



## Złożoność regulacji transkrypcji genów klasy II

Piotr Dullin, Mariola Galbas, Paweł Glanc, Witold Walerych  
Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza  
im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

### Complexity of Class II Genes – the Regulation of Transcription

#### Summary

The control of eucaryotic class II genes transcription is unusually complicated because it is the first stage of their expression in the cell. The assortment of specific gene coding sequence as a process of selection of submission for expression genes particularly essential is. In this process, beside RNA polymerase II, the basic transcription initiation factors that form different initiation complexes with enzyme and DNA take part, as well as other protein factors, often tissue specific that interact with fragment of DNA located in the distant place of the start of transcription. The formation of transcription complex, its components and possible interaction are discussed. The control of this process are discussed on the example of contribution of protein kinases and phosphatases modifying individual proteins, influencing the change of their mutual interactions and, in consequence, differentiating transcription level of specific genes.

#### Key words:

RNA polymerase II, transcription initiation factors, holoenzyme, phosphorylation and dephosphorylation, transcription initiation components.

#### Adres do korespondencji

Piotr Dullin,  
Katedra Biochemii  
i Biotechnologii,  
Akademia Rolnicza  
im. A. Cieszkowskiego,  
ul. Wołyńska 35,  
60-637 Poznań.

### 1. Wstęp

Odkrycie funkcji kwasów nukleinowych przed prawie pięćdziesięciu laty spowodowało gwałtowny rozwój nauk biologicznych, a w jego rezultacie związanych z nim dziedzin stosowanych, takich jak: medycyna, farmacja, szeroko pojęta produkcja żywności i przemysłowe zastosowania agronomii, ogrodnictwa i hodowli zwierząt. Wynikało to ze znaczenia odkrycia Watsona i Cricka dla biologii polegającego na ustaleniu materialnej formy

przenoszącej informację genetyczną wraz ze wszystkimi wynikającymi z tego odkrycia konsekwencjami, takimi jak wszystkie procesy związane z jej ekspresją oraz mechanizmy jej przekazywania zarówno do komórek potomnych, a także w szczególnych przypadkach do innych komórek. Przekazywanie informacji genetycznej do komórek potomnych dotyczy całości tej informacji, podczas gdy koordynowanie procesów zachodzących w komórce, poprzez odpowiednią modyfikację ujawnianej fenotypowo cechy, jest zjawiskiem wielostopniowym i dotyczącym ściśle określonych fragmentów DNA.

Wielostopniowość w bardzo ogólnym ujęciu, polega na odwzorowaniu sekwencji zasad z DNA na RNA w procesie transkrypcji. Nowo powstały kwas, po przeniesieniu do cytoplazmy służy jako matryca do syntezy polipeptydów, a powstałe białko, po wbudowaniu w struktury komórkowe spełnia swoją funkcję umożliwiając tym samym wyrażenie informacji genetycznej w postaci cechy. Głównym mechanizmem pozwalającym tworzyć różne fenotypy jest różnicująca ekspresja genów klasy II (geny klasy I odpowiadają za syntezę RNA rybosomalnego, natomiast geny klasy III syntetyzują tRNA). Regulacja ekspresji genu może nastąpić w każdym stadium biogenezy mRNA lub w czasie translacji mRNA na białko.

## **2. Podstawowe elementy regulacji ekspresji genu**

Wiele dowodów wskazuje na to, że poziom mRNA zależy przede wszystkim od inicjacji transkrypcji. Proces ten regulowany jest głównie przez interakcje pomiędzy sekwencyjnie specyficznymi elementami, które występują, przy (ale często w różnych odległościach) miejscu inicjacji (określane jako elementy cis) oraz zespołem białek, z których wiele wiąże się ze specyficznymi sekwencjami DNA (określane jako elementy trans). Zarówno czasowa jak i tkankowa regulacja transkrypcji jest zatem uzależniona od ilości i dostępności różnych czynników typu trans. Regulacja na poziomie transkrypcji decyduje o właściwościach komórek, tkanek, narządów i całego organizmu.

### **2.1. Podstawowe składniki układu transkrypcyjnego**

Transkrypcja jest enzymatyczną polimeryzacją aktywowanych rybonukleotydów, przebiegającą w kolejności określonej przez sekwencję nukleotydów w matrycy DNA. W wyniku polimeryzacji rybonukleozydo-5'-trifosforanów (ATP, GTP, CTP, UTP) powstaje łańcuch polirybonukleotydowy. Proces ten katalizują enzymy zwane polimerazami RNA zależnymi od DNA (nukleotydylotransferaza NTP:RNA EC 2.7.7.6) zwane potocznie polimerazami RNA. W jądrze komórkowym organizmów eukariotycznych wyróżniono trzy klasy, polimeraz, które odpowiadają trzem klasom produkowanych łańcuchów RNA. Polimeraza RNA I syntetyzuje rybosomalne RNA (rRNA)

i występuje głównie w jąderku. Pozostałe polimerazy występują w nukleoplazmie i odpowiadają za syntezę matrycowego RNA (mRNA) – polimeraza RNA II i transportującego RNA (tRNA) – polimeraza RNA III.

## **2.2. Etapy transkrypcji**

### **2.2.1. Inicjacja transkrypcji**

Proces transkrypcji przebiega w trzech etapach: inicjacji, elongacji i terminacji. Inicjacja procesu transkrypcji rozpoczyna się, gdy cząsteczka polimerazy rozpoznaje specyficzny odcinek DNA zwany promotorem (1). Region ten zawiera sekwencje, które wiążą polimerazę RNA i wyznaczają pierwszą zasadę transkryptu. Promotor obejmuje również sekwencje biorące udział w regulacji transkrypcji. Kompleks inicjacyjny zawiera szereg specyficznych białek inicjacyjnych, które wspomagają oddziaływanie polimerazy z DNA. Pełne złożenie kompleksu inicjacyjnego destabilizuje DNA, prowadząc do jego rozwinięcia. Od tego momentu enzym jest gotowy do przyłączenia pierwszego nukleotydu. Transkrypcji podlega tylko jedna nić rozplecionego DNA.

### **2.2.2. Elongacja RNA**

Etap elongacji zaczyna się po syntezie pierwszego wiązania fosfodiesterowego (2). Do chwili, gdy enzym osiągnie sekwencję terminującą rybonukleotydy przyłączane są do nowo powstającego RNA, zgodnie z zasadą komplementarności zasad, a polimeraza przesuwa się na matrycy DNA. Podczas elongacji niektóre białka inicjacyjne są usuwane, a kompleks transkrypcyjny zostaje wzbogacony o czynniki (białka) elongacyjne przyspieszające przyłączanie zasad. Matryca DNA ulega rozpleceniu, w wyniku działania przedniej części kompleksu transkrypcyjnego i zostaje zwinięta po zakończeniu procesu.

### **2.2.3. Terminacja transkrypcji**

Podczas terminacji rozpada się kompleks transkrypcyjny, a powstały RNA zostaje uwolniony. U prokariota terminacja zachodzi w odpowiedzi na sekwencje DNA sygnalizujące zakończenie transkrypcji. Organizmy eukariotyczne oprócz sekwencji terminującej posiadają określone białka terminujące, destabilizujące kompleks i usuwające transkrypt (3).

## 2.3. Podstawowe czynniki inicjujące transkrypcję

Aktywacja transkrypcji genów eukariotycznych w odpowiedzi na sygnały zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowe wymaga tworzenia wieloskładnikowych kompleksów transkrypcyjnych. Podstawową rolę odgrywają w tym procesie białka specyficznie wiążące się z sekwencjami regulatorowymi genów i umożliwiające inicjację transkrypcji w miejscu startu syntezy RNA danego genu (4-10).

Element promotorowy stanowi minimalna sekwencja DNA, która jest niezbędna dla prawidłowej inicjacji transkrypcji przez polimerazę RNA w rekonstruowanych, pozakomórkowych systemach. Najprostszym z tych elementów, jest element TATA zlokalizowany w pobliżu pozycji od -30 do -25 oraz inicjator (Inr) bogaty w pirymidynę, zlokalizowany w pobliżu miejsca startu transkrypcji.

Dokładna transkrypcja, nawet z silnego promotora, wymaga oprócz polimerazy RNA II dodatkowych czynników białkowych (11). Obecnie dobrze poznano i scharakteryzowano 5 podstawowych białkowych czynników inicjacyjnych. Wyizolowano je z komórek ludzkich, szczurzych, muszki owocowej, drożdży oraz rzodkiewnika. Do czynników tych zaliczamy: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIFH (TFII – oznacza czynnik transkrypcyjny polimerazy II).

### 2.3.1. Czynniki transkrypcyjne TFIID

Dotychczas najbardziej wnikliwie został poznany czynnik inicjujący zwany TFIID, znacznie poszerzając naszą wiedzę o jego mechanizmie działania w procesie inicjacji i regulacji transkrypcji przez polimerazę RNA II. Charakteryzuje się unikatową wśród czynników transkrypcyjnych zdolnością rozpoznawania specyficznych sekwencji w obrębie promotora (12). Składa się on z białka TBP (TATA-*box* Binding Protein – białko wiążące się z sekwencją TATA) i specyficznych gatunkowo i komórkowo białek towarzyszących (TAF's- TATA-*box* Associated Factors) (13-17).

#### 2.3.1.1. Rola TBP w inicjacji transkrypcji

Białko to samoistnie i z dużym powinowactwem asocjuje z regionem TATA i współdziała ze wszystkimi polimerazami RNA. Domena N-końcowa TBP jest gatunkowo specyficzna, natomiast domena C-końcowa o długości około 180 aminokwasów jest wysoce konserwatywna. Potwierdzone to zostało przez analizę sekwencji genów homologicznych (18). W wyniku przeprowadzonej analizy krytalograficznej wyjaśniono rolę TBP w inicjacji transkrypcji. Sprecyzowano strukturę różnych kompleksów TBP, pochodzących z roślin, z różnymi elementami TATA (19-21). Struktury te wykazują duże podobieństwo i reprezentują ogólny indukowany mechanizm rozpoznania typu białko-DNA (22). Pozwala to, na ziden-

tyfikowanie ramki TATA w ujęciu strukturalnym jako sekwencji złożonej z 8 par zasad.

W latach dziewięćdziesiątych, opisano szczegółowy model zachowawczego odcinka TBP. Trójwymiarowa struktura TBP, przypomina siodło, co dokładnie odpowiada biochemicznej funkcji TBP, jako białka, które obejmuje DNA tworząc stabilną platformę dla wiązania się innych czynników transkrypcyjnych. Wiązanie DNA jest wspomagane przez wklęsłą część „siodła”, podczas gdy jego „wypukła” część wiąże różne składniki kompleksu transkrypcyjnego (23). TBP zawiera dwie prawie identyczne domeny, odpowiadające dwóm powtórzeniom znalezionym w zachowawczej części TBP (24). W wiązaniu DNA pośredniczą zakrzywione, antyrównoległe struktury typu  $\beta$ , umożliwiające dużej, wklęsłej powierzchni „siodła” oplecenie nici DNA wzdłuż małej bruzdy oraz kontakt z sekwencją TATA. Koniec 5' standardowej struktury B DNA wchodzi pod wewnętrzną stronę molekularnego „siodła”, gdzie TBP przeprowadza nagłą tranzycję do rzadko występującej, częściowo rozwiniętej formy prawoskrętnej, podwójnej helisy. Efekt ten jest wywołany wprowadzeniem dwóch, fenyloalanin, które wklonowują się pomiędzy pierwsze zasady T:A i odsuwają je od siebie. Później, rozszerzony mniejszy rowek wchodzi w kontakt z nierozwiniętym DNA znajdującym się pod wewnętrzną stroną molekularnego „siodła”, pozwalając na bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy łańcuchami białka, a brzegiem mniejszej bruzdy w obrębie 6 par zasad. Drugi wielki skręt, jest wywołany poprzez wprowadzenie dwóch reszt fenyloalaniny pomiędzy dwie ostatnie zasady ramki TATA i tu następuje ponowny nagły powrót do  $\beta$ -struktury. Ze względu na to, że DNA dąży do utrzymania struktury typu  $\beta$  poza regionem TATA, parowanie zasad w rozwiniętym regionie TATA ciągle się utrzymuje (25). Upakowanie DNA w strukturę nukleosomu związane jest z owinięciem się podwójnej helisy wokół oktameru histonowego. Położenie nukleosomów (uzależnione od sekwencji), jest skorelowane ze skróceniem się sekwencji bogatych w pary A:T względem mniejszej bruzdy (26,27), a upakowanie ramki TATA w nukleosomach, prawdopodobnie powoduje ściśnięcie się mniejszej bruzdy uniemożliwiające wiązanie się podjednostki TBP. Powstały kompleks preinicjacyjny staje się aktywny po złożeniu nukleosomów (28); zrekombinowane drożdżowe TBP zapobiega represji transkrypcji przez nukleosom (29). W ten sposób struktura krystaliczna kompleksu TBP-DNA wyjaśnia mechanizm wzajemnego wykluczania się upakowania cząsteczki DNA i transkrypcji. Aktywatory transkrypcji, jak się wydaje, wiążą się do bliższych i dalszych elementów wzmacniających, pośrednicząc w wiązaniu się czynników przebudowujących nukleosom z promotorem genu podlegającego ekspresji (30). Struktury białka TBP *Acanthamoeba* zmienione w wyniku punktowych mutacji wykazały preferencję dla ustalonych poprzednio miejsc wiązań (31). Oddziaływanie TBP z DNA jest silniejsze, gdy DNA jest skręcone wzdłuż większej bruzdy, natomiast, gdy DNA jest skręcone wzdłuż bruzdy mniejszej, wiązanie TBP do DNA jest hamowane (32).

### **2.3.2. Czynniki inicjujące TFIIA**

Obecność TFIIA przy formowaniu kompleksu promotor-TBP jest nadal kontrolowana, zależy ona od źródła TBP, a także od warunków wiązania. TFIIA jest heterodimerem zbudowanym z dwóch łańcuchów zawierających domeny struktury  $\beta$ -i  $\alpha$ -helisy. Uważa się, że reakcje odtwarzane ze zrekombinowanym TBP nie wymagają TFIIA (33), podczas gdy reakcje z oczyszczonym TFIID są stymulowane (34). Przypuszcza się, że TFIIA spełnia funkcję antyrepresora – poprzez wiązanie się do kompleksu TBP promotor. TFIIA może zwiększać zdolność TBP do konkurowania z niespecyficznymi białkami wiążącymi się z promotorem (35).

### **2.3.3. Czynniki inicjujące TFIIIB**

Czynnik TFIIIB wprowadzony jest do utworzonego na sekwencji promotorowej kompleksu TFIID-IIA-DNA. Główną rolą TFIIIB, jest tworzenie pomostu pomiędzy TFIID a kompleksem pol. RNA II-TFIIF (36-38).

### **2.3.4. Czynniki inicjujące TFIIF**

TFIIF w przeciwieństwie do pozostałych czynników transkrypcyjnych tworzy bardzo stabilny kompleks z polimerazą RNA II. Oddziałując z enzymem, TFIIF zwiększa specyficzność i wydajność transkrypcji, a także wpływa na poziom elongacji (39-41). Istotną jest również jego rola w zapobieganiu wiązaniu się polimerazy do miejsc niespecyficycznych na DNA, podobnie jak czyni to bakteryjny czynnik  $\sigma$  (42-45).

### **2.3.5. Czynniki inicjujące TFIIIE**

Białko TFIIIE, jest heterotetramerycznym białkiem o podjednostkach 34 kD i 56 kD (46). Podjednostka o ciężarze 56 kD zawiera „kieszę” podobną do wszystkich kinaz z dodatkiem domeny palców cynkowych biorącej udział w wiązaniu DNA (47), zaś podjednostka 34 kD zawiera miejsca wiązania nukleotydów. TFIIIE bierze udział w rozluźnieniu promotora, a także pośredniczy w przyłączaniu się TFIIH (48).

### **2.3.6. Czynniki inicjujące transkrypcję TFIIH**

Czynnik TFIIH złożony jest z 9 podjednostek o masach od 39 do 89 kD. Białko to posiada kilka aktywności katalitycznych włączając w to: właściwości DNA- zależnej ATP-azy, DNA- zależnej helikazy oraz seryno/ treoninowej kinazy (CDK7), dzięki któ-

rej TFIIF może fosforylować C-końcową domenę dużej podjednostki polimerazy RNA II (49-51).

### 2.3.7. Znaczenie innych podjednostek czynnika inicjującego TFIID

Wymienione czynniki transkrypcyjne tworzą z DNA i polimerazą RNA podstawowy kompleks transkrypcyjny. Jest on zbudowany z jednoznacznie ustalonych podjednostek z wyjątkiem TFIID, w którym obok TBP występują TAF (TBP – *associated factors*) (52,53). Podjednostki TAF o masach cząsteczkowych w granicach od 20 do 250 kD są filogenetycznie konserwatywnymi białkami, które zlokalizowano u ludzi (hTAFII), muszki owocowej (dTAFII) i u drożdży, (yTAFII). Ich obecność jest wymagana w przypadku transkrypcji (*in vitro*) uzależnionej od aktywatorów u ludzi i muszki owocowej. Jednak ich rola w aktywacji transkrypcji *in vitro*, jak do tej pory, nie jest jasna. Niewiele również wiadomo na temat powiązań TBP i TAF wewnątrz kompleksu TFIID. Na podstawie dotychczasowej wiedzy, wiemy, że największy TAFII (hTAFII250, dTAFII250, yTAFII130) oddziałuje z górną powierzchnią TBP i prawdopodobnie wiąże pozostałe TAF do TBP (54-58). Okazało się, że hTAFII250 zapobiega wiązaniu sekwencji TATA przez podjednostkę TBP (59). Szeroka gama i sama natura oddziaływań TAF z innymi białkami może wywoływać rearanżacje różnych TAF, a w konsekwencji zmiany konformacyjne wewnątrz cząsteczki TFIID. Na podstawie przeprowadzonej analizy porównawczej wyników biochemicznych i krystalograficznych wysnuto hipotezę, że wewnątrz cząsteczki TFIID istnieje struktura podobna do oktameru histonowego (60). Konsekwencją takiego układu, jest utrzymywanie dodatnio naładowanych aminokwasów, które oddziałują z DNA w nukleosomie. Wiążą one promotor i podobnie do histonów owijają DNA na swojej powierzchni. Jednocześnie mogą one również pośredniczyć w oddziaływaniach pomiędzy białkami wewnątrz TFIID (61).

### 2.4. Rola mających zdolność do indukcji czynników inicjujących transkrypcję

Podstawowy kompleks transkrypcyjny, występujący we wszystkich komórkach, aczkolwiek niezbędny w procesie syntezy RNA, kieruje transkrypcją na niskim i niezmiennym poziomie. O mających zdolność do indukcji i tkankowospecyficznej ekspresji genów decydują dodatkowe 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 ich właściwa kombinacja sprawia, że gen ulega prawidłowej i pełnej ekspresji (62,63). Wiele różnych bodźców oddziałujących na ekspresję genów prowadzi do aktywacji kinaz białkowych. Są one integralnym składnikiem holoenzymu odpowiedzialnego

za transkrypcję, w którym również występuje wiele domen podlegających specyficznej fosforylacji. Jest zatem prawdopodobne, że aktywność czynników transkrypcyjnych jest regulowana przez fosforylację/defosforylację. Fosforylacja samego czynnika transkrypcyjnego lub białek cytoplazmatycznych pozwala na przemieszczenie ich do jądra. Powinowactwo jądrowych czynników transkrypcyjnych do DNA może być modulowane przez fosforylację zarówno pozytywnie, jak i negatywnie.

## 2.5. Formy polimerazy RNA II i ich przemiany

Wszystkie geny kodujące białka u eukariotów są transkrybowane przez polimerazę RNA II. Istnieją trzy aktywnie transkrypcyjne formy polimerazy RNA II (IIO, IIA, IIB) różniące się ciężarami największej podjednostki odpowiednio 240 kD, 220 kD, 180 kD. Wiadomo, że są one ściśle ze sobą powiązane: IIB – powstaje w wyniku proteolitycznego trawienia domeny C-końca formy IIA (pozbawiona jest tandemowo powtarzalnej multiheptapeptydowej sekwencji w domenie końca karboksylowego dużej podjednostki – CTD), natomiast IIO jest rezultatem fosforylacji C-końca formy IIA (64). Stwierdzono, że forma IIA wiąże się z kompleksem preinicjacyjnym (65). W przeprowadzonej analizie krystalograficznej drożdżowej polimerazy RNA II (66-68), wykazano obecność wgłębienia o średnicy 250 nm, utworzonego przez duże podjednostki RPB1 i RPB2, przez który przewleczony może być DNA. Obserwowany białkowy „palec” wystający na zewnątrz tej struktury, to domena końca karboksylowego (CTD).

### 2.5.1. Rola CTD i jego modyfikacje w czasie transkrypcji

#### 2.5.1.1. Budowa końca CTD

Fragment C-końcowy (CTD – *Carboxy Terminal Domain*) największej podjednostki polimerazy RNA II, składa się z wielokrotnych powtórzeń heptapeptydu Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (69). Sekwencja ta, może być powtórzona od 26 razy u drożdży do 52 razy u ludzi i, jak się wydaje, jest związana ze złożonością genomu. Ponieważ 5 z 7 składników tych powtórzeń może być fosforylowanych, nic dziwnego, że fosforylacja domeny CTD jest centralnym punktem procesu regulacji transkrypcji.

#### 2.5.1.2. Modyfikacje domeny C-końca w czasie transkrypcji

Podczas inicjacji syntezy RNA, domena CTD ulega hiperfosforylacji jedną grupą fosforanową na jedno powtórzenie, któremu podlega głównie seryna i w mniejszym



stopniu treonina. Do kompleksu preinicjacyjnego wchodzi nieufosforylowana forma pol. RNA II (IIA) (70), podczas gdy w elongacji bierze udział forma ufosforylowana pol. RNA II (IIO) (71). W przeciwieństwie do pozostałych eukariotycznych polimeraz RNA, inicjacja transkrypcji przez polimerazę II wymaga hydrolizy wiązań  $\beta$ - $\gamma$  w cząsteczce ATP. W punkcie tym nasuwa się pytanie, w jaki sposób uzyskiwane jest ATP? Okazuje się, że białko TFIIF zawiera dwie, ATP- zależne helikazy (ERCC2 i ERCC3) (72) oraz kinazę specyficzną dla domeny CTD polimerazy RNA II (73). Przypuszcza się, że jedna z dwóch właściwości, helikazowych TFIIF musi odgrywać decydującą rolę w inicjacji transkrypcji. W badaniach przeprowadzonych na drożdżach wykazano, że z dwóch helikaz ERCC2 i ERCC3, jedynie ERCC3 posiada aktywność istotną dla transkrypcji (74). Dlatego też przyjmuje się ERCC3, jako składnik energetyczny kompleksu transkrypcyjnego.

#### 2.5.1.3. Znaczenie modyfikacji (fosforylacji) domeny CTD w inicjacji i elongacji transkrypcji

Domena końca karboksylowego dużej podjednostki polimerazy RNA II (dalej zwana CTD), podlega fosforylacji w trakcie przejścia od inicjacji do elongacji. Oczywiście jest zatem jej niezbędność dla życia komórki (75). Faktem jest również, że niektóre rekonstruowane systemy transkrypcyjne nie wymagały obecności CTD dla przeprowadzenia transkrypcji. Okazuje się, że zapotrzebowanie na CTD jest zależne od typu promotora: na przykład promotor murynowej reduktazy dihydrofolianowej (Ad-ML) może być transkrybowany pod nieobecność CTD, natomiast promotor murynowy DHFR jest uzależniony od obecności CTD (76). W przypadku promotora TATA, transkrypcja zachodzi bez CTD: stwierdzono, że dodatek odpowiednika TATA do CTD – zależnego promotora reduktazy kwasu dihydrofolowego (DHFR), znosi jego uzależnienie od CTD. Za fosforylację CTD *in vitro* odpowiedzialnych jest wiele kinaz (77), niekoniecznie niezbędnych *in vivo*. Zważywszy, że fosforylacja CTD zachodzi w pierwszych stadiach transkrypcji (inicjacji lub uwalniania promotora), można przypuszczać, że odpowiednie kinazy są integralną częścią kompleksu preinicjacyjnego (78). Według Sheikhattara (79) aktywność kinazowa TFIIF jest obecna w cyklinozależnej kinazie cdk7 (MO15). W komórkach zwierzęcych, cdk7 wraz z cykliną H oraz białkiem aktywującym MAT-1, stanowi czynnik zwany cdk- aktywującą kinazą (CAK). Cdk7, jest obecna podczas transkrypcji tylko, wtedy gdy wymagana jest obecność CTD i to prawdopodobnie podczas uwalniania promotora. Stwierdzenia te są jeszcze w trakcie badań, stąd trudno jak na razie wyciągać na ten temat ostateczne wnioski.

### 3. Aktywacja transkrypcji z poziomu podstawowego do wzbudzonego

#### 3.1. Wpływ innych czynników na transkrypcję

Aktywacja jest to zdolność do stymulowania transkrypcji powyżej podstawowego poziomu. Zarówno genetyczne jak i biochemiczne dowody wskazują na obecność aktywatorów transkrypcyjnych, które pośredniczą w tym procesie poprzez tworzenie połączeń pomiędzy domeną aktywatorową a podstawowym kompleksem transkrypcyjnym. Aktywatory transkrypcyjne zawierają dwie funkcjonalne domeny: domenę wiążącą DNA, która odpowiada za specyficzność oraz domeny aktywatorowe, które oddziałują z kompleksem preinicjacyjnym (80,81): bogate w prolinę, prolaminę oraz reszty kwasowe występujące u wszystkich organizmów.

Transkrypcja promotorów właściwych dla polimerazy RNA II jest procesem ściśle kontrolowanym przez wiele negatywnych lub pozytywnych czynników, takich jak: specyficzne dla określonych sekwencji aktywatory, represory i białka związane z chromatyną. Ekspresja genu związana jest z szeregiem sygnałów zintegrowanych na promotorze umożliwiających odpowiedni poziom produkcji mRNA. Podstawową funkcją białek aktywujących jest przyspieszenie składania kompleksu preinicjacyjnego (82) poprzez zwiększenie liczby specyficznych oddziaływań w trakcie tworzenia tego kompleksu.

#### 3.2. Wpływ aktywatorów na podjednostki TFIID

Wpływ aktywatorów na TAF<sub>115</sub>, wywołuje zwiększone zapotrzebowanie na TFIID lub jego większą stabilizację na promotorze (83). Jakkolwiek wpływ czynników TAF pochodzenia ludzkiego i z muszki owocowej na aktywację transkrypcji jest dobrze udokumentowany, to rola TAF<sub>115</sub> drożdżowego nie jest w pełni poznana. Według Struhla i Greena aktywacja wielu genów drożdżowych nie wymaga obecności TAF<sub>115</sub> (84,85). Usunięcie TAF<sub>115</sub> z komórek drożdżowych nie miało żadnego wpływu na zdolność wielu aktywatorów do stymulacji transkrypcji. Panuje przekonanie, że TAF<sub>115</sub> są wymagane tam, gdzie ekspresji ulegają geny, których produkty są wymagane w zdarzeniach regulujących cykl komórkowy (86).

#### 3.3. Wpływ aktywatorów na TFIIA i TFIIB

Interakcje aktywatorów z TFIIA i TFIIB, zapobiegają ich dysocjacji ułatwiając w ten sposób kolejne etapy procesu inicjacji. Otrzymany w wyniku hybrydyzacji aktywator Gal4-VP16 wywołuje konformacyjne zmiany w TFIIB, które, jak się uważa, rozrywają oddziaływania pomiędzy końcami aminowym i karboksylowym TFIIB oraz wzmacniają przyłączanie się TFIIF oraz polimerazy RNA II do kompleksu preinicjacyjnego (87). Na-

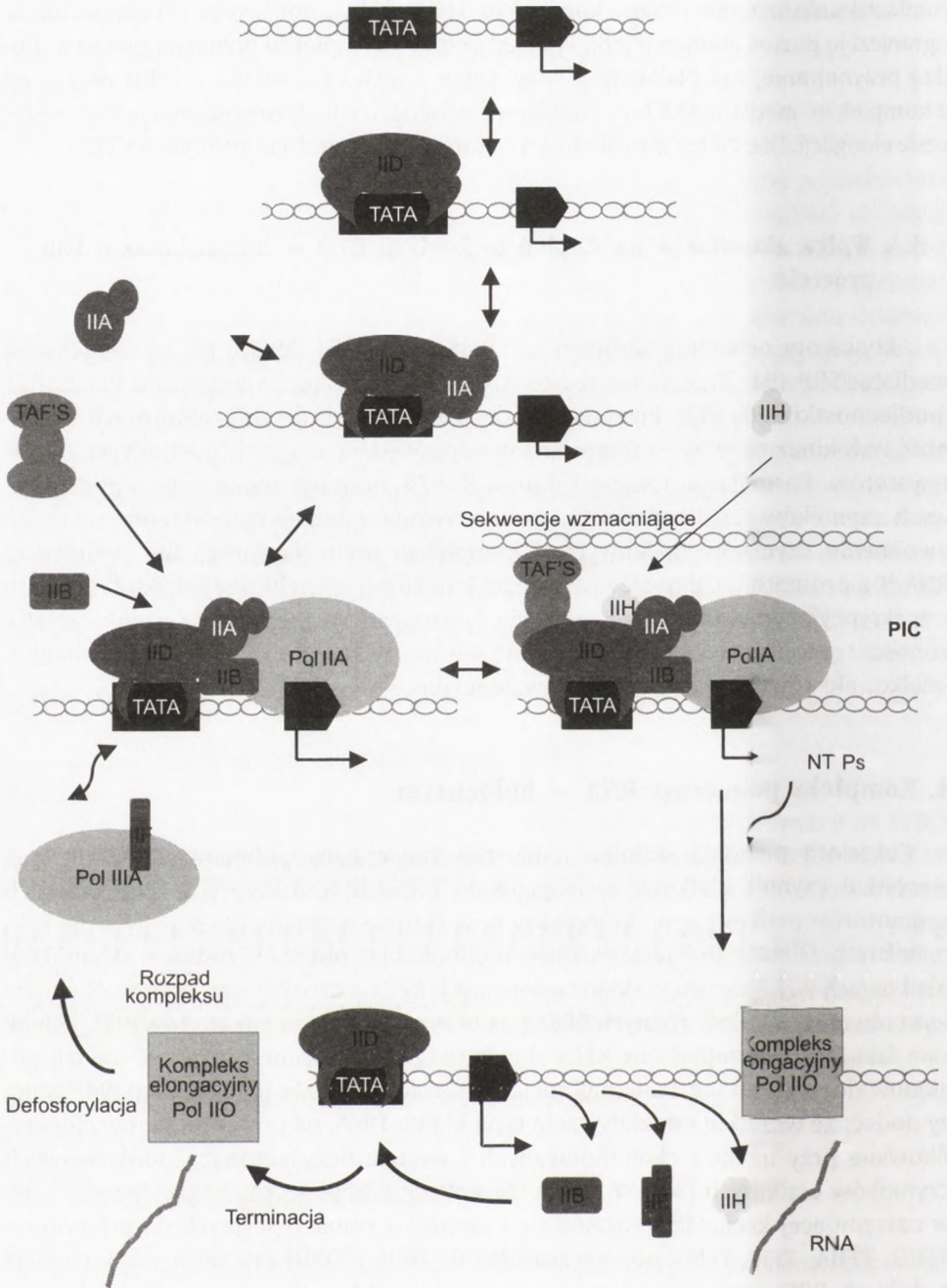
tomiast konformacyjne zmiany kompleksu TFIIA- TFIID, pod wpływem aktywatorów ograniczają poziom aktywacji (88). W skład pełnego kompleksu preinicjacyjnego wchodzi przynajmniej trzy białkowe kinazy. Dwie z nich cdk7/MO15 z TFIIF oraz cdk8 z kompleksu: mediator/SRB biorą udział w fosforylacji cdk, która jest niezbędna w procesie elongacji. Dlatego też zadaniem aktywatorów jest stymulacja fosforylacji CTD.

### 3.4. Wpływ aktywatorów na stopień fosforylacji CTD – udział kinaz w tym procesie

Aktywatory oddziałują zarówno z czynnikiem TFIIF (89,90) jak i kompleksem: mediator/SRB (91). Trzecia kinaza to TAF<sub>II</sub>250, która jest specyficzna dla RAP74 (podjednostki TFIIF) (92). Przypuszcza się, że przy niektórych promotorach aktywność tych kinaz może być wzmacniana w odpowiedzi na sygnały pochodzące od aktywatorów. Fosforylacja domeny C-końca RAP74, oraz być może innych podstawowych czynników transkrypcyjnych, może wywołać późniejsze zdarzenia, takie jak uwolnienie czynników białkowych z kompleksu preinicjacyjnego lub polimerazy RNA II z promotora. Odkrycie aktywności kinazowej u wielu podjednostek aparatu transkrypcyjnego wskazuje, że regulacja syntezy mRNA u eukariota wynika ze złożoności tego procesu, na który składają się nie tylko oddziaływania typu: białko-białko, ale również modyfikacje kowalencyjne.

## 4. Kompleks polimerazy RNA – holoenzym

Eukariota posiadają stabilną jednostkę zawierającą polimerazę RNA II oraz wszystkie czynniki białkowe wymagane do inicjacji transkrypcji z odpowiednich promotorów – holoenzym. Kompleksy te w skrócie nazwano RPCs (*polymerase RNA complexes*). Obecnie nie jest możliwy ujednociony obraz wszystkich składników białkowych wchodzących w skład izolowanych RPCs z drożdży czy ssaków. Nie ustalono również, jaka ilość różnych RPCs jest obecna w jądrach eukariotów (93). Jednak sam fakt izolacji kompleksów RPCs stawia przed badaczami możliwość rewizji poglądów dotyczących mechanizmu inicjacji transkrypcji oraz jej aktywacji (94). Należy dodać, że wszystkie oddziaływania typu białko-DNA, na promotory, były identyfikowane przy użyciu zrekombinowanych i wysoce oczyszczonych podstawowych czynników białkowych (95). W takich warunkach kompleks preinicjacyjny powstaje w następującej kolejności wiązania się czynników transkrypcyjnych do promotora: TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF/ polimeraza RNA II, TFII E i TFIIF (96-98) (rys. 1). Izolacja stabilnych RPCs zawierających podstawowe czynniki białkowe może dowodzić, że niektóre oddziaływania pomiędzy tymi czynnikami mogą nie być ważne dla transkrypcji w kontekście kompleksów holoenzymowych. Na przykład izolowane drożdżowe RPCs nie zawierają TAFs (99,100).



Rys. 1. Tworzenie podstawowego kompleksu inicjacyjnego. Podjednostki TFD (TAF) uwzględnione są oddzielnie jako białka tkankowospecyficzne.

## 5. Wpływ fosforylacji na interakcję podstawowych czynników transkrypcyjnych z wzmacniaczami

Fosforylacja może wpływać na interakcję domen transaktywacji z mechanizmem transkrypcji (101). Przykładem jest tutaj białko c-Jun, w którym w jednym zestawie sekwencji fosforylacja negatywnie reguluje wiązanie DNA, podczas gdy w innym zwiększa aktywność transaktywacyjną (102). Ponadto oprócz regulacji wiązania DNA i funkcji transaktywacyjnych, fosforylacja może też regulować translokację jądrową (103). Prawdopodobne jest, jak się wydaje, że fosforylacja będzie też wpływać na inne właściwości czynników transkrypcyjnych, takich jak interakcja białko-białko, gdy są one połączone z sąsiadującymi miejscami w promotorze lub wzmacniaczu (*enhancer*). Na podstawie trójwymiarowej analizy strukturalnej wykazano, że fosforylacja może wpływać na aktywność białek transkrypcyjnych przez indukcję allosterycznych zmian konformacyjnych, jak również przez elektrostatyczne oddziaływania odpychające. Oba te mechanizmy oddziałują w sposób istotny na regulację transkrypcji.

## 6. Regulacja transkrypcji związana z cyklem komórkowym

Regulacja transkrypcji zachodzi w trakcie fosforylacji zarówno czynników transkrypcji, jak i podjednostek polimeraz RNA. W najnowszych danych wskazuje się, że u ssaków w chwili składania kompleksu preinicjacyjnego wzrasta aktywność rozmaitych kinaz białkowych. Transkrypcja regulowana cyklem komórkowym jest niezmiernie ważna dla poprawnego podziału komórki, a zależna od cyklu komórkowego fosforylacja czynników transkrypcji jest istotna. Na przykład, Oct-1 jest fosforylowany i regulowany w sposób zależny od cyklu komórkowego (104,105). W czasie mitozy transkrypcja ulega znacznemu obniżeniu. Prawdopodobne jest, jak się wydaje, że w hamowaniu tym istotną rolę odgrywa fosforylacja; po pierwsze, fosforylacja histonów i upakowanie chromatyny może uniemożliwić dostęp do aparatu transkrypcji; po drugie, sugeruje się, że fosforylacja cykliny B/Cdc2 uniemożliwia sekwencyjnie specyficznym czynnikom transkrypcji kondensowanie chromatyny w trakcie mitozy (106-109). Kinazy białkowe i fosfatazy odgrywają pierwszoplanową rolę w regulacji transkrypcji i całego cyklu komórkowego (110). Stwierdzono, że niektóre geny związane z drożdżowym aparatem transkrypcyjnym kodują kinazy i fosfatazy białkowe.

## 7. Podsumowanie i znaczenie regulacji ekspresji genów w biotechnologii

Jednym z przyszłych głównych procesów poznawczych będzie poznanie etapów pomiędzy receptorem na powierzchni komórki a docelowym czynnikiem transkrypcyjnym w jądrze. Na przykład w drożdżach, w których feromonowy szlak reakcji

prowadzący do indukcji genu został poddany szczegółowej analizie, stwierdzono istnienie co najmniej trzech kinaz białkowych na szlaku od receptora i towarzyszącego mu białka G do czynnika transkrypcyjnego. W komórkach kręgowców szlak kinazy białka MAP/ERK może obejmować do pięciu kinaz białkowych. Innym ważnym zagadnieniem jest rola fosfataz w regulacji transkrypcyjnej u wyższych eukariotów. W świetle dotychczasowych badań należy pamiętać, że regulacja ekspresji genów u eukariotów zależy nie tylko od struktury kompleksu transkrypcyjnego, ale także od modyfikacji jego składników poprzez szereg szlaków informacyjnych odpowiadzi komórki na bodźce środowiska oraz realizowany przez nią program rozwojowy.

Osiągnięcia badań nad ekspresją genów i jej regulacją znalazły bardzo szybko zastosowanie w biotechnologii. Główne pole aplikacji tych badań dotyczy tworzenia organizmów transgenicznych z wprowadzonym obcym genem. Aby ulegał on prawidłowej ekspresji, zgodnej z życzeniem eksperymentatora, musi być odpowiednio kontrolowany. Jest to przeprowadzane przez zastosowanie właściwego promotora czyli odcinka DNA znajdującego się przed sekwencją kodującą mRNA. W transformacji organizmów eukariotycznych najczęściej stosowanymi są tzw. promotory konstytutywne – uruchamiające syntezę RNA we wszystkich tkankach. Pod ich kontrolą znajdują się wprowadzane geny selekcyjne i geny reporterowe. W przypadku roślin najpopularniejszym, silnym promotorem jest promotor 35S uzyskany z wirusa mozaiki kalafiora o długości około 350 pz. (111). Drugą grupę promotorów to promotory tkankowospecyficzne i mające zdolność do indukowania. Pod ich kontrolą wprowadza się geny, które mają podlegać ekspresji tylko w określonych tkankach lub w określonych stadiach rozwoju organizmu. Znajdują się one pod kontrolą odpowiednich elementów typu trans (112). Podobnie w przypadku transgenicznych zwierząt używa się prawie wyłącznie specyficznych promotorów (113). Zastosowanie określonego promotora wymaga znajomości nie tylko szlaków biochemicznych syntezy określonych produktów, ale też mechanizmów regulacji syntezy poszczególnych enzymów danego szlaku, a do tego wiedza na temat regulacji ekspresji genów jest co najmniej przydatna.

## Literatura

1. Kugel J. F., Goodrich J. A., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 40483-4041.
2. Kugel J. F., Goodrich J. A., (2002), *Mol. Cell. Biol.*, 22, 762-773.
3. Stryer L., (1997), *Biochemia*, PWN, Warszawa.
4. Echols H., (1990), *J. Biolog. Chem.*, 265, 14697-14700.
5. Roeder R. G., (1996), *Trends Biol. Sci.*, 21, 327-335.
6. Verrijzer C. P., Tjian R., (1996), *Trends Biol. Sci.*, 21, 338-342.
7. Gabrielsen D. S., Sentenac A., (1991), *Trends Biochem. Sci.*, 16, 42-416.
8. Borggreffe T., Davis R., Bareket-Samish A., i Kornberg R. D., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 47150-47153.
9. Hampsey M., (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 465-503.

10. Lee T. I., Young R. A., (2000), *Annu. Rev. Genet.*, 34, 77-137.
11. Matsui T., Segall J., Weil P. A., Roeder R. G., (1980), *J. Biol. Chem.*, 255, 11992-11996.
12. Zawal L., Reinberg D., (1993), *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 44, 67-108.
13. Buratowski S., Hahn S., Sharp Pa., Guarente L., (1988), *Nature*, 334, 37-42.
14. Gill G., Tjian R., (1992), *Curr. Opin. in Gen. And Dev.*, 2, 236-242.
15. Peterson M. G., Tanese N., Pugh B. F., Tjian R., (1990), *Science*, 248, 1625-1630.
16. Pugh B. F., Tjian R., (1991), *Genes Dev.*, 5, 1935-1945.
17. Weimann R., (1992), *Gene Express.*, 2, 81-91.
18. Nikolov D. B., Burley S. K., (1994), *Nat. Struct. Biol.*, 1, 621-637.
19. Kim J. L., Nikolov D. B., Burley S. K., (1993), *Nature*, 365, 520-527.
20. Kim J. L., Nikolov D. B., Hahn S., Sigler P. B., (1993), *Nature*, 365, 512-520.
21. Nikolov D. B., Chahn H., Halay D., Hoffmann A., Roeder R. G., Burley S. K., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4956-4961.
22. Nikolov D. B., Burley S. K., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 15-22.
23. Nikolov D. B., Burley S. K., (1994), *Nat. Struct. Biol.*, 1, 621-637.
24. Nikolov D. B. Hu S. H. Lin J., Gash A., Hoffmann A., Horikoshi M., Chua N. H., Roeder R. G., Burley S. K., (1992), *Nature*, 360, 40-46.
25. Nikolov B., Burley S. K., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 15-22.
26. Drew H., Travers A., (1985), *J. Mol. Biol.*, 186, 773-790.
27. Satchwell S., Drew H., Travers A., (1986), *J. Mol. Biol.*, 191, 659-679.
28. Workman J. L., Roeder R. G., (1987), *Cell*, 51, 613-622.
29. Meisterernst M., Horikoshi M., Roeder R. G., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9153-9157.
30. Wolff A., (1994), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4, 245-254.
31. Wong J., Bateman E., (1994), *Nucleic Acids Res.*, 22, 1890-1896.
32. Parvin J., McCormick R., Sharp P., Fisher D., (1995), *Nature*, 273, 724-727.
33. Cortes P., Flores O., Reinberg D., (1992), *Mol. Cell. Biol.*, 12, 403-421.
34. Ozer J., Moore P. A., Bolden A. H., Lee A., Rosen C. A., Liberman P. M., (1994), *Genes & Dev.*, 8, 2324-2335.
35. Orphanides G., Lagrange T., Reinberg D., (1996), *Genes & Dev.*, 10, 2657-2683.
36. Fang S. M., Burton Z. F., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 7245-7248.
37. Faitar S. L., Brodie S. A., Ponticelli A. S., (2001), *Mol. Cel. Biol.*, 21, 4427-4440.
38. Cho E-J., Buratowski S., (2000), *J. Biol. Chem.*, 274, 25807-25813.
39. Flores O., Maldonado, E., Reinberg D., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 8913-8921.
40. Price D. H., Sluder A. E., Greenleaf A. L., (1989), *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1465-1475.
41. Bengal E., Flores O., Krauskopf A., Reinberg D., (1991), *Mol. Cell. Biol.*, 11, 1195-1206.
42. Conaway J. W., Conaway R. C., (1990), *Science*, 248, 1550-1553.
43. Killeen M., Greenblatt J., (1992), *Mol. Cell. Biol.*, 12, 30-37.
44. Lei L., Ren D. Burton Z. F., (1999), *Mol. Cel. Biol.*, 19, 8372-8382.
45. Ren D., Lei L., Burton Z. F., (1999), *Mol. Cel. Biol.*, 19, 7377-7387.
46. Ohkuma Y., Sumimoto H., Horikoshi M., Roeder R. G., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 9163-9167.
47. Peterson M. G., Inostroza J., Maxon M. E., Flores O., Admon A., Reinberg D., Tjian R., (1991), *Nature*, 354, 369-373.
48. Yamamoto S., Watanabe Y., van der Spek P. J., Watanabe T., Fujimoto H., Hanaoka F. I., Ohkuma Y., (2001), *Mol. Cel. Biol.*, 21, 1-15.
49. Ranish J., Hahn S., (1996), *Curr. Opin. In Genetics & Dev.*, 6, 151-158.
50. Bradsher J., Coin F., Egly J.-M., (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 2532-2538.
51. Spangler L., Wang X., Conaway J. W., Conaway R. C., Dvir A., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5544-5549.
52. Guermah M., Tao Y., Roeder R. G., (2001), *Mol. Cel. Biol.*, 21, 6882-6894.
53. Lee T. I., Young R. A., (1998), *Genes and Develop.*, 12, 1398-1408.
54. Kokubo T., Gong D. W., Yamashita S., Horikoshi M., Roeder R. G., Nakatani Y., (1993), *Genes & Dev.*, 7, 1033-1046.

55. Ruppert S., Wang E. H., Tjian R., (1993), *Nature*, 362, 175-179.
56. Weinzierl R., Dynlacht B. D., Tjian R., (1993), *Nature*, 362, 511-517.
57. Reese J. C., Apone L., Walker S. S., Griffin L. A., Green M. R., (1994), *Nature*, 371, 523-527.
58. Poon D., Bai Y., Campbell A. M., Biorlund S., Kim Y. J., Zhou S., Kornberg R. D., Weil P. A., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 8224-8228.
59. Kokubo T., Yamashita S., Horikoshi M., Roeder R. G., Nakatani Y., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 3520-3524.
60. Hoffmann A., Chiang C. M., Oelgeschlager T., Xie X., Burley S. K., Nakatani Y., Roeder R. G., (1996), *Nature*, 380, 356-358.
61. Orphanides, J., Lagrange T., Reinberg D., (1996), *Genes & Dev.*, 10, 2657-2683.
62. Hex A., Rosenfeld M., (1991), *Neuron*, 7, 183-196.
63. Hill C. S., Treisman R., (1995), *Cell*, 80, 199-211.
64. Corden J., (1990), *Trends Biochem. Sci.*, 15, 387-389.
65. Lu H., Flores O., Weinmann R., Reinberg D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10004-10008.
66. Darst S. A., Edwards A. M., Kubalek E. W., (1991), *Cell*, 66, 121-128.
67. Edwards A. M., Dorst S. A., Fearon W. J., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2122-2126.
68. Holstege F. C. P., Fiedler U., Timmers H. Th. M., (1997), *The EMBO Journal*, 16, 7468-7480.
69. Dahmus M. E., (1994), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 48, 143-179.
70. Lu H., Flores R., Weinmann R., Reinberg D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10004-10008.
71. Zawal L., Kumar P., Reinberg D., (1995), *Genes & Dev.*, 9, 1479-1490.
72. Drapkin R., Reardon J. T., Ansari A., Huang J. C., Zawal L., Ahn K., Sancar A., Reinberg D., (1994), *Nature*, 368, 769-772.
73. Serizawa H., Conaway R. C., Conaway J. W., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7476-7480.
74. Guzder S. N., Sung P., Bailly V., Prakash L., Prakash S., (1994), *Nature*, 69, 578-581.
75. Allison L. A., Wong J. K., Fitzpatrick V. D., Moyle M., Ingles C. J., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, 8, 321-329.
76. Akoulithev S., Mäkelä T. P., Weinberg R. A., Reinberg D., (1995), *Nature*, 86, 557-560.
77. Dahmus M. E., (1994), *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 48, 143-179.
78. Orphanides G., (1996), *Genes & Dev.*, 10, 2657-2683.
79. Sheikhattar R., Mermelstein F., Fisher R., Drapkin R., Dynlacht B., Wessling H., Morgan D., Reinberg D., (1995), *Nature*, 374, 283-287.
80. Ptashne S. R., Greenblatt J., (1990), *Nature*, 346, 329-331.
81. Drapkin R., Alejandro M., Reinberg D., (1993), *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 5, 469-476.
82. Choy B., Green M. R., (1993), *Nature*, 366, 531-536.
83. Burley S. K., Roeder R. G., (1996), *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 769-799.
84. Apone L. M., Virbasius C. M., Reece J. C., Green M. R., (1996), *Genes & Dev.*, 10, 2368-2380.
85. Moqtaderi Z., Poon D., Bai Y., Weil P. A., Struhl K., (1996), *Nature*, 383, 188-191.
86. Orphanides G., Lagrange T., Reinberg D., (1996), *Genes & Dev.*, 10, 2657-2683.
87. Roberts S. G., Green M. R., (1994), *Nature*, 371, 717-720.
88. Chi T., Carey M., (1996), *Genes & Dev.*, 10, 2540-2550.
89. Xiao H., Pearson B., Coulombe R., Truant R., Reiger J., Triezenberg S. J., Reinberg D., Flores D. O., Ingles C. J., (1994), *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7013-7024.
90. Tong X., Drapkin R., Reinberg D., Kieff E., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 3259-3263.
91. Hergartner C. J., Thompson C. M., (1995), *Genes & Dev.*, 9, 897-910.
92. Dikstein R., Ruppert S., Tjian R., (1996), *Cell*, 70, 501-512.
93. Liu Y., Ranish J. A., Aebersold R., Hahn S., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 7169-7175.
94. Myers L. C., (2000), *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 729-749.
95. Lee T. I., Young R. A., (2000), *Annu. Rev. Genet.*, 34, 77-137.
96. Kim T. K., Hashimoto S., Kelleher R. J., Flanagan P. M., Kornberg R. D., Horikoshi M., Roeder R. G., (1994), *Nature*, 369, 252-255.
97. Koleske A. J., Young R. A., (1995), *TIBS*, 368, 466-469.
98. Ossipow V., Tassan J. P., (1995), *Cell*, 83, 137-146.
99. Goodrich J. A., Cutler G., Tjian R., (1996), *Cell*, 84, 825-830.



100. Hunter T., Karin M., (1992), *Cell*, 70, 375-387.
101. Felinski E. A., Kim J., Lu J., Quinn P. G., (2001), *Mol. Cell Biol.*, 21, 1001-1010.
102. Angel P., Karin M., (1991), *Bioch. Biophys. Acta*, 1072, 129-157.
103. El-Hodiri H. M., Che S., Nelman-Gonzales M., Kuang J., Etkin L. D., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272(33), 20463-20470.
104. Grzelakowska-Sztabert B., (1995), *Postępy Biochemii*, 41(2), 80-91.
105. Kirschner M., (1992), *TIBS*, 17, 281-285.
106. Denobdt H. L., Rosentblatt J., Jancarik J., Jones H., Morgan D., (1993), *Nature*, 368, 595-602.
107. Welch P. J., Wang J. Y., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3093-3097.
108. John P. C., Sek F., Carmichael J. P., McCurdy D., (1990), *J. Cell Sci.*, 97, 627-630.
109. Martinez M. C., Jorgensen J. E., Lewton M. A., Lamb C., Doener P., (1990), *Mol. Cell Biol.*, 10, 7360-7364.
110. Mendenhall M. D., Hodge A. E., (1998), *Microbiol. Molec. Biol.*, 62, 1191-1243.
111. Benfey N.-H., Chua K., (1990), *Science*, 250, 956.
112. Kyoizuka D., McElroy T., Hayakawa Y., Lie R., Shimamoto K., (1992), *Plant Physiol.*, 102, 991.
113. Gossen M., S. Freundlieb G., Bender G., Muller W., Hillen W., Bujard H., (1995), *Science*, 268, 1766.