

SKŁADANIE RNA – FORMY ALTERNATYWNE, REGULACJA I FUNKCJE

ALTERNATIVE SPLICING – mRNA VARIANTS, REGULATION
AND FUNCTION

Monika Sylwia JĘDRZEJCZAK, Marek Leszek KOWALSKI

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie: Alternatywne składanie RNA jest procesem zwiększającym różnorodność powstających transkryptów RNA i w konsekwencji również białek. Szacuje się, że zjawisko to występuje w około 5–30% ludzkich genów. Jest to bardzo złożony proces regulowany przez liczne czynniki wzmacniające lub wyciszające, różne w zależności od lokalizacji tkankowej, wpływające na ostateczny poziom alternatywnego transkryptu. Znane są liczne przykłady białek tworzonych na alternatywnych matrycach, np. enzymów 15-LOb i COX. Alternatywne warianty białek mogą spełniać odmienne funkcje jak w przypadku IL-4. Poznanie mechanizmów alternatywnego składania RNA i ich regulacji budzi nadzieje na wykorzystanie tego procesu do diagnostyki, detekcji predyspozycji genetycznych lub jako celu dla potencjalnej terapii.

Słowa kluczowe: alternatywne składanie RNA, gen, regulacja, funkcja.

Summary: Alternative splicing is defined as a process that increases the diversity of transcripts and protein variety. It is estimated that 5–30% of human genes express alternative variants. Alternative splicing is regulated by different, tissue-specific splicing enhancers and silencers. Numerous proteins are the products of this process, as for example 15-lipoxygenase-b and cyclooxygenase. Alternative variants of proteins may have different functions like for example IL-4. Understanding the mechanism of alternative splicing and its regulation will allow to use this process for diagnosis, genetic predisposition detection or as a target for therapy.

Key words: alternative splicing, gene regulation, protein isoforms.

WSTĘP

Genom człowieka zawiera kilkadziesiąt tysięcy genów, czyli jest ich tylko dwukrotnie więcej niż u robaków czy owadów [8]. Stosunkowo mała liczba genów w genomach *Eukariota* nasuwa pytanie, co stanowi źródło tak olbrzymiej ich różnorodności [14].

Do mechanizmów, które zwiększają liczbę powstających izoform białka należy między innymi alternatywne składanie genu [5]. Może ponadto dochodzić do pobudzenia nieaktywnych wcześniej miejsc początku transkrypcji, różnych promotorów dla tego samego RNA, pozostawienia pewnych intronów lub usunięcia bądź pozostawienia określonych eksonów. Poliadenylacja zachodząca w różnych miejscach oraz wcześniejsze zakończenie pre-mRNA także przyczyniają się do zwiększenia liczby izoform białka [8]. Źródłem zmienności w populacji są ponadto polimorfizmy w obrębie pojedynczego genu (ang. *Single Nuclear Polimorphism* – SNP), zwiększające również liczbę powstających form białka. Do tej pory zidentyfikowano ponad 1,4 miliona SNP i zestawiono w odpowiedniej bazie danych [14].

Zmiany zachodzące w pre-mRNA obejmują dojrzewanie końca 5', cięcie i poliadenylację końca 3', metylację oraz składanie RNA (*splicing*). Składanie RNA polega na wycinaniu z pierwotnego transkryptu prekursorowego mRNA sekwencji niekodujących (intronów) i łączeniu fragmentów kodujących – eksonów [53]. W wyniku alternatywnego składania z jednego genu może powstać jedna lub kilka różnych cząsteczek mRNA. Obecnie szacuje się, że 5 do 30%, a nawet 40% ludzkich genów ulega temu procesowi, którego regulacja zależy może od stadium rozwoju, stanu fizjologicznego tkanki lub toczącego się procesu patologicznego [6, 49].

Zjawisko alternatywnego składania RNA budzi szerokie zainteresowanie wśród badaczy. Według bazy Medline każdego dnia pojawiają się dwa nowe doniesienia na temat alternatywnego składania genów [6]. Wzrastająca ilość badań w obszarze tego zagadnienia świadczy o wielu wciąż niepoznanych mechanizmach ekspresji genów.

MECHANIZM SKŁADANIA RNA

Sekwencje kluczowe w procesie składania RNA

Składanie pierwotnego transkryptu odbywa się w jądrze komórkowym i poprzedza transport dojrzałego mRNA do cytoplazmy (ryc. 1). W obrębie pre-mRNA istnieją trzy sekwencje kluczowe dla procesu składania genu, warunkujące dokładność i efektywność procesu. Pierwszą z nich stanowią „miejsca splicingowe”, czyli miejsca, w których dochodzi do wycinania intronów. W górnej części intronu leży miejsce składania 5' zwane również miejscem donorowym, a dolną część ogranicza miejsce składania 3', czyli akceptor. Każdy intron rozpoczyna się sekwencją GURAGU (R jest puryną), a kończy dwoma nukleotydami – AG [8,14]. Drugą ważną sekwencją jest trakt polipirymidynowy, znajdujący się na końcu 3', kilkanaście zasad przed AG, będący sekwencją bogatą w cytydynę i urydynę, a ostatnią sekwencję stanowią miejsca rozgałęzienia [4].

Powstawanie spliceosomu

Proces składania genu przebiega w spliceosomie, będącym kompleksem pięciu snRNP (*small nuclear* – małych jądrowych RNP, powstałych przez połączenie snRNA ze specyficznymi białkami) i bardzo wielu innych białek pomocniczych (np. U2AF, pPTB, IBP) [18]. Małe jądrowe RNA (snRNA – U1, U2, U4, U5, U6) występują we

TABELA 1. Przykłady zmian w procesie składania RNA [24]

Zmiana	Skutki zmian
Alternatywne rozpoczęcie	N-koniec białka różni się, gdy do jego powstania zostały wykorzystane różne wersje eksonu 5' (18%)
Alternatywne zakończenie	C-koniec białka różni się z uwagi na różną ramkę odczytu (13%)
Wydłużenie eksonu (5' lub 3')	ekson może ulec wydłużeniu w kierunku 5' lub 3' w konsekwencji wykorzystania innych niż normalnie miejsc składania (6%)
Skrócenie eksonu	podobny mechanizm jw. (23%)
Ominięcie eksonu lub włączenie ukrytego	rozpoznanie nowych miejsc składania 5' lub 3' (40%)

REGULACJA PROCESU ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA GENU

Procesy fizjologiczne wymagają niezwykle precyzyjnych mechanizmów regulacji, różnych w zależności od np. lokalizacji tkankowej [24]. Istnieje duża grupa białek pełniących tę funkcję, których cechą charakterystyczną jest fakt posiadania dwóch domen – domeny łączącej się z RNA i łączącej się z białkami [7].

Eksonowe i intronowe elementy wzmacniające i hamujące składanie RNA

Alternatywne składanie RNA jest bardzo złożonym systemem z licznymi czynnikami wzmacniającymi lub wyciszającymi i w konsekwencji wpływającymi na ostateczny poziom alternatywnego transkrypty [10]. W zależności od lokalizacji i funkcji wyróżniamy: eksonowe elementy wzmacniające – ESEs (ang. *exonic splicing enhancers*), intronowe elementy wzmacniające – ISEs (ang. *intrinsic splicing enhancers*) oraz analogicznie elementy hamujące – ESSs (ang. *exonic splicing silencer*) i ISSs (ang. *intrinsic splicing silencer*) [8,17,22,26]. Pojedynczy element wzmacniający ESE przyczynia się do rozpoznania kilku miejsc składania podczas tego samego etapu tworzenia się spliceosomu. Wzmacniacze składania genu – ESE, znajdujące się na różnych eksonach, działają synergistycznie w procesie aktywacji miejsc składania [8, 17]. Jednocześnie liczne nieaktywne miejsca składania w intronach mogą być hamowane przez intronowe elementy hamujące proces składania genu – ISSs.

Rola białek z rodziny SR i ich antagoniści

Białka SR należą do rodziny wysoce konserwatywnych czynników regulujących proces składania genu [8,17,41]. Zbudowane są z domen RRM (ang. *RNA recognition element*) odpowiadających za specyficzne przyłączanie się do RNA i domeny SR

oddziałującej pomiędzy białkami [8,18,29]. Białka SR mogą przyłączać się do elementów wzmacniających w obrębie eksonów i poprzez bezpośrednią interakcję z U2AF i U1snRNP stymulować spliceosom do połączenia sąsiadujących ze sobą miejsc składania [10,18]. Biorą również udział w późniejszych etapach składania genu poprzez rekrutację kompleksu czynników: U4/U6,U5 [28, 29].

Istnieją rodziny białek działających antagonistycznie w stosunku do białek SR. Znane są białka hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) rozpoznające ESS i ISS, niezawierające domeny RS [18]. Znajdują się one w dużych ilościach w obrębie jądra komórkowego i w okolicy jąderkowych ziarnistości [8,30]. Istnieje też grupa białek podobnych do SR zwanych SRrps (*SR-related proteins*) mających domeny RRM.

Białka SR przyczyniają się do wyboru bliższego intronowi miejsca składania 5', jeżeli istnieje więcej niż jedno takie miejsce. Przeciwnie, nadmiar hnRNP A/B promuje wybór dystalnego miejsca składania 5'. Funkcjonalny antagonizm pomiędzy SF2/ASF – białkiem należącym do rodziny SR a hnRNP dotyczący miejsc składania jest oparty na kompetycyjnym łączeniu się tych białek z pre-mRNA [18, 30].

Białko U2AF a dwie klasy intronów

U2AF jest białkiem odgrywającym kluczową rolę w zainicjowaniu rozpoznania miejsca składania 3' oraz regionu rozgałęziającego [38]. Zbudowane jest ono z dwóch podjednostek – dużej U2AF65 i małej U2AF35. Podjednostka U2AF65 łączy się bezpośrednio z traktem polipirymidynowym i z sekwencją rozgałęziającą. U2AF35 ma natomiast zdolność rozpoznawania połączenia AG/G w miejscu składania 3' i ułatwia oddziaływanie U2snRNP z miejscem rozgałęzienia [13,39].

Rola U2AF jest nieco odmienna w zależności od klasy intronów biorących udział w składaniu genu. Pierwsza grupa intronów obejmuje tzw. AG-niezależne, które mają silny trakt polipirymidynowy. W ich przypadku pierwszy etap składania RNA zachodzi, nawet gdy jest mutacja w obrębie sekwencji AG. Czynniki U2AF łączy się z intronem efektywnie poprzez swoją większą podjednostkę i nie potrzebuje mniejszej podjednostki ani sekwencji AG. Konserwatywny dwunukleotyd AG potrzebny jest dopiero w drugim etapie procesu.

Sytuacja wygląda inaczej w przypadku tzw. intronów AG-zależnych, gdzie sekwencja AG odgrywa istotną rolę również w pierwszym etapie. Introny zależne od AG mają krótszy, a tym samym słabszy szlak polipirymidynowy. Podjednostka większa U2AF65 przyłącza się do tych intronów ze znacznie mniejszą siłą i aby połączenie to było efektywne, potrzebuje dodatkowo połączenia pomiędzy AG a podjednostką mniejszą U2AF35. Gdy jest mutacja w obrębie AG, proces składania RNA nie zachodzi [9,40,50].

Czynnik hSlu7 a wybór dwunukleotydu AG

W sytuacji, gdy istnieje więcej niż jeden dinukleotyd AG, omijana jest para bliższa sekwencji rozgałęziającej i wybierana ta położona dalej od niej. Możliwość wymiennego wyboru AG dotyczy dwunukleotydów znajdujących się w odległości nie większej niż 30 nt od sekwencji rozgałęziającej. Duże zainteresowanie budzi czynnik hSlu7, pod nieobecność którego dochodzi do aktywacji alternatywnych par AG zamiast prawidłowych. Uważa się, że czynnik hSlu7 odpowiada za silne przyłączenie pierwszego

TABELA 2. Przykłady czynników regulacyjnych występujących w różnych tkankach [18, 30,49]

Białko	Charakterystyka
PTB <i>Polypyrimidine tract binding protein</i>	łączy się z RNA, rozpoznaje szlak polipirymidynowy poprzedzający miejsce składania 3' i działa jako negatywny regulator w genie dla α -tropomiozyny lub α -aktyliny; przypuszcza się, że PTB i U2AF działają kompetycyjnie
CELF	należące do tej rodziny CELF3 i CELF5 znajdowano tylko w mózgu, ale CUG-BP, ETR-3 i CELF4 są rozpowszechnione znacznie szerzej; białka CELF przyłączają się do wzmacniaczy składania genu sercowej troponiny T (cTNT) i powodują włączenie eksonu 5
Sam68 (z rodziny STAR)	występuje w fibroblastach i limfocytach, gdzie łączy się z fosfolipazą C γ i kinazą fosfatydyloinozitolową p85 zaangażowanymi w transdukcję sygnału; oddziałuje z intronowym regulatorem RNA i białkiem FBP21 związanym ze spliceosomem; fosforylacja SAM68 zmienia jego zdolności łączenia się z innymi białkami
rSLM-2 (z rodziny STAR)	łączy się bezpośrednio z regionami RNA bogatymi w puryny i prawdopodobnie reguluje wybór miejsc składania; łączy się też z czynnikami regulacyjnymi SRp30c, ASF/SF2, htra2- β 1 i jednocześnie z końcem karboksylowym największej podjednostki polimerazy RNA II, przez co nasila proces składania genu; w białkach neurofilamentu powoduje włączenie eksonu 3, a w cząsteczkach CD44 eksonu 5

eksonu w obrębie spliceosomu [6,21]. Gdy nie ma czynnika hSlu7, ekson ten przyłączony jest luźno i w konsekwencji nie ma możliwości dotarcia do prawidłowego dwunukleotydu (AG), może jednak atakować pozostałe dwunukleotydy AG (tab. 2).

SKŁADANIE GENU A FAZY CYKLU KOMÓRKOWEGO

Uważa się, że białko SRp38 ma działanie hamujące proces składania genu. Białko to jest silnie aktywowane w wyniku defosforylacji, do której dochodzi podczas fazy M cyklu komórkowego. Aktywacja regulatorów mitozy przez ich defosforylację jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim, z reguły to fosforylacja prowadzi do aktywacji procesu [11,28,32].

TRANSKRYPCJA A SKŁADANIE GENU

Transkrypcja i dojrzewanie pre-mRNA nie są zjawiskami zupełnie od siebie niezależnymi. Istnieje silny związek czasowy i przestrzenny pomiędzy reakcjami tworzenia czapeczki, składania RNA a wydłużaniem RNA z udziałem polimerazy RNA II (pol II) [18,44,45]. Postuluje się istnienie wielkiej jednostki dla całego procesu powstawania RNA, tj. kompleksu, który może się przyłączać do chromatyny, złożonego z RNA polimerazy II i czynników transkrypcyjnych [30].

W procesie alternatywnego składania RNA ważna jest struktura promotora. W rzeczywistości większość genów ma tylko jeden promotor, więc kontrola odbywa się przez szereg regulujących czynników transkrypcyjnych, których różnorodność związana jest z lokalizacją tkankową. Białka te mogą też mieć różne funkcje w każdym z procesów [33, 27].

Biorąc pod uwagę zdolność stymulacji określonych etapów transkrypcji wyróżniono trzy klasy transkrypcyjnych domen aktywujących:

- 1) aktywatory klasy I stymulujące inicjację, np. Sp1, CTF/NF1,
- 2) aktywatory klasy II stymulujące wydłużanie, np. HIV-1, Tat,
- 3) aktywatory klasy III pobudzające oba etapy działania polimerazy II, np. VP16, p53, E2F1 [27].

TRANS-SPLICING

Proces składania RNA może przebiegać w dwóch formach przestrzennych. U większości znanych organizmów zachodzi w układzie cis, ale u niektórych, takich jak na przykład trypanosomy lub pewne gatunki nicieni, mamy do czynienia z układem trans [35,44,45,46].

W procesie składania RNA w układzie trans (analogicznie jak w układzie cis) w drodze etapowej transestryfikacji dochodzi do przyłączenia tzw. SL (*spliced leader sequence*) powstającej ze specyficznych dla procesu zachodzącego w układzie trans snRNP (SL RNP) i kofaktorów U2, U4 i U6 snRNP. U organizmów, u których składanie RNA zachodzi w układzie trans, obecny jest czynnik podobny do U5 snRNP, nazwany SLA2 RNA (związany z SL RNA) [22].

METODY ANALIZY ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA RNA

EST – alternatywne składanie RNA może być badane przez sekwencjonowanie fragmentów genomu, tworzenie baz EST (ang. *expressed sequence tag*) [2,3,12,15,25, 36,42,43,51,52]. W 1990 roku rozpoczęto w Stanach Zjednoczonych zgłoszony w 1985 roku projekt sekwencjonowania całego genomu ludzkiego – *Human Genome Project* (HGP) pod kierownictwem Narodowego Instytutu Zdrowia i Departamentu Energii Stanów Zjednoczonych, przewidujący skompletowanie całej sekwencji w ciągu 15 lat. Projekt ten ukończono w 2003 r. ogłaszając prawie całkowitą sekwencję genomu ludzkiego [1].

EST otrzymywane są przy wykorzystaniu metody PCR z różnych komórek i tkanek, z całkowicie przetworzonego mRNA, po zakończonym procesie składania, poliadenylacji i dojrzewania końca 5' [24]. W kolejnym etapie stworzono bazę EST pozwalającą na szybką identyfikację genów i tworzenie mapy genomu człowieka [1]. Korzystając z bazy zawierającej obecnie ponad 3,1 miliona sekwencji EST można również porównywać sekwencje wariantów mRNA ze znaną sekwencją genu. Na tej podstawie powstała nowa gałąź nauki – bioinformatyka [7].

ZNACZENIE ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA RNA

Uważa się, że 10–20 tys. ludzkich genów wykazuje alternatywne składanie RNA, z czego prawie 1000 skatalogowanych jest w bazie alternatywnie składanych wariantów występujących u ssaków AsMamDB (*Alternative Splicing Database of Mammals*) [15].

Badania na podstawie EST

Wykazano, iż prawie połowa ludzkich genów ma przynajmniej dwie formy utworzone poprzez alternatywne składanie. Przypuszcza się, że te dane liczbowe mogą być zaniżone z uwagi na zbyt jeszcze wąską bazę EST nieuwzględniającą rozmieszczenia poszczególnych izoform w różnych tkankach i w zależności od stadium rozwoju poszczególnych tkanek [6,7].

Szacuje się, że większość alternatywnych form składania RNA pojawia się w regionie 5' nieulegającym translacji (5'UTR). Około 70–88% modyfikacji prowadzi do zmiany struktury białka, z czego 19% wynika ze zmiany ramki odczytu i prowadzi do syntezy krótszego białka powstającego na matrycy utworzonej przez alternatywne składanie [7,14,15]. Modrek i wsp. zaobserwowali, że w 46% dochodzi do zmiany końca karboksylowego, 37% stanowią wewnętrzne delecje, insercje i substytucje, a w 17% zmiany są w N-końcu [15]. Badania na podstawie EST wykazały ponadto, że 25% genów ma odmienne alternatywne formy poliadenylacji [7,14].

Białka powstałe w wyniku alternatywnego składania RNA mają bardzo różną lokalizację w komórce. Największą pulę stanowią białka jądra (35%), następnie cytoplazmy (29%), macierzy zewnątrzkomórkowej (19%), błon (13%) i mitochondrium (4%). Niektóre białka mogą mieć więcej niż jedną lokalizację, a ponadto poszczególne izoformy mogą występować w różnych przedziałach komórkowych, np. β -receptor kwasu retinowego występuje w jądrze jako białka β -1 i β -2 oraz jako zlokalizowane w cytoplazmie białko β -3 [24].

Kolejnym zadaniem, jakie zostało postawione w czasie teoretycznych rozważań na podstawie EST, była próba oszacowania, jakich komórek i układów w szczególności dotyczy omawiane zjawisko. Wykazano, iż 29% genów, w których stwierdzono alternatywne składanie RNA, związanych jest z układem immunologicznym, a 12% dotyczy układu nerwowego. Uzasadnieniem takich wyników wydaje się fakt, że oba te systemy wymagają niezwykle precyzyjnej kontroli w zakresie różnicowania komórkowego i aktywacji. Pozwala to na przetworzenie olbrzymiej ilości informacji.

Proces alternatywnego składania RNA dotyczy głównie genów kodujących białka błon komórkowych (29%), 14% dotyczy białek sekrecyjnych, a 9% genów kodujących cząsteczki przekazujące sygnał. Kolejnymi dużymi grupami są czynniki regulujące transkrypcję (14%) i biorące udział w apoptozie (11%). Ogółem 75% alternatywnie powstających transkryptów odpowiada za funkcje związane z transdukcją sygnału w komórce [15].

Brett i wsp. [5] zbadali występowanie prawdopodobnych form alternatywnego składania RNA u siedmiu eukariotycznych organizmów poprzez porównanie ESTs z sekwencją ich mRNA wykorzystując do tego celu program BLAST. Oceniano ilość genów ulegających alternatywnemu składaniu i ilość transkryptów przypadających na jeden gen. U wszystkich badanych kręgowców i bezkręgowców wykazano podobną częstotliwość występowania

tego procesu. Alternatywne składanie RNA zwiększa możliwości kodowania genów, ale podobny jego poziom u różnych gatunków przeczy założeniu, iż proces ten stanowi istotne źródło złożoności genomu u wyższych organizmów [5].

Baza danych ISIS

Odmienną metodą posłużyli się Croft i wsp. [16] stwarzając własną bazę 170 000 sekwencji intronowych, pośród których szukali łączących się z nimi sekwencji EST. Połączenia z intronami znaleźli w 582 genach. Połączenia EST w obrębie sekwencji uznanych za intronowe wskazują na istnienie niewykrytych wcześniej, alternatywnie wycinanych eksonów. Na tej podstawie stworzono system do badania procesu ewolucji i funkcji intronów u eukariontów. Korzystając z bazy ISIS (ang. *Intron Sequence Information System*) można zapoznać się ze strukturą genów, gdyż przedstawiono w niej graficznie alternatywne regiony kodujące, miejsca połączeń z EST i sekwencje powtarzające się [16].

Baza danych ASAP

Informacje zgromadzone w bazie danych ASAP (ang. *Alternative Splicing Annotation Project*) obejmują dokładną strukturę połączeń ekson – intron, specyficzną lokalizację tkankową oraz izoformy białek powstających w wyniku alternatywnych form składania jednego RNA. Obecnie w bazie tej znajdują się informacje dotyczące 18 173 genów, zawierających więcej niż jeden ekson, z czego alternatywny proces składania RNA wykryto w 7991 spośród nich i opisano 30 793 zależności o podobnym charakterze. Opisano 667 alternatywnie powstających form związanych z określoną dystrybucją w tkankach. Najbardziej specyficznymi lokalizacjami wydają się być mózg, jądra, skóra i węzły chłonne. Formy wykazujące silną specyficzność tkankową nazwano większymi, a te, które nie wykazują takiej specyficzności, mniejszymi [23]. Skutki alternatywnego składania RNA przekładają się oczywiście na zmiany w drugo- i trzeciorzędowej strukturze białka [24].

Znaczenie mutacji dla procesu alternatywnego składania RNA

Mutacje w obrębie regionów niekodujących, takich jak miejsca składania 3' lub 5', w obrębie sekwencji rozgałęziającej oraz mutacje wpływające na poliadenylację często powodują wrodzone zaburzenia [18]. U ludzi około 15% chorób o podłożu genetycznym powstałych w wyniku mutacji punktowych związanych jest z zaburzeniami w procesie składania RNA [8]. Mogą one obejmować nieaktywne miejsca składania lub powodować powstawanie nowych, mogą prowadzić do zmiany przyłączania się białek SR i w konsekwencji do wycięcia jakiegoś eksonu w dojrzałym RNA (50% zbadanych mutacji dotyczyło białek SR, takich jak: SF2/ASF, SRp40, SRp55, SC35) [8,18]. Wydaje się, że główną przyczyną omijania eksonów są pojedyncze zmiany nukleotydów w eksonowych sekwencjach wzmacniających.

Zmiana drugorzędowej struktury pre-mRNA może wpływać na wybór miejsc składania, a tym samym na prawidłowe łączenie eksonów. Podobne skutki mają mutacje

nonsensowne oraz delecje i insercje w obrębie eksonów [31,34]. Mogą one powodować przedwczesne pojawienie się kodonów terminujących i prowadzić do syntezy krótszych, niefunkcjonalnych białek [18]. Mutacje w sekwencjach eksonowych niszczą z reguły motywy ESE i ESS. Mogą powodować usunięcie jednego lub kilku eksonów, ale nieraz eliminowana jest jednocześnie nonsensowna mutacja i zachowana zostaje translacyjna ramka odczytu [19]. Istnieją też tak zwane ciche mutacje, niezmieniające sekwencji aminokwasów, które również mogą wpływać na ESE i ESS i powodować zmiany w procesie składania RNA.

Mutacje dotyczące składania RNA można podzielić na podklasy. Podklasa I stanowi około 60% i dotyczy mutacji w niezmiennych sekwencjach miejsc składania, w wyniku czego eksony przestają być rozpoznawane. Mutacje I podklasy powodują ciężkie choroby, gdyż w ich wyniku nie dochodzi do powstawania prawidłowego transkryptu [19].

Podklasa II to mutacje w obrębie motywów zmiennych, prowadzące do powstawania jednocześnie transkryptów prawidłowego i alternatywnego poprzez wzmocnienie lub osłabianie motywów rozpoznających ekson. W tej podklasie znajdują się mutacje w intronach, które to generują ukryte miejsca donorowe lub akceptorowe i mogą prowadzić do częściowego włączenia sekwencji intronowych. Skutki mutacji podklasy II są łagodniejsze, ponieważ powstaje transkrypt prawidłowy [19].

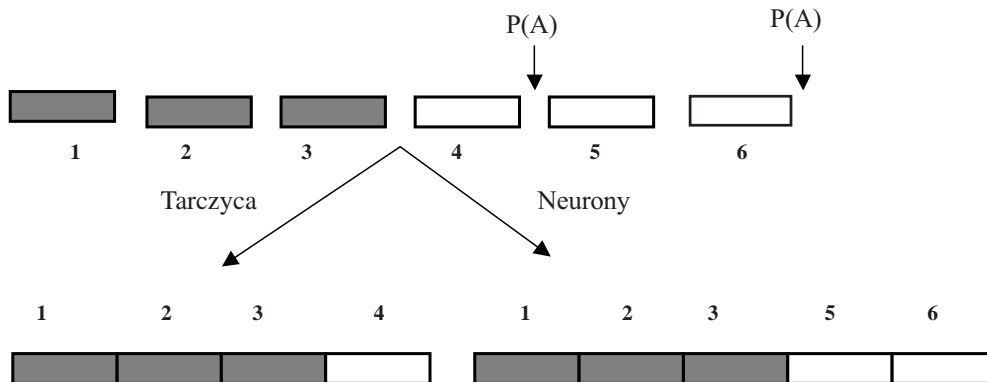
W niektórych przypadkach mutacja może mieć wpływ pozytywny. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a jest ciężką, postępującą chorobą degeneracyjną mięśni spowodowaną mutacją w genie dystrofiny. Nonsensowne mutacje w tym genie prowadzą z reguły do wcześniejszego zakończenia syntezy i powstania w wyniku tego krótszego białka. Jednakże mutacja E1211X w sekwencji ESE prowadzi do ominięcia eksonu 27 i tylko częściowej zmiany ramki odczytu, a w konsekwencji do znacznie łagodniejszej formy klinicznej choroby nazwanej Dystrofią mięśniową Beckera [20].

ZNACZENIE ALTERNATYWNEGO SKŁADANIA RNA W PATOLOGII CHORÓB

Kalcytonina/CGRP

Klasyczny przykład alternatywnego składania RNA stanowi gen dla kalcytoniny (ryc. 2), na którego matrycy powstają dwa różne białka o odmiennej lokalizacji tkankowej. W tarczycy dochodzi do ekspresji kalcytoniny, powstałej w wyniku połączenia czterech pierwszych eksonów. W neuronach powstaje natomiast CGRP – białko będące produktem genu dla kalcytoniny po złożeniu eksonów 1, 2, 3, 5 i 6.

Regulacja tego procesu wydaje się być zależna od istniejącego w eksonie 4-eksonowego elementu wzmocniającego, do którego przyłącza się SRp55. Różna ilość białka SRp55 w różnych tkankach może odpowiadać za regulację alternatywnego składania genu. Istotny jest także udział hormonów. W badaniu obejmującym pacjentów poddanych leczeniu deksametazonem z powodu nowotworu wywodzącego się z komórek rdzenia tarczycy stwierdzono wzrost mRNA dla kalcytoniny i jednoczesny spadek mRNA dla CGRP [37].



RYCINA 2. Alternatywne składanie genu CGRP

IL-4 i jej forma alternatywna IL-4 δ 2

IL-4 jest kluczową cytokiną biorącą udział w powstawaniu odpowiedzi IgE-zależnej i w rozwoju zapalenia alergicznego. Różnicuje ona dojrzewające limfocyty T w kierunku Th2 i prowadzi do uwalniania przez nie odpowiednich cytokin (IL-4,5,9,13), indukuje przełączenie immunoglobulin w kierunku izotypu IgE oraz nasila IgE-zależną aktywację komórek tucznych. Wpływa ponadto na ekspresję cząsteczki adhezyjnej VCAM-1, zwiększa liczbę receptorów obecnych na powierzchni komórki i nasila sekrecję śluzu.

Gen dla interleukiny 4 znajduje się na chromosomie 5 w obszarze q23-31 i składa się z czterech eksonów. W wyniku jego ekspresji powstają dwa produkty: prawidłowa IL-4 oraz IL-4 δ 2 (alternatywna forma składania RNA z wycięciem eksonu 2), będąca swoistym inhibitorem dla receptora IL-4. IL-4 δ 2 hamuje stymulację limfocytów T, sekrecję PGE₂ przez monocyty, syntezę IgE przez limfocyty B i ekspresję CD23.

W niestymulowanych komórkach krwi obwodowej stwierdzono większą ilość produktu prawidłowego w stosunku do alternatywnego u pacjentów z astmą atopową w porównaniu z osobami chorymi na gruźlicę i grupą kontrolną [55]. W komórkach pobranych podczas biopsji z drzewa oskrzelowego stwierdzono natomiast, że osoby z astmą mają wyższą ekspresję IL-4 δ 2 niż osoby zdrowe [54]. Sugeruje się, że równowaga pomiędzy IL-4 a IL-4 δ 2 może regulować przebieg procesu zapalnego w astmie. Nasze obserwacje obejmujące 18 pacjentów z astmą atopową i 14 osób zdrowych wykazały obecność produktu alternatywnego składania genu IL-4. U wszystkich badanych istnieje wyższa ekspresja formy prawidłowej genu dla IL-4 w stosunku do izoformy IL-4 δ 2. Nie stwierdziliśmy natomiast różnicy w nasileniu procesu alternatywnego składania RNA między osobami zdrowymi a chorymi z astmą atopową. Poziom ekspresji zarówno konstitutywnej, jak i alternatywnej formy składania genu dla IL-4 nie ulega zmianie w zależności od nasilenia procesu chorobowego w astmie [56].

IL-2 i jej izoformy alternatywne

Kolejną cytokiną, której izoformy są kompetycyjnymi inhibitorami dla wariantu prawidłowego, jest interleukina 2. Cytokina ta spełnia rozmaite funkcje, między innymi bierze udział w różnicowaniu limfocytów B i sekrecji immunoglobulin. Wzmacnia cytotoksyczność monocytów, nasila fagocytozę i proliferację makrofagów, stymuluje proliferację komórek NK i ich aktywność cytologiczną. Wykryto dwa produkty będące wynikiem alternatywnego składania RNA dla IL-2: IL-2 δ 2 powstającą z ominięciem eksonu 2 i IL-2 δ 3 bez eksonu 3. W przeciwieństwie do formy prawidłowej izoformy składania alternatywnego nie stymulują proliferacji limfocytów T i hamują przyłączenie rhIL-2 do receptorów dla IL-2 [62].

15-LOb i jej izoformy

15-lipoksygenaza (15-LO) należy do grupy enzymów katalizujących przekształcenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych do lipoksyn. U ludzi opisano kilka jej rodzajów: 5-LO, 12-LO, 12R-LO, 15-LOa, 15-LOb. 15-LOb powoduje hydroksylację kwasu arachidonowego w pozycji 5 lub 15 w konfiguracji S. Prowadzi to do powstania pochodnej 15-HETE kwasu arachidonowego, a w konsekwencji również lipoksyn, substancji o potencjalnie modulującym wpływie na stany zapalne. Gen dla 15-LOb znajduje się na chromosomie 17 i zawiera 14 eksonów. W procesie składania RNA, na skutek usunięcia eksonu 9 powstaje izoforma 15-LOb2 (*15-LOXb sv-a*). Nowo powstały enzym wykazuje odmienną od swego prekursora aktywność katalityczną. Ulega on inaktywacji przez powstające produkty już po 1–2 minutach, a nie po 30 minutach jak w przypadku 15-LOb. Istnieją ponadto: *15-LOXb sv-b*, która powstaje w wyniku wycięcia eksonu 9. części eksonu 10. i całego eksonu 11., na skutek czego enzym staje się nieaktywny oraz *15-LOXb sv-c* będąca wynikiem pozostawienia intronu 12., co prowadzi do zmiany ramki odczytu i wcześniejszego wystąpienia kodonu stopu. Produkt powstający na tej matrycy jest nieaktywny, ponieważ w wyniku składania mRNA w końcu karboksylowym usunięta zostaje izoleucyna, potrzebna do regulacji katalitycznego żelaza [63].

COX-1 i jej izoformy

Cyklooksygenazy są grupą enzymów odgrywających istotną rolę w procesie zapalnym. Białka te katalizują transformację kwasu arachidonowego, będącego składnikiem błon lipidowych prowadząc do powstania prostaglandyn, tromboksanów i prostacyklin. Istnieją dwie izoformy enzymu COX-1 – występująca konstytutywnie i forma indukowana COX-2. Gen dla COX-1 znajduje się na chromosomie 9q32-33.3, a dla COX-2 na chromosomie 1q25.2-q25.3.

Znane są alternatywne warianty składania RNA dla COX-1. Istnieje forma transkryptu opisywana jako COX-3, gdy nie dochodzi do wycięcia intronu 1 oraz warianty składania genu prowadzące w konsekwencji do powstania białek krótszych. Są to PCOX-1a i PCOX-1b powstałe w wyniku usunięcia eksonów od 5 do 8, przy czym w przypadku PCOX-1 podobnie jak w COX-3 pozostaje intron 1. COX-3 ma aktywność enzymatyczną odmienną od COX-1, zależną od procesów glikozylacji. COX-

3 jest hamowana swoiście (w porównaniu z COX-1 i COX-2) przez niesteroidowe leki przeciwzapalne, takie jak acetaminofen, fenacetyna [59].

Prowadzone są również ciekawe badania dotyczące alternatywnej formy składania, opisywanej jako COX-1SV, powstającej na matrycy RNA COX-1, ale krótszej o pierwsze 150 nt. Wiadomo, że prostaglandyny będące produktami metabolizmu cyklo-oksigenaz odgrywają istotną rolę w obronie śluzówki żołądka. Wykazano zmiany w ekspresji obu wariantów COX-1 w zależności od wieku pacjentów. U osób starszych dominowała izoforma COX-1SV, co może mieć istotny związek z malejącą z wiekiem protekcją śluzówki [60].

Stwierdzono także, że COX-1SV stanowi 2% ekspresji całkowitego mRNA białka COX-1 w komórkach raka jelita grubego. Poziom COX-1SV wzrastał w przypadku guzów jelita grubego i odbytnicy, a następnie ulegał obniżeniu, po zastosowaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych, do wartości wykrywanych w śluzówce osób zdrowych [61].

Uważa się, że produkty transformacji kwasu arachidonowego powstające na szlaku cyklooksygenazowym są zaangażowane w patomechanizm astmy. Prowadząc badania nad ekspresją cyklooksygenaz stwierdziliśmy, że w ludzkich leukocytach obecny jest jeszcze jeden produkt alternatywnego składania genu COX-1. Białko to powstaje na skutek delekcji fragmentu mRNA o długości 111 nukleotydów, stanowiących ekson 9. Stwierdziliśmy, że u osób z astmą istnieje wyższa ekspresja formy prawidłowej w stosunku do izoformy alternatywnej w porównaniu z grupą kontrolną. Czynnościowe znaczenie tego zjawiska nie zostało jak dotąd poznane. Nie wykazaliśmy istotnych statystycznie różnic w ekspresji obu izoform białka COX-1 pomiędzy pacjentami z astmą oskrzelową tolerującymi aspirynę a osobami chorującymi na astmę z nadwrażliwością na aspirynę, u których zaburzenia syntezy PGE₂ uznane są za kluczowy element patomechanizmu nadwrażliwości [57,58].

PODSUMOWANIE

Alternatywne składanie RNA odgrywa istotną rolę w tworzeniu zróżnicowanych sekwencyjnie matryc translacyjnych, powstających z tego samego genu, a w konsekwencji prowadzi do powstania olbrzymiej puli białek o różnorodnych funkcjach. Istnienie tego zjawiska może stanowić podłoże powstania pewnych chorób. Ważne jest dokładne poznanie mechanizmów regulacji ekspresji genów i syntezy białek oraz wzajemne relacje pomiędzy tymi procesami. Znaczenie alternatywnego składania RNA i mechanizmów jego regulacji wydaje się niezwykle istotne, budzi nadzieje na możliwość wykorzystania w przyszłości w celu lepszego wykrywania chorób, wcześniejszej detekcji predyspozycji genetycznych do pojawienia się choroby lub jako celu dla potencjalnej terapii.

PIŚMIENNICTWO

- [1] VENTER JC, ADAMS MD, MYERS EW et al. The Human Genome. *Science* 2001; **291**: 1305–1351.
- [2] LIANG F, HOLT I, PERTEA G. Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nature Genetics* 2000; **25**: 239–240.

- [3] EWING B, GREEN P. Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nature Genetics* 2000; **25**: 232–234.
- [4] WEBSTER NJ, HUANG Z. Hormonal regulation of alternative splicing. *Front Horm Res* 1999; **25**: 1–17.
- [5] BRETT D, HEIKE P, VALCARCEL J. Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics* 2002; **30**: 29–30.
- [6] SOREK R, AMITAI M. Piecing together the significance of splicing. *Nature Biotechnology* 2001; **19**: 196.
- [7] MODREK B, LEE Ch. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* 2002; **30**: 13–19.
- [8] MANIATIS T, TASIC B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 2002; **418**: 236–243.
- [9] GRAVELEY BR. Sex, Agility, and the Regulation of Alternative Splicing. *Cell* 2002; **109**: 409–412.
- [10] BLACK DL. Protein Diversity from Alternative Splicing: A Challenge for Bioinformatics and Post-Genome Biology. *Cell* 2000; **103**: 367–370.
- [11] MATTER N, HERRLICH N, KONING H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 2002; **420**: 691–695.
- [12] SCHULER GD. Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* 1997; **75**: 694–698.
- [13] STANLEY JP, GUTHRIE C. Mechanical Devices of the Spliceosome: Motors, Clocks, Springs, and Things. *Cell* 1998; **92**: 315–326.
- [14] INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**: 860–921.
- [15] MODREK B, RESCH A, GRASSO C, LEE Ch. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Research* 2001; **29**: 2850–2859.
- [16] CROFT L, SCHANDORFF S, CLARK F. ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. *Nature Genetics* 2000; **24**: 340–341.
- [17] LAM BJ, HERTEL KJ. A general role for splicing enhancers in exon definition. *RNA* 2002; **8**: 1233–1241.
- [18] CACERES JF, KORNBLIHTT AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics* 2002; **18**: 186–193.
- [19] NISSIM-RAFANIA M, KEREM B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends in Genetics* 2002; **18**: 123–127.
- [20] SHIGA N, TAKESHIMA Y, SAKAMOTO H, INOUE K, YOKOTA Y, YOKOYAMA M, MATSUO M. Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1997; **100**: 2204–2210.
- [21] CHUA K, REED R. The RNA splicing factor hSlu7 is required for correct 3' splice-site choice. *Nature* 1999; **402**: 207–210.
- [22] NEWMAN AJ. The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing. *EMBO J* 1997; **16**: 5797–5800.
- [23] LEE Ch, ATANELOV L, MODREK B, XING Y. ASAP: the Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: 101–105.
- [24] BOUE S, VINGRON M, KRIVENTSEVA E, KOCHI I. Theoretical analysis of alternative splice forms using computational methods. *Bioinformatics* 2002; **18**: S65–S73.
- [25] CASTILLO-DAVIS CI, MEKHEDOV SL, HARTL D, KOONIK E, KONDRASHOV A. Selection for short introns in highly expressed genes. *Nature Genetics* 2002; **31**: 415–418.
- [26] COWARDE E, HAAS S, VINGRON M. SpliceNest: visualizing gene structure and alternative splicing based on EST clusters. *Trends in Genetics* 2002; **18**: 53–54.
- [27] NOGUES G, KADENER S, CRAMER P, BENTLEY D. Transcriptional Activators Differ in Their Abilities to Control Alternative Splicing. *J Biol Chem* 2002; **277**: 43110–43114.
- [28] SHIN C, MANLEY JL. The SR Protein SRp38 Represses Splicing in M Phase Cells. *Cell* 2002; **111**: 407–417.
- [29] COWPER A, CACERES J, MAYEDA A, SCREATON G. Serine-Arginine (SR) Protein-like Factors That Antagonize Authentic SR Proteins and Regulate Alternative Splicing. *J Biol Chem* 2001; **276**: 48908–48914.
- [30] STOSS O, OLBRICH M, HARTMANN A, KONIG H. The STAR/GSG Family protein rSLM-2 Regulates the Selection of Alternative Splice Sites. *J Biol Chem* 2001; **276**: 8665–8673.
- [31] LIU H, CARTEGINI L, ZHANG M, KRAINER A. A mechanism for exon skipping caused by nonsense and missense mutation in BRCA1 and other genes. *Nature Genetics* 2001; **27**: 55–58.

- [32] CHO R, HUANG M, CAMPBELL M, DONG H. Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. *Nature Genetics* 2001; **27**: 48–54.
- [33] PRUDOFOT N, FURGER A, DYE M. Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* 2002; **108**: 501–512.
- [34] PAGANI F, BURATTI E, STUANI C, BEBDIX R. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nature Genetics* 2002; **30**: 426–429.
- [35] ABELSON J, TROTTA Ch., LI H. tRNA Splicing. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12685–12688.
- [36] NEUBAUER G, KING A, RAPPSILBER J, CALVIO C. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics* 1998; **20**: 46–50.
- [37] LOU H, GAGEL RF. Alternative RNA processing – its role in regulating expression calcitonin/calcitonin gene-related peptide. *J Endocrinol* 1998; **156**: 401–405.
- [38] WU S, ROMFO C, NILSEN T, GREEN M. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF. *Nature* 1999; **402**: 832–835.
- [39] ZORIO D, BLUMENTHAL T. Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1999; **402**: 835–838.
- [40] MERENDINO L, GUTH S, BILBAO D, MARTINEZ C. Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF and the 3' splice site AG. *Nature* 1999; **402**: 838–841.
- [41] DAM D, ZILCH Ch. Regulation of Alternative Splicing of CD45 by Antagonistic Effects of SR Protein Splicing Factors. *J Immunol* 2000; **164**: 5287–5299.
- [42] FRANTZ S, THIARA A, LODWICK D. Exon repetition in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5400–5405.
- [43] GUAHTHERET D, POIROT O, LOPEZ F. Alternate Polyadenylation in Human mRNAs: A Large-Scale Analysis by EST Clustering. *Genome Research* 1998; **8**: 524–528.
- [44] FINTA C, ZAPHIROPOULOS PG. Intergenic mRNA Molecules Resulting from trans-Splicing. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5882–5889.
- [45] DORN R, REUTER G, LOEWENDORF A. Transgene analysis proves mRNA trans-splicing at the complex mod(mdg4) locus in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 9724–9729.
- [46] CAUDEVILLA C, SERRA D, MILIAR A. Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 12185–12190.
- [47] REED R, HURT E. A conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing. *Cell* 2002; **108**: 523–531.
- [48] VILLA T, PLEISS JA, GUTHERIE C. Spliceosomal snRNAs: Mg²⁺ Dependent Chemistry at the Catalytic Core? *Cell* 2002; **109**: 149–152.
- [49] SCHMUCKER D, CLEMENS JC, SHU H, WORBY CA, XIAO J, MUDA M, DIXON JE, ZIPURSKY SL. *Drosophila* Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell* 2000; **101**: 671–684.
- [50] LALLENA MJ, CHALMERS KJ, LLAMAZARES S, LAMOND AI, VALCARCEL J. Splicing Regulation at the Second Catalytic Step by Sex-lethal Involves 3' Splice Site Recognition by SPF45. *Cell* 2002; **109**: 285–296.
- [51] XU Q, MODREK B, LEE C. Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome. *Nucleic Acids Research* 2002; **30**: 3754–3766.
- [52] IRIZARRY K, KUSTANOVICH V. Genome-wide analysis of single-nucleotide polymorphisms in human expressed sequences. *Nature Genetics* 2000; **26**: 233–236.
- [53] LAWRENCE J. Shared Strategies in Gene Organization among Prokaryotes and Eukaryotes. *Cell* 2002; **110**: 407–413.
- [54] GLARE E, DIVJAK M. Asthmatic airway biopsy specimens are more likely to express the IL-4 alternative splice variant IL-4δ2. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **104**: 978–982.
- [55] SEAH GT, GAO PS, HOPKIN JM. Interleukin-4 and Its Alternatively Spliced Variant (IL-4δ2) in Patients with Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**: 1016–1018.
- [56] JEDRZEJCZAK M, BOROWIEC M, PTASINSKA A, WYSOCZYNSKA K, BIENKIEWICZ B, WOSZCZEK G, KOWALSKI ML. Alternatywne transkrypty mRNA genu interleukiny 4 w leukocytach krwi obwodowej u chorych z astmą oskrzelową. *Alergia Astma Immunologia* 2003; **8**: 188–193.
- [57] BOROWIEC M. Rozprawa doktorska pt: „Identyfikacja oraz ocena częstości występowania polimorfizmów w sekwencjach genów dla cyklooksygenaz (COX-1, COX-2) u osób tolerujących i nadwrażliwych na aspirynę i inne niesteroidowe leki przeciwzapalne” 2002.

- [58] WOSZCZEK G, KOWALSKI M.L, BOROWIEC M, CIESLAK M. Cyclooxygenase-1 alternatively spliced variant is overexpressed in peripheral blood leukocytes of asthmatic patients. *Eur Resp J* 2002 (abstract); **20**: 79–85.
- [59] CHANDDRASEKHARAN NM, DAI H, ROSS KL, EVANSON NK, TOMSIK J, ELTON TS, SIMMONS DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 13926–13931.
- [60] VOGIAGIS D, GLARE E, MISAJON A, BROWN W, O'BRIEN PE. Cyclooxygenase-1 and an alternatively spliced mRNA in the rat stomach: effects of aging and ulcers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; **278**: G820–827.
- [61] VOGIAGIS D, BROWN W, GLARE E. Rat colorectal tumours treated with a range of non-steroidal anti-inflammatory drugs show altered cyclooxygenase-2 and cyclooxygenase-1 splice variant mRNA expression levels. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 869–874.
- [62] TSYTSIKOV V, YUROVSKY V, ATAMAS S. Identification and Characterization of Two Alternative Splice Variants of Human Interleukin-2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 23055–23060.
- [63] BHATIA B, MALDONADO CJ, TANG S, CHANDRA D, KLEIN RD, CHOPRA D, SHAPPELL SB, YANG P, NEWMAN RA, TANG DG. 2003. Subcellular localization and tumor-suppressive functions of 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) and its splice variants. *J Biol Chem* **278**(27): 25091–25100.

..

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska

Otrzymano: 07.09.2005 r.

Przyjęto: 15.09.2005 r.

ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź

e-mail: mjedrzejczak@mediclub.pl