przejawem lokalnej różnorodności strukturalnej włókna nukleosomowego jest także zmienna długość łącznikowego DNA. W tej samej chromatynie cząstki rdzeniowe sąsiadujących nukleosomów mogą się znajdować dalej lub bliżej siebie [21].



## FUNKCJA CHROMATYNY

U bakterii, których DNA występuje również w postaci kompleksu nukleoproteinowego, nie wykryto histonów ani regularnych struktur analogicznych do nukleosomów. Rodzi to pytanie o funkcje nukleosomów w komórce eukariotycznej.

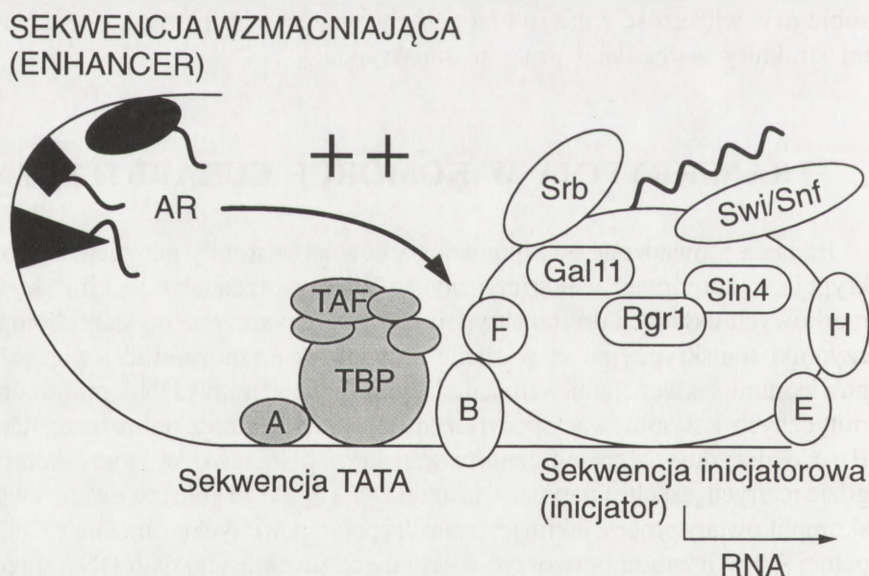
Każda z komórek organizmu ludzkiego zawiera DNA długości około 2 metrów. Upakowanie takiej ilości materiału genetycznego w jądrze komórkowym o średnicy 3,4–20  $\mu\text{m}$  nie jest sprawą trywialną. Chodzi tu przy tym o upakowanie umożliwiające nie tylko transkrypcję wybranych genów, lecz i replikację całości DNA oraz precyzyjny podział materiału genetycznego w trakcie mitozy i mejozy. Wprawdzie nie wszystkie eukarionty zawierają w swoich komórkach aż tyle DNA co komórki ludzkie, jednak zawartość DNA w komórkach organizmów eukariotycznych jest ogólnie znacznie wyższa niż w komórkach bakterii. Trudno oprzeć się wrażeniu, że powstanie regularnej struktury nukleosomowej było istotnym, jeśli nie najważniejszym elementem adaptacji ewolucyjnej na poziomie molekularnym, która umożliwiła kiedyś eukariontom skokowe zwiększenie zawartości DNA. Wśród biologów zajmujących się chromosomami nikt wprawdzie nie kwestionuje znaczenia powyższej korelacji, mało kto jednak uważa, że rozwiązuje ona całkowicie problem funkcji chromatyny (nie bez znaczenia jest tu fakt, że wnioski dotyczące adaptacyjnego znaczenia przeszłych wydarzeń ewolucyjnych trudno jest na ogół zweryfikować doświadczalnie). Problem, który można analizować doświadczalnie i który stawia sobie dziś większość z nas, od lat zajmujących się chromatyną, dotyczy znaczenia tej struktury w regulacji procesu transkrypcji.

## TRANSKRYPCJA W KOMÓRCE EUKARIOTYCZNEJ

Badania prowadzone od kilku dziesiątków lat odsłoniły już wiele tajemnic transkrypcji w komórkach eukariotycznych. Wiemy przede wszystkim, że w bezkomórkowych układach do transkrypcji *in vitro* oczyszczone do stanu homogenności czynniki transkrypcyjne są w stanie prawidłowo rozpoznawać i wiązać się z odpowiednimi sekwencjami wzmacniającymi (enhancerami) DNA promotorów eukariotycznych i stymulować specyficzną transkrypcję przez polimerazę RNA II (pol II). Co decyduje o specyficzności transkrypcji *in vivo*, w jądrze komórkowym, gdzie matrycą jest chromatyna, a nie nagi DNA? Fakt że konserwowany ewolucyjnie, skomplikowany proces, jakim jest transkrypcja eukariotyczna, można z zachowaniem pełnej specyficzności odtworzyć w próbówce zawierającej nagi DNA, przekonywał jeszcze do niedawna, że o specyficzności, a także o regulacji procesu transkrypcji decydują te same czynniki, które działają *in vitro*, czyli przede wszystkim białkowe aktywatory i czynniki transkrypcyjne oddziałujące ze składnikami kompleksu po-

pleksu polimerazy II. Jednak dzisiaj coraz więcej danych genetycznych i biochemicznych wskazuje, że dodatkowy, ważny wpływ regulatorowy na przebieg procesu transkrypcji mają elementy strukturalne chromatyny.

Minimalny zestaw wymagany do wiernej transkrypcji *in vitro* zawiera czynniki transkrypcyjne: TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, polimerazę II i w przypadku niektórych układów *in vitro*, czynnik TFIIA (rys. 2). *In vitro*, pierwszym etapem inicjacji transkrypcji jest przyłączenie się TFIID do elementu TATA w DNA. TFIID jest w istocie wieloskładnikowym kompleksem białkowym złożonym z wiążącego się z sekwencją TATA białka TBP (ang. *TATA Binding Protein*) i około 10 czynników określanych skrótem TAF (ang. *TBP Associated Factor*) zasocjowanych z TBP. U większości badanych pod tym względem organizmów (wyjątkiem są drożdże) kompleks TBP-czynniki TAF jest wyjątkowo stabilny. Przepuszczalnie właśnie w tej postaci TBP rozpoznaje sekwencję TATA i wiąże się z nią *in vivo*. Doświadczenia *in vitro* wskazują, że pozostające w kompleksie z TBP czynniki TAF są głównymi elementami, z którymi oddziałują domeny aktywujące specyficznych aktywatorów związanych z sekwencjami regulatorowymi enhancerów (rys. 2) [17]. Aktywatory te stymulują także tworzenie się kompleksu między TFIID, TFIIA i sekwencją TATA. Utworzenie kompleksu między TBP i zasocjowanymi z nim białkami a sekwencją TATA oraz dołączenie aktywatorów do sekwencji regulatorowych enhancerów uznać można za dwa kluczowe wydarzenia w inicjacji transkrypcji. Trzecim, nie mniej ważnym, jest pojawienie się w miejscu startu transkrypcji holoenzymu



Rys. 2. Schemat inicjacji transkrypcji u eukariontów (wg [15]): TATA – sekwencja TATA w DNA, TBP – białko wiążące się z TATA (ang. *TATA binding protein*), TAF – czynniki określone tym skrótem (ang. *TBP Associated Factor*), czynniki transkrypcyjne II: A, B, E, F, H (TFII), polII – polimeraza DNA II

polimerazy II. Holoenzym pol II podobnie jak TFIID jest wieloskładnikowym kompleksem białkowym. Zawiera większość spośród tak zwanych podstawowych czynników transkrypcyjnych (TFIIB, TFIIF, TFIIH, TFIIE), zidentyfikowanych swego czasu dzięki zastosowaniu układu do transkrypcji *in vitro*. Oprócz nich zawiera jednak wiele dodatkowych białek, przede wszystkim z rodziny Srb (oznaczanych indeksem od 2 do 11), a także Gal11, Sin4, Rgr1 (rys. 2), których nie udało się wykryć wyłącznie za pomocą badań nad transkrypcją *in vitro*. Zidentyfikowano je dopiero dzięki analizie mutacji powodujących różnorodne zakłócenia transkrypcji u drożdży. Analiza tego rodzaju mutantów doprowadziła też do wykazania, że polimeraza II jest w istocie częścią ogromnego, wieloskładnikowego kompleksu, którego białka, np. z grupy Srb, mogą być celem specyficznych oddziaływań aktywatorów transkrypcji [15].

## TRANSKRYPCJA A HISTONY RDZENIOWE

Stwierdzono *in vitro*, że połączenie matrycowego DNA z histonami w chromatynie poważnie ogranicza dostęp białkowych regulatorów transkrypcji do promotorów [15]. Represja spowodowana istnieniem chromatyny dotyka wprawdzie genów wszystkich rodzajów, jednak jej zakres może się różnić w zależności od pozycji, jaką zajmują nukleosomy w stosunku do promotorów, a także od zdolności TBP i aktywatorów do rozpoznawania i wiązania się z DNA pozostającym w kompleksie z histonami. Wyniki, które otrzymano w ostatnich latach, wskazują, że w komórkach eukariotycznych występują czynniki, które są zdolne do zmiany struktury nukleosomów i ułatwiania transkrypcji na matrycach chromatynowych *in vitro*. Klasycznym już przykładem takiego białka jest kompleks SWI/SNF (nazwa wymawiana switch/sniff). Pierwsze informacje o tym, że w bezkomórkowych ekstraktach używanych do przeprowadzania transkrypcji *in vitro* występuje aktywność specyficznie zmieniająca strukturę chromatyny, pochodziły z laboratorium C. Wu w USA, w którym zajmowano się badaniem transkrypcji genów szoku cieplnego. Okazało się, że dodanie czynnika transkrypcyjnego zwanego GAGA do matrycy nukleosomowej zawierającej rozpoznawaną przez ten czynnik sekwencję DNA prowadzi, w obecności ekstraktu z komórek, do zmian w strukturze chromatyny. Wykryta aktywność była zależna od egzogennej energii, obserwowano ją bowiem wyłącznie w obecności ATP. Niedługo później w laboratoriach C. Petersona i J. Workmana w USA zidentyfikowano u drożdży białka, które mogły być odpowiedzialne za typ aktywności opisany przez Wu i jego współpracowników [15].

Jeszcze zanim za pomocą metod biochemicznych wykazano istnienie aktywności reorganizującej nukleosomy, genetycy zajmujący się drożdżami mieli powody przypuszczać, że białka kodowane przez geny *Swi/Snf* mają wiele wspólnego z trans-

krypcją i z histonami. W grupie kilkunastu białek kodowanych przez geny rodziny *Swi/Snf* znajdowała się zależna od DNA ATPaza. Wyłączenie któregośkolwiek z genów *Swi/Snf* (operacja możliwa do przeprowadzenia u drożdży) powodowało zahamowanie transkrypcji wielu innych genów. Efekt ten był odwracany przez mutacje w genach histonów rdzeniowych (rys. 1). Nasunęło to przypuszczenie, że brak sprawnych białek SWI/SNF uniemożliwia neutralizację represji wynikającej z oddziaływań DNA-histony rdzeniowe. Podobieństwo efektów fenotypowych będących następstwem zakłócenia różnych genów *Swi/Snf* stanowiło mocną przesłankę, że produkty tych genów współdziałają ze sobą, prawdopodobnie jako wielobiałkowy kompleks. Dzisiaj wiemy, że białka SWI/SNF (jest ich kilkanaście) są składnikami kolejnego wielkiego kompleksu współpracującego z aparatem transkrypcyjnym. Kompleks wykazuje aktywność zależną od DNA ATPazy i w obecności ATP jest w stanie dokonywać reorganizacji struktury nukleosomów *in vitro*, która ułatwia wiązanie aktywatorów transkrypcji oraz TBP do odpowiednich sekwencji DNA znajdujących się w obrębie nukleosomów [3].

*In vivo*, kompleks SWI/SNF jest niezbędny do transkrypcji tylko niektórych genów. Nie jest on niezbędny do wzrostu komórek. Mimo istniejących wcześniej przesłanek (jedno z białek z rodziny SNF okazało się identyczne z białkiem G3 wchodzącym w skład czynnika transkrypcyjnego TFIIF) większość badaczy zajmujących się chromatyną i transkrypcją była zaskoczona dokonaniem w 1996 r. przez Younga i wsp. odkryciem, że kompleks SWI/SNF jest integralną częścią holoenzymu pol II i nadaje mu zdolność do reorganizacji nukleosomów [9]). Obecność kompleksu SWI/SNF w holoenzymie pol II rozwiązuje problem transportu białek SWI/SNF do odpowiednich promotorów. Pojawia się jednak nowa zagadka. Trudno wątpić, że holoenzym pol II bierze udział w transkrypcji wszystkich genów jądrowych. Jeżeli kompleks SWI/SNF jest jego integralnym składnikiem, dlaczego mutacje w *Swi/Snf* zakłócają transkrypcję tylko niektórych, nie zaś wszystkich genów? Być może częściowej odpowiedzi na to pytanie dostarczają ostatnie doniesienia o wykryciu kolejnych kompleksów białkowych, takich jak NURF (*Nucleosome Remodelling Factor*) z *Drosophila*, zdolnych dokonywać reorganizacji nukleosomów *in vitro* [9]. Czyżby różne geny wymagały różnych czynników rozluźniających nukleosomy?

Dodanie nowych elementów do i tak już niezmiernie złożonego obrazu transkrypcji eukariotycznej obciąża wprawdzie dodatkowo pamięć, rozwiązuje jednak niejasną do tej pory kwestię inicjacji transkrypcji na DNA ściśle owiniętym wokół histonowego rdzenia nukleosomu.

Nie wspominam tu szerzej o białkach o funkcji antagonistycznej w stosunku do funkcji białek SWI/SNF i ich analogów. Białka należące do rodziny Polycomb u *Drosophila*, a także białka rodziny SIR u drożdży działają jako silne represory transkrypcji, ponieważ indukują stabilne struktury heterochromatynowe. W przy-

padku białek SIR wydaje się, że istotne znaczenie dla ich funkcji ma oddziaływanie z niezestrukturalizowanymi fragmentami (ogonami) histonów rdzeniowych [10].

## TRANSKRYPCJA A HISTON H1

Nie wszystkie właściwości chromatyny wynikają z oddziaływań DNA - histony rdzeniowe. Jest jeszcze histon H1. Czy odgrywa on jakąś rolę w modulacji transkrypcji? Wiele za tym przemawia.

Na poparcie tezy o istotnej roli H1 w regulacji genów przytacza się zwykle następujące argumenty:

1) *In vitro* H1 wywiera wyraźny wpływ na proces zależnej od stężenia soli kondensacji i agregacji chromatyny (każdy kto pracował z chromatyną wie, że im mniej w niej H1, tym trudniej wytrąca się ona w punkcie krytycznym dla agregacji, tj. w 0,14 M roztworze chlorku sodu).

2) H1 łączy się z DNA w sposób kooperatywny. Raz zainicjowany proces odkładania H1 może więc przybierać charakter lawinowy obejmując znaczne obszary DNA.

3) H1 występuje w chromatynie w postaci co najmniej kilku wariantów sekwencyjnych, przy czym wydaje się, że rozkład wariantów nie jest całkowicie przypadkowy. Przynajmniej niektóre warianty różnią się powinowactwem do DNA i zdolnością do agregacji chromatyny *in vitro*.

4) H1 ulega licznym modyfikacjom potranslacyjnym. Cykliczna fosforylacja i defosforylacja H1 w trakcie cyklu komórkowego (z maksimum fosforylacji przypadającym w metafazie mitozy) jest jednym z najbardziej spektakularnych, a jednocześnie tajemniczych zjawisk molekularnych zachodzących w trakcie podziałów komórkowych [4, 6, 19].

5) W początkowych etapach rozwoju u zwierząt następuje wymiana wczesnych (zarodkowych) wariantów H1 na późne (dorosłe). Udokumentowano to szczególnie dobrze u szkarłupni (jeżowiec) i płazów (*Xenopus*).

6) Różnicowanie niektórych tkanek skorelowane jest w czasie z wymianą wariantów H1. Klasycznym przykładem jest dojrzewanie jądrzastych erytrocytów u ptaków, w trakcie którego typowy somatyczny H1 zastępowany jest przez inny, bardziej zasadowy wariant zwany histonem H5 [19].

Dodany do układu do transkrypcji *in vitro* H1 działa zwykle jako represor. Jednak nie łatwo jest ustalić, czy efekt ten odzwierciedla rzeczywistą funkcję H1 *in vivo*. Po pierwsze dlatego, że bardzo trudno jest uzyskać zrekonstruowaną *in vitro* chromatynę, w której H1 byłby prawidłowo ułożony (z kolei układy do rekonstrukcji zawierające bezkomórkowe ekstrakty z oocytów *Xenopus* lub zarodków *Drosophila*, które umożliwiają odtworzenie w miarę natywnej chromatyny, zawierają

także dziesiątki dodatkowych czynników białkowych o nieznannej funkcji.) Po drugie dlatego, że efekty H1 w układach *in vitro* obserwuje się zwykle dla stężeń tego białka znacznie przekraczających jego stężenie fizjologiczne. Mimo tych zastrzeżeń, jako roboczą hipotezę przyjmuje się na ogół, że H1 jest generalnym represorem transkrypcji. Niestety, nie ma żadnych danych o tym, czy H1 "postrzegany jest" w podobny sposób przez komórkową maszynę transkrypcyjną. Gdyby obecność H1 była dla systemu transkrypcyjnego zawadą (np. na skutek utrzymywania nukleosomów w postaci skondensowanego włókna 30 nm lub struktur jeszcze wyższego rzędu), której usunięcie wymaga dodatkowych czynników, H1 mógłby być doskonałym podłożem dla skutecznego systemu regulacji. Na przykład warianty silniej kondensujące chromatynę wprowadzane byłyby wtedy, gdy wymogi rozwoju lub różnicowania dyktowałyby konieczność rozszerzenia lub wzmocnienia represji. W myśl takiego scenariusza obecność takich, a nie innych wariantów H1 decydowałaby o skali globalnej represji w komórce, a tym samym w dużej mierze o globalnym profilu transkrypcji. Można by sobie także wyobrazić, że różne rejony chromatyny są w różnym stopniu wysyczone H1. Wiadomo, że w nukleosomach oprócz głównego miejsca wiązania H1 istnieje jeszcze co najmniej jedno miejsce dodatkowe. Ponieważ w chromatynie na jeden nukleosom przypada średnio jedna cząsteczka H1, większe stężenie H1 w pewnych rejonach musiałoby być zrekompensowane przez jego brak w innych. Pomijając mechanizm zapewniający takie zróżnicowanie, miałoby ono z pewnością duży wpływ na całkowity obraz transkrypcji. Zupełnie przeciwny pogląd zakłada, że obecność H1 nie jest poważną przeszkodą dla transkrypcji i regulacja na tym poziomie nie odgrywa zasadniczej roli w decydowaniu o globalnej aktywności genów. Oczywiście, nie wyklucza to udziału H1 w regulacji transkrypcji pojedynczych genów.

Kwestia jest daleka od rozstrzygnięcia. Brak typowego H1 u drożdży (jest to kolejna zagadka, która wciąż czeka na wyjaśnienie) uniemożliwia analizę fenotypową mutantów z defektem H1, jak to było możliwe w przypadku histonów rdzeniowych. Ciekawe wyniki przynoszą publikowane w ciągu ostatnich lat badania nad liniami transgenicznymi [13, 14] i całymi transgenicznymi organizmami [11], w których dokonano trwałych zmian w składzie lub ilości histonu H1. Na razie wyniki tych badań przyjmuje się jako dowód, że H1 nie jest regulatorem decydującym o globalnym profilu transkrypcji. Potwierdzają one natomiast wnioski płynące z wielu doświadczeń *in vitro* [2, 7, 5, 18], że transkrypcja niektórych genów może być w wysoce specyficzny sposób regulowana przez H1. Czy H1 może mieć jeszcze inną, nieznaną dotąd funkcję? Na to pytanie wciąż nie ma odpowiedzi.

Udział struktur chromatynowych w regulacji ekspresji genów analizowany jest obecnie najintensywniej w czołowych ośrodkach badań nad transkrypcją, w których dawniej nie przywiązywano większej wagi do histonów. Dla nikogo nie ulega dziś wątpliwości, że właśnie na poziomie chromatyny rozgrywa się wiele zdarzeń do-

tyczących regulacji transkrypcji, które są istotne dla prawidłowego przebiegu rozwoju organizmu i różnicowania komórek.

## LITERATURA

- [1] ARENTS G, MOUDRIANAKIS EW. The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11170–11174.
- [2] BOUVET P, DIMITROV S, WOLFFE AP. Specific regulation of *Xenopus* chromosomal 5S RNA gene transcription *in vivo* by histone H1. *Genes Dev* 1994; **8**: 1147–1159.
- [3] IMBALZANO AN, KWON M, GREEN MK, KINGSTON RE. Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 1994; **370**: 481–485.
- [4] JERZMANOWSKI A, MALESZEWSKI M. Phosphorylation and methylation of *Physarum* histone H1 during mitotic cycle. *Biochemistry* 1985; **24**: 2360–2367.
- [5] JERZMANOWSKI A, COLE RD. Flanking sequences of *Xenopus* 5S RNA genes determine differential inhibition of transcription by H1 histone *in vitro*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10726–10732.
- [6] JERZMANOWSKI A, COLE RD. Partial displacement of histone H1 from chromatin in required before it can phosphorylated by mitotic H1 kinase *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; **267**: 8514–8520.
- [7] KANDOLF H. The H1A histone variant is an *in vivo* repressor of oocyte-type 5S RNA gene transcription in *Xenopus laevis* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7257–7261.
- [8] KORNBERG R. Chromatin structure; a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974; **184**: 868–871.
- [9] KRUDE T, ELGIN SCR. Pushing nucleosomes around. *Curr Biol* 1996; **6**: 511–515.
- [10] NOWAK R. Histones hush yeast mating genes. *Science* 1995; **270**: 1590.
- [11] PRYMAKOWSKA-BOSAK M, PRZEWŁOKA M, IWKIEWICZ J, EGIERSZDORFF S, KURAŚ M, CHAUBET N, GIGOT C, SPIKER S, JERZMANOWSKI A. Histone H1 overexpressed to high level in tobacco affects certain developmental programs but has limited effect on basal cellular functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 10250–10255.
- [12] SCHWABE JWR, TRAVERS AA. What is evolution playing at? *Curr Biol* 1993; **3**: 628–630.
- [13] SHEN XYL, WEIR JW, GOROVSKY MA. Linker histones are not essential and affect chromatin condensation *in vivo*. *Cell* 1995; **82**: 47–56.
- [14] SHEN X, GOROVSKY MA. Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription *in vivo*. *Cell* 1996; **86**: 475–483.
- [15] STRUHL K. Chromatin structure and RNA Polymerase II Connection: Implications for transcription. *Cell* 1996; **84**: 179–182.
- [16] THOMA F, KOLLER T, KLUG A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and in the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* 1979; **83**: 403–427.
- [17] TIJAN R, MANIATIS T. Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 1994; **77**: 5–8.
- [18] TOMASZEWSKI R, JERZMANOWSKI A. The AT-rich flanks of the oocyte-type 5S RNA gene of *Xenopus laevis* act as a strong local signal for histone H1-mediated chromatin reorganization *in vitro*. *Nucl Acids Res* 1996; (w druku).
- [19] VAN HOLDE KE. Chromatin. 1988; Springer Verlag, New York

- [20] VAN HOLDE KE, ZLATANOVA J. Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *J Biol Chem* 1995; **270**: 8373–8377.
- [21] WOLFFE A. Chromatin structure and function. 1995; Academic Press, London.

*Otrzymano: 15.09.1996 r.*

*Przyjęto: 22.10.1996 r.*

*Adres autora: Andrzej Jerzmanowski Pracownia Biologii Molekularnej Roślin  
Uniwersytet Warszawski i Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa*



## UDZIAŁ METYLACJI DNA W REGULOWANIU TRANSKRYPCJI U EUKARIONTÓW

### THE ROLE OF DNA METHYLATION IN THE REGULATION OF TRANSCRIPTION IN EUKARYOTES

JAN FRONK

Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego

*Streszczenie:* W DNA wyższych eukariontów od 5 do 30% reszt cytozynowych ulega metylacji. Metylacja cytozyny jest mutagenna i prowadzi do deficytu dinukleotydu CpG. Niemetylowane wyspy CpG towarzyszą genom podstawowego metabolizmu. Poziom zmetylowania wielu genów zmienia się w czasie różnicowania organizmu i jest odwrotnie proporcjonalny do ich aktywności transkrypcyjnej. Liczne białka oddziałujące z DNA są wrażliwe na jego metylację. Zmetylowanie DNA może wpływać na strukturę chromatyny.

*Słowa kluczowe:* imprinting molekularny, 5-metylocytozyna, mutageneza, różnicowanie, wyspy CpG

*Summary:* In higher eukaryotic DNA between 5 and 30% of cytosines are methylated. Cytosine methylation is mutagenic and leads to a deficit of CpG dinucleotides. Housekeeping genes are accompanied by unmethylated CpG islands. Methylation level of numerous genes changes during differentiation and is inversely proportional to their transcriptional activity. Numerous DNA-binding proteins are sensitive to DNA methylation. DNA methylation may influence the structure of chromatin.

*Key words:* molecular imprinting, 5-methylcytosine, mutagenesis, differentiation, CpG islands

## WPROWADZENIE

W każdej chwili życia komórki wyrażana jest tylko część informacji genetycznej, zapisanej w jej genomie w tysiącach genów. Dotyczy to zarówno najprostszych organizmów jednokomórkowych (prokariotów i niektórych eukariotów), jak i poszczególnych komórek organizmów tkankowych. W komórkach samodzielnych wybiórcza ekspresja informacji genetycznej jest podstawowym mechanizmem za-

pewniającym dostosowanie metabolizmu do zmieniających się warunków zewnętrznych. Cały genom komórki jest potencjalnie aktywny, a o transkrypcji poszczególnych genów, lub jej braku, decydują niemal wyłącznie lokalne i krótkotrwałe oddziaływania białek regulatorowych z drobnocząsteczkowymi ligandami i obszarami regulatorowymi DNA położonymi w sąsiedztwie danego genu.

W komórkach stanowiących część organizmu sytuacja jest znacznie bardziej złożona, bowiem obok konieczności reagowania na chwilowe zmiany parametrów otoczenia każda komórka realizuje także długoterminowy program rozwojowy, podporządkowany nadrzędnemu celowi, jakim jest wytworzenie złożonego organizmu wielokomórkowego. Jak wiadomo, poza nielicznymi wyjątkami (komórki niektórych nicieni, układu immunologicznego) różnicowanie komórek organizmów tkankowych odbywa się przy zachowaniu niezmienionego w stosunku do zygoty zapisu genetycznego. Tak więc muszą istnieć mechanizmy nadrzędne nad zapisem genetycznym, powodujące w trakcie rozwoju osobnika selektywne wyłączenie znacznych części genomu poszczególnych komórek, przy zachowaniu pozostałej części w postaci aktywnej, lub potencjalnie aktywnej. Poznanie takich mechanizmów epigenetycznych jest istotne nie tylko dla zrozumienia wielu podstawowych problemów szeroko rozumianej biologii molekularnej i biologii rozwoju, ale także powinno ułatwić zapobieganie lub skuteczne leczenie chorób, których podłożem jest "niezgodna z planem" ekspresja informacji genetycznej – chorób nowotworowych i zaburzeń rozwojowych.

Epigenetyczne mechanizmy regulatorowe muszą spełniać kilka podstawowych warunków, by mogły kierować procesami różnicowania komórek. Po pierwsze, wytworzone modyfikacje genoforu muszą być stabilne w czasie życia komórki, ale także w trakcie podziałów muszą ulegać powieleniu i wiernemu przekazaniu komórkom potomnym. Po wtóre, modyfikacje takie nie mogą być nieodwracalne, bowiem pozbawiłoby to procesy rozwojowe jakiegokolwiek plastyczności. Po trzecie wreszcie, złożona odpowiedź różnicującej komórki musi być reakcją na stosunkowo prosty bodziec; gdyby nie było tego rodzaju narastającej złożoności w ciągu:

**bodziec pierwotny** ⇨ **odpowiedź I rzędu** ⇨ **odpowiedź II rzędu** ⇨ ⇨ ⇨ .....  
wszelkie procesy rozwojowe byłyby niemożliwe.

Dwie cechy genoforu komórek eukariotycznych wyczerpują podane wyżej wymogi: sposób upakowania DNA w struktury nukleoproteinowe [1] i metylacja zasad w DNA. W dalszej części pracy skoncentruję się tylko na tym drugim zjawisku, ale nie należy zapominać, że obie te cechy mogą być, i najprawdopodobniej są, w złożony sposób ze sobą powiązane. O powiązaniach tych wspomnę w przedostatnim paragrafie artykułu. "Jak metylacja DNA może wpływać na transkrypcję".

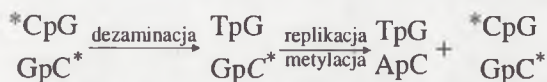
## METYLACJA DNA EUKARIONTÓW

Obok czterech podstawowych zasad w DNA eukariontów odnajduje się także 5-metylocytozynę i w znacznie mniejszych ilościach niekiedy także 6-metyloadeninę. Dalej terminu metylacja DNA będę używać tylko dla określenia metylacji cytozyny w pozycji 5; \*C będzie oznaczać 5-metylocytozynę.

Zmetylowana cytozyna stanowi około 5% całości cytozyny w DNA kręgowców, od 6% do około 40% w DNA roślin kwiatowych, natomiast w poszczególnych gatunkach pozostałych grup taksonomicznych jej zawartość jest zróżnicowana i wynosi od zera do około 5% [2]. Metylacji ulegają głównie cytozyny w palindromowym układzie 5'CpG3', u roślin także 5'CpNpG3' i, w mniejszym stopniu, w innych sekwencjach [3]. Enzym dokonujący tej modyfikacji wykazuje znaczny konserwatyzm ewolucyjny nie tylko w obrębie eukariontów, ale też jest wyraźnie homologiczny z metylotransferazami bakteryjnymi [4,5]. Sugeruje to, że zdolność do metylacji DNA była bardzo wczesną ewolucyjnie cechą, którą niektóre gatunki utraciły. Donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina. Wszystkie zbadane metylotransferazy wykazują bardzo silną aktywność w stosunku do DNA hemimetylowanego  $\begin{matrix} *CpG \\ GpC \end{matrix}$ , co zapewnia podtrzymanie wzoru metylacji DNA po jego replikacji [6].

## METYLACJA DNA JEST MUTAGENNA

Grupa metylowa w pozycji piątej cytozyny zwiększa około dwudziestokrotnie łatwość dezaminacji cytozyny z wytworzeniem tyminy [7], w wyniku czego powstaje obszar niesparowany w DNA, którego replikacja, o ile nie zostanie poprzedzona naprawą, prowadzi do utrwalenia mutacji (tranzycji C:G → T:A):



Istnieje wprawdzie wyspecjalizowany układ naprawczy [8], preferencyjnie wycinający T z obszaru  $\begin{matrix} TpG \\ GpC^* \end{matrix}$  ale jego wydajność nie jest wystarczająca dla zapobieżenia mutagenezie według opisanego scenariusza. Stwierdzono, że ponad 30% mutacji punktowych w chorobach nowotworowych i genetycznych człowieka jest wynikiem takich właśnie mutacji [7,9,10].

## WYSPY CpG

Tendencja układu  $\begin{matrix} *CpG \\ GpC* \end{matrix}$  do mutowania w kierunku  $\begin{matrix} TpG \\ ApC \end{matrix}$  ma interesującą konsekwencję ewolucyjną: w genomach organizmów intensywnie metylujących DNA (np. ssaków) częstość dinukleotydu 5'CpG3' jest około pięciokrotnie mniejsza niż losowa, a częstości dinukleotydów TpG i CpA są odpowiednio wyższe ([2,11]). Co ciekawe, rozmieszczenie stosunkowo nielicznych dinukleotydów CpG nie jest przypadkowe: średnio co 100 000 par zasad występują w genomie tzw. wyspy CpG [10,12], odcinki o długości około 1000 par zasad, bogate w pary GC (ponad 50%, przy średniej dla całego genomu ok. 44%), w których zawartość dinukleotydu CpG jest zbliżona do losowej (ok. 6–7%). Wyspy CpG bardzo często pokrywają się z rejonem końca 5' genów, zwłaszcza kodujących enzymy podstawowego metabolizmu (*housekeeping genes*). Wyspy CpG charakteryzują się wyjątkowo niskim poziomem metylacji, co chociaż częściowo może tłumaczyć fakt ich istnienia – po prostu przy braku metylacji nie było presji mutacyjnej prowadzącej do eliminacji dinukleotydu CpG. Warto tu jeszcze raz podkreślić, że – uwzględniając wysoką zawartość par GC w wyspach – częstość występowania w nich dinukleotydu CpG **nie** przekracza losowej.

W pozostałych 99% genomu dinukleotyd CpG występuje stosunkowo regularnie, przy czym w większości (60–90%) przypadków zawiera zmetylowaną cytozynę. Wynika z tego prosty wniosek: skoro rozproszone dinukleotydy CpG są w dużym stopniu zmetylowane (także w linii komórek generatywnych), metylacja cytozyny sprzyja jej przekształceniu w tyminę, a mimo to nie nastąpiła w ewolucji eliminacja tych dinukleotydów – oznacza to, że ich istnienie w tych miejscach genomu jest konieczne dla poprawnego funkcjonowania komórki. Liczne obserwacje potwierdzają słuszność tego rozumowania.

## PRAWDOPODOBNE FUNKCJE METYLACJI DNA

Setki prac dokumentują korelację stopnia zmetylowania genów, zwłaszcza ich regionów 5', z intensywnością ich transkrypcji [2,13,14]. W ogromnej większości przypadków geny nieaktywne transkrypcyjnie są silniej zmetylowane. Należy tu podkreślić, że tylko w stosunkowo nielicznych przypadkach szczegółowo śledzono kinetykę zmian aktywności transkrypcyjnej i metylacji w trakcie różnicowania; w tych przypadkach **masowa** metylacja DNA następowała najczęściej bezpośrednio **po** ustaniu transkrypcji, natomiast rozpoczęcie transkrypcji genów uprzednio nieaktywnych było poprzedzane ich demetylacją.

W komórkach samic ssaków nieaktywna kopia chromosomu X jest silnie zmetylowana, kopia aktywna – znacznie słabiej [15,16]. Podanie dzielącym się komórkom inhibitorów metylacji DNA (np. 5-azacytydyny) prowadzi do demetylacji DNA i równoległego uaktywnienia transkrypcji genów normalnie w komórkach tego typu nieaktywnych [17,18,19]; uaktywnieniu ulega m.in. uprzednio nieaktywna kopia chromosomu X [20]. Podobnie, aktywność transkrypcyjna DNA sztucznie wprowadzonego do komórek jest uzależniona od tego, czy wprowadzony DNA był, czy nie był, zmetylowany [21–23].

Metylacja DNA leży zapewne u podstaw zjawiska tzw. imprintingu molekularnego (*molecular imprinting*; nie sądzę, by termin ten należało spolszczać, postępując się wprowadzonym przez etologów terminem "wpajanie") – zróżnicowania aktywności transkrypcyjnej matczyńskich i ojcowskich alleli genów somatycznych [24,25]. Zjawisku temu podlega m.in. kilka genów, których mutacje powodują u ludzi poważne zaburzenia rozwoju.

Usunięcie genu kodującego metylotransferazę DNA z genomu myszy prowadzi do zaburzeń rozwojowych, powodujących w efekcie obumarcie zarodka [26]. Co ciekawe, wyizolowane totipotentne komórki wczesnego zarodka w hodowli *in vitro* nie wykazują żadnych widocznych zaburzeń, mimo bardzo niskiego poziomu metylacji DNA.

Obniżenie zawartości w pokarmie związków uczestniczących w procesach metylacji (witaminy B12, metioniny, choliny, kwasu foliowego) prowadzi do obniżenia ogólnego poziomu metylacji DNA i zmiany wzoru metylacji i jednocześnie znacząco zwiększa częstość nowotworów wątroby [27]. W bardzo wielu nowotworach ogólny poziom metylacji DNA jest obniżony [9,10], co być może ma związek z podwyższonym poziomem transkrypcji wielu onkogenów i ogólnym "odróżnicowaniem" komórek. Zgodnie z tymi obserwacjami, substancje hamujące metylację DNA są kancerogenami. Szczep myszy, dziedzicznie podatnych na nowotworzenie, wykazuje brak metylacji jednego miejsca w onkogenie *ras*, które u myszy "normalnych" jest zmetylowane [28]. W spontanicznych przypadkach glejaka siatkówki (retinoblastoma) niekiedy nie dochodzi do mutacji w genie *Rb* (który jest antyonkogenem), a tylko do **podwyższonej jego metylacji** i w konsekwencji do silnego osłabienia transkrypcji [29]. Metylacja DNA hamuje zdolność transposonów roślinnych do przemieszczania w genomie [30] i rekombinację somatyczną genów immunoglobulin [31].

U roślin wprowadzone sztucznie do genoforu odcinki DNA ulegają stopniowej metylacji i inaktywacji transkrypcyjnej [18,32]; proces ten zachodzi wydajnie w przypadku wprowadzenia kilku kopii obcej sekwencji nukleotydowej lub gdy wykazuje ona znaczące podobieństwo do sekwencji własnych komórki. Zjawisko to stanowić może poważne utrudnienie przy próbach konstruowania roślin transgenicznych.

W literaturze powszechny jest obecnie pogląd, że pierwotnym ewolucyjnie zadaniem metylacji DNA była obrona przed transformacją komórek przez obcy DNA (pasożytów komórkowych, komórek wchłoniętych w wyniku fagocytozy) [33,34].

## JAK METYLACJA DNA MOŻE WPŁYWAĆ NA TRANSKRYPCJĘ

Mimo obszernie udokumentowanych związków między aktywnością transkrypcyjną a stopniem zmetylowania odcinka DNA stosunkowo mało wiadomo o mechanizmach tej zależności. Jeszcze mniej wiadomo o przyczynach, powodujących wybiórczą metylację i demetylację poszczególnych reszt cytozyny.

Postulowano trzy główne mechanizmy wpływu metylacji DNA na transkrypcję: bezpośrednie blokowanie oddziaływań czynników transkrypcyjnych z DNA, istnienie białek preferencyjnie wiążących zmetylowany DNA i uniemożliwiających tym samym wiązanie czynników transkrypcyjnych i przyjmowanie przez zmetylowany DNA zwartej struktury chromatynowej. Znalezione dowody doświadczone na poparcie każdej z powyższych hipotez.

Metylacja C w rozpoznawanej przez białko cMyc sekwencji CACGTG umożliwia jego wiązanie [35]; podobnie, metylacja osłabia wiązanie z DNA wielu innych czynników transkrypcyjnych [2,36,37].

Znalezione szereg białek preferencyjnie wiążących zmetylowany DNA [38–40]. Dwa z nich, najlepiej scharakteryzowane, mają bardzo różne wymagania: MCP1 wiąże odcinki DNA zawierające przynajmniej 12 par dinukleotydów \*CpG [41], MCP2 do wiązania wystarcza obecność jednej pary \*CpG [42]. Związanie MCP1 z rejonem promotora genu hamuje transkrypcję, przy czym *in vivo* efekt ten jest wypadkową dwóch parametrów: liczby zmetylowanych CpG (a co za tym idzie, zapewne także siły związania i być może także liczby cząsteczek MCP1) i siły promotora; obecność silnego enhancera może przeważać i doprowadzić do transkrypcji słabo zmetylowanego obszaru. Przy dużej gęstości metylacji do transkrypcji nie dochodzi.

Warto podkreślić, że oparte na stosunkowo licznych doniesieniach [38,43] domniemanie, jakoby histony H1 wykazywały znaczną preferencję wiązania zmetylowanego DNA nie są powszechnie akceptowane [44,45].

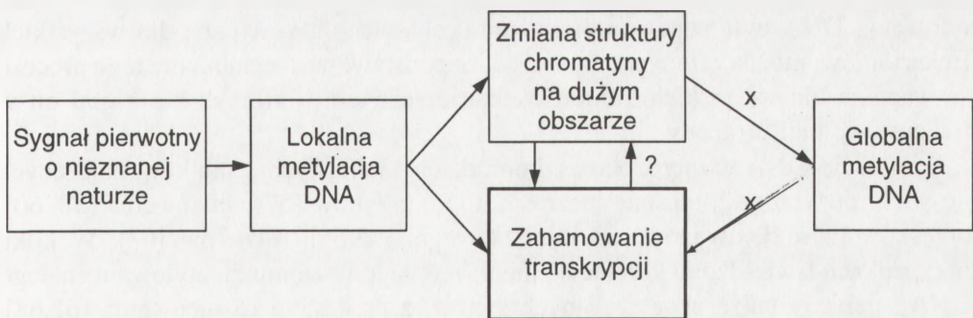
Szereg obserwacji i eksperymentów wskazuje na rolę struktury chromatyny w regulowaniu transkrypcji przez metylację DNA [1,19,46]. DNA heterochromatyny jest znacznie silniej zmetylowany, niż w euchromatynie. W wielu przypadkach hamujący efekt metylacji ujawnia się dopiero po utworzeniu chromatyny na DNA. Chromatyna tworząca się na zmetylowanym DNA jest znacznie bardziej zwarta,

niż na DNA niezmetylowanym [21,31], przy czym wpływ metylacji rozciąga się także na stosunkowo dużą odległość na przyległe obszary niezmetylowane [22,23,47].

Nie należy także lekceważyć następujących, powszechnie znanych faktów: poszczególne pętle chromatynowe zachowują topologiczną niezależność i wykazują silną negatywną superhelikalność, która zwykle jest ustabilizowana w wyniku związania DNA z rdzeniem nukleosomów, ale niekiedy przejawia się nieskompensovanym ujemnym naprężeniem torsyjnym; w genomie eukariontów występują lokalnie obszary bogate w naprzemiennie ułożone nukleotydy purynowe i pirymidynowe  $(PuPy)_n$ , m.in  $(CpG)_n$ ; pod wpływem silnych ujemnych naprężeń torsyjnych takie sekwencje mogą przyjmować strukturę Z, co dramatycznie obniża naprężenie torsyjne; przejściu DNA ze struktury B w Z sprzyja metylacja cytozyny; obniżenie ujemnego naprężenia torsyjnego utrudnia rozplecenie podwójnego heliksu DNA, a zatem utrudnia inicjację transkrypcji. W tym kontekście dużego znaczenia nabiera obserwacja, że metylacja DNA hamuje aktywność topoizomerazy II i, zależnie od położenia zmetylowanej cytozyny, może hamować lub stymulować aktywność topoizomerazy I [48].

Charakter czynników i bodźców decydujących *in vivo* o metylacji/demetylacji poszczególnych zasad pozostaje nieznan. W kilku przypadkach udało się natomiast zidentyfikować odcinki DNA, których obecność powoduje specyficzną metylację lub demetylację obszarów przyległych [49–52].

Przy obecnym stanie wiedzy wyłaniający się ogólny model udziału metylacji DNA w regulowaniu aktywności transkrypcyjnej w różnicujących komórkach przedstawia się następująco:



Przejścia oznaczone x miałyby charakter zmian wtórnych, stabilizujących obszar genoforu w stanie nie sprzyjającym transkrypcji. Model ten nie uwzględnia przypadku stosunkowo nielicznych genów, które wykazują wysoką aktywność transkrypcyjną w stanie zmetylowanym.

Powyższe rozważania dotyczą fazy rozwoju, w której następuje wzrost spe-

cializacji komórek. Jest oczywiste, że w którymś momencie cyklu życiowego musi nastąpić "odróżnicowanie" skrajnie wyspecjalizowanych komórek rozrodczych (o silnie zmetylowanym genomie) i wytworzenie totipotencyjnych komórek wczesnego zarodka. Istotnie, taka faza "wymazania" (ang. *erasure*) z niemal kompletną demetylacją DNA następuje na etapie moruli i utrzymuje się we wczesnej blastuli, po czym dochodzi do masowej metylacji, a następnie selektywnej demetylacji genów specyficznych tkankowo [10,53]. W późniejszych fazach rozwoju dochodzi do ponownej metylacji niektórych genów [54].

Omawiane dotychczas wnioski na temat roli metylacji DNA wysnuto na podstawie wyników badań komórek ssaków i – w znacznie mniejszym stopniu – roślin kwiatowych. Jak zauważył jeden z najbardziej zasłużonych badaczy metylacji DNA, Adrian Bird, mimo intensywnej pracy wielu ośrodków postęp w tej dziedzinie jest raczej skromny, gdyż tak się złożyło, że najpopularniejsze i najdogodniejsze do analiz i manipulacji genetycznych obiekty doświadczalne – *Drosophila sp.*, *Caenorhabditis sp.*, *Saccharomyces sp.*, (*Dictyostelium sp.*, [55] dopisek JF) – mają niezmetylowany DNA [56].

## METYLACJA DNA U NIŻSZYCH EUKARIONTÓW

Trudno się zatem dziwić, że równoległe z badaniami metylacji DNA u zaawansowanych ewolucyjnie organizmów o bardzo dużym genomie, złożonych procesach rozwojowych i stosunkowo słabo poznanej genetyce – ssaków i roślin kwiatowych – prowadzone są poszukiwania prostszych eukariotów, które mogłyby stanowić dogodniejszy obiekt do badania tego zjawiska. Przypomnę, że zdolność do metylowania DNA była zapewne pierwotną cechą charakterystyczną dla wszystkich Eukariotów, można zatem przypuszczać, że podstawowe mechanizmy tego procesu są wspólne dla wszystkich komórek eukariotycznych, u których nie został on w trakcie ewolucji utracony.

Metylację DNA stwierdzono w komórkach nielicznych gatunków należących do wielu dużych grup taksonomicznych, m.in. grzybów [57], śluzowców [58–60], orzęsków [61,62], owadów [63,64], szkarłupni [65,66], mszaków [67]. W kilku przypadkach stwierdzono korelację zmian średniego poziomu zmetylowania całego DNA, niekiedy także poszczególnych genów, z procesami różnicowania [62,68]. W komórkach podstawczaka *Coprinus cinereus* metylacja DNA zapewne uczestniczy, podobnie jak u roślin kwiatowych, w wyłączaniu transkrypcji powtarzających się sekwencji nukleotydowych [69]. Jak dotąd brak dokładniejszych danych dotyczących regulacji procesu metylacji DNA i sposobów, w jaki mogłaby ona uczestniczyć w regulowaniu transkrypcji u tych organizmów, ale można mieć nadzieję,



że dalsze ich badania ułatwią zrozumienie roli metylacji DNA także w procesach różnicowania bliższych nam ze względów praktycznych ssaków i roślin kwiatowych.

## LITERATURA

- [1] WOLFFE AP. Inheritance of chromatin states. *Dev Genet* 1994; **15** : 463–470.
- [2] HERGERSBERG M. Biological aspects of cytosine methylation in eukaryotic cells, *Experientia* 1991; **47**; 1171–1185.
- [3] MEYER P, NIEDENHOF I., ten LOHUIS M. Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida*, *EMBO J.* 1994; **13**; 2084–2088.
- [4] KUMAR S, CHENG X, KLIMASAUSKAS S, MI S, POSFAI J, ROBERTS RJ, WILSON, GG. The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucl Acids Res* 1994; **22**; 1–10.
- [5] ADAMS RLP. Eukaryotic DNA methyltransferases – structure and function, *BioEssays* 1995; **17**: 139–145.
- [6] SMITH SS. Biological implications of the mechanism of action of human DNA (cytosine-5)methyltransferase. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 1994; **49**: 65–11.
- [7] ZHANG X, MATHEWS CK. Effect of DNA cytosine methylation upon deamination-induced mutagenesis in a natural target sequence in duplex DNA. *J Biol Chem* 1994; **269**: 7066–7069.
- [8] GRIFFIN S, KARRAN P. Incision at DNA G T mismatches by extract of mammalian cells occurs preferentially at cytosine methylation sites and is not targeted by a separate G T binding reaction. *Biochemistry* 1993; **32**: 13032–13039.
- [9] JONES PA, RIDEOUT (III) WM, SHEN J-C, SPRUCK CH, TSAI YC. Methylation, mutation and cancer. *BioEssays* 1992; **14**: 33–36.
- [10] LAIRD PW, JAENISCH R. DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1487–1495.
- [11] BIRD AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucl Acids Res* 1980; **8**: 1499–1504.
- [12] MATSUO K, CLAY O, TAKAHASHI T, SILKE J, SCHAFFNER W. Evidence for erosion of mouse CpG islands during mammalian evolution, *Som. Cell Mol Genet* 1993; **19**: 543–555.
- [13] CHRISTOPHE D, PICHON D. DNA methylation and gene activity: towards the end of the debate? *Mol Cell Endocrinol* 1994; **100**: 155–158.
- [14] WEISSBACH A, WARD C, BOLDEN A. Eukaryotic DNA methylation and gene expression. *Curr Topics Cell Regulat* 1989; **30**: 1–21.
- [15] MONK M. Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X-chromosome activity and imprinting. *Phil Trans R Soc Lond B* 1990; **326**: 299–312.
- [16] MONK M. The X chromosome in development in mouse and man, *J. Inherit Metab Dis* 1992; **15**; 499–513.
- [17] GINDER GD, WHITTERS MJ, POHLMAN JK. Activation of a chicken embryonic globin gene in adult erythroid cells by 5-azacytidine and sodium butyrate, *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 3954–3958.
- [18] KILBY NJ, LEYSER HMO, FURNER IJ. Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 1992; **20**: 103–112.
- [19] HAAF T. The effects of 5-azacytidine and 5-azadeoxycytidine on chromosome structure and function: Implications for methylation-associated cellular processes. *Pharmac Ther* 1995; **65**: 19–46.
- [20] GARTLER SM, GOLDMAN MA. Reactivation of inactive X-linked genes. *Dev Genet* 1994; **15**: 504–514.

- [21] KESHET I, LIEMAN-HURWITZ J, CEDAR H. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 1986; **44**: 535–543.
- [22] BRYANS M, KASS S, SEIVWRIGHT C, ADAMS RLP. Vector methylation inhibits transcription from the SV40 early promoter. *FEBS Lett* 1992; **309**: 97–102.
- [23] PICHON B, CHRISTOPHE-HOBERTUS C, VASSART G, CHRISTOPHE D. Unmethylated thyroglobulin promoter may be repressed by methylation of flanking DNA sequences. *Biochem J* 1994; **298**: 537–541.
- [24] RAINIER S, FEINBERG AP. Genomic imprinting, DNA methylation, and cancer. *J Natl Canc Inst* 1994; **86**: 753–759.
- [25] RAZIN A, CEDAR H. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* 1994; **77**: 473–476.
- [26] LI E, BESTOR TH, JAENISCH R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; **69**: 915–926.
- [27] CHRISTMAN JK, CHEN M-L, SHEIKHNEJAD G, DIZIK M, ABILEAH S, WAINFAN E. Methyl deficiency, DNA methylation, and cancer: Studies on the reversibility of the effects of a lipotrope-deficient diet. *J Nutr Biochem* 1993; **4**: 672–680.
- [28] GOODMAN JL, WARD JM, POPP JA, KLAUNIG JE, FOX TR. Mouse liver carcinogenesis: Mechanisms and relevance. *Fund Appl Toxicol* 1991; **17**: 651–665.
- [29] OHTANI-FUJITA N, FUJITA T, AOIKE A, OSIFCHIN NE, ROBBINS, PD, SAKAIT. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 1993; **8**: 1063–1067.
- [30] Van SLUYS M-A, SCORTECCI KC, TEMPE J. DNA methylation associated to Ac element in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 1993; **31**: 805–813.
- [31] HSIEH C-L, LIEBER MR. CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication. *EMBO J* 1992; **11**: 315–325.
- [32] MEYER P, HEIDMANN I. Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 1994; **243**: 390–399.
- [33] BARLOW DP. Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation? *Science* 1993; **260**: 309–310.
- [34] BIRD AP. Functions for DNA methylation in vertebrates, Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1993; **58**: 281–285.
- [35] PRENDERGAST GC, ZIFF EB. Methylation-sensitive sequence specific DNA binding by the cMyc basic region. *Science* 1991; **251**: 186–189.
- [36] COMB M, GOODMAN HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 3975–3982.
- [37] ADAMS RLP. DNA methylation. *Biochem J* 1990; **265**: 309–320.
- [38] JOST J-P, HOFSTEENGE J. The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially *in vitro* and *in vivo* to methylated nonspecific DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9499–9503.
- [39] EHRLICH KC. Characterization of DBPm, a plant protein that binds to DNA containing 5-methylcytosine. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1172**: 108–116.
- [40] ZHANG X-Y, JABRANE-FERRATN, ASIEDUCK, SAMACS, PETERLIN BM, EHRLICH M. The major histocompatibility complex class II promoter-binding protein RFX (NF-X) is a methylated DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 6810–6818.
- [41] BOYES J, BIRD A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of methyl-CpG binding protein. *EMBO J* 1992; **11**: 327–333.
- [42] LEWIS JD, MEEHAN RR, HENZEL WJ, MAURER-FOGY I, JEPPESEN P, KLEIN F, BIRD A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992; **69**: 905–914.
- [43] LEVINE A, YEIVIN A, BEN-ASHER E, ALONI Y, RAZIN A. Histone H1-mediated

- inhibition of transcription initiation of methylated templates *in vitro*. *J Biol Chem* 1993; **268**: 21754–21759.
- [44] NIGHTINGALE K, WOLFFE A. Methylation at CpG sequences does not influence histone H1 binding to a nucleosome including a *Xenopus borealis* 5S rRNA gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4197–4200.
- [45] CAMPOY FJ, MEEHAN RR, MCKAY S, NIXON J, BIRD A. Binding of histone H1 to DNA is indifferent to methylation at CpG sequences. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26473–26481.
- [46] SELKER EU. DNA methylation and chromatin structure: a view from below. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**: 103–107.
- [47] KASS SU, GODDARD JP, ADAMS RLP. Inactive chromatin spreads from a focus of methylation. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 7372–7397.
- [48] LETEURTRE F, KOHLHAGEN G, FESEN MR, TANIZAWA A, KOHN KW, POMMIER, Y. Effects of DNA methylation on topoisomerase I and II cleavage activities. *J Biol Chem* 1994; **269**: 7893–7900.
- [49] LICHTENSTEIN M, KEINI G, CEDAR H, BERGMAN Y. B-cell specific demethylation: a novel role for the intronic chain enhancer sequence. *Cell* 1994; **76**: 913–923.
- [50] MUMMANENI P, BISHOP PL, TURKER MS. A cis-acting element accounts for a conserved methylation pattern upstream of the mouse adenine phosphoribosyltransferase gene. *J Biol Chem* 1993; **268**: 552–558.
- [51] HASSE A, SCHULZ WA. 1994 Enhancement of reporter gene *de novo* methylation by DNA fragments from the -fetoprotein control region. *J Biol Chem* **269**: 1821–1826.
- [52] MACLEOD D, CHARLTON J, MULLINS J, BIRD AP. Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Develop* 1994; **8**: 2282–2292.
- [53] BRANDEIS M, ARIEL M, CEDAR H. Dynamics of DNA methylation during development. *BioEssays* 1993; **15**: 709–713.
- [54] RAZIN A, KAFRI T. DNA methylation from embryo to adult. *Progr Nucl Acid Res Mol Biol* 1994; **48**: 53–81.
- [55] SMITH SS, RATNER DI. Lack of 5-methylcytosine in *Dictyostelium discoideum* DNA. *Biochem J* 1991; **277**: 273–275.
- [56] BIRD A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; **70**: 5–8.
- [57] RUIZ-HERRERA J. Polyamines, DNA methylation, and fungal differentiation. *Crit Revs Microbiol* 1994; **20**: 143–150.
- [58] EVANS HH, EVANS TE. Methylation of the deoxyribonucleic acid of *Physarum polycephalum* at various periods during the mitotic cycle. *J Biol Chem* 1970; **245**: 6436–6441.
- [59] FRONK J, MAGIERA R. DNA methylation during differentiation of a lower eukaryote, *Physarum polycephalum*. *Biochem J* 1994; **304**: 101–104.
- [60] MAGIERA J, FRONK J. Gene-specific changes of DNA methylation accompany differentiation of the slime mold *Physarum polycephalum*. *Cell Biol Int* 1994; **18**: 907–909.
- [61] PRATT K, HATTMAN S. Deoxyribonucleic acid methylation and chromatin organization in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* 1981; **1**: 600–608.
- [62] PALACIOS G, MARTIN-GONZALES A, GUTIERREZ JC. Macronuclear DNA demethylation is involved in the encystment process of the ciliate *Colpopoda inflata*. *Cell Biol Intern* 1994; **18**: 201–206.
- [63] MANICARDI GC, BIZZARO D, AZZONI P, BIANCHI U. Cytological and electrophoretic analysis of DNA methylation in the holocentric chromosomes of *Megoura viciae* (Homoptera, Aphidae). *Genome* 1994; **37**: 625–630.
- [64] SARKAR S, RAO SRV, GUPTA VS, HENDRE RR. 5-methylcytosine content in *Gryllotalpa fossor* (Orthoptera). *Genome* 1992; **35**: 163–166.
- [65] BIRD AP, TAGGART MH, SMITH BA. Methylated and unmethylated DNA compartments in the sea urchin genome. *Cell* 1979; **17**: 889–901.

- [66] FRONK J, TANK GA, LANGMORE JP. DNA methylation pattern changes during development of a sea urchin. *Biochem J* 1992; **751**–753.
- [67] TAKIO S, SATOH Y, SATOH T. Occurrence of DNA methylation in chloroplasts of the suspension cultured cells from a liverwort, *Marchantia paleacea* var *diptera*. *J Plant Physiol* 1994; **143**: 173–177.
- [68] CANO-CANCHOLA C, SOSA L, FONZI W, SYPHERD P, RUIZ-HERRERA J. Developmental regulation of *CUP* gene expression through DNA methylation in *Mucor* spp. *J Bacteriol* 1992; **174**: 362–366.
- [69] FREEDMAN T, PUKKILA PJ. *De novo* methylation of repeated sequences in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 1993; **135**: 357–366.

Otrzymano: 15.09. 1996 r.

Przyjęto: 22.10. 1996 r.

Adres autora: 02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 93

## **XENOPUS LAEVIS JAKO MODEL DO FUNKCJONALNYCH BADAŃ REGULACJI TRANSKRYPCJI**

**XENOPUS LAEVIS AS A MODEL FOR FUNCTIONAL STUDIES  
OF TRANSCRIPTION REGULATION**

**MONIKA PUZIANOWSKA-KUŹNICKA**

**NIH, NICHD, LME, 18 Library Drive, MSC 5430, Bldg. 18T, Rm. 101, Bethesda,  
MD 20892-5430, USA**

**Streszczenie:** U podstawy procesów biologicznych zachodzących w żywym organizmie leżą zmiany na poziomie molekularnym. Wielkim zainteresowaniem cieszy się badanie regulacji transkrypcji genów. Jednym z popularnych zwierząt doświadczalnych, stosowanym do badań regulacji transkrypcji jest żaba *Xenopus laevis*. Do badań wykorzystuje się różne etapy rozwojowe tego zwierzęcia. Oocyty używane są do produkcji rekombinowanych czynników transkrypcyjnych (jak również ich mutantów), do badań wpływu chromatyny, modyfikacji DNA oraz działania czynników zewnętrznych (takich jak temperatura, hormony) na transkrypcję, do badania zjawiska "maskowania" RNA. Iniekcje doembrionalne dostarczają informacji na temat regulacji translacji mRNA pochodzenia matczynego i zygocznego, zmian w składzie chromatyny zachodzących podczas wczesnych etapów rozwoju organizmu oraz na temat biologicznej funkcji badanych czynników transkrypcyjnych. Nowo opracowany system doświadczalny – żaby transgeniczne – może służyć jako bardzo dokładnie kontrolowany system do badań czynników transkrypcyjnych i promotorów. Liczne opisane wyżej zastosowania, w połączeniu z łatwością hodowli *Xenopus laevis* powodują, że zwierzę to ponownie staje się coraz bardziej popularnym modelem do badań regulacji transkrypcji *in vivo*.

**Słowa kluczowe:** *Xenopus laevis*, regulacja transkrypcji, oocyty, zarodki, żaby transgeniczne, hormon tarczycy, receptor hormonu tarczycy (TR), receptor X kwasu retinowego (RXR).

**Summary:** At the basis of all biological processes occurring in any living organism lay changes at the molecular level. Of special interest is transcription regulation of the genes. One of the popular experimental animals used for studying transcription regulation *in vivo* is *Xenopus laevis*. Different developmental stages of this animal are used for this purpose. Its oocytes are used for production of recombinant transcription factors (including mutant proteins), to study chromatin, DNA modifications and exogenous factors (temperature, hormones, etc.) influence on transcription, RNA masking, etc. Embryo injections

deliver information on transcription regulation of maternal and zygotic genes, changes in chromatin content throughout development, and on biological function of studied transcription factors. Newly developed system, transgenic frogs, can serve as a very well controlled biological system to study transcription factors and promoters. Thanks to multiple, described above, uses, combined with the easy rearing, *Xenopus laevis* becomes again a very popular system to study transcription regulation *in vivo*.

**Key words:** *Xenopus laevis*, transcription regulation, oocytes, embryos, transgenic frogs, thyroid hormone, thyroid hormone receptor (TR), retinoic acid X receptor (RXR).

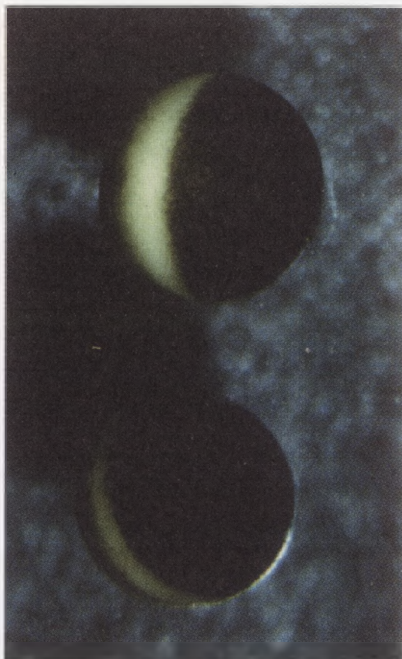
## WSTĘP

Procesy biologiczne, obserwowane w żyjącym organizmie są wynikiem zmian zachodzących na poziomie supramolekularnym. Ostateczny efekt biologiczny powstaje na skutek złożonego procesu regulacji na poziomie transkrypcji, dojrzewania mRNA (dołączanie sekwencji poli-A, różnicowe wycinanie intronów), transportu mRNA z jądra do cytoplazmy, "maskowania" mRNA w cytoplazmie, oporności mRNA na trawienie enzymatyczne, translacji i potranslacyjnych modyfikacji białek. Transkrypcja na poziomie podstawowym może być aktywowana lub hamowana. Dany gen może ulegać ekspresji przez cały czas lub tylko na pewnym etapie życia osobniczego, we wszystkich komórkach organizmu lub jedynie w określonej grupie komórek, tkance lub narządzie. Ponadto zmianę ekspresji genu mogą wywoływać czynniki wewnętrzne lub zewnętrzne. W procesie regulacji transkrypcji biorą udział białka zwane czynnikami transkrypcyjnymi (mogą to być czynniki powszechnie występujące jak i specyficzne, np. tkankowo) oraz niebiałkowe cząsteczki.

Badania regulacji transkrypcji przeprowadzane są w systemach *in vitro* i *in vivo*, przy czym ten ostatni jest bardziej zbliżony do stanu fizjologicznego. Celem poniższego opracowania jest przedstawienie doskonałego modelu zwierzęcego, służącego do badań czynników transkrypcyjnych i regulacji transkrypcji, jakim jest żaba *Xenopus laevis*. Do badań wykorzystuje się różne, opisane poniżej etapy rozwojowe tego zwierzęcia.

## OOCYTY

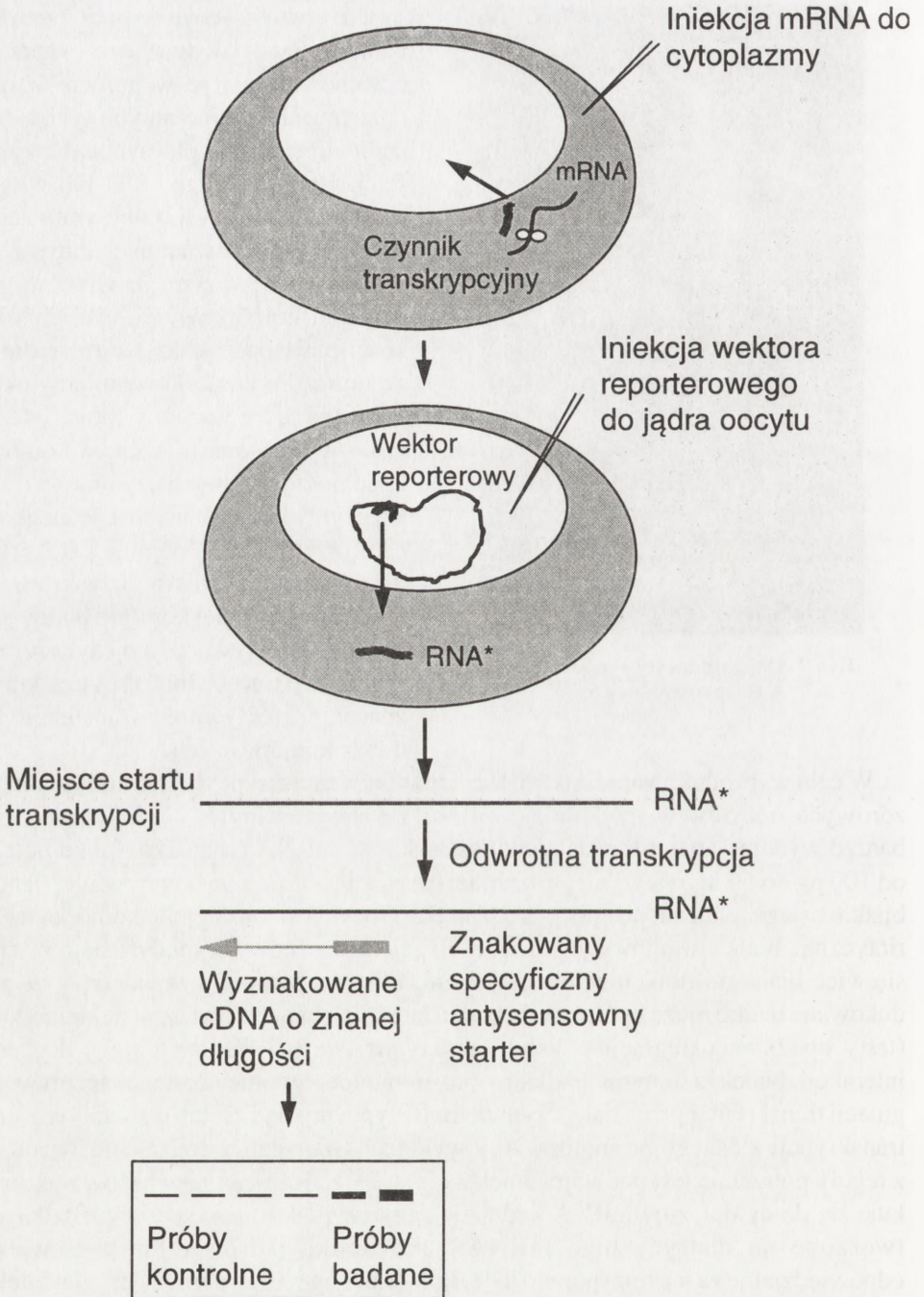
Dojrzałe oocyty *Xenopus laevis* (rys. 1) uzyskuje się poprzez operacyjne wycięcie części lub całości jajnika z jamy brzusznej dorosłej samicy. Oocyty pokryte są warstwą komórek folikularnych, które usuwa się poprzez inkubację w roztworze kolagenazy (mg/ml). Tak przygotowane oocyty gotowe są do iniekcji, choć zaleca się odczekanie przynajmniej trzech godzin przed rozpoczęciem doświadczenia.



Rys. 1. Dojrzałe oocyty *Xenopus laevis*  
(etap rozwojowy 6)

Utrzymanie oocytów przy życiu nie wymaga specjalistycznego sprzętu: przechowuje się je w buforze zawierającym mieszaninę antybiotyków (np. penicylinę ze streptomycyną) najczęściej w temperaturze 18°C lub w temperaturze pokojowej. Olbrzymią zaletą oocytów w porównaniu z innymi systemami badawczymi *in vivo*, np. hodowlami komórkowymi, jest ich wielkość: mają one około 1 mm średnicy, a samo jądro komórkowe mierzy około 0,2 mm. Jądra oocytów mogą być ręcznie wyjmowane z wnętrza komórki. Ilość poszczególnych czynników transkrypcyjnych uzyskanych z jednego oocytu przekracza co najmniej stokrotnie ilość tychże czynników uzyskiwanych z jednej hodowanej komórki hodowanej *in vitro*. Efektywność pojedynczej mikroiniekcji mRNA lub DNA przekracza znacznie efektywność transfekcji hodowli komórkowych.

W celu wyprodukowania dużej ilości czynników transkrypcyjnych, do cytoplazmy zdrowych oocytów wstrzykuje się mRNA zsyntetyzowany *in vitro*. Oocyty mają bardzo wydajny aparat translacyjny: wstrzyknięty mRNA (w zależności od potrzeb od 100 pg do 50 ng/oocyt) ulega szybkiej translacji, a ilość nowo wyprodukowanego białka osiąga plateau już po 6 godzinach. Oocyt jest olbrzymią komórką eukariotyczną: białka w nim wytworzone ulegają prawidłowym modyfikacjom, stają się więc białkami funkcjonalnie czynnymi. Ekstrakt białkowy zawierający wyprodukowane białko może być użyty do badań interakcji białek z kwasami nukleinowymi (testy opóźnienia migracji w żelu "gel mobility shifts", "footprinting"), do badań interakcji białek z innymi białkami (ko-immunoprecypitacja), mechanizmów regulacji transkrypcji przez dany czynnik transkrypcyjny (rys. 2) lub do badań regulacji transkrypcji z danego promotora. Aby wykonać dwa ostatnie rodzaje doświadczeń, z reguły potrzebna jest podwójna iniekcja (rys. 2). Najczęściej jako pierwsze wstrzykuje się do cytoplazmy mRNA kodujący dany czynnik transkrypcyjny. Białka wytworzone na matrycy tego mRNA, jako białka jądrowe, mają sekwencje odpowiedzialne za ich transport do jądra komórkowego. Przy pomocy drugiej iniekcji do jądra wprowadza się gen reporterowy (lub DNA zawierający badany promotor). Po kilku–kilkunasto-godzinnej inkubacji, ze zdrowych oocytów izoluje się całkowity

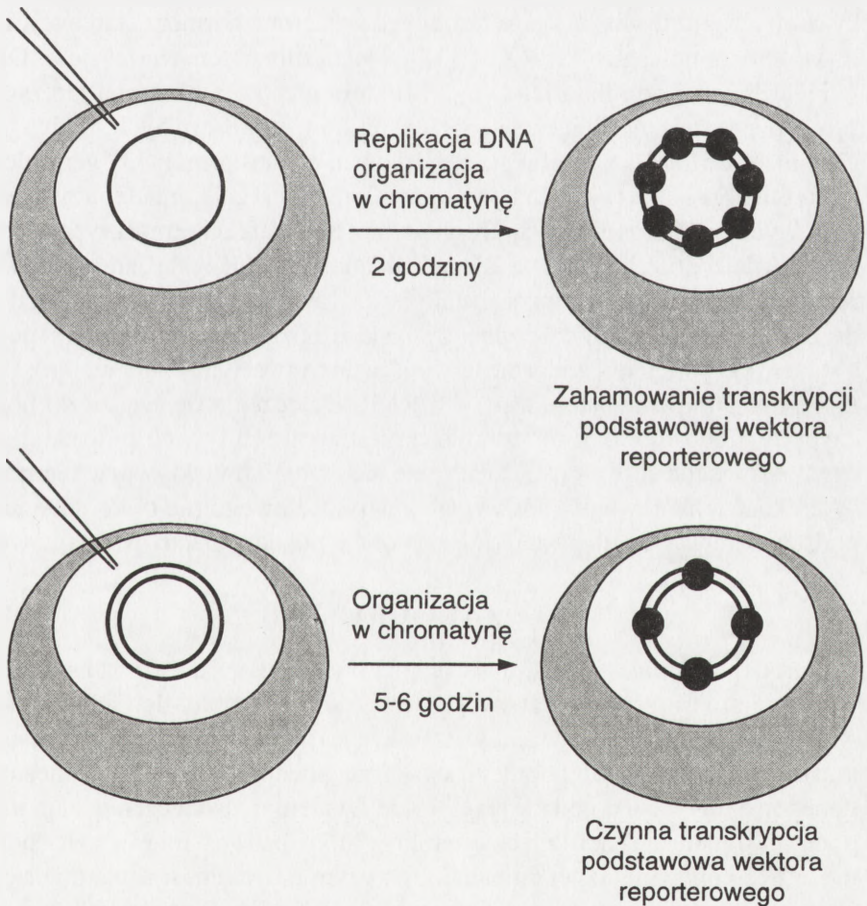


Rys. 2. Schemat przedstawiający badanie regulacji transkrypcji *in vivo* przez rekombinowane czynniki transkrypcyjne, z wykorzystaniem systemu oocytarnego *Xenopus laevis*



RNA, w którym znajduje się również transkrypt z wprowadzanego genu reporterowego. Dla uwidocznienia jedynie tego specyficznego RNA, dokonuje się odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem znakowanego startera, specyficznego jedynie dla tego RNA. Produkt reakcji zawierający znakowany, specyficzny, jednoniciowy cDNA rozdzielany jest na żelu sekwencyjnym, a intensywność prążków kontrolnych i badanych mierzona jest przy pomocy densytometru [9].

Zakres przydatności systemu oocytnego powiększa się znacznie, jeśli badaniom poddaje się mutanty delecyjne lub punktowe [10] danego czynnika transkrypcyjnego (poszukiwanie domen lub poszczególnych aminokwasów odpowiedzialnych za szczególne funkcje, np. za wiązanie DNA, aktywację transkrypcji, wiązanie ligandu itd.). Mutanty punktowe i delecyjne danego promotora pozwalają z kolei na iden-



Rys. 3. Schemat przedstawiający proces strukturalnej organizacji wstrzykniętego do oocytu *Xenopus laevis* reporterowego DNA; wydajność i szybkość tego procesu zależy od tego, czy wstrzyknięto DNA jedno- czy dwuniciowy

tyfikację sekwencji, z którymi wiążą się poszczególne czynniki transkrypcyjne, oraz fragmentów promotora koniecznych do aktywacji i hamowania transkrypcji.

System oocytarny wykorzystywany jest również do badań wpływu chromatyny na transkrypcję. Reporterowy DNA pozbawiony jakichkolwiek białek, a wstrzyknięty do jądra oocyta ulega organizacji w chromatynę. Wydajność tego procesu zależy od tego, czy wstrzyknięto DNA jedno- czy dwuniciowy [1] (rys. 3). Dwuniciowy DNA ulega organizacji w chromatynę powoli i niewydajnie, co umożliwia czynnikiem transkrypcyjnym dostęp do promotora. Efektem tego jest wysoki poziom transkrypcji podstawowej. Tak więc DNA dwuniciowy powinien być używany do badań hamowania transkrypcji (łatwa do zaobserwowania różnica pomiędzy wysokim poziomem transkrypcji podstawowej a stanem zahamowania transkrypcji). Przykładem może być badanie hamowania transkrypcji genu zawierającego TRE, sekwencje, z którą wiąże się heterodimer receptora hormonu tarczycy i receptora X kwasu retinowego (TR/RXR) [15]. Heterodimer ten wiąże się z DNA nawet w nieobecności hormonu tarczycy. Struktura receptora hormonu tarczycy w takiej sytuacji pozwala na dołączenie się czynników supresorowych, takich jak SMRT [2] lub N-CoR [4], i w efekcie zahamowanie transkrypcji [3] genu docelowego.

Replikacja DNA (synteza komplementarnej nici) znakomicie przyśpiesza i zwiększa wydajność organizacji w chromatynę [1]. W efekcie transkrypcja podstawowa z wprowadzonego promotora ulega zahamowaniu. Użycie jednoniciowego DNA reporterowego jest więc zalecane do badań aktywacji transkrypcji pod wpływem danego czynnika (różnica pomiędzy niskim poziomem transkrypcji podstawowej a stanem aktywacji jest znacznie łatwiejsza do zauważenia i zmierzenia). Przykładem może być ponownie heterodimer TR/RXR. Dołączenie się cząsteczki hormonu tarczycy do TR zmienia jego strukturę przestrzenną [6,14], co powoduje uwolnienie czynników supresorowych i dołączenie się czynników aktywujących transkrypcję. W efekcie zahamowana transkrypcja genu docelowego nie tylko powraca do stanu podstawowego, ale ulega dalszej aktywacji ponad poziom podstawowy.

## ZARODKI ŻĄBY

Zarodki *Xenopus laevis*, powszechnie wykorzystywane do badań mechanizmów wczesnej embriogenezy, stanowią również idealny model do badań funkcji *in vivo* wielu białek, w tym czynników transkrypcyjnych. Owulacja u samicy *Xenopus laevis* indukowana jest poprzez podskórne podanie 300–500 jednostek ludzkiej gonadotropiny 12–16 godzin przed rozpoczęciem doświadczenia. Jaja uzyskuje się przez "wyciśnięcie" ich z ciała samicy (która po 1–2 miesiącach "odpoczynku" może być ponownie użyta do badań), po czym natychmiast zapładnia się je spermą uzyskaną ze zmacerowanych jąder. mRNA lub/i DNA wstrzykuje się do zarodka w momencie pojawienia się pierwszej bruzdy podziałowej (rys. 4), najlepiej do obydwu przyszyłych komórek. Ilość mRNA nie powinna przekroczyć 1 ng (większe

ilości są toksyczne dla zarodka, który z reguły nie przeżywa etapu gastrulacji). Wadą tego modelu, głównie w badaniach fenotypowych, jest mozaikowa ekspresja białka (po iniekcjach mRNA i DNA), jak również krótki okres ekspresji (do 48 godzin po iniekcjach mRNA). Z drugiej strony okres ten jest z reguły wystarczający do wykonania większości doświadczeń. Białka wytworzone w zarodkach mogą być wykorzystywane do takich samych doświadczeń, jakie uprzednio opisano w rozdziale o oocytach.

Dodatkową zaletą tego modelu jest możliwość śledzenia wpływu badanych czynników transkrypcyjnych na aktywację genów endogennych [11], np. badanie wpływu heterodimerów receptora hormonu tarczycy z receptorem X kwasu retinowego (TR/RXR) na aktywację genów znanych jako geny regulowane przez hormon tarczycy, takich jak gen

stromielizyny-3 [8], hedgehog [13], NFI [9]. Ponadto, prawidłowy rozwój embryonalny może być zaburzony poprzez ekspresję danego białka. Ciągła obserwacja zarodka rozwijającego się poza organizmem matki, umożliwi ocenę, jakie struktury anatomiczne rozwijają się nieprawidłowo (rys. 5). Pochodzenie poszczególnych tkanek i narządów z określonych komórek wczesnego zarodka *Xenopus laevis* jest dokładnie znane, co umożliwi dodatkowe zawężenie zakresu działania wyindukowanego czynnika poprzez iniekcję kodującego go mRNA (lub DNA) do jednej z komórek powstałej po kilku podziałach.

Dodatkowe informacje o zmianach aktywacji genów endogennych, miejsca i zakresu ich ekspresji pod wpływem wyindukowanego czynnika transkrypcyjnego uzyskuje się wykonując badania immunohistochemiczne i hybrydyzację *in situ*.

## ŻABY TRANSGENICZNE

Niedoskonałość iniekcji mRNA lub DNA do zarodków (krótka i mozaikowa ekspresja) stała się przyczyną poszukiwań lepszego systemu, którego ostatecznym celem było osiągnięcie stabilnej ekspresji danego genu/białka w określonej tkance/narządzie. System taki do badań na ssakach znany był i udoskonalany od wielu



Rys. 4. Zarodki albinosa *Xenopus laevis* podczas pierwszego podziału komórkowego

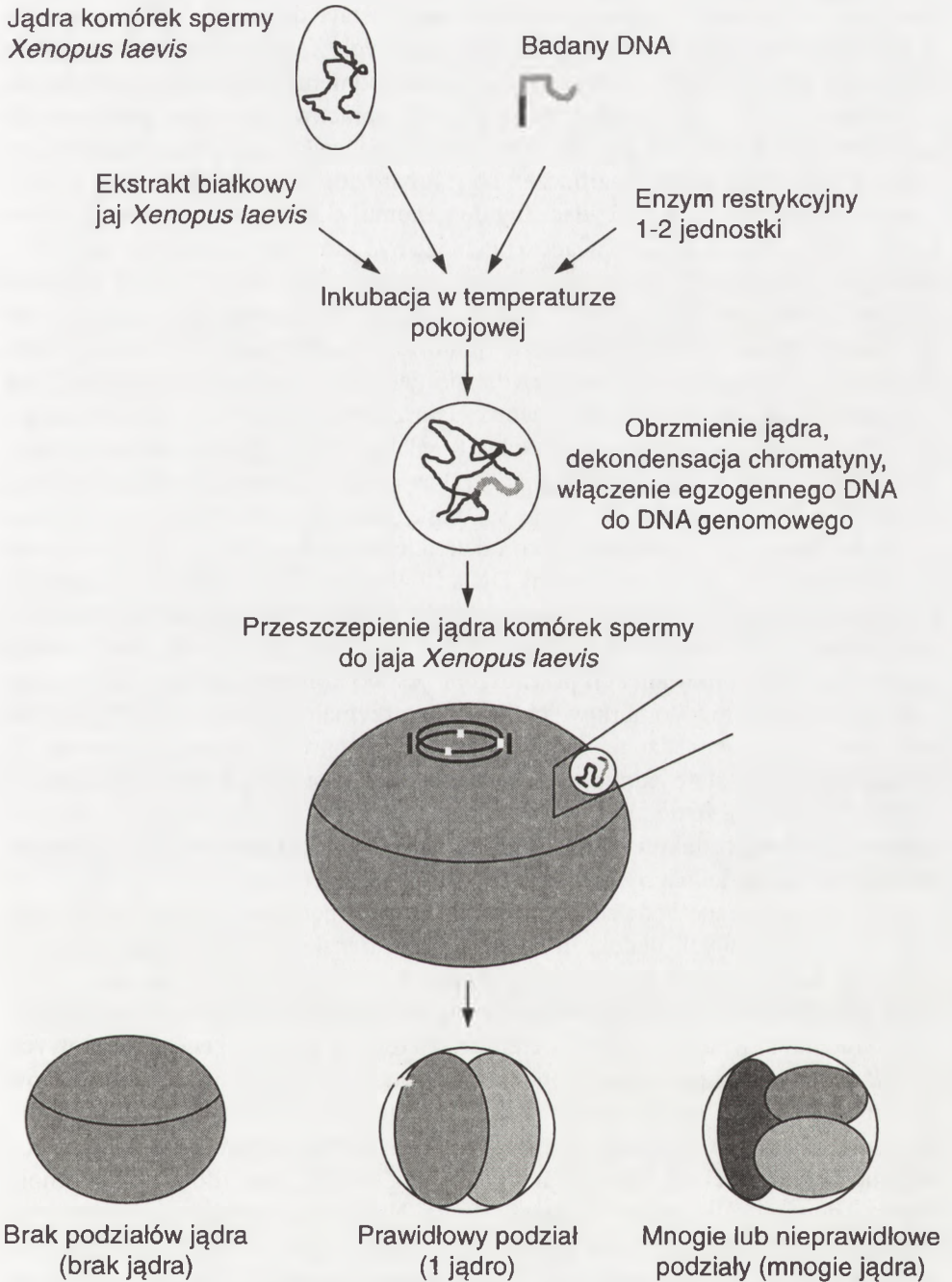


lat. W efekcie – tworzenie myszy transgenicznych zarówno mających dodatkowe kopie danego genu ("*transgenic mouse*"), jak i pozbawionych danego genu ("*knock-out*") stało się powszechną metodą badań funkcji genów i białek.

*Xenopus laevis* ma jednak niezaprzeczalną przewagę nad modelem mysim: cały rozwój embrionalny, aż do osiągnięcia postaci dorosłej, odbywa się poza organizmem matki. Ponadto, wczesny zarodek *Xenopus laevis* jest wielokrotnie większy niż zarodek myszy i można go obserwować nawet gołym okiem. Cechy te umożliwiają ciągłą obserwację rozwijającego się zarodka bez konieczności zabijania zarówno jego, jak i matki, jeśli konieczne jest zbadanie wczesnych faz rozwojowych [7]. Dotychczas nie udało się uzyskać żaby transgenicznej "*knock-out*", głównie dlatego, że *Xenopus laevis* jest organizmem pseudotetraploidalnym.

Transgenizacja żab również okazała się zadaniem trudnym. Pierwsza praca, w której opisano technikę wy-

Rys. 5. Trzydniowe zarodki *Xenopus laevis*: A – zarodki kontrolne; B – zarodki nastrzyknięte mRNA receptora hormonu tarczycy TR $\alpha$  i kwasu retinowego RXR $\alpha$ , przetrzymywane w buforze bez hormonu; zgodnie z proponowanym mechanizmem działania TR zmiany fenotypowe spowodowane są zahamowaniem transkrypcji podstawowej genów regulowanych przez hormon tarczycy; C – zarodki jak w B, przetrzymywane w obecności 100 nM hormonu tarczycy (T<sub>3</sub>); prawie wszystkie zarodki umierają przed ukończeniem 3 dnia życia, pojedyncze przeżywają do 5 dni; obserwowany fenotyp powstaje na skutek aktywacji genów regulowanych przez hormon tarczycy



Rys. 6. Schemat doświadczenia prowadzącego do wytworzenia transgenicznego zarodka *Xenopus laevis*

tworzania żab transgenicznych, opublikowana została dopiero w 1994 roku [5]. W metodzie tej jądra komórek hodowli tkankowych *Xenopus laevis*, które uległy transfekcji danym genem, wykorzystano do zapłodnienia dojrzałego jaja (metodą mikroiniekcji). Odkrywczy tej metody poszli dalej, opracowując metodę mikroiniekcji jądra komórki spermy do jaja. W nowej metodzie wykorzystuje się materiał genetyczny męskiej komórki rozrodczej, co jest bardziej "fizjologiczne" (rys. 6). Egzogenny DNA, który ma być włączony do genomu, składa się z promotora i DNA kodującego białko. Celem doświadczenia może być zarówno badanie funkcji białka, które jest "skierowane" przez odpowiedni promotor albo do wszystkich komórek organizmu (np. promotor CMV), albo do wybranych komórek przy pomocy specyficznego promotora (np. promotora jelitowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe [12], którego ekspresję obserwuje się jedynie w nabłonku jelitowym), jak i badanie danego promotora, który wówczas przyłącza się do genu reporterowego, np. GFP ("*green fluorescent protein*") lub  $\beta$ -galaktozydazy. Końce liniowego, dwuniciowego DNA trawione są enzymem restrykcyjnym, pozostawiającym lepkie końce 5'. Jądra komórek spermy inkubuje się z ekstraktem białkowym z jaj *Xenopus laevis*, co doprowadza do ich obrzęku i dekondensacji chromatyny. Do mieszaniny tej dodaje się oczyszczony egzogenny DNA i 1–2 jednostki enzymu restrykcyjnego, użytego uprzednio do przygotowania końców DNA. DNA genomowy trawiony jest przez enzym i w miejsce to włącza się DNA egzogenny. Następnie jądro komórki spermy w drodze mikroiniekcji przenoszone jest do komórki jajowej. Jeśli nie obserwuje się podziałów komórkowych, jajo nie otrzymało męskiego przedjądrza lub było ono bardzo uszkodzone. Prawidłowy podział na dwie komórki oznacza, że jajo zapłodnione zostało jednym przedjądrzem, natomiast mnogie lub nieprawidłowe podziały oznaczają, że do jaja przeszczepiono więcej niż jedno przedjądrze. Metoda ta umożliwia wyprodukowanie od kilkudziesięciu do kilkuset zarodków transgenicznych podczas jednego doświadczenia.

Żaby transgeniczne będą stanowić coraz bardziej popularny model do funkcjonalnych badań różnych białek, m.in. czynników transkrypcyjnych, jak i regulacji i specyficzności danych promotorów. Przykładem są prowadzone aktualnie prace z wykorzystaniem dominującego-negatywnego mutantu receptora hormonu tarczycy TR $\beta$ . Mutant ten wiąże się z TRE w elementach regulatorowych genów docelowych, jednak dodanie hormonu tarczycy nie powoduje oczekiwanej aktywacji tych genów. Wśród wielu genów regulowanych przez hormon tarczycy i jego receptory znajduje się również sam gen TR (który w związku z tym podlega autoregulacji). W trakcie metamorfozy postaci larwalnej (kijanki) w postać dorosłą, geny docelowe hormonu tarczycy powinny ulec dramatycznej aktywacji. Nieaktywny dominujący-negatywny mutant teoretycznie powinien uniemożliwić tę aktywację, a w efekcie uniemożliwić proces metamorfozy. Powyższe doświadczenie jest przykładem, w jaki sposób badania fenotypowe mogą potwierdzić opracowany *in vitro* model działania danego

czynnika transkrypcyjnego. Pozwalają one również stwierdzić, jaka jest fizjologiczna rola danego czynnika.

## PODSUMOWANIE

Dla zrozumienia procesów biologicznych zachodzących w żywym organizmie eukariotycznym konieczne jest poznanie przyczyn tych procesów, czyli zmian zachodzących na poziomie molekularnym. W tym celu wciąż poszukuje się systemów doświadczalnych, stosunkowo łatwo kontrolowanych i łatwych do manipulacji.

W powyższym opracowaniu przedstawiono zastosowania i liczne zalety modelu zwierzęcego *Xenopus laevis*, służącego między innymi do badań czynników transkrypcyjnych i procesów regulujących transkrypcję w systemie *in vivo*. Dodatkową wartość modelu stanowi łatwość hodowli zwierząt znajdujących się na każdym etapie rozwoju, wielkość oocytów i zarodka, łatwość manipulacji (np. mikroiniekcji) i możliwość ciągłej obserwacji nawet bez użycia mikroskopu. Cechy te, jak również nowo wprowadzane zastosowania (m. in. żaby transgeniczne) powodują, że choć organizm *Xenopus laevis* jest wykorzystywany od wielu lat, jego popularność jako modelu do badań różnych aspektów transkrypcji nadal rośnie.

## LITERATURA

- [1] ALMOUZNI G, WOLFFE AP. Replication-coupled chromatin assembly is required for the repression of basal transcription *in vivo*. *Genes Dev* 1993; 7: 2033–2047.
- [2] DON CHEN J, EVANS RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995; 337: 454–457.
- [3] FONDELL DJ, ROY AL, ROEDER RG. Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev* 1993; 7: 1400–1410.
- [4] HORLEIN AJ, NAAR AM, HEINZEL T, TORCHIA J, GLOSS B, KUOKAWA R, RYAN A, KAMEI Y, SODERSTROM M, GLASS CK, ROSENFELD MG. Ligand-independent repression by thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995; 377: 397–403.
- [5] KROLL KL, GERHART JC. Transgenic *X. laevis* embryos from eggs transplanted with nuclei of transfected cultured cells. *Science* 1994; 226: 650–653.
- [6] LENG X, TSAI SY, O'MALLEY BW, TSAI M-J. Ligand-dependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoic X receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 46: 643–661.
- [7] NIEUWKOOP PD, FABER J. Normal table of *Xenopus laevis*. North Holland Publishing, 1956, Amsterdam.

- [8] PATTERTON D, HAYES WP, SHI YB. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase gene stromelysin-3 coincides with thyroid hormone-induced cell death during frog metamorphosis. *Dev Biol* 1995; **167**: 252–262.
- [9] PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M, SHI YB. Nuclear Factor I as a potential regulator during organ post-embryonic development. *J Biol Chem* 1996A; **271**: 6273–6282.
- [10] PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M, WONG J, KANAMORI A, SHI YB. Functional characterization of a mutant thyroid receptor in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 1996B; (w druku)
- [11] PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M, SHI YB. Ectopic expression of TR and RXR leads to specific regulation of T3-response genes and alters embryonic development in *Xenopus laevis*. 1996C (wysłany do druku)
- [12] SHI YB, HAYES WP. Thyroid hormone-dependent regulation of the intestinal fatty acid-binding protein gene during amphibian metamorphosis. *Dev Biol* 1994; **161**: 48–58.
- [13] STOLOW MA, SHI YB. *Xenopus* sonic hedgehog as a potential morphogen during embryogenesis and thyroid hormone-dependent metamorphosis. *Nucleic Acid Res* 1995; **23**: 2555–2562.
- [14] WAGNER RL, APRILETTI JW, McGRATH ME, WEST BL, BAXTER DJ, FLETTERICK RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 1995; **378**: 690–697.
- [15] ZHANG XK, HOFFMANN B, TRAN PBV, GRAUPNER G, PFAHL M. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 1992; **355**: 441–446.

Otrzymano: 15.09. 1996 r.

Przyjęto: 22.10. 1996 r.

Adres autora: ul. Nowogrodzka 62B m 16, 02-002 Warszawa



## MECHANIZMY KOMÓRKOWO-SPECYFICZNEJ EKSPRESJI GENÓW – BADANIA ODCINKÓW PROMOTOROWYCH\*

### MECHANISMS OF CELL-SPECIFIC GENE EXPRESSION PROMOTOR STUDIES

JACEK KUŹNICKI, WIESŁAWA LEŚNIAK

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

*Streszczenie:* Pytanie, w jaki sposób komórka eukariotyczna może dać początek organizmowi zbudowanemu z wielu wyspecjalizowanych tkanek i komórek, z których większość ma podobną informację genetyczną, ale wykorzystuje ją wysoce selektywnie wywołując ekspresję tylko niektórych genów, stanowi centralny problem współczesnej biologii. W artykule niniejszym omówiono niektóre aspekty regulacji ekspresji genów na poziomie transkrypcji, zarówno czynniki konieczne dla transkrypcji podstawowej, jak i mechanizmy, dzięki którym poziom transkrypcji może być modulowany w odpowiedzi na sygnał zewnętrzny lub zmiany w organizmie wywołane dojrzewaniem, starzeniem się czy też chorobą. Zaprezentowano techniki doświadczalne umożliwiające wykazanie interakcji pomiędzy DNA i białkowymi czynnikami wpływającymi na proces transkrypcji, określenie miejsca tej interakcji i jej wpływu na poziom transkrypcji. Poznane dotychczas mechanizmy regulacji ekspresji genów omówiono na przykładzie immunoglobulin, globin i kalbindyny-D9k. Przedstawiono również wyniki własne dotyczące komórkowo-specyficznego ekspresji genów białek wiążących wapń: kalcykliny i kalretiny.

*Słowa kluczowe:* transkrypcja, promotor, czynniki transkrypcyjne, komórkowo specyficzna ekspresja genów, kalbindyna-D9k, kalcyklina, kalretina.

*Summary:* How can a single eukaryotic cell develop into an organism built of many specialized cells and tissues, most of each carrying similar genetic information, yet using it selectively to express only some of the genes is a central problem of the present-day biology. This article describes some aspects of the regulation of gene expression at the transcription level, both the factors engaged in basal transcription as well as the mechanisms allowing the transcription rate to be tuned in response to external signals or changes in the organism caused by development, aging or disease. Experimental methods designed to

\*Praca została napisana i część wyników wykonana dzięki dofinansowaniu z grantu KBN 6PO4A 01211

detect the interaction between DNA and protein factors affecting transcription, to map the site of the interaction and evaluate its effect on the transcription rate have been presented. Possible mechanisms involved in the regulation of the expression of immunoglobulin, globin and calbindin-D9k genes have been described. The results from the authors' laboratory concerning the cell-specific expression of genes of two calcium binding proteins: calcyclin and calretinin are also presented.

*Key words:* transcription, promotor, transcription factors, cell-specific gene expression, calbindin-D9k, calcyclin, calretinin

## PODSTAWY REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

W latach sześćdziesiątych Francois Jacob i Jacques Monod przeprowadzili kluczowe doświadczenia, dzięki którym stało się możliwe poznanie regulacji genów u *Prokaryota*. Od tego czasu badania tego typu były kontynuowane przez wielu badaczy i zostały rozszerzone na geny organizmów eukariotycznych. Istnieje wiele podobieństw między mechanizmami regulacji ekspresji genów u *Prokaryota* i *Eukaryota*, u tych ostatnich są one jednak znacznie bardziej skomplikowane. Dość przypomnieć, że z pojedynczej komórki zawierającej określony zestaw genów powstaje w procesie rozwoju wielokomórkowy organizm zbudowany ze zróżnicowanych tkanek i komórek. Co determinuje aktywację tych, a nie innych genów w różnicujących się komórkach? Jakie mechanizmy decydują o aktywności genów w odpowiedzi na zmiany w środowisku, zmiany w wyniku dojrzenia i starzenia się, zmiany chorobowe? Jakie mechanizmy wyłączają aktywne wcześniej geny? Odpowiedzi na te pytania są głównym problemem biologii molekularnej *Eukaryota* [24, 31], a zrozumienie mechanizmów, dzięki którym specyficzne geny stają się aktywne w odpowiednim czasie i w odpowiednim miejscu w organizmie, jest nie tylko problemem o znaczeniu poznawczym, ale również o ogromnym potencjale zastosowań praktycznych.

## POZIOMY REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Geny eukariotyczne poddane są regulacji na większej liczbie poziomów niż geny bakteryjne. Głównym mechanizmem regulacji ekspresji genów jest proces transkrypcji w jądrze komórkowym [6]. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji dokonuje się najczęściej na poziomie inicjacji transkrypcji, rzadziej dotyczy zmiany miejsca startu lub zakończenia transkrypcji. Dodatkowe poziomy regulacji ekspresji genów to: obróbka RNA w jądrze (dodawanie czapeczki lub sekwencji poliA), a także różnicowe wycinanie intronów i łączenie eksonów z utworzeniem dojrzałego mRNA (ang. *splicing*), transport mRNA z jądra do cytoplazmy, stabilizacja mRNA w cytoplazmie i poziom translacji w cytoplazmie. Powstanie białka jest więc ukoronowaniem wieloetapowego procesu, a jego ilość wynikiem skomplikowanej i

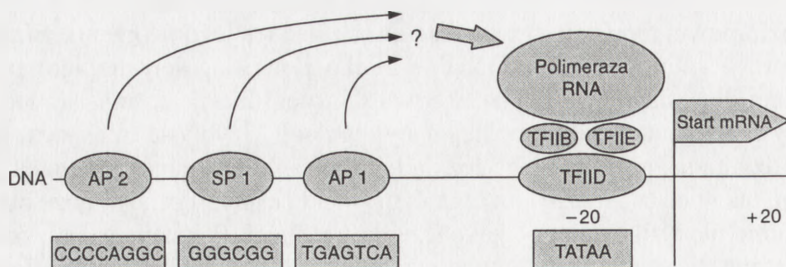
wielopoziomowej regulacji na poszczególnych etapach jego tworzenia. Efekt końcowy ekspresji genu, czyli funkcjonalne białko jest osiągnięty dopiero po, często koniecznej dla osiągnięcia pełnej aktywności, modyfikacji potranslacyjnej. Jest to następny proces potencjalnie podlegający regulacji. Szybkość transportu białka do miejsca działania i szybkość jego rozkładu to procesy, które mogą również podlegać regulacji, tak więc ostateczny dla organizmu efekt ekspresji genów może być jeszcze kilkakrotnie modyfikowany po zakończeniu translacji. Pokazuje to, jak skomplikowaną maszynę stanowią mechanizmy regulacyjne, określające fenotyp poszczególnych komórek *Eukaryota*.

## ELEMENTY REGULACJI TRANSKRYPCJI

W komórkach eukariotycznych w transkrypcji uczestniczą kompleksy trzech polimeraz RNA. RNA-polimeraza I prowadzi zasadniczo transkrypcję rybosomalnego RNA, RNA-polimeraza II – genów kodujących białka, a RNA-polimeraza III – genów tRNA. Podstawowy kompleks RNA-polimerazy II składa się z wielojednostkowej polimerazy oraz dodatkowych składników (czynników transkrypcyjnych), m. in. TBP (białka wiążącego TATA-box) oraz TFIIB. Kompleks RNA-polimerazy II wiąże się z odpowiednimi sekwencjami DNA rejonu promotora znajdującego się blisko miejsca inicjacji transkrypcji (a ta poprzedza rejon kodujący białko). Promotorem nazywamy odcinek DNA zlokalizowany najczęściej powyżej startu transkrypcji. Typowy promotor zawiera rejon bogaty w zasady A-T, zwany TATA-box (będący miejscem związania kompleksu polimerazy) i jeden lub wiele elementów zwanych ogólnie UPE (ang. *upstream promotor elements*) zbudowanych z kilku/kilkunastu par zasad, które mogą zmieniać poziom transkrypcji (rys. 1). Przykładem UPE jest tzw. CCAAT-box, występujący w wielu promotorach. Nie wszystkie promotory mają TATA-box [24].

Elementy regulujące transkrypcję (ang. *response elements*) mogą zwiększać aktywność transkrypcyjną i są wówczas określane jako sekwencje aktywatora lub wzmacniacza (ang. *enhancer*) [26]. Sekwencje te znajdują się w różnych odległościach od miejsca inicjacji transkrypcji i mogą działać w obu orientacjach. Nie wszystkie wzmacniacze podlegają regulacji. Te, które są regulowane, można podzielić na dwie kategorie: takie, które reagują na zmiany środowiska, tzw. wzmacniacze indukowalne (reagujące na szok cieplny, ekspozycję wobec metali ciężkich, infekcje wirusowe, czynniki wzrostowe czy steroidy) [24] i tzw. wzmacniacze czasowe lub tkankowo-specyficzne, które są aktywne tylko w określonym czasie w trakcie rozwoju lub tylko w określonych tkankach.

Inne elementy genu mogą działać hamująco na transkrypcję i wtedy są często określane jako elementy represorowe lub wyciszające (ang. *silencer*) [15]. Aktywność transkrypcyjna w danych warunkach jest więc efektem obecności pozytywnych i



Rys. 1. Schemat podstawowego kompleksu polimerazy RNA oraz czynników transkrypcyjnych związanych z sekwencjami wzmacniacza w odcinku promotorowym genu

negatywnych elementów promotorowych i jest regulowana przez specyficzne czynniki transkrypcyjne, czyli białka wiążące się z regulatorowymi sekwencjami DNA. Białka te mogą działać pojedynczo, częściej jednak działają w kombinacji z innymi, modyfikując podstawową aktywność transkrypcyjną [14, 25]. Większość czynników regulujących transkrypcję nie działa na zasadzie całkowitego włączenia albo całkowitego wyłączenia (represji) genu. Maksymalna lub całkowicie zahamowana transkrypcja (lub aktywność pośrednia) jest efektem skoordynowanej interakcji czynników transkrypcyjnych działających między sobą synergistycznie lub antagonistycznie w zależności od ich względnego stężenia, regulacyjnych modyfikacji (np. fosforylacji) i fizycznego połączenia z DNA. Aczkolwiek aktywacja genu czasami wymaga syntezy nowego białka, najczęściej następuje ona na skutek modyfikacji już istniejących czynników transkrypcyjnych. Modyfikacja taka może zwiększyć powinowactwo czynnika wobec DNA lub może zmienić konformację czynnika, który już jest związany z elementem regulatorowym i w ten sposób zmienić powinowactwo tego białka wobec innych białek regulatorowych.

Czynniki transkrypcyjne mogą działać dopiero wtedy, gdy chromatyna jest gotowa do transkrypcji (ang. *primed*). Polega to na "rozkęceniu" chromatyny regulowanym prawdopodobnie przez tzw. LCR, lokalne regiony kontrolne (ang. *locus control regions*) i wiążące się z nimi czynniki białkowe, co zapoczątkowuje reorganizację chromatyny i często demetylację DNA w części promotorowej [1, 4, 7, 28]. Chociaż "*priming*" chromatyny musi poprzedzać aktywację transkrypcji, to jednak nie musi poprzedzać pojawienia się tkankowo-specyficznych czynników transkrypcyjnych. Czynniki te mogą dawać sygnał do zmiany organizacji chromatyny [7, 27]. Ponadto, np. do demetylacji odpowiedniego rejonu promotora immunoglobulin potrzebny jest specyficzny wzmacniacz. Świadczy to, że tkankowo-specyficzne elementy regulatorowe DNA i białka z nimi oddziałujące odgrywają również rolę w regulowaniu modyfikacji DNA [23].

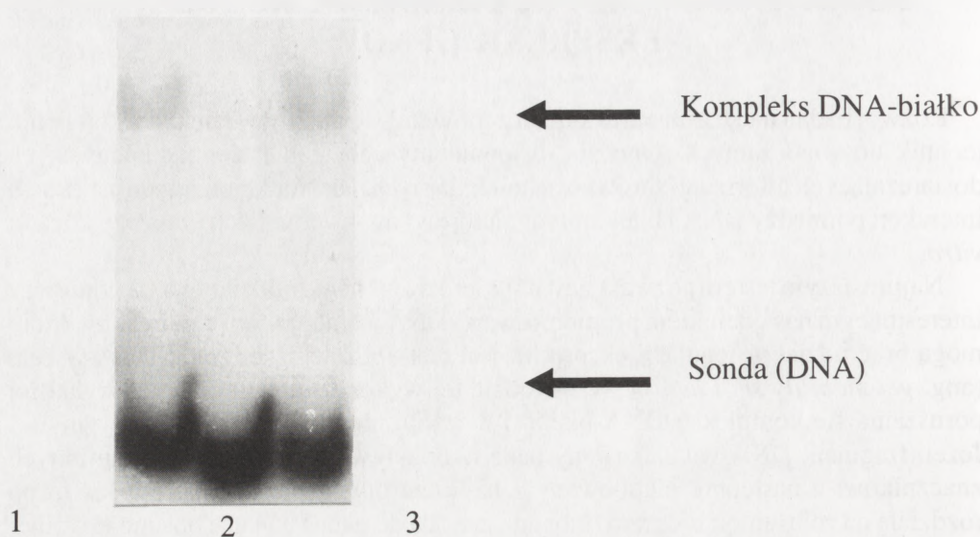
## PODSTAWOWE METODY BADANIA REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Rozwój badań nad regulacją ekspresji genów stał się możliwy dzięki doskonaleniu technik doświadczalnych. Obecnie dysponujemy całą gamą technik badawczych dostarczających informacji zarówno o molekularnych, jak i funkcjonalnych aspektach interakcji pomiędzy DNA i białkami regulatorowymi w warunkach *in vivo*, jak też *in vitro*.

Najprostszym testem pozwalającym stwierdzić istnienie oddziaływania pomiędzy interesującym nas odcinkiem promotorowego DNA a białkowymi czynnikami, które mogą brać udział w regulacji ekspresji, jest test opóźnienia migracji DNA w żelu (ang. *gel mobility shift assay*). W metodzie tej wykorzystuje się różnice szybkości poruszania się kompleksu DNA-białko i niezwiązanego DNA w żelu natywnym. Jeżeli fragment DNA wyznakowany bądź radioaktywnie, bądź przy użyciu innych znaczników, a następnie inkubowany z białkiem utworzy z nim kompleks, to po rozdziale na żelu autoradiogram (lub inna metoda detekcji) wykaże obecność wolnego DNA (sondy) oraz poruszającego się wolniej prążka odpowiadającego kompleksowi DNA-białko (rys. 2). Jako frakcji białkowej używać można zarówno oczyszczonych białek, jak i ekstraktów jądrowych lub komórkowych. Wszelkie niespecyficzne oddziaływania są eliminowane poprzez dodanie do mieszaniny inkubacyjnej nadmiaru niespecyficznego DNA, najczęściej polimeru dIdC lub dAdT. Powstający kompleks jest wynikiem specyficznego oddziaływania białka z rozpoznawaną przez to białko sekwencją nukleotydową obecną w użytym do doświadczenia fragmencie DNA.

Metodą umożliwiającą dokładne określenie sekwencji DNA uczestniczących bezpośrednio w wiązaniu czynników białkowych jest tzw. metoda "*footprinting*". Polega ona na trawieniu DNA, przy czym reakcja przebiega równolegle w próbce zawierającej tylko DNA oraz w próbce zawierającej również oczyszczone białko lub ekstrakt białkowy. Związanie się białka chroni odcinek DNA przed trawieniem DNazą lub działaniem czynników chemicznych. W rezultacie na żelu sekwencyjnym, zamiast "drabinki" charakterystycznej dla prób zawierających wyłącznie DNA, obserwuje się wygaszanie sygnału w rejonach DNA związanych z białkiem. Odczytanie w równoległej próbce sekwencji DNA umożliwia określenie sekwencji nukleotydów znajdujących się w rejonie wiążącym białko. Podobnie jak w poprzedniej metodzie, użycie do doświadczeń ekstraktów różnych typów komórek pozwala określić, które odcinki DNA oddziałują z powszechnie występującymi czynnikami białkowymi, a które wiążą czynniki tkankowo-specyficzne, czy też śledzić różnice pojawiające się np. na różnych etapach różnicowania.

Informacje uzyskane przy zastosowaniu wyżej omówionych metod mogą być rozszerzone za pomocą techniki "*South-western blot*" będącej modyfikacją klasycznej metody hybrydyzacji Southerna i polegającej na hybrydyzacji znakowanego DNA na



Rys. 2. Test opóźnienia migracji DNA w żelu z zastosowaniem odcinka (-744,-568) promotora kalcykliny i białek ekstraktu jądrowego komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Zaznaczono pozycję sondy (znakowanego DNA) i kompleksów białko-DNA: 1 – bez dodatków; 2 – ze specyficznym kompetytorem; 3 – z niespecyficznym kompetytorem

nośniku zawierającym elektroforetycznie rozdzielone ekstrakty białkowe. Metoda ta pozwala na określenie masy cząsteczkowej białka wiążącego się z DNA, jak również porównanie jego poziomu w różnych tkankach.

Metodą pozwalającą na preparatywne oczyszczenie czynników transkrypcyjnych oddziałujących z badanym odcinkiem DNA jest chromatografia powinowactwa DNA-białko. Fragment DNA, w formie najczęściej homooligomeru uzyskanego w wyniku działania ligazy, sprzęga się kowalencyjnie z nośnikiem, którym mogą być dostępne komercyjnie złoża. Warunkiem umożliwiającym związanie do nośnika jest istnienie tzw. lepkiego końca 5' i obecność w nim guaniny. Białka związane z unieruchomionym DNA wymywa się następnie zwiększając stężenie soli. Wprowadzenie nowych technik badawczych, takich jak np. BIA (ang. *real-time Biomolecular Interaction Analysis*), znacznie ułatwi badania oddziaływań między białkami a DNA i umożliwi jednoczesne uzyskiwanie danych jakościowych i ilościowych oraz izolowanie poszukiwanych czynników.

Określeniu funkcjonalnego znaczenia poszczególnych odcinków promotora dla ekspresji badanego genu służy metoda transfekcji komórek plazmidem zawierającym promotor sprzężony z tzw. genem reporterowym, tj. sekwencją kodującą enzym, którego aktywność w transfekowanych tkankach będzie następnie miarą poziomu ekspresji genu, a więc aktywności promotora. Najpowszechniej stosuje się w tej metodzie acylotransferazę chloramfenikolu (CAT) lub lucyferazę, a więc enzymy

katalizujące reakcje, których produkty oznacza się stosunkowo prostą metodą, a równocześnie unika problemu, jaki mogłaby stanowić aktywność endogennego enzymu. Porównując aktywność produktu genu reporterowego w komórkach transfekowanych plazmidami zawierającymi odcinki promotora o różnej długości uzyskuje się informacje o tym, jaki odcinek promotora jest niezbędny dla podstawowej transkrypcji, które zaś odcinki mają potencjalną zdolność aktywacji lub hamowania transkrypcji. Cennych informacji o sekwencjach promotora, które mogą być istotne dla komórkowo-specyficznego wyrażenia, dostarcza porównanie efektów transfekcji tymi samymi plazmidami dwóch typów komórek różniących się poziomem ekspresji badanego genu. Stopniowe skracanie odcinka promotorowego w kierunku 3' prowadzi najczęściej do uzyskania jednakowej ekspresji genu w obu typach komórek. Oznacza to, że na skutek kolejnej delecji usunięty został fragment promotora odpowiedzialny za inhibicję ekspresji w jednym lub jej aktywację w drugim typie komórek. Podwójna transfekcja komórek plazmidem zawierającym promotor i gen reporterowy oraz drugim plazmidem zawierającym sekwencję kodującą wiążący się z promotorem czynnik transkrypcyjny stanowi doskonały test funkcjonalny, umożliwiający obserwację wpływu tego czynnika na aktywność promotora w warunkach *in vivo*.

Metoda "transkrypcji *in vitro*" umożliwia natomiast badanie ekspresji genu w układzie, którego skład można w dużej mierze kontrolować. DNA zawierający odcinek promotorowy i np. część kodującą znanego genu inkubuje się z ekstraktami jądrowymi zawierającymi m.in. aktywny kompleks polimerazy RNA. Do takiego układu można dodawać oczyszczone białka regulujące, czy też używać ekstraktów białkowych pozbawionych pewnego składnika uzyskując tą drogą bezpośrednio informacje o wpływie wprowadzonej zmiany na aktywność promotora. Mieszaninę taką uzupełnia się zestawem 4 nukleotydów, z których jeden jest znakowany, a następnie mierzy ilość produktu reakcji, czyli znakowanego mRNA o długości odpowiadającej długości części kodującej plazmidu.

Użycie plazmidów DNA zawierających badany odcinek promotorowy i gen reporterowy "do produkcji" myszy transgenicznnych, czyli zwierząt, które we wszystkich komórkach mają wbudowany w genom dodatkowy odcinek DNA, stanowi doskonałą, acz drogą i czasochłonną metodę identyfikacji elementów DNA odpowiedzialnych za komórkowo-specyficzną ekspresję. Stwierdzono np., że odcinek promotorowy o długości 1.1 kpz genu  $\alpha$ -1-tubuliny zawiera wystarczającą informację do ekspresji  $\beta$ -galaktozydazy w myszach transgenicznnych w takim samym momencie okresu embrionalnego i tylko w neuronach, czyli tak jak genu  $\alpha$ -1-tubuliny [11].

## REGULACJA TRANSKRYPCJI IMMUNOGLOBULIN, GLOBIN I KALBINDYNY-D9k

Istnieją dwa główne modele, według których dokonuje się regulacja inicjacji transkrypcji. Według pierwszego białka regulatorowe występują w sposób restrykcyjny, tzn. tylko w niektórych komórkach i reagują tylko z genami należącymi do jednej

rodziny genów aktywnych tkankowo specyficznie. Kontrola różnicowania mięśni szkieletowych przez rodzinę czynników transkrypcyjnych MyoD jest tego przykładem. Ekspresja białek MyoD jest ograniczona do linii komórek mięśni szkieletowych i ektopowa ekspresja *in vitro* i *in vivo* wystarcza do transformacji większości linii komórkowych w komórki mięśni szkieletowych. Ta właściwość miogenicznej konwersji w wyniku działania dominującego master-genu wydaje się być unikatowa dla komórek macierzystych mięśni szkieletowych. Natomiast, np. w wątrobie, płucach, tarczycy występuje drugi typ regulacji transkrypcji determinującej specyficzność komórkową. W tkankach tych występują te same czynniki transkrypcyjne, a specyficzna ekspresja dokonuje się w wyniku ich kombinowanego działania. Są to oddziaływania pomiędzy czynnikami wiążącymi się z DNA lub interakcja pomiędzy czynnikiem wiążącym się z DNA a czynnikiem nie wiążącym się z DNA, kowalencyjna modyfikacja czynnika (najczęściej fosforylacja), która wywołuje zmiany w preferencji wobec DNA lub powinowactwie wobec innych białek. A zatem ważnymi determinantami specyficzności tych systemów są interakcje wyższego rzędu typu białko-białko i białko-DNA [2].

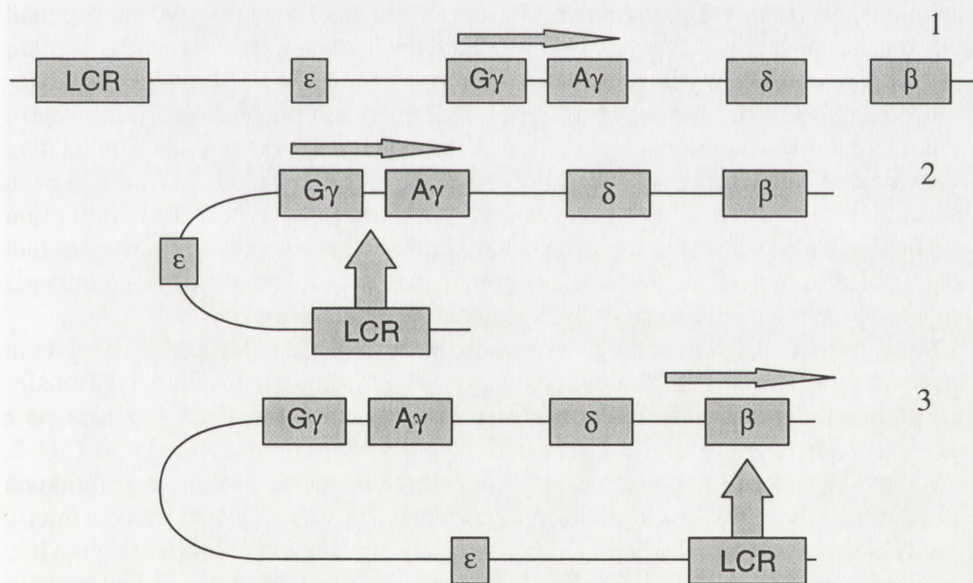
Dobrze scharakteryzowanymi genami o tkankowo-specyficznej ekspresji są geny dojrzałych immunoglobulin [23]. Białka te pojawiają się nie tylko w limfocytach B, na określonym etapie różnicowania się komórek limfoidalnych. W regulacji ekspresji genów immunoglobulin biorą udział co najmniej trzy różne elementy. Są to: specyficzny wzmacniacz dla limfocytów B, element aktywowany w komórkach limfoidalnych, a także sekwencje biorące udział w komórkowo-specyficznej kontroli potranskrypcyjnej. Elementy wzmacniaczy specyficznych dla limfocytów B są zlokalizowane wewnątrz intronów łańcuchów ciężkich oraz lekkich łańcuchów typu kappa. Jeden z czynników wiążących się z genem lekkiego łańcucha kappa (NFkB), który wydawał się występować tylko w limfocytach B, znaleziono w wielu komórkach, ale w formie nieaktywnej. Dopiero aktywacja tego czynnika transkrypcyjnego umożliwia jego specyficzne wiązanie się ze wzmacniaczem genu lekkiego łańcucha kappa i aktywację transkrypcji. Jest to zatem rozwiązanie, w którym czynniki komórkowego różnicowania przekształcają odpowiednie zestawy nieaktywnych czynników transkrypcyjnych w formy aktywne.

Badanie regulacji genu globiny dostarczyło użytecznego paradygmatu komórkowo-specyficznej i rozwojowej kontroli transkrypcji u wyższych *Eukaryota*. Centralnym problemem jest to, w jaki sposób geny poszczególnych izoform globiny są selektywnie aktywowane w rozwijających się komórkach erytroidalnych i indywidualnie programowane tak, aby pojawić się tylko w specyficznym okresie rozwojowym. Zestaw (ang. *cluster*)  $\beta$ -genów globiny zawiera geny kodujące te izoformy oraz, w kierunku 5', pięć miejsc o wysokiej wrażliwości na DNazę (tzw. HS), z czego cztery obecne są tylko w chromatynie pochodzącej z tkanek lub komórek erytroidalnych [27]. Miejsca te tworzą razem tzw. lokalny rejon kontrolny (LCR). Działanie LCR polega prawdopodobnie na tym, że wygina się on, by móc fizycznie oddziaływać z promotorem genu poszczególnych izoform globiny lub ich 3'-wzmacniaczami. Dwa



modele autonomiczny i kompetycyjny mogą tłumaczyć działanie LCR w programie ekspresji genów globiny w trakcie rozwoju organizmu. W pierwszym modelu LCR może tworzyć odpowiednie warunki w chromatynie do dalszej ekspresji genów globiny, z których każdy regulowany jest autonomicznie. W drugim modelu kolejna aktywacja poszczególnych genów może być uzyskana przez kompetycję o LCR przez te geny, w taki sposób, że w danym momencie na pojedynczym chromosomie możliwa jest interakcja LCR tylko z jednym z genów globiny. Według tego modelu pojedyncze geny globiny leżące w pozycji cis współzawodniczą kolejno ze sobą o LCR. Wynik tego współzawodnictwa zależy nie tylko od tego, jaki zestaw czynników transkrypcyjnych oddziałuje z promotorem, ale również od tego, jakie czynniki są związane z LCR (rys. 3). Stwierdzono, że ekspresja dwóch embrionalnych genów globiny jest regulowana autonomicznie, pozostałe geny globiny są regulowane kompetycyjnie. Na przykład wyłączenie płodowego genu globiny  $\gamma$  dokonuje się na skutek kompetycji z genem izoformy  $\beta$  typowej dla osobników dorosłych.

Co najmniej dziewięć genów białek S100 występuje obok siebie na chromosomie 1q21 [29], ale każde z tych białek występuje w innego typu komórkach i ich geny mogą być indukowane przez różne czynniki. Przykładowo białko S100 $\alpha$  występuje w komórkach mięśni, MRP8/MRP14 (kalgranulina A i B) w granulocytach i monocytach, kalcyklina w komórkach nabłonkowych i w fibroblastach, a poziom kalwaskuliny zwiększa się w nowotworowych komórkach metastatycznych. Geny



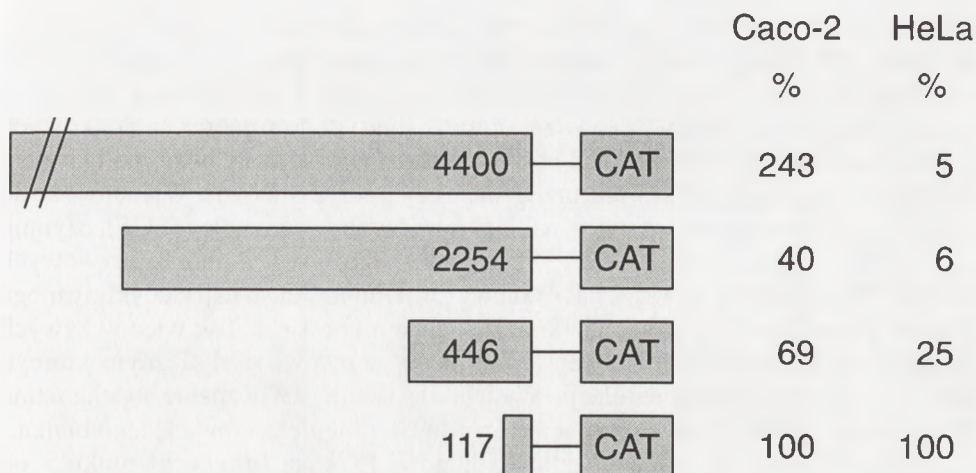
Rys. 3. Mechanizm regulacji genów globiny: 1 – organizacja kompleksu genów  $\beta$ -globiny u człowieka; 2 – w fazie płodowej interakcja LCR z genem  $\gamma$ -globiny uniemożliwia jednoczesną transkrypcję genu  $\beta$ -globiny; 3 – u dorosłego osobnika interakcja LCR z genem  $\gamma$ -globiny wyklucza transkrypcję  $\gamma$ -globiny

niektórych białek S100, np. kalbindyny-D9k (białka obecnego w nabłonku jelita), białka S100P (łożysko), białka S100B (komórki gleju) są zlokalizowane na innych chromosomach. Geny białek S100 są zatem idealnym materiałem do poszukiwania odpowiedzi na następujące pytania: Jaki jest mechanizm(y) i jakie czynniki transkrypcyjne biorą udział w procesach regulacji transkrypcji? Które sekwencje promotora są odpowiedzialne za komórkowo-specyficzną ekspresję poszczególnych białek S100?

Gen kalbindyny-D9k ulega ekspresji głównie w zróżnicowanych komórkach nabłonkowych dwunastnicy i jest to gen modelowy w badaniu molekularnych mechanizmów specyficznie jelitowej transkrypcji. W genie tym zidentyfikowano jedno miejsce wrażliwe na DNAzę (miejsce HS4) blisko promotora, a drugie (miejsce HS1) 3,5 kbp powyżej miejsca startu transkrypcji [21]. Do HS4 wiążą się jelitowy czynnik transkrypcyjny Cdx-2 oraz powszechnie występujące czynniki transkrypcyjne i te, które występują w dużej ilości w wątrobie.

Analizowano różne plazmidy zawierające fragmenty 5'-genu kalbindyny-D9k oraz gen reporterowy wprowadzając je do dwóch typów komórek: komórek wykazujących naturalną ekspresję kalbindyny-D9k (Caco-2) oraz komórek HeLa, które nie wykazują obecności transkryptu tego genu [21]. Region od -117 do +20 bp kierował ekspresją genu reporterowego w jednakowy sposób w obu typach komórek i ten poziom uznano jako 100% (rys. 4). Wydłużenie odcinka w kierunku 5' z jednej strony zmniejszyło poziom transkrypcji, a z drugiej ujawniło zróżnicowaną aktywność plazmidów w badanych komórkach. W komórkach HeLa zaobserwowano ponad 20-krotną represję transkrypcji, a w komórkach pochodzenia jelitowego nie większą niż 3-krotną represję. Wydłużenie plazmidów powyżej -2254 bp (do -4400) powodowało ponad 24-krotny wzrost transkrypcji w komórkach pochodzenia jelitowego i żadnej zmiany w komórkach HeLa. Ta analiza delecyjna wskazuje, że istnieją dwa rejony determinujące specyficznie jelitową transkrypcję: jeden od -117 do +20 bp, a drugi pomiędzy -466 a 4,4 kbp powyżej miejsca startu transkrypcji. Ten drugi rejon wydaje się działać jako rejon supresorowy w komórkach nie wykazujących naturalnej ekspresji kalbindyny-D9k, natomiast w komórkach pochodzenia jelitowego ujawnia obecność pozytywnych i negatywnych elementów regulatorowych.

Stosując metodę "footprinting" wykazano, że czynnik Cdx-2 wiązał się z rejonem A (od -40 do -23 bp) promotora pokrywającym się częściowo z TATA-box. Transfekcja komórek dwoma plazmidami, z których jeden zawierał miejsce A połączone z genem reporterowym, a drugi był wektorem ekspresyjnym kodującym czynnik Cdx-2, powodowała znaczne hamowanie aktywności genu reporterowego w komórkach HeLa, w przeciwieństwie do komórek pochodzenia jelitowego. Do pozostałych miejsc zidentyfikowanych metodą "footprinting" wiązały się inne czynniki transkrypcyjne: do miejsca B i D – czynnik C/EBP, który jest obecny w ekstraktach jelitowych i wątrobowych, do miejsca C – czynnik HNF-1 obecny m.in. w ekstraktach wątroby, do miejsca E – czynnik HNF-4 (wątrobowy), a do miejsca G – czynnik NF-1 występujący powszechnie. Powyższe wyniki wskazują, że gen kalbindyny-D9k za-



Rys. 4. Schematyczne przedstawienie plazmidów użytych do transfekcji i względna aktywność CAT w transfekowanych komórkach Caco-2 i HeLa. Liczbami oznaczono długość (pz) odcinków promotora genu kalbindyny-D9k w kolejnych plazmidach. W procentach wyrażono względną aktywność CAT przyjmując za 100% aktywność w komórkach transfekowanych plazmidem zawierającym najkrótszy (-117, +20) odcinek promotora (według [26], zmodyfikowane)

wiera rejon podstawowego promotora (od -117 do +20), który działa zarówno w komórkach wykazujących ekspresję tego białka, jak i takich, w których nie ma żadnej ekspresji. Specyficznie jelitowa ekspresja kalbindyny-D9k dokonuje się dzięki sekwencjom zlokalizowanym powyżej tego odcinka DNA. Zidentyfikowano czynniki transkrypcyjne wiążące się z badaną częścią genu kalbindyny-D9k. Szczególnie interesujący jest fakt, że są to czynniki występujące w jelicie i wątrobie. Jeden z nich (Cdx-2) pojawia się tylko w jelicie różnych gatunków zwierząt. Promotor kalbindyny-D9k zawiera zatem wyspecjalizowany TATA-box, który współpracując z otaczającymi sekwencjami determinuje jelitowo specyficzną transkrypcję. Nie jest to pierwszy przypadek, gdy TATA-box bierze udział w regulacji komórkowo-specyficznego transkrypcji. Na przykład czynnik GATA-1 wiąże się z TATA-box genu  $\beta$ -globiny kury.

## REGULACJA TRANSKRYPCJI KALCYKLINY I KALRETININY – BADANIA WŁASNE

Kalcyklina jest białkiem wiążącym wapń z grupy białek S100, które charakteryzują się obecnością dwóch domen typu "EF-hand". Wiąże z różnym powinowactwem dwa jony wapnia, czemu towarzyszy zmiana konformacyjna powodująca ekspozycję domen hydrofobowych [16]. Tak jak w przypadku innych białek S100 fizjologiczna rola kalcykliny nie została dotąd zdefiniowana. W badaniach biochemicznych wyka-

ziano zdolność kalcykliny do wiązania się z dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego [9] i z białkami grupy aneksyn [9, 37], jednak funkcjonalne znaczenie tych interakcji nie jest znane. Histologicznie wykazano, że kalcyklina jest obecna w różnych narządach, ale jej występowanie ograniczone jest do komórek nabłonkowych i fibroblastów [17]. W komórkach hodowanych *in vitro* zmiany poziomu ekspresji kalcykliny mogą być indukowane przez różne czynniki zewnętrzne. Wiadomo, że do czynników takich należą: surowica, nabłonkowy czynnik wzrostowy (EGF), czynnik wzrostowy z płytek krwi (PDGF) [3], czynnik wzrostowy komórek nerwowych (NGF) [22], estry forbolu [12], kwas retinowy [32]. Zmiany ekspresji kalcykliny mogą też być indukowane transformacją komórek genem H-ras [5]. Tak więc w żywych organizmach kalcyklina jest białkiem komórkowo i tkankowo specyficznym, którego ekspresja podlega ścisłej regulacji. Wydaje się zatem, że poznanie mechanizmu aktywacji genu kalcykliny może pomóc wyjaśnić fizjologiczną funkcję tego białka.

Znany jest fragment genu kalcykliny o długości 1371 par zasad w kierunku 5' od miejsca inicjacji transkrypcji. Odcinek ten zawiera typową sekwencję TATA (poz -29 pz), sekwencję zbliżoną do sekwencji wzmacniacza transkrypcji (podobną do tzw. składnika C2 SV40 enhancera) (poz. od -164 do -144 pz) oraz prawdopodobnie drugą taką sekwencję w poz. -935, a także odcinki bogate w zasady GC, typowe dla elementów wiążących czynnik transkrypcyjny SP-1 [8]. Stwierdzono brak typowych sekwencji najwyższej zgodności typu AP-1, NFκB, czy elementu odpowiedzi na surowicę (SRE) – pomimo aktywacji transkrypcji pod wpływem surowicy; znaleziono natomiast 4 potencjalne sekwencje typu AP-2 [12].

Zbadano także funkcjonalne znaczenie poszczególnych odcinków promotora genu kalcykliny i stwierdzono, że element konieczny do stymulacji przez surowicę znajduje się w odcinku od -42 do -32 pz [10]. Usunięcie sekwencji domniemanego wzmacniacza transkrypcji (-164 do -144 pz) powoduje, zgodnie z oczekiwaniem, spadek ekspresji genu. Prawdopodobnie odcinek pomiędzy -1371 i -1194 pz zawiera element regulacji negatywnej (element supresorowy), gdyż ekspresja genu zawierającego promotor o długości 1371 pz jest niższa niż genu o promotorze długości 1194 pz [8].

Podjęte przez nas badania 5'-odcinka genu kalcykliny mają na celu wyjaśnienie mechanizmu tkankowo i komórkowo specyficznego ekspresji tego białka, a w szczególności określenie, które odcinki promotora są odpowiedzialne za komórkowo-specyficzną ekspresję, jakie czynniki białkowe wpływają na podstawową i indukowaną ekspresję tego genu i czy są one komórkowo-/tkankowo-specyficzne. W pierwszym etapie badań, posługując się metodą opóźnienia migracji DNA w żelu, zbadano interakcje zachodzące pomiędzy DNA promotora a białkami jądrowymi z tkanek o różnym poziomie ekspresji kalcykliny. Stwierdzono istnienie jakościowych różnic w wiązaniu się z promotorowym DNA białek z ekstraktów jądrowych pochodzących z tkanek o wysokiej (komórki raka Ehrlicha) i niskiej (wątroba, płuca, nerki) ekspresji kalcykliny. Obserwacje te potwierdzono metodą hybrydyzacji *South-western blot*, wykazując różnice mas cząsteczkowych białek z ekstraktów komórek raka Ehrlicha i wątroby wiążących się z tym samym odcinkiem DNA genu kalcykliny. Z

kolei użycie oligonukleotydów kompetycyjnych wiążących niektóre znane czynniki transkrypcyjne, i stwierdzony brak kompetycji z promotorowym DNA, pozwoliło wykluczyć zaangażowanie tych czynników w regulacji ekspresji kalcykliny [33]. Identyfikacja białek oddziałujących z odcinkiem promotorowym genu kalcykliny będzie prawdopodobnie możliwa poprzez określenie metodą "footprinting" rozpoznawanych przez nie sekwencji nukleotydów i równoległe zastosowanie chromatografii powinowactwa dla oczyszczenia niektórych czynników. Końcowym etapem będzie zastosowanie metod pozwalających na zbadanie wpływu tych czynników na aktywność promotora *in vitro*.

Kalretinina należy do białek wiążących wapń, charakteryzujących się obecnością sześciu motywów "EF-hand" i wykazuje wysoką homologię do kalbindyny-D28k [36]. Kalretinina ma masę cząsteczkową około 31,5 kDa i wiąże 4 lub 5 jonów wapnia, czemu towarzyszy zmiana konformacji i wyeksponowanie domen hydrofobowych [18, 19, 34, 35]. Sugeruje to, że kalretinina jest zależnym od wapnia sensorem działającym podobnie jak kalmodulina. Sugestię tę potwierdzają wyniki badań, w których transfekowane komórki PC12, w których zachodziła ektopowa ekspresja kalretininy nie były bardziej odporne na wysokie stężenie jonów wapnia od komórek nie zawierających kalretininy [20]. Kalretinina jest białkiem tkankowo i komórkowo specyficznym. Jej ekspresja zachodzi w komórkach nerwowych w czasie rozwoju i w pewnych obszarach mózgu zwierząt dorosłych [13, 36]. Specyficzne występowanie kalretininy sugeruje ścisłą regulację ekspresji tego białka. Z biblioteki genomowej myszy wyizolowano i następnie zsekwencjonowano odcinek DNA o długości 1486 pz, w którym na końcu 3' znajdowały się sekwencje CAAT, TATA-box i fragment pierwszego eksonu kodującego kalretininę [30]. Badano następnie funkcję delecyjnych plazmidów zawierających fragmenty promotora genu kalretininy i gen reporteryowy lucyferazę. Plazmidami tymi transfekowano embrionalne komórki mózgu hodowane *in vitro*, których część wykazywała ekspresję kalretininy. Wykazano, że fragment zawierający 1486 pz reguluje transkrypcję na wysokim poziomie i tylko w neuronach, czyli z zachowaniem specyficzności komórkowej. Wysoką i neuronowo-specyficzną transkrypcję obserwowano również z plazmidami zawierającymi fragment około 900 pz powyżej miejsca startu transkrypcji. Te i inne wyniki wskazują, że odcinek proksymalny badanego fragmentu DNA zawiera promotor i rejon wyciszacza ograniczającego ekspresję do neuronów, środkowa część zawierająca rejon wzmacniacza jest potrzebna do maksymalnej ekspresji, a część dystalna zawiera dodatkowe elementy wzmacniające [30]. Badania te są kontynuowane m. in. z użyciem krótkich odcinków DNA, które wiążą różne białka w zależności od tego, czy badano ekstrakty jądrowe z mózgu czy z tkanek nie zawierających kalretininy.

## PODSUMOWANIE

Zrozumienie mechanizmów, dzięki którym specyficzne geny stają się aktywne w odpowiednim czasie i w odpowiednim miejscu w organizmie, jest problemem o dużym znaczeniu poznawczym i o ogromnym potencjale zastosowań praktycznych. Znaczenie badań regulacji ekspresji genów to między innymi stworzenie podstaw do genetycznego "screeningu" genów odpowiedzialnych za zwiększoną predyspozycję do różnych chorób. Badania takie otwierają możliwości do genetycznych interwencji i stosowania leków specyficznych wobec promotorów genów odpowiedzialnych ze predystynowanie do tych chorób. Leki działające na poziomie transkrypcji, szczepionki w postaci DNA ("immunizacja" genetyczna), czy metody umożliwiające wprowadzanie genów do wybranych tkanek organizmu w celach terapeutycznych (terapia genowa) to przyszłość, ale prawdopodobnie bliższa niż nam się obecnie wydaje.

## LITERATURA

- [1] BIRD A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; **70**: 5-8.
- [2] BOHINSKI RJ, DI LAURO R, WHITSETT JA. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Molecular Cell Biol* 1994; **14**: 5671-5681.
- [3] CALABRETTA B, VENTURELLI D, KACZMAREK L, NARNI F, TALPAZ M, ANDERSON B, BERAN M, BASERGA R. Altered expression of G<sub>1</sub>-specific genes in human malignant myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 1495-1498.
- [4] CEDAR H, RAZIN A. DNA methylation and development. *Biochem Biophys Acta* 1990; **1049**: 1-8.
- [5] CHAMBERS AF, TUCK AB. Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit Rev Oncogen* 1993; **4**: 95-114.
- [6] DARNELL JR JE. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. *Nature* 1982; **297**: 365-371.
- [7] FELSENFELD G. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 1992; **355**: 219-224.
- [8] FERRARI S, CALABRETTA B, DERIEL JK, BATTINI R, GHEZZO F, LAURET E, GRIFFIN C, EMANUEL BS, GUERIERI F, BASERGA R. Structural and functional analysis of a growth-regulated gene, the human calyculin. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8325-8332.
- [9] FILIPEK A, GERKE V, WEBER K, KUŹNICKI J. Characterization of the cell-cycle regulated protein calyculin from Ehrlich ascites tumor cells; identification of two binding proteins obtained by Ca<sup>2+</sup> dependent affinity chromatography. *Eur J Biochem* 1991; **195**: 795-800.
- [10] GHEZZO F, LAURET E, FERRARI S, BASERGA R. Growth factor regulation of the promoter for calyculin, a growth-regulated gene. *J Biol Chem* 1988; **263**: 4758-4763.
- [11] GLOSTER A, WU W, SPEELMAN A, WEISS S, CAUSING C, POZNIAK C, REYNOLDS B, CHANG E, TOMA JG, MILLER FD. The T1-tubulin promoter specifies gene expression as a function of neuronal growth and regeneration in transgenic mice. *J Neurosci* 1994; **14**: 7319-7330.

- [12] GONG Y, ALKHALAF B, MURPHY J, MURPHY LC. Differential effects of phorbol esters on proliferation and calcyclin expression in human endometrial carcinoma cells. *Cell Growth Diff* 1992; **3**: 847–853.
- [13] JACOBOWITZ DM, WINSKY L. Immunocytochemical localization of calretinin in forebrain of the rat. *J Comp Neurol* 1991; **304**, 198–218.
- [14] JOHNSON PF, MCKNIGHT SL. Eukariotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 799–839.
- [15] JOHNSON AD. The price of repression. *Cell* 1995; **81**, 655–658.
- [16] KUŹNICKI J, FILIPEK A. Purification and properties of a novel  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein (10.5 kDa) from Ehrlich-ascites-tumour cells. *Biochem J* 1987; **247**: 663–667.
- [17] KUŹNICKI J, KORDOWSKA J, PUZIANOWSKA M, WOŹNIEWICZ BM. Calcyclin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. *Exp Cell Res* 1992; **200**: 425–430.
- [18] KUŹNICKI J, WANG TC, MARTIN BM, WINSKY L, JACOBOWITZ DM. Evidence for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent conformational changes of calretinin by limited tryptic proteolysis. *Biochem J* 1995; **308**: 607–619.
- [19] KUŹNICKI J, STRAUSS KI, JACOBOWITZ DJ. Conformational changes and calcium binding by calretinin and its recombinant fragments containing different sets of EF-hand motifs. *Biochemistry* 1995; **34**: 15389–15394.
- [20] KUŹNICKI J, ISAACS K, JACOBOWITZ DM. The expression of calretinin in transfected PC12 cells provides no protection against  $\text{Ca}^{2+}$ -overload or trophic factor deprivation. *Biochim Biophys Acta* 1996, in press.
- [21] LAMBERT M, CILNOT S, SUHER, L'HORSET F, BLIN C, CALLIOT M-E, RAYMOND-JEAN M, THOMASSET M, TRABER PG, PERRET CH. *cis*-acting elements and transcription factors involved in the intestinal specific expression of the rat calbindin-D9k gene. *Eur J Biochem* 1996; **236**: 778–788.
- [22] LEONARD DB, ZIFF EB, GREENE LA. Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 3156–3167.
- [23] LICHTENSTEIN M, KEINI G, CEDAR H, BERGMAN H. B-Cell-specific demethylation: A novel role for the intronic kappa chain enhancer sequence. *Cell* 1994; **76**: 913–923.
- [24] MANIATIS T, GOODBOURN S, FISCHER JA. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 1987; **236**: 1237–1245.
- [25] MCKNIGHT S, YAMAMOTO K. (red.) W: Transcriptional regulation. *Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor NY, 1992.
- [26] MÜLLER MM, GERSTER T, SCHAFFNER W. Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur J Biochem* 1988; **176**: 485–495.
- [27] ORKIN SH. Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur J Biochem* 1995; **231**: 271–281.
- [28] PARANJAPE SM, KAMAKAKA RT, KADANOJA JT. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 265–297.
- [29] SCHAFFER BW, WICKI R, ENGELKAMP D, MATTEI M-G, HEIZMANN CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 1995; **25**: 638–643.
- [30] STRAUSS KI, KUŹNICKI J, HAMMER M, WINSKY L, JACOBOWITZ DM. The mouse calretinin gene promoter region: structural and functional components. Submitted, 1996.
- [31] STRUHL K. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 1051–1077.
- [32] TONINI GP, ANTONELLA C, CARA A, DIMARTINO D. Inducible expression of calcyclin, a gene with strong homology to S100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Schwann-like cell lines. *Cancer Res* 1991; **51**: 1733–1737.

- [33] WAKARECY G, LEŚNIAK W, KUŹNICKI J. Oddziaływanie czynników transkrypcyjnych z odcinkiem promotorowym genu kalcykliny. *Streszczenia XXXII Zjazdu Pol Tow Biochem*, Kraków 1996; 134.
- [34] WINSKY L, KUŹNICKI J. Calcium-dependent association of calretinin with synaptic membrane fractions of rat cerebellum. *J Neurochem* 1995; **65**: 381–388.
- [35] WINSKY L, KUŹNICKI J. Evidence for calcium-conformation dependent antibody recognition of calcium binding proteins. *J Neurochem* 1996; **66**: 764–771.
- [36] WINSKY L, NAKATA H, MARTIN BM, JACOBOWITZ DM. Isolation, partial amino acid sequence and immunohistochemical localization of a brain specific calcium-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 10139–10143.
- [37] ZENG FY, GERKE V, GABIUS HJ. Identification of annexin II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calcyclin-binding proteins in bovine heart. *Int J Biochem* 1993; **25**: 1019–1029.

Otrzymano: 15.09. 1996 r.

Przyjęto: 22.10. 1996 r.

Adres autorów: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3



## ROLA INDUKOWALNYCH CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

### ROLE OF INDUCIBLE TRANSCRIPTION FACTORS IN THE REGULATION OF GENE EXPRESSION

BOŻENA KAMIŃSKA

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN  
im. M. Nenckiego

*Streszczenie:* Specyficzność regulacji ekspresji genów zależy od współdziałania szeregu czynników transkrypcyjnych. Aktywacja transkrypcyjna danego genu jest często wypadkową działania czynników pozytywnych i negatywnych zaangażowanych w jego regulację. Ekspresja genów w komórce ciągle modulowana przez liczne bodźce zewnętrzne. Ważnym szlakiem wewnątrzkomórkowego przekazywania różnych bodźców od aktywowanych receptorów błonowych do jądra komórkowego są kaskady sekwencyjnie aktywowanych kinaz białkowych. Regulują one ekspresję genów poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych w dwojaki sposób. Pierwszy mechanizm polega na tym, że nieaktywne czynniki transkrypcyjne, znajdujące się w cytoplazmie, są aktywowane przez fosforylację i przemieszczają się do jądra. Drugi mechanizm polega na przemieszczaniu się aktywnych kinaz białkowych do jądra i fosforylacji docelowych czynników transkrypcyjnych. Fosforylacja czynników transkrypcyjnych jest podstawowym mechanizmem prowadzącym do integracji informacji przekazywanych w komórce i regulującym ekspresję genów. Indukowalne czynniki transkrypcyjne pełnią zatem rolę detektora określonych zmian w komórce i zależnie od sposobu aktywacji wpływają na poziom ekspresji docelowych genów.

*Słowa kluczowe:* czynniki transkrypcyjne, fosforylacja białek, kinazy MAP, przekaznictwo komórkowe, AP-1, NFκB.

*Summary:* The selective regulation of gene expression depends on cooperative action of multiple transcription factors. The transcriptional activity of a particular gene is frequently determined by the balance of positive and negative signals influencing its regulation. The cellular gene expression is constantly modulated by a variety of extracellular stimuli. Modules of sequentially activated protein kinases serve as important routes for the intracellular transmission of signals from diverse stimuli to nucleus. Two general mechanism have evolved for the rapid and accurate transmission of signals from

cell-surface receptors to the nucleus, both involving protein phosphorylation. In one mechanism, inactive transcription factors kept in the cytoplasm are translocated into the nucleus upon activation. Second mechanism depends on the translocation of activated protein kinases to the nucleus, where they phosphorylate target transcription factors. Phosphorylation of a transcription factor by several different kinases is a simple mechanism that allows different signals to converge at the same factor.

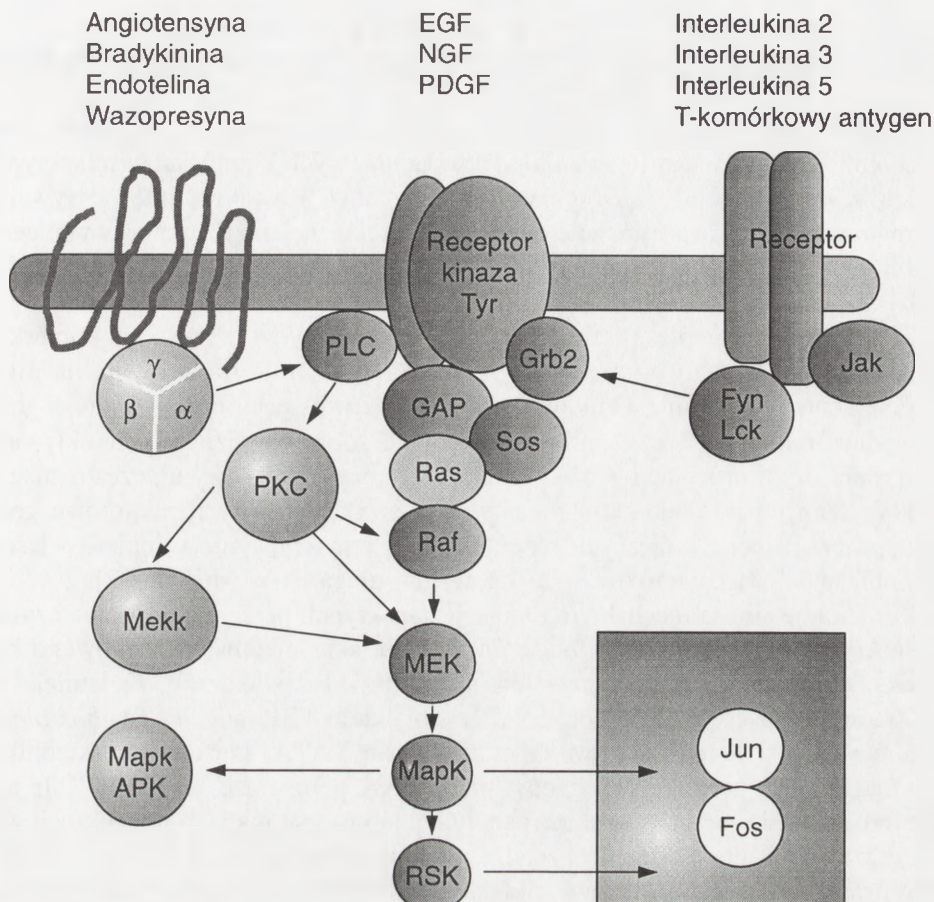
**Key words:** transcription factors, protein phosphorylation, MAP kinases, signal transduction, AP-1, NF $\kappa$ B.

## WSTĘP

Komórki eukariotyczne reagują na zmiany w środowisku włączając i wyłączając odpowiednie zestawy genów. Wielokomórkowe organizmy eukariotyczne wymagają dodatkowych mechanizmów regulacyjnych umożliwiających poszczególnym komórkom pełnienie wyspecjalizowanych funkcji. Przepływ informacji (w postaci: hormonów peptydowych, neurotransmiterów, czynników wzrostowych) ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki odbywa się za pośrednictwem swoistych receptorów błonowych. Oddziaływanie bodźców zewnątrzkomórkowych z receptorami powoduje powstawanie określonych związków wewnątrzkomórkowych zwanych wtórnymi przekąźnikami. Indukują one kaskadę następujących po sobie reakcji regulujących rozliczne funkcje komórki oraz zmieniających ekspresję genów, co prowadzi do długotrwałej zmiany w funkcjonowaniu komórki [16, 27].

## PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU OD AKTYWOWANYCH RECEPTORÓW BŁONOWYCH DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO

Istotnym elementem działania wtórnych przekąźników jest ich zdolność do aktywowania kaskady swoistych kinaz białkowych. W poszczególnych komórkach istnieje szereg równoległych szlaków przekąźnictwa sygnału, które w pewnych sytuacjach mogą się zająć i oddziaływać poprzez wspólny szlak, którym jest przekąźnictwo za pośrednictwem tzw. kinaz MAP (ang. *mitogen activated protein kinases*) [1, 15, 17, 25, 30, 37]. Mechanizm aktywacji kinaz MAP przedstawiono na rysunku 1. Kaskada kinaz MAP pozwala na aktywowanie przez fosforyzację kolejnych kinaz białkowych należących do rodziny kinaz MAP [1, 7, 15]. Charakterystyczną cechą tego szlaku jest fakt, że w przeciwieństwie do innych kinaz białkowych działających w asocjacji z błoną komórkową takich jak kinazy receptorów czynników wzrostowych lub kinaza C, niektóre kinazy MAP mogą się przemieszczać do jądra komórkowego. Po aktywacji komórki kinazy: MapK (ang. *mitogen activated protein kinase*), RSK (ang. *ribosomal S6 kinase*) i JNK (ang. *Jun N-terminal kinase*) przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego [5]. Aktywacja kinaz białkowych MAP prowadzi do aktywacji transkrypcji szeregu genów, w tym genów



Rys. 1. Schemat aktywacji kaskady kinaz MAP podczas przekazywania sygnału od błony do jądra komórkowego. Po związaniu się cytokin z receptorami i ich aktywacji dochodzi do autofosforylacji receptorów czynników wzrostu lub cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych z rodziny Src. Z ufosforylowaną tyrozyną łączą się białka GRB2-Sos, które oddziałują następnie z białkiem Ras. Aktywacja białka Ras powoduje stymulację kinazy seryno-treoninowej Raf1, która z kolei fosforyluje MEK-kinazę kinazy MAP. Substratem MEK są MAP kinazy (Erk1 i Erk2), których substratami są inne kinazy: Rsk (kinaza 90 kDa rybosomalnej podjednostki S6) i MAPKAPK2 (kinaza 2 aktywowana przez kinazę MAP). Także aktywacja receptorów 7TM (7 domen transbłonowych), powiązanych z białkami G prowadzi do aktywacji kaskady kinaz MAP. Aktywowane kinazy MAP przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie powodują indukcję czynnika transkrypcyjnego AP-1 złożonego z białek Fos i Jun

kodujących indukowalne czynniki transkrypcyjne, takie jak AP-1 (ang. *activator protein-1*), c-Myc, STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) [6, 28, 33, 36]. W ten sposób kinazy MAP mogą pośredniczyć w przekazywaniu sygnału od błony komórkowej do jądra komórkowego. Indukowane przez nie czynniki transkrypcyjne oddziałują na ekspresję innych genów.

## **ROLA INDUKOWALNYCH CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW**

Aktywacja transkrypcji genów eukariotycznych w odpowiedzi na sygnały zewnętrzne wymaga tworzenia wieloskładnikowych kompleksów transkrypcyjnych w obrębie sekwencji regulatorowych genów. Kluczową rolę odgrywają w tym procesie białka specyficznie wiążące się z sekwencjami regulatorowymi genów i umożliwiające inicjację transkrypcji w miejscu startu syntezy mRNA danego genu [31, 34].

Podstawowy kompleks transkrypcyjny, występujący we wszystkich komórkach, aczkolwiek niezbędny w procesie syntezy RNA, kieruje transkrypcją na niskim i niezmiennym poziomie. O indukowalnej i tkankowo-specyficznej ekspresji genów decydują indukowalne czynniki transkrypcyjne. Mogą one działać jako aktywatory lub represory transkrypcji wiążąc się z obszarami regulatorowymi, często znacznie oddalonymi od miejsca startu transkrypcji. Zwykle obszary regulatorowe genów mają szereg miejsc wiążących różne czynniki transkrypcyjne i dopiero właściwa kombinacja tych czynników sprawia, że gen ulega ekspresji [11, 12].

Przyjmuje się, że mechanizm regulacji transkrypcji przez indukowalne czynniki transkrypcyjne polega na ich oddziaływaniu ze składnikami podstawowego kompleksu inicjującego transkrypcję [34, ]. Na przykład wykazano, że istnieje bezpośrednie oddziaływanie czynnika AP-1 z białkiem TBP (ang. *TATA-box binding protein*) – białkiem wiążącym się z sekwencją TATA, kluczowym składnikiem wymaganym do transkrypcji genów przez RNA polimerazę II [24]. Rola aktywatorów transkrypcji nie ogranicza się tylko do procesu inicjacji transkrypcji genu. Wykazano bowiem, że ciągła obecność czynników transkrypcyjnych jest niezbędna, aby transkrypcja genu mogła zachodzić prawidłowo. Są one bowiem wymagane do reinicjacji procesu i utrzymania kompleksu transkrypcyjnego w promotorze określonego genu [14]. Oznacza to w praktyce, że ekspresja danego genu trwa tak długo, jak długo określona kombinacja czynników transkrypcyjnych zajmuje miejsca regulatorowe i oddziałuje z podstawowym kompleksem transkrypcyjnym.

## **REGULACJA INDUKOWALNYCH CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH PRZEZ FOSFORYLACJĘ**

Indukowalne czynniki transkrypcyjne są białkami jądrowymi mającymi dwie podstawowe aktywności: zdolność wiązania się z DNA i aktywowania transkrypcji. Zazwyczaj są one nieaktywne lub nieobecne w komórkach spoczynkowych i dopiero w warunkach pobudzenia komórki dochodzi do ich aktywacji.

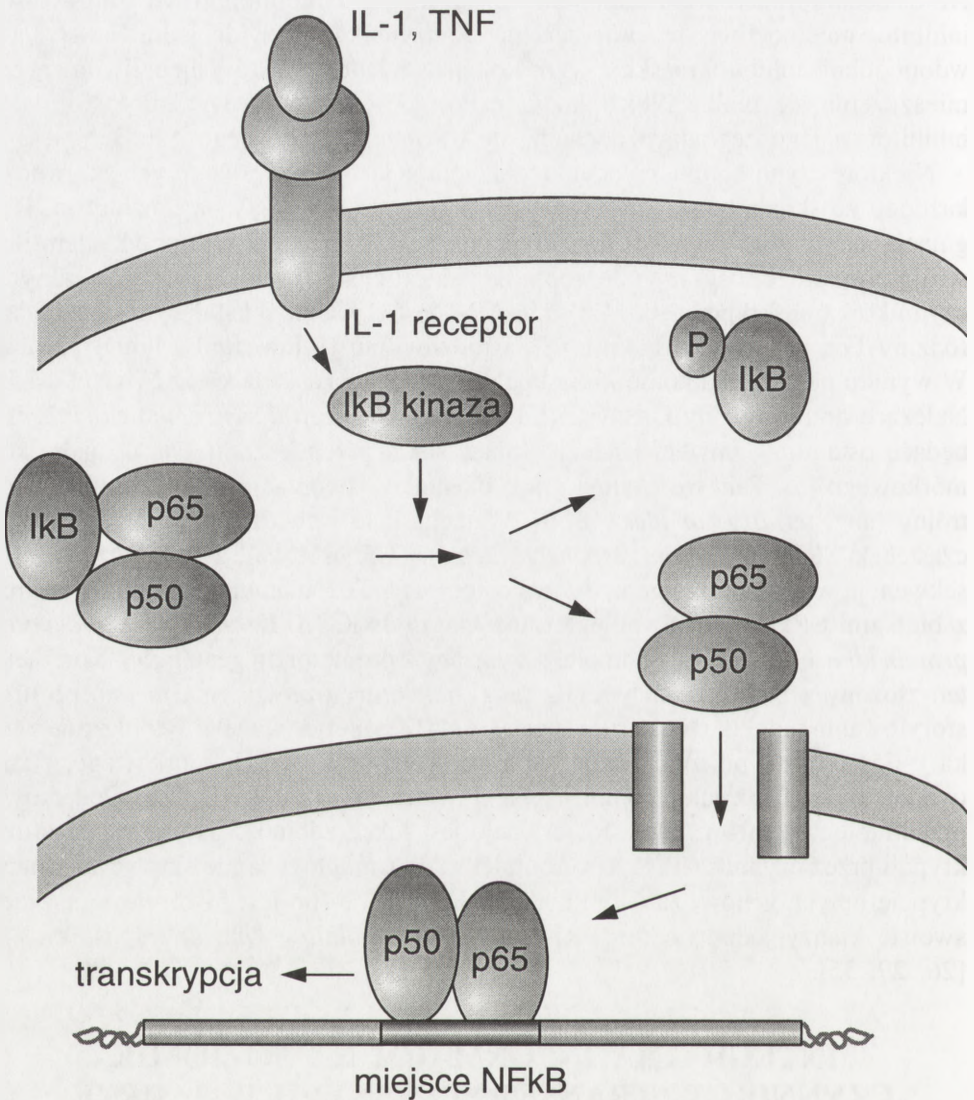
Stosunkowo prosto ulegają aktywacji czynniki transkrypcyjne, które znajdują się w cytoplazmie jako nieaktywne kompleksy. Niektóre z nich jak np. czynnik

NFκB będący dimerem białek p65-p50, związany jest z inhibitorem IκB. Ten swoisty inhibitor uniemożliwia przemieszczenie się czynnika NFκB do jądra [3, 4]. Prawdopodobnie inhibitor maskuje sygnał lokalizacji jądrowej, który umożliwiłby przemieszczenie się białka NFκB do jądra komórkowego. W wyniku fosforylacji inhibitora i jego degradacji dochodzi do uwolnienia aktywnego NFκB (rys. 2).

Niektóre czynniki transkrypcyjne funkcjonują jako dimery, w których aktywność każdego ze składników regulowana jest przez odrębny szlak przekazywania. Regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 jest dobrym przykładem ilustrującym złożoność i wielostopniowość procesu aktywacji indukowalnych czynników transkrypcyjnych. Czynniki AP-1 jest dimerem składającym się z białek rodziny Fos (c-Fos, FosB, Fra1 i 2) i rodziny Jun (c-Jun, JunB, JunD) [2, 24]. W wyniku pobudzenia komórki zostaje uruchomiona kaskada kinaz MAP [17, 25]. Należące do tej rodziny kinazy ERK1 i 2 (ang. *extracellularly regulated kinases*), będące ostatnim ogniwem łańcucha kinaz MAP, przemieszczają się do jądra komórkowego [5]. Tam fosforylują grupę czynników tworzących tzw. kompleks potrójny (ang. *ternary complex*) [8, 9]. W jego skład wchodzi: białko TCF i dwie cząsteczki SRF (ang. *serum responsive factor*). TCF jest trwale związany ze swoistą sekwencją w promotorze genu *c-fos*. Fosforylacja TCF ułatwia jego oddziaływanie z białkami SRF [13]. Równolegle inne kinazy JNK/SAPK (ang. *stress activated protein kinase*) fosforylują kompleks związany z promotorem genu *c-jun*. Kompleks ten złożony z białek c-Jun i ATF2 (ang. *activatory transcription factor*) po ufosforylowaniu indukuje transkrypcję genu *c-jun*. Zsyntetyzowane w cytoplazmie białka c-Fos i c-Jun przemieszczają się z powrotem do jądra komórkowego, gdzie tworzą dimer i już jako kompleks AP-1 wiążą się z DNA [2, 25]. Dodatkowo przedmiotem regulacji przez fosforylację jest także zdolność aktywowania transkrypcji przez czynniki AP-1. Aby kompleks AP-1 mógł wydajnie aktywować transkrypcję innych genów, zarówno białko c-Fos jak i c-Jun jest fosforylowane przez swoje kinazy, odpowiednio FRK (ang. *Fos regulating kinase*) i JNK (rys. 3) [26, 29, 35].

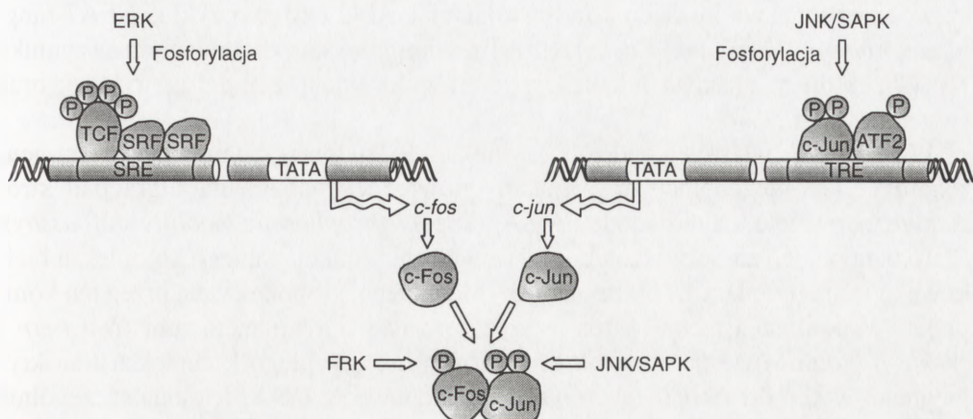
## INTEGRACJA INFORMACJI NA POZIOMIE CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH W JĄDRZE KOMÓRKOWYM

Przedstawiony powyżej opis aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP-1 jest doskonałym przykładem, jak dochodzi do konwergencji różnych szlaków przekazywania komórkowego. Odrębne kinazy MAP odpowiedzialne są za zwiększenie ilości kompleksu AP-1, inne zaś za podwyższenie jego aktywności specyficznej. Ta wielostopniowa regulacja wynika z faktu, że czynniki AP-1 jest uniwersalnym jądrowym przekaźnikiem informacji indukowanym przez szereg różnych bodźców.



Rys. 2. Schemat aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFκB przez cytokiny. Interleukina 1 lub TNF (czynniki nekrozy nowotworu) wiążą się z receptorem, co aktywuje jeszcze niezidentyfikowaną kinazę inhibitora IκB. Kinaza fosforyluje inhibitor, co powoduje jego odszczepienie się od NFκB. Uwolniony NFκB przemieszcza do jądra komórkowego i wiąże się z promotorem docelowych genów

Przedstawiony powyżej schemat dobrze ilustruje tezę, że aby doszło do indukcji jednego (co prawda ważnego) czynnika transkrypcyjnego musi dojść do równoległego pobudzenia kilku kaskad następujących po sobie reakcji. Każda z tych



Rys. 3. Regulacja aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 przez kinazy MAP. Trzy różne typy kinaz MAP są zaangażowane w regulację syntezy czynnika AP-1 i jego aktywności. Kinazy Erk indukują ekspresję genu *c-fos* poprzez fosforylację białka TCF związanego z promotorem *c-fos*. Kinazy JNK fosforylują białko c-Jun, które w kompleksie z czynnikiem ATF2 zwiększa syntezę *c-jun* mRNA, co prowadzi do wzrostu ilości białka c-Jun. Nowopowstałe białka c-Fos i c-Jun tworzą funkcjonalny czynnik transkrypcyjny AP-1, którego zdolność do aktywowania transkrypcji jest regulowana przez kinazy JNK i FRK

kaskad uruchamiana jest przez inne wtórne przekaźniki, które z kolei powstają pod wpływem działających na komórkę bodźców zewnątrzkomórkowych. W ten sposób na poziomie czynnika transkrypcyjnego dochodzi do integracji informacji przekazywanych w komórce i indukcja określonego czynnika transkrypcyjnego jest wypadkową działania różnych bodźców. Zróżnicowana odpowiedź komórkowa, w postaci ekspresji określonego zestawu genów, na te same często bodźce w różnych komórkach, zależy od rodzaju komórek i może powstawać w dwojaki sposób. Po pierwsze docelowe dla czynników transkrypcyjnych elementy genów mogą być dostępne w określonym stanie chromatyny lub niedostępne w skondensowanej chromatynie. Po drugie indukowalne czynniki mogą współdziałać z różnymi tkankowo-specyficznymi czynnikami transkrypcyjnymi i w zależności od kombinacji regulować ekspresję genów [12].

## TEST OPÓŹNIENIA MIGRACJI ELEKTROFORETYCZNEJ W ŻELU JAKO METODA OCENY AKTYWNOŚCI CZYNNIKÓW TRANSKRYPCYJNYCH

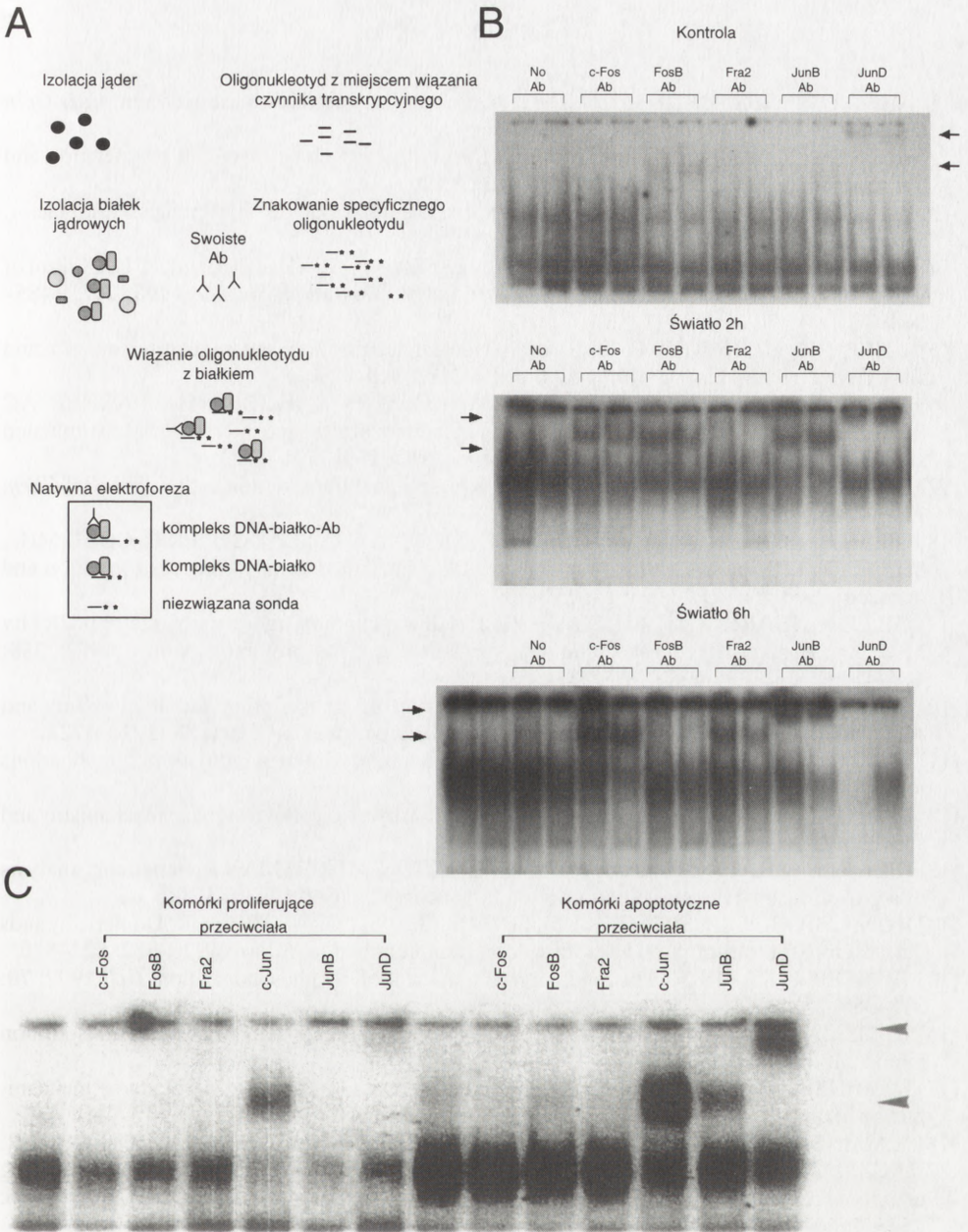
Wymienione powyżej przykłady regulacji aktywności czynników transkrypcyjnych wskazują, że stosowane do niedawna powszechnie metody badania ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne, mogą być zawodne. Dotyczy to zwła-

szcza czynników wieloskładnikowych takich jak AP-1 czy na przykład NFAT (ang. *nuclear factor of activated T cells*). NFAT jest kompleksem zbudowanym z czynnika NFATp, którego jądrowa lokalizacja jest regulowana przez defosforylację, oraz czynnika AP-1 [24].

W badaniach własnych nad rolą czynnika AP-1 w procesach plastyczności neuronalnej i neurodegeneracji stosowaliśmy głównie test opóźnienia migracji elektroforetycznej w żelu, czyli metodę EMSA (ang. *electrophoretic mobility shift assay*). Metoda ta polega na odtworzeniu *in vitro* wiązania funkcjonalnego kompleksu białkowego z fragmentem DNA zawierającym sekwencję rozpoznawaną przez ten kompleks. Wspomniana technika ma tę wyższość nad innymi metodami (*Northern i Western blotting*), że pozwala określać ilość funkcjonalnego kompleksu transkrypcyjnego w komórce oraz jego zdolność wiązania się z DNA. Jest ona szczególnie użyteczna do badania czynników transkrypcyjnych działających jako wieloskładnikowe kompleksy (rys. 4 A). Metoda ta nie pozwala niestety oceniać, jak zmienia się w trakcie aktywacji czynnika jego zdolność do stymulowania ekspresji genów.

Badania nasze, jak też wielu innych autorów wykazały, że do indukcji czynnika AP-1 i genów kodujących jego składniki, dochodzi w komórkach stymulowanych do proliferacji, różnicowania [2] i programowanej śmierci komórek [18, 22], a także po aktywacji komórek zróżnicowanych, nieproliferujących, takich jak neurony [19, 20, 23] czy makrofagi [21]. Dzięki opracowaniu modyfikacji metody EMSA możliwa stała się identyfikacja składników funkcjonalnego kompleksu transkrypcyjnego. Po zastosowaniu przeciwciał swoiście rozpoznających poszczególne białka z rodzin Fos i Jun, mogliśmy zidentyfikować składniki kompleksu AP-1 w różnych sytuacjach fizjologicznych. Stwierdziliśmy, że chociaż kompleks AP-1 jest indukowany w wielu sytuacjach, czasami pozornie przeciwstawnych: jak stymulacja proliferacji i śmierci komórek, jego skład białkowy nie jest wówczas taki sam (rys. 4). Na przykład skład kompleksu AP-1 występującego w komórkach proliferujących jest inny niż w komórkach apoptotycznych [18 i dane niepublikowane]. Z kolei w doświadczeniach nad fizjologiczną stymulacją wzrokową, zaobserwowaliśmy następującą z upływem czasu po stymulacji, wymianę składników kompleksu AP-1. W krótkim czasie po stymulacji w komórkach dominowały kompleksy zawierające białka c-Fos, JunB i c-Jun. Wraz z upływem czasu (6 godzin) w kompleksach AP-1 występowały białka FosB i JunD (rys. 4 C) [20]. Obserwowano *in vitro*, że poszczególne białka Fos i Jun mają trochę inne właściwości, więc utworzony przez różne kombinacje białek kompleks AP-1 będzie obdarzony odmiennymi właściwościami [2, 10, 24, 32]. Skład kompleksu determinuje jego zdolność do wiązania się z określonym promotorem oraz jego aktywność transkrypcyjną. Na przykład wykazano, że białka c-Fos i c-Jun, ale nie inne białka z tej rodziny, oddziałują z białkami TBP ułatwiając tworzenie kompleksu, który inicjuje transkrypcję.





Rys. 4. Schemat metody EMSA (A) i przykłady składu kompleksu AP-1 w różnych sytuacjach fizjologicznych: stymulacja wzrokowa, apoptoza; B – skład kompleksu AP-1 w korze wzrokowej mózgu szczurów kontrolnych oraz szczurów trzymanyh w ciemności i wystawionych na światło na 2 lub 6 godzin; C – skład kompleksu AP-1 w komórkach glejaka C6 przed i w 24 h po indukcji apoptozy przez cyklosporynę A

## LITERATURA

- [1] AHN NG, SEGER R, KREBS EG. The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr Opin Cell Biol* 1992; **4**: 992–999.
- [2] ANGEL P, KARIN M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transfrmation. *Bioch Biophys Acta* 1991; **1072**: 129–157.
- [3] BAEUERLE PA, BALTIMORE D. IκB: a specific inhibitor of the NFκB transcription factor. *Science* 1988; **242**: 540–546.
- [4] BROWN K, GERSTBERGER S, CARLSON L, FRANZOSO G, SIEBENLIST U. Control of IκB proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 1995; **267**: 1485–1488.
- [5] CHEN RH, SARNECKI C, BLENIS J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 915–927.
- [6] DAVID M, PETRICOIN III E, BENJAMIN C, PINE R, WEBER MJ, LARNER AC Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alfa- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins. *Science* 1995; **269**: 1721–1723.
- [7] DAVIS RJ. The Mitogen-activated Protein Kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14553–14556.
- [8] GILLE H, KORTENJANN M, THOMAE O, MOOMAW C, SLAUGHTER C, COBB MH, , SHAW PE. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 1995; **14**: 951–962.
- [9] GILLE H, SHARROCKS AD, SHAW PE. Phosphorylation of transcription factor p62tcf by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promotor. *Nature* 1992; **358**: 414–417.
- [10] HAI T, CURRAN T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA-binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3720–3724.
- [11] HE X, ROSENFELD MG. Mechanisms of complex transcriptional regulation: implications for brain development. *Neuron* 1991; **7**: 183–196.
- [12] HILL CS, TREISMAN R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 1995; **80**: 199–211.
- [13] HILL CS, MARAIS R, JOHN S, WYNNE J, DALTON S, TREISMAN R. Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. *Cell* 1993; **73**: 395–406.
- [14] HO SN, BIGGER SR, SPENCER DM, SCHREOBER SL, CRABTREE GR. Dimeric ligands define a role for transcription activation domains in reinitiation. *Nature* 1996; **382**: 822–826.
- [15] HUNTER T, KARIN M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 1992; **70**: 375–387.
- [16] KACZMAREK L. Glutamate-evoked gene expression in brain cells - Focus on transcription factors. *AminoAcids* 1994; **7**: 245–254.
- [17] KAMIŃSKA B. Receptory czynników wzrostu-struktura i funkcje. w Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałow w komorce. PWN (red.) L. Konarska 1995; 62–75.
- [18] KAMIŃSKA B, FILIPKOWSKI RK, ZURKOWSKA G, LASON W, PRZEWLOCKI R, KACZMAREK L. Dynamic changes in composition of AP-1 transcription factor DNA binding activity in rat brain following kainate induced seizures and cell death. *Eur J Neurosci* 1994; **6**: 1558–1566.
- [19] KAMIŃSKA B , KACZMAREK L. Robust induction of AP-1 transcription factor DNA binding activity in the hippocampus of aged rats. *Neurosci Lett* 1993; **153**: 189–191.
- [20] KAMIŃSKA B., KACZMAREK L, CHAUDHURI A. Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in rat visual cortex. *J Neurosci* 1996; **16**: 3968–3978.
- [21] KAMIŃSKA B, KACZMAREK L, MALAQUARNERA L., ARCIDIACONO A., MESSINA

- L., SPAMPINATO G., MESSINA A. Transcription factor activation and functional stimulation of human monocytes. *Cell Biol Int Rep* 1992,
- [22] KAMIŃSKA, ŁUKASIUK K, KACZMAREK L. Seizures-evoked activation of transcription factors. *Acta Neurobiol Exp* 1994; **54**: 65–72.
- [23] KAMIŃSKA B, MOSIENIAK G, GIERDALSKI M, KOSSUT M, 19. KACZMAREK L. Elevated AP-1 transcription factor DNA binding activity at the onset of functional plasticity during development of rat sensory cortical areas. *Mol Brain Res* 1995; **33**: 295–304.
- [24] KAMIŃSKA B, MOSIENIAK G, WIŚNIEWSKA M. Współdziałanie czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFAT w procesie regulacji ekspresji genów. *Post Bioch* 1996;
- [25] KARIN M, HUNTER T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current Biology* 1995; **5**: 747–757.
- [26] KYRIAKIS JM, BANERJEE P, NIKOLAKAKI E, DAI T, RUBIE EA, AHMAD MF, AVRUCH J., WOODGETT JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994; **369**: 156–160.
- [27] MORGAN JI, CURRAN T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann Rev Neurosci* 1991; **14**: 421–451.
- [28] LEE JC, LAYDON JT, MCDONNELL PC, GALLAGHER TF, KUMAR S, GREEN D, MCNULTY D, BLUMENTHAL MJ, HEYS JR, LANDVATTER SW. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994; **372**: 739–746.
- [29] MINDEN A, LIN A, MCMAHON M, LANGE-CARTER C, DERIJARD B, DAVIS RJ, JOHNSON GL, KARIN M. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* 1994; **266**: 1719–1723.
- [30] PAWSON T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995; **373**: 573–580.
- [31] ROEDER RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biol Sci* 1996; **21**: 327–335.
- [32] RYSECK RP, BRAVO R. c-JUN, JUN B and JUN D differ in their binding affinities to the AP-1 and CRE consensus sequences, effect of FOS proteins. *Oncogene* 1991; **6**: 533–542.
- [33] VAN DER GEER P, HUNTER T, LINDBERG RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Ann Rev Cell Biol* 1994; **10**: 251–337.
- [34] VERRIJZER CP, TJIAN R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biol Sci* 1996; **21**: 338–342.
- [35] XIA Z, DICKENS M, RAINEGAUD J, DAVIS RJ, GREENBERG ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; **270**: 1326–1331.
- [36] ZANG Z, BLENIS J, LI H, SCHNDLER C, CHEN-KIANG S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 1995; **267**: 1990–1994.
- [37] ZIEMIECKA A, HARPUR AG, WILKS AF. JAK protein tyrosine kinases: their role in cytokine signalling. *Trends Genet* 1994; **10**: 207–211.

Otrzymano: 15.09. 1996 r.

Przyjęto: 22.10. 1996 r.

Adres autora: Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego

## KOMUNIKATY

---

Zarząd **Polskiego Towarzystwa Andrologicznego** ma zaszczyt zaprosić PT lekarzy wszystkich specjalności na międzynarodowe sympozjum naukowe pt.

**"Hormonalna kontrola spermatogenezy: aspekty doświadczalne i kliniczne"**.

Odbędzie się ono w **Krakowie w dniach 21–22 maja 1997 r.** i będzie Sympozjum Satelitarnym dla VI Międzynarodowego Kongresu Andrologii w Salzburgu (25–29 maja 1997 r.).

Program będzie się składał z wykładów w języków angielskim prezentowanych przez kilkunastu światowych ekspertów z dziedziny andrologii. Prace krajowe przedstawione zostaną w postaci plakatów i plenarnej dyskusji. Wszystkich zainteresowanych uczestnictwem w Sympozjum prosimy o kontakt z Biurem Organizacyjnym pod adresem:

**Fast PLK Sp. z o.o.  
30-363 Kraków, ul. Rzemieślnicza 1**

*Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego* Przewodniczący Komitetu Naukowego  
*Dr n. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer* Prof. dr hab. med. Krzysztof Kula

---

### **Drugie Sympozjum Hodowców Tkanek Europy Środkowej**

**odbędzie się w Krakowie w dniach 25–28 czerwca 1997 r.**

Serdecznie zapraszamy do licznego udziału.

Zgłoszenia prosimy kierować do sekretarza sympozjum dr Jolanty Sadowskiej pod adres:

**Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński  
30-060 Kraków, ul. Ingardena 6  
fax: 48-12-340785, tel. 48 12, 33-63-77 w. 418  
E mail: [stok@zuk.iz.uj.edu.pl](mailto:stok@zuk.iz.uj.edu.pl)**

*Termin nadsyłania streszczeń mija 1 marca 1997 r.*

---

## TBP – STRUKTURA, FUNKCJE ORAZ INTERAKCJE Z INNYMI CZYNNIKAMI TRANSKRYPCYJNYMI

### TBP – STRUCTURE, FUNCTIONS AND INTERACTIONS WITH OTHER TRANSCRIPTION FACTORS

ROBERT KUCHARSKI, EWA BARTNIK

Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego i Instytut Biochemii i Biofizyki  
PAN, Warszawa

*Streszczenie:* TBP – białko wiążące się z sekwencją TATA (*TATA-box binding protein*) bierze udział w transkrypcji przeprowadzanej przez wszystkie jądrowe eukariotyczne polimerazy RNA. W artykule omówiono działanie tego czynnika przy transkrypcji przez polimerazę RNA II.

*Słowa kluczowe:* TBP, polimeraza RNA II, transkrypcja

*Summary:* TBP – the TATA-box binding protein – is involved in transcription by all three nuclear eukaryotic RNA polymerases. The action of this transcription factor in RNA polymerase II transcription is described.

*Key words:* TBP, RNA polymerase II, transcription

## WSTĘP

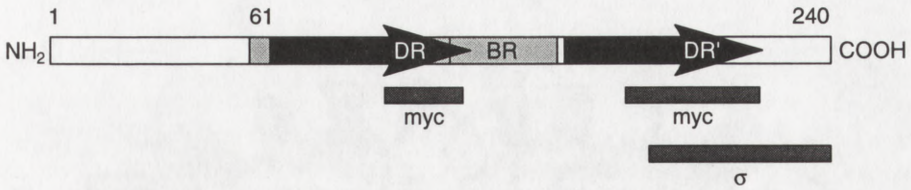
TBP (*TATA-box binding protein*, zwany też TFIID i TBF) jest jednym z najintensywniej badanych czynników transkrypcyjnych. Przyczyniają się do tego niezwykle właściwości charakteryzujące to stosunkowo niewielkie, monomeryczne białko. TBP był początkowo utożsamiany z czynnikiem TFIID oczyszczanym z ekstraktów drożdżowych i ludzkich komórek HeLa, niezbędnym do rekonstrukcji układów transkrypcyjnych *in vitro* i oddziałującym z sekwencjami TATA promotorów eukariotycznych genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II (RNA-Pol II). Wkrótce TBP okazał się być białkiem niezbędnym do inicjacji transkrypcji przez wszystkie trzy polimerazy RNA oraz uniwersalnym składnikiem kompleksów

transkrypcyjnych oddziałujących z różnymi elementami regulatorowymi obecnymi w eukariotycznych promotorach. TBP występuje powszechnie w komórkach *Eukaryota*, a niedawno geny kodujące homologiczne białka zostały sklonowane z trzech gatunków *Archaea*, co pozwoliło na stwierdzenie istnienia konserwowanych elementów w strukturze aparatów transkrypcyjnych dwóch odległych ewolucyjnie grup organizmów.

Mimo swojej niewielkiej masy cząsteczkowej białko to może być zaangażowane w bardzo dużą ilość oddziaływań z innymi makrocząsteczkami. TBP ma bardzo duże powinowactwo do DNA, w szczególności do sekwencji najwyższej zgodności 5'-TATA<sub>t</sub>/aA<sub>t</sub>/aA-3', występującej w elementach TATA-box, choć również może wiązać się z innymi sekwencjami. Ponadto TBP może uczestniczyć w licznych interakcjach z innymi białkami, w tym białkami ulegającymi ścisłej asocjacji (TAF – *TBP associated factors*) i tworzącymi z TBP wielopodjednostkowe kompleksy biorące udział w rozpoznawaniu sekwencji promotorowych, z innymi ogólnymi czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w czasie inicjacji transkrypcji w tworzeniu kompleksów preinicjacyjnych (PIC – *preinitiation complexes*) oraz z wieloma białkami modulującymi aktywność transkrypcyjną genów, w tym z represorami oraz z szeregiem aktywatorów i białek wspomagających aktywację [20]. Jednocześnie udział w rozpoznawaniu rdzeniowych sekwencji promotorowych oraz w oddziaływaniach z białkami biorącymi udział w tworzeniu i regulacji powstawania kompleksu preinicjacyjnego powoduje, że TBP należy traktować jako kluczowy składnik maszynierii transkrypcyjnej występującej we wszystkich komórkach eukariotycznych.

## STRUKTURA TBP

Po raz pierwszy gen kodujący TBP został sklonowany z drożdży niezależnie przez kilka zespołów [20, 23]. Do chwili obecnej poznano sekwencje TBP z wielu organizmów. TBP jest białkiem o długości 191–353 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 22–38 kDa i punkcie izoelektrycznym 9–10. W białku można wyróżnić dwie domeny charakteryzujące się różnym tempem ewolucji: silnie konserwowaną ewolucyjnie domenę C-kończową o stosunkowo stałej długości 180 aminokwasów i N-kończową domenę o wysokiej zmienności zarówno pod względem sekwencji, jak i długości. Międzygatunkowe homologie w domenie C-kończowej wynoszą 80–95%. W domenie tej można wyróżnić dwa proste powtórzenia sekwencji (DR, *direct repeats*) o znaczącej homologii do bakteryjnych czynników  $\sigma$  i obszar łącznikowy zawierający wiele reszt aminokwasów zasadowych (BR, *basic repeat*). TBP ma także motywy, które można odnaleźć w białku c-myc oraz IHF (Integration Host Factor) [15, 23, 24, 25] (rys. 1)

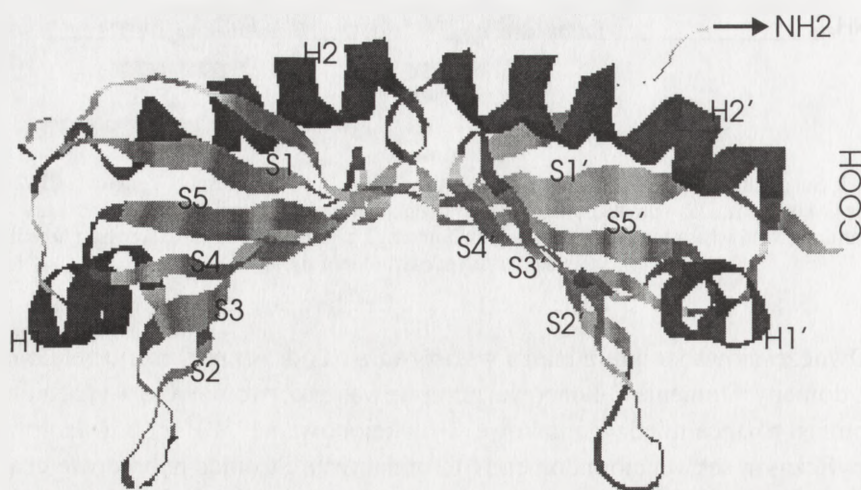


Rys. 1. Schemat struktury TBP *Saccharomyces cerevisiae*: 1–60 – domena N-końcowa, 61–240 – domena C-końcowa; DR – proste powtórzenia sekwencji aminokwasowej; BR – region bogaty w reszty aminokwasów zasadowych; myc – region homologii z białkiem c-myc;  $\sigma$  – region homologii z bakteryjnym czynnikiem sigma

Dwuczęściowa struktura białka wskazywała na odmienne funkcje pełnione przez obie domeny. Domenie C-końcowej przypisywano pierwotnie rolę w wiązaniu DNA, natomiast różnice międzygatunkowe w funkcjonowaniu TBP próbowano przypisać specyficznym sekwencjom domen N-terminalnych. Stosując hybrydowe cząsteczki TBP wykazano jednak, że np. funkcjonalne różnice między TBP ludzkim i drożdżowym mapują się w obszarze domeny C-terminalnej [17, 23]. W wyniku analizy funkcjonalnej cząsteczek TBP mających różne mutacje stwierdzono, że domena C-terminalna odpowiedzialna jest jednocześnie za rozpoznawanie sekwencji DNA, jak również za interakcje z ogólnymi czynnikami transkrypcyjnymi i białkami regulatorowymi. Rola domeny N-terminalnej nie jest jasna i może nie być taka sama u wszystkich organizmów; u drożdży nie wydaje się być niezbędna [17], a u człowieka jest odpowiedzialna za aktywację transkrypcji przez czynnik transkrypcyjny Sp1 [40].

Uzyskanie kryształów TBP *Arabidopsis thaliana* i *Saccharomyces cerevisiae* pozwoliło na ustalenie III-rzędowej struktury białka [6, 36]. Region cząsteczki odpowiadający domenie C-terminalnej TBP ma dwuboczną symetrię, co potwierdza przewidywania wynikające z analizy sekwencji aminokwasowej. TBP przypomina swoją strukturą siodło, którego wewnętrzna, wklęsła strona zbudowana jest z antyrównoległych łańcuchów struktury  $\beta$  mogących opasywać cząsteczkę DNA. W ekspozowanej na zewnątrz wypukłej części dominują heliksy  $\alpha$ , których reszty aminokwasowe mogą brać udział w oddziaływaniach z innymi składnikami kompleksów transkrypcyjnych (rys. 2).

Związanie TBP z DNA powoduje duże zmiany topologiczne w strukturze kwasu nukleinowego, co wykazano badaniem krystalograficznym kompleksów TBP drożdży i *Arabidopsis* z fragmentem DNA zawierającym sekwencje TATA [30]. TBP oddziałuje z DNA wzdłuż całej wklęsłości zawartej między strzemiionami powodując dwukrotne zgięcie cząsteczki z sumaryczną zmianą kąta biegu heliksu o  $100^\circ$  oraz częściowe rozwinięcie heliksu DNA prowadzące do powiększenia małego rowka oddziałującego z wklęsłą powierzchnią TBP. Sekwencja TATA-box oddziałuje z drugą połową domeny C-terminalnej odpowiadającej drugiemu prostemu powtó-



Rys. 2. Struktura III-rzędowa domeny C-terminalnej TBP *S. cerevisiae*: S – łańcuchy  $\beta$ , H – heliksy  $\alpha$

rzeniu. TBP w czasie wiązania się z DNA ulega jedynie nieznacznym zmianom konformacyjnym polegającym na przesunięciu obu subdomen C-końcowych względem siebie. Zmiany topologiczne zachodzące w obrębie kompleksu TBP-DNA są najprawdopodobniej sygnałem umożliwiającym powstanie kompleksu preinicjacyjnego.

## FUNKCJE TBP W PROCESIE INICJACJI TRANSKRYPCJI

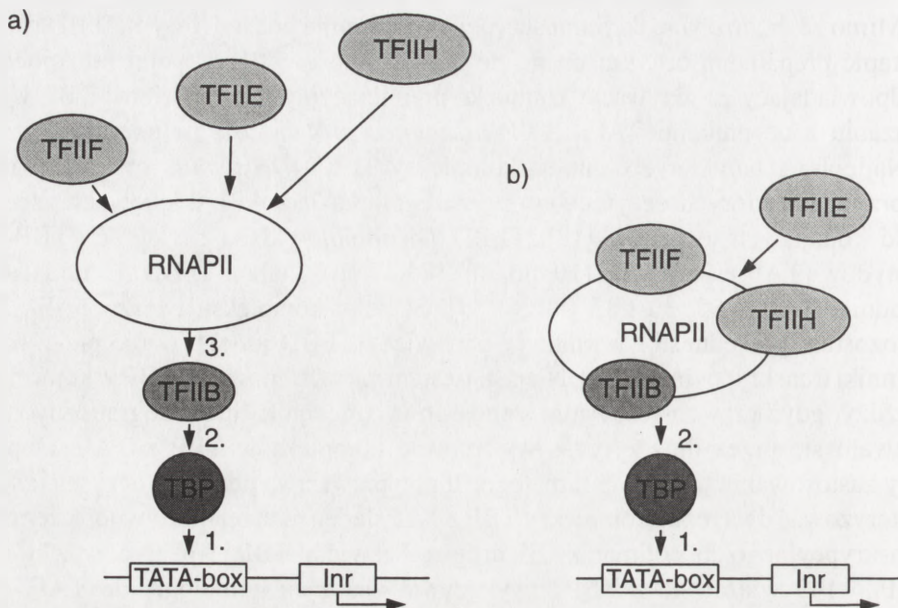
Transkrypcja genów kodujących białka prowadzona przez polimerazę RNA II zależna jest od obecności w promotorze elementu inicjatorowego lub sekwencji TATA decydujących o rekrutacji do promotora kompleksu TFIID oraz mającego powinowactwo do polimerazy RNA II czynnika TFIIB. W przypadku promotorów zawierających sekwencję TATA-box, występującą najczęściej w rejonie około 30 nukleotydów przed punktem startu transkrypcji, TFIID (lub TBP) wiąże się w pierwszej kolejności z DNA w obrębie sekwencji TATA. Przy współdziałaniu czynnika TFIIA zaś tworzy kompleks DA. Następnie przyłączany jest czynnik TFIIB będący łącznikiem między kompleksem DA oraz polimerazą RNA II. Do kompleksu DAB rekrutowana jest następnie polimeraza RNA II w połączeniu z czynnikiem TFF. Po przyłączeniu TFIIF i TFIIE powstaje pełny kompleks preinicjacyjny, który ulega następnie aktywacji w reakcji wymagającej obecności ATP [12].



Mimo że *in vitro* w reakcji transkrypcji na poziomie podstawowym TFIID można zastąpić preparatem oczyszczonego do homogenności TBP, w pełni funkcjonalny i odpowiadający za aktywację kompleksu preinicjacyjny musi zawierać TBP w powiązaniu z czynnikami TAF<sub>II</sub> (*TBP associated proteins* dla polimerazy RNA II). Najlepiej scharakteryzowane są kompleksy TFIID *Drosophila* oraz człowieka, w przypadku których oczyszczono poszczególne składniki i sklonowano znaczną ilość kodujących je genów [18]. TFIID *Drosophila* składa się oprócz TBP z 8 peptydów (TAF<sub>II</sub> 250, 150, 110, 80, 40, 30 $\alpha$  i 30 $\beta$ ). Ludzki TFIID ma dodatkowe składniki TAF<sub>II</sub> 55, 30 i 18 [9, 26, 34]. Szkielet kompleksu tworzy TAF<sub>II</sub> 250, a pozostałe podjednostki warunkują odpowiedź TFIID na aktywację przez różne czynniki transkrypcyjne [8, 51]. Niejasna jest forma występowania TBP w komórkach drożdży, gdyż przy zastosowaniu standardowych technik chromatograficznych nie udawało się przez dłuższy czas wyizolować kompleksów TBP z TAF. Dopiero przy zastosowaniu technik chromatografii powinowactwa udało się oczyścić i scharakteryzować dwa różne kompleksy TBP z TAF. Jeden nich miał aktywność czynnika transkrypcyjnego dla polimerazy III, drugi zaś zawierał TBP i 9 peptydów, z których TAF<sub>II</sub> 145 wiązał się z TBP i wykazywał znaczącą homologię do TAF<sub>II</sub> 250 *Drosophila*, natomiast TAF<sub>II</sub> 90 był homologiczny z TAF<sub>II</sub> 80. Oczyszczony kompleks funkcjonował w teście na aktywację transkrypcji [42]. Gdy porównano TAF<sub>II</sub> 150 z *Drosophila* z innymi białkami, okazało się, że białko to jest homologiczne ze znanym drożdżowym białkiem kodowanym przez gen *TSM-1*. Oba białka wykazują również silne podobieństwo funkcjonalne, gdyż wiążą się z TBP i TAF<sub>II</sub> 250 z *Drosophila* [48]. Ze względu na znaczące homologie drożdżowych TAF z TAF *Metazoa* istnieje duże prawdopodobieństwo, że mogą one pełnić analogiczne funkcje zarówno w procesie tworzenia kompleksu inicjacyjnego, jak też i w procesie aktywacji transkrypcji. Jednak ostatnio sugeruje się, że być może u drożdży czynniki TAF<sub>II</sub> nie są niezbędne do aktywacji *in vitro*, ponieważ brak sześciu różnych TAFów, choć jest letalny, nie wpływa na aktywację transkrypcji [5]. Być może TAF<sub>II</sub> są niezbędne do aktywacji transkrypcji tylko pewnych genów.

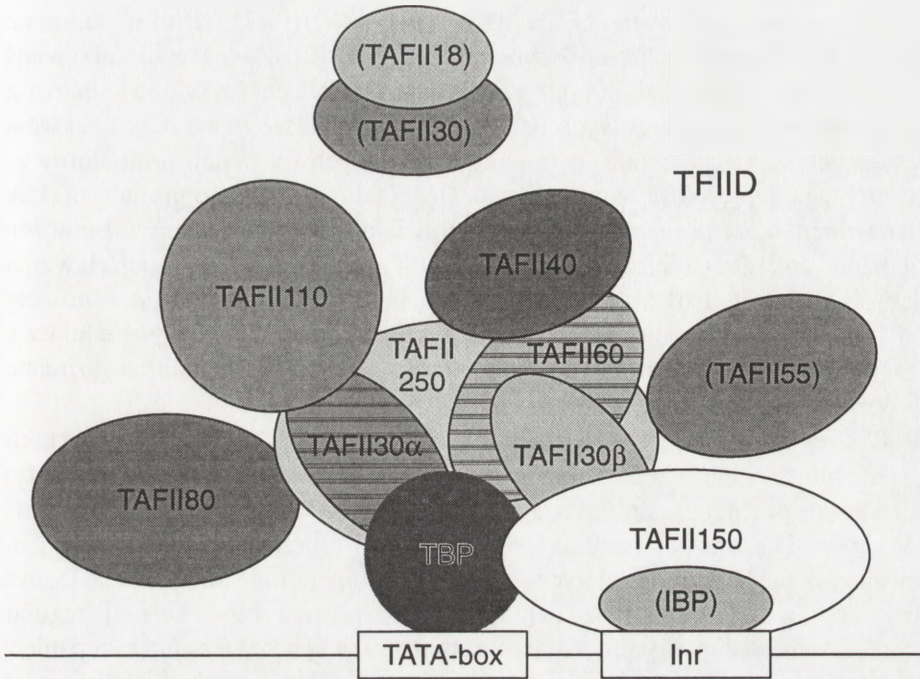
Istnieją dowody na to, że w komórkach drożdży wszystkie, z wyjątkiem TBP, składniki kompleksu preinicjacyjnego związane są z polimerazą RNA II w formie holoenzymu, zawierającego dodatkowo kompleks białek pełniących funkcje w czasie aktywacji transkrypcji, zwany mediatorem. Fakt ten wskazuje na istnienie alternatywnej drogi tworzenia kompleksu preinicjacyjnego, w którym, analogicznie jak w drodze klasycznej, pierwszym etapem jest wiązanie TBP z sekwencją TATA-box, a następnie rekrutacja przez TBP holoenzymu polimerazy RNA II zawierającego pozostałe elementy niezbędne do rozpoczęcia transkrypcji [32, 45]. Obie drogi tworzenia kompleksu preinicjacyjnego przedstawiono na rysunku 3.

W promotorach genów kodujących białka transkrybowanych przez polimerazę RNA II i nie zawierających sekwencji TATA-box elementem określającym specyficzność polimerazy jest również czynnik TFIID, jednak wchodzący w jego skład



Rys. 3. Alternatywne drogi składania kompleksu preinicjacyjnego na promotorach genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II i zawierających sekwencję TATA-box: a – model sekwencyjny, b – model holoenzymu RNAP II, Inr – sekwencja inicjatorowa

TBP nie pełni funkcji głównego elementu rozpoznającego sekwencje promotorowe. Istnieje kilka modeli opisujących mechanizm rekrutacji TFIID do tego typu promotorów. Rekrutacja może następować przez pośrednie lub bezpośrednie oddziaływanie TAF wchodzących w skład TFIID z inicjatorem, sekwencją najwyższej zgodności 5'-RRCARRRRR-3' zachodzącą na punkt startu transkrypcji. Przy bezpośrednim oddziaływaniu rolę tę pełni TAF<sub>II</sub> 150 mający znaczne powinowactwo do zawierającej inicjator sekwencji znajdującej się w rejonie -1-+38 w stosunku do punktu startu transkrypcji [48, 49]. W pośrednim oddziaływaniu TAF wchodzących w skład TFIID (np. TAF<sub>II</sub> 150) z regionem otaczającym punkt startu transkrypcji mogą pośredniczyć białka wiążące się do sekwencji inicjatorowych (IBP – *initiator binding proteins*). Opisane do tej pory białka o charakterze IBP, m.in. specyficzne białko TFIID-I, aktywatory transkrypcyjne YY1, HIP1 i USF oraz polimeraza RNA II nie wiążą się z sekwencją najwyższej zgodności inicjatora, wciąż pozostaje więc otwarty problem istnienia uniwersalnego czynnika transkrypcyjnego rozpoznającego specyficznie sekwencje inicjatorowe [27, 49]. Inny model zakłada rekrutację TFIID poprzez oddziaływanie TAF z czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym się ze specyficzną sekwencją regulatorową znajdującą się przed punktem startu transkrypcji, bez wiązania TBP do sekwencji promotorowych [41]. Mimo istnienia mechanizmów rekrutacji TFIID do sekwencji promotorowych zachodzących z pominięciem etapu wiązania TBP do DNA nie można wykluczyć istnienia wtórnych



Rys. 4. Struktura kompleksu TFIID

oddziaływać TBP z sekwencjami leżącymi przed punktem startu transkrypcji. Oddziaływania te mogą mieć charakter nieswoisty lub być wynikiem zmiany powinowactwa TBP do DNA następującej po związaniu TBP z TAF i innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Wyniki przeprowadzonych *in vitro* testów kinetyki wiązania TBP z różnymi sekwencjami DNA oraz analiza wpływu sekwencji znajdującej się w regionie -30 na efekt aktywacji transkrypcji przez czynnik Sp1 wskazują na istnienie wspomnianych powyżej oddziaływań [52, 55]. Na rysunku 4 przedstawiono budowę TFIID.

## AKTYWACJA TRANSKRYPCJI GENÓW KODUJĄCYCH BIAŁKA

Mechanizmy aktywacji transkrypcji najintensywniej analizowane są w układach transkrypcyjnych dla genów kodujących białka i transkrybowanych przez polimerazę RNA II. Uzyskanie transkrypcji na poziomie podstawowym *in vitro* wymaga obecności matrycy zawierającej sekwencję TATA-box lub inicjatora, kilku ogólnych

czynników transkrypcyjnych: TFIIB, TBP, TFIIF, TFIIE i TFIIH oraz polimerazy RNA II, ATP oraz trifosforanów rybonukleozydów [2]. Zwiększenie aktywności transkrypcyjnej ponad poziom podstawowy wymaga obecności odpowiedniego zestawu elementów regulatorowych działających w układzie *in cis*, czyli sekwencji znajdujących się bezpośrednio w pobliżu rdzeniowych sekwencji promotorowych, sekwencji znajdujących się w pewnej odległości od minimalnego promotora (UAS, *upstream activating sequences*) i sekwencji działających niezależnie od położenia i orientacji względem miejsca startu transkrypcji zawartych w sekwencjach wzmacniających (enhancerach) oraz elementów działających w układzie *in trans*, czyli odpowiedniego zestawu białek regulatorowych oddziałujących bezpośrednio z sekwencjami regulatorowymi wspomagającymi aktywację, określanych często mianem koaktywatorów lub mediatorów.

Białka regulatorowe, których związanie z sekwencjami regulatorowymi, takimi jak UAS lub sekwencje wzmacniające (enhancery), powoduje zwiększenie aktywności transkrypcyjnej regulowanego genu, zbudowane są zazwyczaj z domeny wiążącej się z DNA oraz domeny aktywującej (AD), a ponadto białka działające w formie homo- lub heterooligomerycznej zawierają domenę multimeryzującą. Domena wiążąca się z DNA odpowiedzialna jest za rozpoznawanie sekwencji regulatorowych, natomiast domeny aktywujące zaangażowane są w procesy interakcji między poszczególnymi elementami trans-regulatorowymi. Wśród wielu białek regulatorowych można stwierdzić występowanie charakterystycznych motywów zarówno w sekwencjach domen oddziałujących z DNA (np. palce cynkowe, heliks-skręt-heliks lub domena *homeobox*), aktywujących (np. kwaśne, bogate w reszty glutaminy lub proliny) oraz multimeryzujących (np. suwak leucynowy) [53].

Mimo że mechanizm aktywacji transkrypcji nie został do chwili obecnej precyzyjnie scharakteryzowany, niewątpliwie największe znaczenie mają w tym procesie bezpośrednie oddziaływania między białkami regulatorowymi a składnikami maszyny transkrypcyjnej wiążącej się z rdzeniowymi sekwencjami promotorowymi otaczającymi punkt startu transkrypcji.

W procesie aktywacji transkrypcji zaangażowane są niektóre podstawowe czynniki transkrypcyjne. Domeny aktywujące białek regulatorowych mogą w procesie aktywacji transkrypcji oddziaływać z podstawowymi czynnikami transkrypcyjnymi, w tym przede wszystkim z regionem bogatym w reszty aminokwasów zasadowych domeny C-terminalnej TBP [20], czynnikami transkrypcyjnymi TFIIA [43], TFIIB [11, 33], TFIIF [29], TFIIH [54] oraz z CTD – domeną C-kończącą polimerazy RNA II [16].

Większość aktywatorów wymaga do swego działania udziału dodatkowych białek, tzw. koaktywatorów lub mediatorów, które pierwotnie zostały zidentyfikowane jako elementy TFIID [41, 47]. Koaktywatory można podzielić na dwie grupy: białka ściśle związane z TBP (TAF), tworzące z nim stabilny kompleks TFIID oraz koaktywatory niezależne od TAF.

Wykazano, że niektóre TAF uczestniczą w procesie aktywacji transkrypcji. Domeny białek regulatorowych człowieka, *Drosophila* i drożdży mogą oddziaływać z poszczególnymi TAF [9, 46]. Istnieją dane, że w komórkach mogą występować subpopulacje TFIID zawierające większość rdzeniowych TAF, natomiast różniące się między sobą obecnością lub brakiem niektórych TAF.

Oprócz białek ściśle zasocjowanych z TBP wiele koaktywatorów daje się wyizolować jako osobne białka lub składniki większych kompleksów. Opisano szereg przykładów białek izolowanych z komórek ssaków, które są niezbędne do aktywacji i które nie są elementami kompleksu TFIID: np. ACF i PC1 [28].

U drożdży do tej pory scharakteryzowano 4 kompleksy białkowe, których składnikom można przypisać rolę mediatorów, kompleks Swi/Snf, kompleks Ada2/Ada3/Gcn5, mediator oraz kompleks Spt.

Pierwszy wymieniony kompleks Swi/Snf zawiera szereg scharakteryzowanych białek jak Swi1/Adr6, Swi2/Snf2, Swi3m Snf5, Snf oraz co najmniej cztery dodatkowe peptydy [4]. Mutacje w genach kodujących poszczególne składniki kompleksu Swi/Snf wykazywały u drożdży podobny fenotyp charakteryzujący się obniżeniem transkrypcji aktywowanej wielu genów m.in. HO, INO1, ADH1, ADH2, SUC2, GAL1 I GAL10 [38]. Podobne kompleksy zidentyfikowano u człowieka i *Drosophila* [39]. W doświadczeniach genetycznych wykazano, że kompleks ten jest związany z procesem aktywacji transkrypcji, z jednej strony przez oddziaływanie i przemodelowywanie związane z DNA zależną aktywnością ATPazy, z drugiej strony przez umożliwienie czynnikom transkrypcyjnym, takim jak Gal4, GR oraz TBP, wiązanie się z nukleosomami i aktywację transkrypcji [39].

Nazwę mediatora przypisano wielopodjednostkowemu kompleksowi zasocjowanemu z C-terminalną domeną polimerazy RNA II. Zawiera on białka Srb oraz inne komponenty. takie jak Gal1, Sug 1 oraz TFIIF [1]. Białka Srb zostały zidentyfikowane jako supresory delekcji siedmioamiokwasowych powtórzeń występujących w C-terminalnej domenie polimerazy RNA II. Należą do nich tworzące parę kinaza/cyklina białka Srb10 i Srb11, które są niezbędne w procesie aktywacji transkrypcji przez galaktozę, koaktywatory transkrypcji Srb2 i Srb5 oraz białka Srb4 i Srb6 istotne dla podstawowych funkcji komórki [37]. Wielu składnikom mediatora przypisano rolę w procesie aktywacji transkrypcji zależnej od określonych typów aktywatorów, np. Gal 1 jest istotny w aktywacji Rap i Gal4 [22].

Białka kompleksu Ada2/Ada3/Gcn5 zostały zidentyfikowane w warunkach wysokiej ekspresji w komórkach drożdży hybrydowego aktywatora Gal4-VP16, co powodowało zahamowanie wzrostu, prawdopodobnie w wyniku tworzenia nieaktywnych kompleksów między domeną aktywującą V16 a przypuszczalnym koaktywatorem. Poszukując mutacji znoszących ten efekt znaleziono szereg genów supresorowych. Stwierdzono, że produkty trzech genów *Ada2*, *Ada3* i *Gcn5* tworzą kompleks i są związane z aktywacją transkrypcji przez m.in. Gcn4, ale nie Gal4 [25].

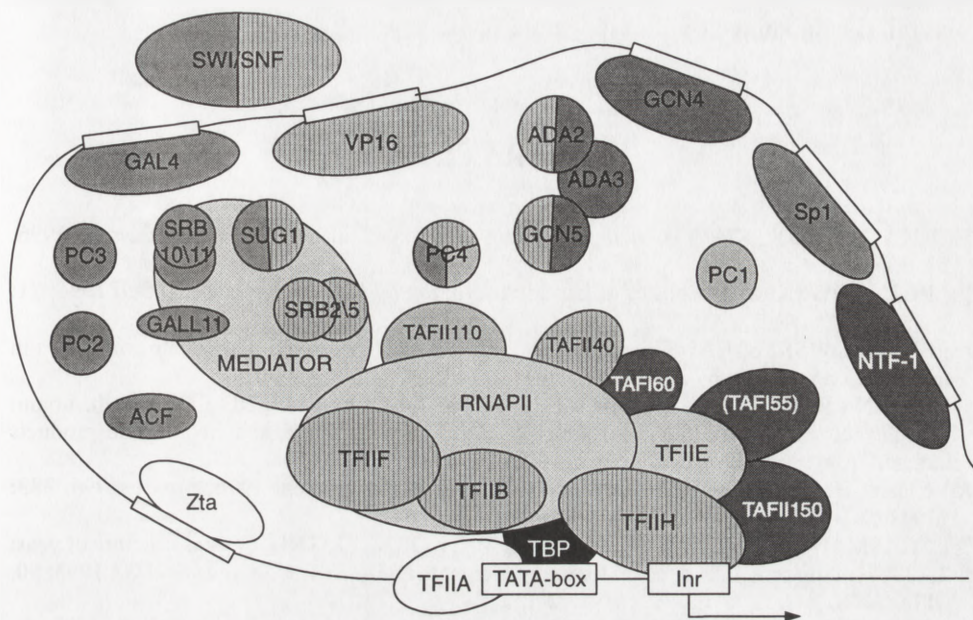
Geny *SPT* zostały zidentyfikowane jako supresory mutacji wywołanych przez insercje transpozonu Ty. Analizą genetyczną wykazano, że produkt genu *SPT3* oddziałuje z TBP i może być składnikiem wielobiałkowego kompleksu, w którego skład mogą wchodzić również produkty genów *SPT7* i *SPT8* [14].

Przykładowe drogi aktywacji prowadzonej przez wybrane białka aktywatorowe przedstawiono na rysunku 5.

Warto także pamiętać, że oprócz aktywatorów w komórce znajduje się też szereg czynników represorowych, które mogą oddziaływać bezpośrednio z TBP.

Mimo nagromadzenia bardzo dużej ilości danych wciąż nieznany jest dokładny mechanizm działania aktywatorów i koaktywatorów transkrypcji. Aktywność transkrypcyjna danego promotora jest najprawdopodobniej sumarycznym wynikiem szeregu różnorodnych bezpośrednich i pośrednich interakcji pomiędzy poszczególnymi elementami kompleksów transkrypcyjnych [13]. Jest prawdopodobne, że nie istnieje jeden uniwersalny mechanizm tego procesu. Najprostszym wytłumaczeniem działania aktywatorów może być zwiększanie tempa tworzenia kompleksu preinicjacyjnego przez przyciąganie podstawowych czynników transkrypcyjnych [10], wpływ na zmianę aktywności lub powinowactwa podstawowych czynników transkrypcyjnych i zwiększanie ilości aktywnych pośrednich kompleksów preinicjacyjnych [2]. Możliwe jest też wywołanie zmian konformacyjnych w matrycy, w wyniku których ułatwione jest przechodzenie kompleksu preinicjacyjnego w kompleks otwarty i zmiana ilości czynników niezbędnych do rozpoczęcia procesu elongacji [44, 50], kompetycyjne współzawodnictwo z represorem o miejsce wiązania z podstawowym czynnikiem transkrypcyjnym (np. TBP lub TFIIB) oraz przeciwdziałanie tworzeniu nieproduktywnych kompleksów, jak również likwidacja negatywnego oddziaływania chromatyny [19].

Ponieważ wiele aktywatorów i koaktywatorów oddziałuje z TBP i opisanych jest wiele mutacji powodujących obniżenie siły oddziaływań, co daje zniesienie efektu aktywacji, TBP jest prawdopodobnie jednym z najważniejszych odbiorców sygnałów regulatorowych. Niezależnie od modelu tworzenia kompleksu preinicjacyjnego etap wiązania TBP z sekwencjami -25/30 promotora jest jednym z pierwszych i najistotniejszych etapów w tworzeniu aktywnego kompleksu preinicjacyjnego [3]. Tempo asocjacji i dysocjacji TBP z DNA jest bardzo wolne, stąd tworzenie kompleksu TBP-DNA może być etapem limitującym w procesie rekrutacji podstawowych czynników transkrypcyjnych wchodzących w skład kompleksu preinicjacyjnego. Oddziaływania aktywator-TBP mogą prowadzić do przesunięcia równowagi w stronę asocjacji subkompleksu preinicjacyjnego TBP/DNA i zwiększać tym samym wydajność transkrypcyjną promotora. Doświadczenia przeprowadzone z hybrydowymi czynnikami transkrypcyjnymi wykazały, że obecność domeny aktywującej można zastąpić połączeniem aktywatora z TBP za pomocą wiązania kowalencyjnego lub za pośrednictwem domen dimeryzujących. W wyniku takiego połączenia białko hybrydowe (lub heterodimer) powoduje zwiększenie poziomu transkrypcji tak jak



Rys. 5. Udział podstawowych czynników transkrypcyjnych i koaktywatorów w procesie aktywacji zależnej od wybranych białek regulatorowych: Zta, Gal4, VP16, Gcn4, Sp1 i NTF1. Odcienie szarego odpowiadają bezpośrednim interakcjom między aktywatorami a pozostałymi składnikami występującymi

to ma miejsce podczas prawidłowej aktywacji [7, 31]. Białka hybrydowe rozpoznające jednocześnie dwie sekwencje regulatorowe (TATA-box oraz sekwencję specyficzną) mają zwiększone powinowactwo do DNA, co pozwala na przyspieszenie etapu wiązania TBP z matrycą. Aktywacja może być wynikiem kooperatywnego oddziaływania dwóch białek, w wyniku którego ich siła wiązania do DNA jest dużo wyższa niż suma sił wiązania przy oddziaływaniach niezależnych. Efektem jest w tym przypadku wyraźnie zwiększona ilość aktywnych kompleksów preinicjacyjnych w obrębie danego promotora [21]. Dodatkowe powinowactwo aktywatorów do podstawowych czynników transkrypcyjnych może ułatwić przyciąganie kolejnych elementów kompleksu preinicjacyjnego lub stabilizować strukturę tego kompleksu.

Niewątpliwie wiele czasu będzie jeszcze potrzebne, aby wyjaśnić do końca wszystkie szczegóły dotyczące procesów zachodzących w czasie inicjacji transkrypcji w komórkach eukariotycznych. Priorytetowe wydają się w tej chwili badania prowadzone nad klonowaniem i analizą strukturalną poszczególnych elementów wchodzących w skład maszyneryi transkrypcyjnych genów transkrybowanych przez różne

polimerazy RNA w komórkach różnych organizmów oraz prowadzoną różnymi technikami *in vitro* i *in vivo* analizą funkcjonalnych korelacji między poszczególnymi składnikami kompleksów transkrypcyjnych.

## LITERATURA

- [1] BJORKLUND S., KIM Y-J. Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 335–337.
- [2] BURATOWSKI S. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 1994; **71**: 1–3.
- [3] BURATOWSKI S, HAHN S, GUARENTE L, SHARP PA. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 1989; **56**: 549–561.
- [4] CAIRNS BR, KIM Y-J, SAYRE MH, LAURENT BC, KORNBERG RD. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI/SNF2, SWI3, SNF5 and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1950–1954.
- [5] CHAO DM, YOUNG RA. Activation without a vital ingredient 1996; *Nature* 1996; **383**: 119–120.
- [6] CHASMAN DI, FLAHERTY DM, SHARP PA, KORNBERG RD. Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8174–8178.
- [7] CHATTERJEE S., STRUHL K. Connecting a promoter-bound protein to TBP bypasses the need for a transcriptional activation domain. *Nature* 1995; **374**: 820–821.
- [8] CHEN JL, ATTARDI ILD, VERRIJZER CP, YOKOMORI K, TJIAN R. Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 1994; **79**: 93–105.
- [9] CHIANG C.M., ROEDER RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 1995; **267**: 531–536.
- [10] CHOY B., GREEN MR. Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature* 1993; **366**: 531–536.
- [11] COLGAN J, WAMPLER S, MANLEY JL. Interaction between a transcriptional activator and transcription factor IIB *in vitro*. *Nature* 1993; **362**: 549–553.
- [12] CONAWAY RC, CONAWAY JW. General initiation factors for RNA polymerase II. *Ann Rev Biochem* 1993; **62**: 161–190.
- [13] DAS G, HINKLEY CS, HERR W. Basal promoter elements as a selective determinant of transcriptional activator function. *Nature* 1995; **374**: 657–660.
- [14] EISENMANN DM, ARNDT KM, RICUPERO SL, ROONEY JW, WINSTON F. SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gen Dev* 1992; **6**: 1319–1331.
- [15] GASCH A, HOFFMANN A, HORIKOSHI M, ROEDER RG, CHUA N. *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature* 1990; **346**: 390–394.
- [16] GERBER HP, HAGMANN M, SEIPEL K, GEORGIEV O, WEST MA, LITINGTUNG Y, SCHAFFNER W, CORDEN JL. RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* 1995; **374**: 660–662.
- [17] GILL G, TJIAN R. A highly conserved domain of TFIID displays species specificity *in vivo*. *Cell* 1991; **65**: 333–340.
- [18] GOODRICH JA, TJIAN R. TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 403–409.



- [19] HAHN S. Structure (?) and function of acidic transcription activators. *Cell* 1993; **72**: 481–483.
- [20] HERNANDEZ N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Gen Dev* 1993; **7**: 1291–1308.
- [21] HERSCHLAG D, JOHNSON FB. Synergism in transcriptional activation: a kinetic view. *Gen Dev* 1993; **7**: 173–179.
- [22] HIMMELFARB HL, PEARLBERG J, LAST DH, PTASHNE M. GAL11P: a yeast mutation that potentiates the effect of weak GAL4-derived activators. *Cell* 1990; **63**: 1299–1309.
- [23] HORIKOSHI M, WANG CK, FUJII H, CROMLISH JA, WEIL PA, ROEDER RG. Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box. *Nature* 1989; **341**: 299–303.
- [24] HORIKOSHI M, YAMAMOTO T, OHKUMA Y, WEIL PA, ROEDER RG. Analysis of structure-function relationships of yeast TATA box binding factor TFIID. *Cell* 1990; **61**: 1171–1178.
- [25] HORIUCHI J, SILVERMAN N, MARCUS GA, GUARENTE L. ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol Cell Biol* 1991; **15**: 1203–1209.
- [26] JACQ X, BROU C, LUTZ Y, DAVIDSON I, CHAMBON P, TORA L Human TAF<sub>II</sub> 30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 1994; **79**: 107–117.
- [27] JAVAKARY R, KHACHI A, LO K, ZENZIE-GREGORY B, SMALE ST. DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 116–127.
- [28] KAISER K, MEISTERERNST M. The human general cofactors. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 342–345.
- [29] KEPHART DD, WANG BQ, BURTON ZF, PRICE DH. Functional analysis of *Drosophila* factor 5 (TFIIF), a general transcription factor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13536–13543.
- [30] KIM Y., GEIGER JH, HAHN S, SIGLER PB. Crystal structure of a yeast TBP/TATA box complex. *Nature* 1993; **365**: 512–520.
- [31] KLAGES N, STRUBIN M. Stimulation of RNAPolymerase II transcription initiation by recruitment of TBP *in vivo*. *Nature* 1995; **374**: 822–823.
- [32] KOLESKE AJ, YOUNG RA. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 1994; **368**: 466–469.
- [33] LIN YS, GREEN MR. Mechanism of action of an acidic transcriptional activator *in vitro*. *Cell* 1991; **64**: 971–981.
- [34] MENGUS G, MAY M, JACQ X, STAUB A, TORA L, CHAMBON P, DAVIDSON I. Cloning and characterization of hTAF<sub>II</sub>18, hTAF<sub>II</sub>20 and hTAF<sub>II</sub>28: three subunits of the human transcription factor TFIID. *EMBO J* **14**: 1520–1531.
- [35] NASH HA, GRANSTON AE. Similarity between the DNA-binding domains of IHF protein and TFIID protein. *Cell* 1991; **67**: 1037–1038.
- [36] NIKOLOV DB, HU SH, LIN J, GASCH A, HOFFMANN A, HORIKOSHI M, CHUA NH, ROEDER RG. Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* 1992; **360**: 40–46.
- [37] O' NEILL EM, OSHEA EK. Transcriptional regulation. Cyclins in initiation. *Nature* 1995; **374**: 121–122.
- [38] PETERSON CL, HERSHKOVITZ I. Characterization of the yeast SWI1, SWI2, SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 1992; **68**: 573–583.
- [39] PETERSON CL, TAMKUN JW. The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 143–146.
- [40] PETERSON MG, TANESE N, PUGH BF, TJIAN R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science* 1990; **248**: 1625–1630.

- [41] PUGH BF, TJIAN R. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 1990; **61**: 1187–1197.
- [42] REESE JC, APONE L, WALKER SS, GRIFFIN LA, GREEN MR. Yeast TAFIIs in a multisubunit complex required for activated transcription. *Nature* 1994; **371**: 523–527.
- [43] STARGELL LA, STRUHL K. The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators *in vivo*. *Science* 1995; **265**: 202–207.
- [44] TANTIN D, CAREY M. A heteroduplex template circumvents the energetic requirement for ATP during activated transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1994; **269**: 17397–17400.
- [45] THOMPSON CM, YOUNG RA. General requirement for RNA polymerase II holoenzymes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4587–4590.
- [46] THUT CJ, CJEN JL, KLEMM R, TJIAN R. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAF<sub>II</sub>40 and TAF<sub>II</sub>60. *Science* 1995; **267**: 100–104.
- [47] TJIAN R, MANIATIS T. Transcriptional activation: a complex puzzle with a few easy pieces. *Cell* 1994; **77**: 5–8.
- [48] VERRIJZER CP, YOKOMORI K, CHEN J L, TJIAN R. *Drosophila* TAF<sub>II</sub>150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science* 1994; **264**: 933–940.
- [49] VERRIJZER CP, TJIAN R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 338–341.
- [50] WANG W, CAREY M, GRALLA JD. Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* 1992; **255**: 450–453.
- [51] WENZIERL RO, DYNLACHT BD, TJIAN R. Largest subunit of *Drosophila* transcription factor TFIID directs assembly of a complex containing TBP and a coactivator. *Nature* 1993; **362**: 511–517.
- [52] WILEY SR, KRAUS RJ, MERTZ JE. Functional binding of the TATA box binding component of transcription factor TFIID to the -30 region of TATA-less promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5814–5818.
- [53] WOLBERGER C. Transcription factor structure and DNA binding. *Curr Opin Struct Biol* 1993; **3**: 3–10
- [54] IAO H, PEARSON A, COULOMBE B., TRUANT R, ZHANG S, REGIER JL, TRIEZENBERG SJ, REINBERG D, FLORES O, INGLES CJ. Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 7013–7024.
- [55] ZENZIE-GREGORY B, KHACHI A, GARRAWAY IP, SMALE ST. Mechanism of initiator mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 3841–3849.

Otrzymano: 15.09. 1996 r.

Przyjęto: 22.10. 1996 r.

Adres autorów: Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego,  
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

# INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności, a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

## POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację,

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania: Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin.

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została wysłana do innej redakcji.

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie** Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak nie** Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn. **tak nie** Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **podpis**

## TREŚĆ

Wprowadzenie – J. Kawiak, J. Kuźnicki	1
JERZMANOWSKI A.: Struktura chomatyny a regulacja ekspresji genów	3
FRONK J.: Udział metylacji DNA w regulowaniu transkrypcji u eukariontów	15
PUZIANOWSKA-KUŹNICKA M.: <i>Xenopus laevis</i> jako model do funkcjonalnych badań regulacji transkrypcji	27
KUŹNICKI J., LEŚNIAK W.: Mechanizmy komórkowo-specyficznej ekspresji genów – badania odcinków promotorowych	39
KAMIŃSKA B.: Rola indukowalnych czynników transkrypcyjnych w regulacji ekspresji genów	55
Komunikaty	66
KUCHARSKI R., BARTNIK E.: TBP – struktura, funkcje oraz interakcje z innymi czynnikami transkrypcyjnymi	75

Warunki prenumeraty kwartalnika  
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

***Prenumerata na rok 1997***

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1997 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) na rok 1997:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 50 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

*Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1997 should be placed at the local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:*

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

*Price per year 20 US dollars.*

Indeks 369705