

ZASTOSOWANIE NARZĘDZI BIOINFORMATYCZNYCH W BADANIU STRUKTURY I EKSPRESJI GENU ORAZ BUDOWY I FUNKCJI BIAŁKA NA PRZYKŁADZIE CZĄSTECZKI NCAM

APPLICATION OF BIOINFORMATIC TOOLS FOR THE ASSESSMENT
OF GENE AND PROTEIN STRUCTURE AND FUNCTION:
NCAM MOLECULE AS AN EXAMPLE

Mariusz KACZMAREK, Mirosław SZCZEPAŃSKI, Jan ŻEROMSKI

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej,
Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Dynamiczny rozwój nauk przyrodniczych oraz medycyny w dużej mierze zależy od rosnącej ilości zasobów baz danych oraz ich dostępności dla badaczy. Wszystkie ośrodki zajmujące się kolekcjonowaniem sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych wymieniają pomiędzy sobą informacje i aktualizują je wzajemnie. Pełną korzyść płynącą z tych zasobów daje dopiero ich odpowiednia analiza. Możliwość taką oferują liczne serwisy bioinformatyczne. Ich tworzeniem zajmuje się szeroka społeczność naukowa, udostępniając niekomercyjnie na stronach internetowych programy pozwalające analizować zgromadzone dane w różnych aspektach. Dla przykładu, o właściwościach biologicznych nerwowej cząsteczki adhezyjnej (NCAM) decydują liczne modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne. Podejście bioinformatyczne pozwala ocenić ich znaczenie. Dzięki użyciu programów bioinformatycznych wykazano między innymi, że NCAM ma teoretyczną możliwość obecności od 40 do 46 eksonów, podczas gdy sekwencja genetyczna wskazywała jedynie na obecność 20 eksonów. Stosując program Spidey uzyskano nowe dane o eksonie VASE wykazującym związki z obniżoną plastycznością mózgu. Przy pomocy innych programów określono szczegóły powstawania białka NCAM w komórce, jej formy transbłonowej i rozpuszczalnej, a także jej struktury trzeciorzędowej i możliwych modyfikacji. Wykazano zdolność NCAM do wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału i rolę fosforylacji białka w tym procesie. Zastosowanie dostępnych w internecie narzędzi bioinformatycznych w znacznym stopniu może przybliżyć do lepszego poznania struktury i biologii cząsteczki NCAM. Dzięki czemu staje się możliwe bardziej szczegółowe określenie jej funkcji w organizmie, zarówno w zdrowiu jak i w chorobie.

Słowa kluczowe: bioinformatyka, bazy danych i narzędzia, nerwowa cząsteczka adhezyjna – NCAM, modyfikacje potranskrypcyjne i potranslacyjne.

Summary: Rapid progress of biological and medical research depends largely on steadily growing information in online databases and its accessibility for researchers. All centers involved in the collection of nucleotide and amino acid sequences exchange and update available data. Full benefit from this information may be obtained only by proper analysis provided by several bioinformatic services. In their formation people from broad scientific community are engaged and their effects of work are accessible free of charge in internet. This software permits to analyze collected data in various aspects. For example, properties of neural cell adhesion molecule (NCAM) depend a lot on multiple posttranscriptional and posttranslational modifications. Bioinformatic approach allows to assess their significance. Due to bioinformatic tools it was shown that NCAM may theoretically possess 40 up to 46 exons, while genetic screening indicated 20 only. Application of Spidey software revealed novel data about VASE exon, showing links with decreased brain plasticity. Other tools permitted to obtain details about NCAM protein formation in the cell, its transmembrane and soluble forms as well as tertiary structure and its possible modifications. I was also shown that NCAM is able to intracytoplasmic signal transduction and emphasized the role of protein phosphorylation in this process. This will make possible to determine precisely the role of NCAM molecule both in health and disease.

Key words: bioinformatics, databases and tools, neural cell adhesion molecule – NCAM, posttranscriptional and posttranslational modifications.

WSTĘP

Dynamiczny rozwój nauk przyrodniczych oraz medycyny w dużej mierze zależy od rosnącej ilości zasobów baz danych oraz ich dostępności dla badaczy. Głównymi bazami zawierającymi sekwencje aminokwasowe i nukleotydowe są amerykańska GeneBank (*National Center for Biotechnology Information*), europejska EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) oraz japońska DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*). Do czołówki należą również trzy bazy kolekcjonujące jedynie sekwencje białkowe: SWISS-PROT, PIR (*Protein Information Resource*) oraz PDB (*Protein Data Bank*). Wszystkie te ośrodki wymieniają pomiędzy sobą informacje jednocześnie aktualizując je wzajemnie. Pełną korzyść płynącą z tych zasobów daje dopiero ich odpowiednia analiza. Możliwość taką oferują liczne serwisy bioinformatyczne. Ich tworzeniem zajmuje się szeroka społeczność naukowa, udostępniając niekomercyjnie na stronach internetowych programy pozwalające analizować sekwencje nukleotydowe i białkowe w różnych aspektach (tab.1).

Nerwowa cząsteczka adhezyjna, NCAM1 (*Neural Cell Adhesion Molecule 1*) [HUGO], zwana także CD56, po raz pierwszy została opisana w 1977 roku. Należy do dużej i dobrze poznanej nadrodziny cząsteczek immunoglobulinopodobnych. Całą rodzinę nerwowych cząsteczek adhezyjnych pogrupowano na mniejsze podrodziny. W zależności od liczby zewnątrzkomórkowych domen immunoglobulinopodobnych typu C2 (Ig) oraz powtórzeń fibronektynowych typu III (FN) nadano im odpowiednie numery. NCAM reprezentuje rodzinę 5/2, która wykazuje obecność pięciu domen Ig oraz dwóch domen FN. Członkowie całej nadrodziny receptorów Ig-podobnych, do której oprócz NCAM i innych cząsteczek adhezyjnych należą między innymi Ig, TCR, CD4, CD8 i inne, są stałymi lub długotrwałymi składnikami błon komórkowych. Ich obecność wykazano w wielu tkankach w trakcie rozwoju oraz życia dorosłego [42]. Cząsteczka NCAM występuje w przyrodzie w trzech podstawowych izoformach: 180 kDa, 140

TABELA 1. Adresy internetowe baz danych, serwisów i programów bioinformatycznych wykorzystanych w przeprowadzonej analizie cząsteczki NCAM

Bazy danych, narzędzia	Adresy internetowe	Zastosowanie
<p>BAZY DANYCH</p> <p>GeneBank EMBL DDBJ SWISS-Prot PIR PDB HUGO Gene Nomenclature Committee ENSEMBL LocuLink GeneLoc UniProt</p>	<p>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/ http://www.ebi.ac.uk/embl/ http://www.ddbj.nig.ac.jp/ http://www.expasy.org/sprot/ http://pir.georgetown.edu/home.shtml http://www.rcsb.org/pdb/ http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/ http://www.ensembl.org/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ http://genecards.weizmann.ac.il/gene/loc/index.shtml http://www.expasy.uniprot.org/</p>	<p>Baza danych <i>National Center for Biotechnology Information</i> Baza danych <i>European Molecular Biology Laboratory</i> Baza danych <i>DNA Data Bank of Japan</i> Baza danych sekwencji białkowych <i>SWISS-PROT</i> database Baza danych sekwencji białkowych <i>Protein Information Resource</i> Baza danych sekwencji białkowych <i>Protein Data Bank</i> Baza danych sekwencji białkowych <i>Human Genome Organisation</i> zatwierdza nazwy i symbole genów <i>Ensembl Genome Browser</i> Prezentuje zintegrowane mapy dla każdego ludzkiego chromosomu Prezentuje zintegrowane mapy dla każdego ludzkiego chromosomu Centralna baza danych sekwencji białkowych i ich funkcji</p>
<p>NARZĘDZIA</p> <p>ExpASY FASTA programs CBS Prediction Server The Predict Protein Server ProtParam IMolTalk Swiss-Pdb Viewer Cn3D 4.1 ASpic Spidey ClustalW SecretomeP SignalP BigPi Predictor Kate Dooll's hydrophobicity plots TMHMM Sosui HMMTOP TMpred TMmap NetN Glyc NetO Glyc NetPhos</p>	<p>http://au.expasy.org/ http://fasta.bioch.virginia.edu/ http://www.cbs.dtu.dk/services/ http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/ http://umoltalk.org/ http://www.expasy.org/spdbv/ http://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml http://aspic.algo.discu.unimib.it/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/ http://www.ebi.ac.uk/cluster/ http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0/ http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ http://mendel.inp.univie.ac.at/sat/gp/plant_server.html http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www/grease.htm http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ http://sosui.proteome.bio.uat.ac.jp/so_sulfame0.html http://www.enzim.hu/hmmap/ http://www.ch.emblnet.org/software/TMPRED_form.html http://bioinfo.linbo.ifm.liu.se/tmap http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/ http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/ http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/</p>	<p>ExpASY (<i>Expert Protein Analysis System</i>) analiza sekwencji i struktur białkowych Przeszukiwanie baz danych sekwencji białkowych i DNA <i>Center for Biological Sequence Analysis</i> Serwis predykcji struktury, analizy sekwencji i funkcji białka Pozwala określić różne fizyczne i chemiczne parametry białka Interaktywny serwis dla analizy struktury białka Program do analizy, wizualizacji i porównania struktur 3D białka Program do analizy, wizualizacji i porównania struktur 3D białka ASPic (<i>Alternative Splicing Prediction</i>) analiza struktury genu Program porównujący sekwencje genomową z mRNA genu Serwer do porównywania wielu sekwencji genów i białek Predykcja lokalizacji komórkowej białka Predykcja peptydu sygnałowego Predykcja wiązania GPI Analiza sekwencji hydrofobowych Predykcja sekwencji transbłonowych białka Predykcja sekwencji transbłonowych białka Predykcja sekwencji transbłonowych białka Predykcja sekwencji transbłonowych białka Predykcja sekwencji transb3onowych białka Predykcja miejsc N-glikozylacji w obrębie ludzkich białek Predykcja miejsc O-glikozylacji w obrębie ludzkich białek Predykcja miejsc fosforylacji w komórkach eukariotycznych</p>

Narzędzia – serwisy i programy bioinformatyczne

kDa oraz 120 kDa [44]. Bazy danych NCBI oraz SWISS-Prot zawierają jednak tylko dwie sekwencje referencyjne, których obecność wykazano w organizmie człowieka. Są to cząsteczki o masie 140 kDa (wariant o długości 848 AA NCBI [[>gi|10834990|ref|NP_000606.1](#)]; Swiss-Prot [P13591] oraz wariant o długości 858 AA NCBI [[>gi|41281937|ref|NP_851996.1](#)] i 120 kDa (obydwa warianty o długości 761 AA Swiss-Prot [P13592-1] oraz [P13592-2]). Obecność izoformy o masie 180 kDa wykazano w komórkach mysich *Mus musculus* [UniProt: P13595], żaby szponiastej *Xenopus laevis* [UniProt: P16170], traszki z gatunku *Cynops pyrrhogaster* [UniProt: O57576], a także u kury domowej *Gallus gallus domestica* [UniProt: P13590].

STRUKTURA GENU I MODYFIKACJE POTRANSKRYPCYJNE

Gen o długości 70 tysięcy par zasad, kodujący NCAM został zmapowany na długim ramieniu chromosomu 11 [LocusLink i Ensembl: 11q23.1; GeneLoc: GC11P112369]. Pełen zestaw właściwości biologicznych oraz funkcji pełnionych przez cząsteczkę NCAM nie został ostatecznie poznany. Wiadomo jednak, że budowa i funkcjonowanie tej struktury mogą być modyfikowane w drodze regulacji ekspresji genu, lokalizacji białka oraz interakcji z innymi białkami [35]. Wszystkie różniące się między sobą warianty białka nerwowej cząsteczki adhezyjnej powstają w drodze alternatywnego składania (*splicing*). Ogólnie wyróżniamy cztery główne typy splicingu różnicowego: z użyciem różnych promotorów, z zatrzymaniem intronów w dojrzałych cząsteczkach, z pozostawianiem lub usuwaniem poszczególnych eksonów oraz z użyciem różnych miejsc poli(A). Mechanizm dojrzewania mRNA kodującego poszczególne warianty NCAM podobny jest do obserwowanego w trakcie dojrzewania transkryptów immunoglobulin. Użycie dalszego, silniejszego miejsca poli(A) powoduje, że dojrzały mRNA zawiera eksony kodujące regiony odpowiedzialne za kotwiczenie białka w błonie, tzw. *stop-transfer*. Wykorzystanie natomiast miejsca bliższego, tj. słabszego, skutkuje powstawaniem formy rozpuszczalnej immunoglobulin [23].

Przyjmuje się, że całkowita sekwencja genetyczna różnych izoform ludzkiej cząsteczki NCAM może wykazywać obecność maksymalnie 20 eksonów. Określono, że eksony 1–14 kodują domeny zewnątrzkomórkowe, ekson 15 odpowiedzialny jest za fragment transbłonowy, natomiast pozostałe eksony odpowiadają za wewnątrzplazmatyczną sekwencję cząsteczki. Zaobserwowano, że w trakcie rozwoju serca szczura, w wyniku różnych przetasowań eksonów może powstać przynajmniej 27 różnych wariantów mRNA. Wykorzystanie programu ASPic ujawniło teoretyczną możliwość obecności od 40 do 46 eksonów, które w zależności od zadanych stopni swobody w wyniku różnych rearanzacji mogą tworzyć od 25 do 55 różnych transkryptów. Zadaniem tego narzędzia bioinformatycznego jest przewidywanie struktury alternatywnie składanych transkryptów na podstawie porównania odpowiedniej sekwencji genomowej z poznanymi znacznikami sekwencji ulegających ekspresji (EST). Część z przewidzianych w ten sposób eksonów oraz stworzonych przez nie transkryptów może mieć znaczenie wyłącznie teoretyczne. Sekwencje mRNA czterech podstawowych wariantów NCAM dostępne są w bazach danych [Ensembl: ENST00000316851, ENST00000350484, ENST00000359771,

ENST00000356076]. Aby określić lokalizację poszczególnych eksonów znajdujących się w obrębie różnych transkryptów, można posłużyć się obecnym na stronie NCBI programem Spidey, który umożliwia zestawienie wybranych sekwencji mRNA z odpowiednią sekwencją referencyjną DNA [dla NCAM; GeneBank: NT_033899].

Obecność i rodzaj alternatywnie składanych eksonów decyduje o długości poszczególnych transkryptów NCAM. Pierwszą zidentyfikowaną strukturą tego typu był zlokalizowany pomiędzy eksonami 7 i 8 tzw. ekson VASE (*Variable Alternative Spliced Exon*) o długości 30 par zasad [40]. Wykorzystanie programu Spidey może być pomocne w wykazaniu, że fragment ten stanowi odrębny ekson, eliminowany w trakcie dojrzewania mRNA. Dotychczas nieznane są uwarunkowania występowania tej sekwencji, jednak liczne dowody sugerują, że występuje związek pomiędzy VASE a obniżoną plastycznością mózgu. Przemawia za tym fakt, iż ilość cząsteczek NCAM wykazujących obecność tego eksonu wzrasta wraz z wiekiem. W 1992 roku Doherty wraz ze współpracownikami wykazał, że obecności VASE może towarzyszyć obniżenie wzrostu neurytów. Kolejną wykrytą sekwencją alternatywnie składaną jest tzw. MSD-1 (*Muscle-Specific Domain 1*). Jest to fragment o długości 108 pz. zlokalizowany w miejscu splicingu pomiędzy eksonami 12 i 13, który składa się z trzech krótkich eksonów o długości 15, 48 i 42 par zasad oraz dodatkowego tripletu AAG w pozycji 3' sąsiadującego z eksonem 13. Te trzy krótkie eksony mogą być włączane w dowolny sposób (np. ex12-ex13, ex12-a15-ex13 albo ex12-a15-a48-a42-ex13) powodując różnice w budowie transkryptów NCAM. Jak dotąd strukturę tę wykazano wyłącznie w mięśniach zarówno szkieletowych, jak i w mięśniu sercowym [1, 31]. Alternatywnie składanym eksonem jest również sekwencja SEC (*Secreted Exon*). Obecność tego 76 nukleotydowego fragmentu powoduje przedwczesną terminację translacji oraz utratę przez syntetyzowane białko domeny cytoplazmatycznej lub transbłonowej [41]. Szacuje się, że jeśli wszystkie zidentyfikowane kombinacje eksonów obecnych w genie kodującym NCAM uległyby translacji, mogłoby powstać ponad 192 kombinacji, które skutkowałyby powstaniem takiej samej ilości białek. Jednak funkcje wielu z nich nadal są nieznane.

Program ClustalW pozwala wskazać podobieństwa i różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami NCAM zarówno w obrębie sekwencji nukleotydowych, jak i aminokwasowych. Analiza homologii międzycząsteczkowej przeprowadzona przy pomocy tego narzędzia może wskazać, w jaki sposób alternatywnie składane eksony mogą modulować sekwencje aminokwasowe badanych wariantów.

BUDOWA BIAŁKA I MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE

Wszystkie modyfikacje potranskrypcyjne prowadzą w konsekwencji do powstania trzech form białka, które różnią się pomiędzy sobą strukturą, lokalizacją i funkcją. Nerwowa cząsteczka adhezyjna może występować w formie transbłonowej oraz może być zakotwiczona w błonie komórkowej przy pomocy kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolowej (GPI) [43]. Wykazano również obecność formy rozpuszczalnej. Zastosowanie programu SecretomeP 1.0 [5], pozwala wstępnie określić lokalizację

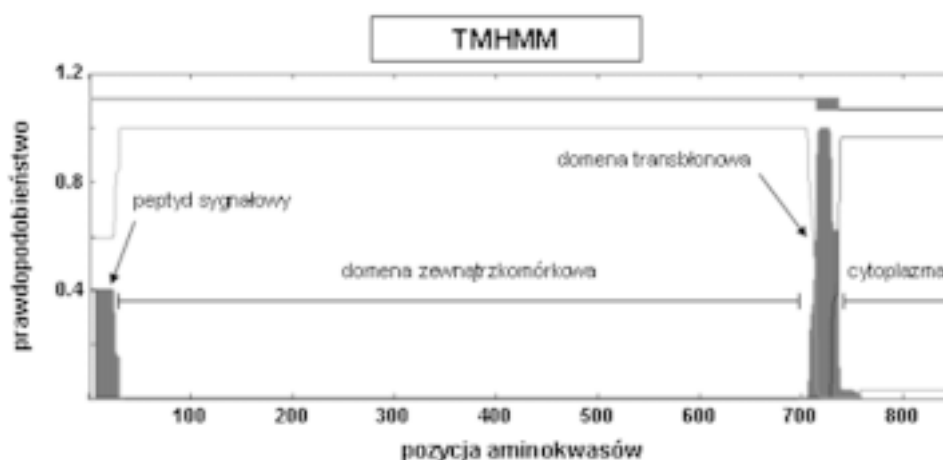
komórkową badanego białka, tzn. czy analizowana proteina pozostaje w obrębie komórki, czy jest wydzielana na zewnątrz. Przewidywanie lokalizacji białka NCAM przeprowadzone przy pomocy tego programu wykazało, że spośród czterech badanych wariantów potencjalnie dwa mogą być wydzielane na zewnątrz komórki. Obok modyfikacji potranskrypcyjnych drugą, jeszcze liczniejszą grupą zjawisk zachodzących w przebiegu dojrzewania cząsteczki NCAM stanowią modyfikacje potranslacyjne. Ogólnie wyróżnia się trzy podstawowe kategorie modyfikacji białek, tj. modyfikacje zachodzące z rozerwaniem wiązań chemicznych, głównie peptydowych, modyfikacje grupy α -aminowej i α -karboksylowej oraz modyfikacje łańcuchów bocznych. W trakcie dojrzewania cząsteczki NCAM wykazano wiele różnych modyfikacji. Są to głównie hydroliza peptydu sygnałowego, tworzenie kotwicy GPI oraz synteza mostków dwusiarczkowych. Pośród modyfikacji łańcuchów bocznych najważniejszymi, decydującymi o różnorodności biologicznego działania tego białka są różne formy glikozylacji, zwłaszcza polisialylacja, a także inne modyfikacje, takie jak fosforylacja i sulfatacja.

PEPTYD SYGNAŁOWY, SEKWENCJE TRANSBLONOWE, KOTWICA GPI

Pierwszą modyfikacją nowopowstałego propeptydu jest hydroliza tzw. peptydu sygnałowego. Zadaniem tej sekwencji jest przeprowadzenie nowopowstałej cząsteczki białka przez tzw. translokon do światła szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (*rough endoplasmic reticulum* – RER), gdzie zostaje poddana kolejnym etapom nabierania kompetencji. W obrębie prekursorów wszystkich izoform NCAM na końcach N obecne są wysoce hydrofobowe, 19 nukleotydowe sekwencje sygnałowe [45]. W celu identyfikacji peptydu sygnałowego można zastosować program SignalP 3.0 [6].

Po odcięciu peptydu sygnałowego białko przechodzi dalej do światła RER. Jednak niektóre warianty NCAM w swojej strukturze wykazują obecność szczególnej hydrofobowej domeny, która hamuje ten ruch. Jest to wspomniana wyżej sekwencja stop-transfer, która unieruchamia przechodzące białko w błonie retikulum. Występowanie zarówno peptydu sygnałowego, jak i sekwencji stop-transfer charakteryzuje cząsteczkę NCAM jako integralne białko błonowe typu I. Określenie topografii sekwencji transbłonowej umożliwiają liczne narzędzia bioinformatyczne, są to między innymi programy, takie jak: TMHMM, SOSUI, HMMTOP [39], TM Pred [21] czy TMap [33]. Wskazanie fragmentów hydrofobowych łańcucha białkowego umożliwia również program *Kyte-Doolittle hydrophathy plot* [29]. Wykorzystanie tego narzędzia pozwoliło określić, że zarówno forma transbłonowa NCAM, jak i związana kotwicą glikozylofosfatydyloinozytolową wykazują obecność wysoce hydrofobowej sekwencji, jaką jest sekwencja stop-transfer (ryc. 1).

Modyfikacja potranslacyjna związana z powstawaniem wiązania lipidowego GPI obejmuje zarówno modyfikacje zachodzące z rozerwaniem wiązania peptydowego, jak i glikozylację. GPI jest to struktura przyłączająca białko NCAM do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W ciągu niecałej minuty po wniesieniu białka do retikulum endoproteazy odcinają część poza błonową, natomiast transaminazy przyłączają do



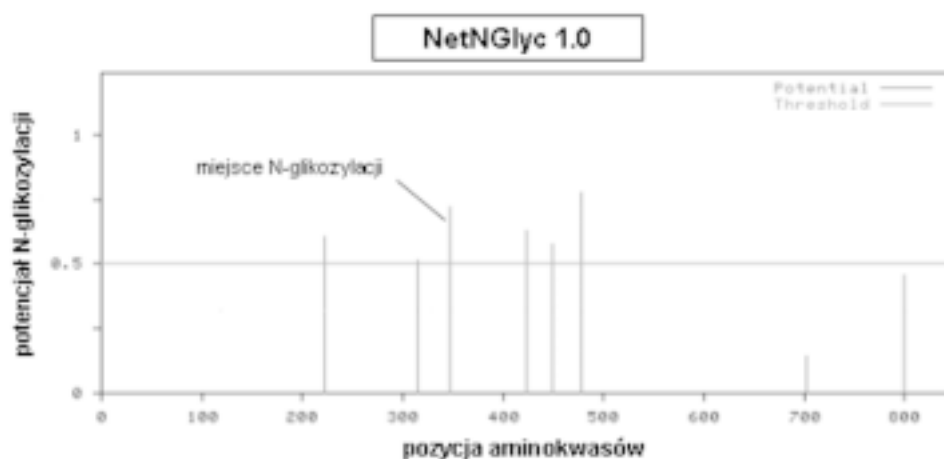
RYCINA 1. Zastosowanie programu TMHMM w celu identyfikacji domeny transbłonowej izoformy NCAM 140 kDa [NP_000606]. Domena zlokalizowana jest pomiędzy 714 a 736 aminokwasem łańcucha peptydowego (sekwencja: *IVGLIVIFVLLLVVVDITCYFL*)

wolnego końca karboksylowego kotwicę GPI. Tak zmodyfikowane białko wydostaje się w trakcie transportu pęcherzykowego na powierzchnię komórki. Sygnał określający wystąpienie tej modyfikacji zawarty jest wewnątrz sekwencji znajdującej się na styku części błonowej i pozabłonowej białka w miejscu omega, tzw. *o-side* [14]. Teoretyczne przewidywanie wystąpienia wiązania GPI umożliwia między innymi program Big-P Predictor [13]. Analiza wykonana za pomocą tego programu wykazała, że dwa z czterech badanych wariantów NCAM posiadają w swojej strukturze miejsce omega. Są to te same warianty, które według programu SecretomeP 1.0 teoretycznie mogą być wydzielane na zewnątrz komórki. W trakcie frakcjonowania tkanki mózgowej szczura wykazano, że około 75% cząsteczek wariantu NCAM o masie cząsteczkowej 120 kDa związanych było z błoną komórkową, natomiast pozostałe około 25% znajdowało się w supernatancie. Dalsze badania wykazały, że białko związane z błoną komórkową poprzez kotwicę GPI w miarę upływu czasu było systematycznie uwalniane z powierzchni komórki. Okazało się, że za to zjawisko odpowiedzialne były endogenne fosfolipazy PI-PLC, tzn. fosfatydyloinozytoloswoiste fosfolipazy C. Obecność w surowicy rozpuszczalnej formy NCAM próbowano wykorzystać jako marker diagnostyczny, między innymi dla różnicowania różnych typów paraproteinemii szpiczaka mnogiego [36].

Glikozylacja

Głównym typem modyfikacji łańcuchów bocznych NCAM jest glikozylacja. Jest to proces przyłączania do cząsteczki białka reszt cukrowych sterowany za pomocą glikozylotransferaz. Wyróżniamy dwa typy glikozylacji: *N*- i *O*-glikozylację. Różnica pomiędzy nimi polega na tym, że synteza oligosacharydów przyłączonych wiązaniem *O*-glikozylowym zachodzi na drodze kolejnego dodawania jednostek monosacharydowych do powstającego białka. Natomiast oligosacharyd przyłączany wiązaniem *N*-glikozylowym powstaje na odpowiednim nośniku lipidowym, jakim jest np. fosforan dolicholu i dopiero w tej postaci zostaje przyłączany do białka [18]. W cząsteczce

NCAM występuje sześć reszt aminokwasowych, które ulegają *N*-glikozylacji. Potwierdzono to eksperymentalnie wykorzystując techniki spektrometrii masowej oraz cienkowarstwowej chromatografii cieczowej HPLC [30]. Miejsca te są wysoce konserwatywne pomiędzy różnymi gatunkami. W pozycjach N-5 oraz N-6 dochodzi do wiązania PSA, czyli kwasu α -2,8 polisialowego. Przeprowadzone badania wykazały, że domena N-1 modyfikowana jest tylko częściowo, natomiast domeny N-5 i N-6 oprócz PSA mogą być modyfikowane także przez ważny funkcjonalnie epitop HNK-1. Epitop ten odkryto również na resztach N-2 i N-4 na bydłych oraz N-2 i N-3 na mysich cząsteczkach NCAM [1]. Wykorzystując program NetNGlyc 1.0 Server można określić obecność wszystkich glikolizowanych w ten sposób reszt asparaginy obecnej w motywie Asn-Xaa-Ser/Thr [8] (ryc. 2). Głównym substratem glikozylacji cząsteczki NCAM oraz ważnym regulatorem powierzchniowych interakcji komórkowych jest polimer kwasu α -2,8-polisialowego (PSA). Kwasy sialowe należą do grupy pochodnych *N*- i *O*-acylowych kwasu neuraminowego (NeuAc). Syntetyzowane są w aparacie Golgiego z *N*-acetyl-*D*-mannozoaminy (ManNAc), a następnie aktywowane w jądrze komórkowym do CMP-SA. Ilość kwasów sialowych w komórce może być regulowana w drodze specyficznych przemian metabolicznych. Wykazano, że PSA nadaje cząsteczce NCAM ładunek ujemny, którego wartość wzrasta wraz z ilością przyłączonych jednostek. Obecność kwasu polisialowego (poliSia) moduluje interakcje komórkowe zarówno w trakcie rozwoju, jak i onkogenezy [11]. Polisjalylacja wpływa na homofilne połączenia komórka-komórka oraz zmienia właściwości transdukcji sygnału cząsteczki NCAM [15]. Wykazano, że PSA-NCAM odgrywa główną rolę w trakcie rozwoju mózgu, regeneracji układu nerwowego, a także w procesach plastyczności mózgu obejmujących uczenie się oraz procesy pamięci. Polisjalylowany NCAM obecny jest również na powierzchni komórek różnych endokrynnych nowotworów wykazujących duży stopień złośliwości, a ich ilość koreluje ze złą prognozą w przebiegu choroby. Biosyntezę poliSia katalizują



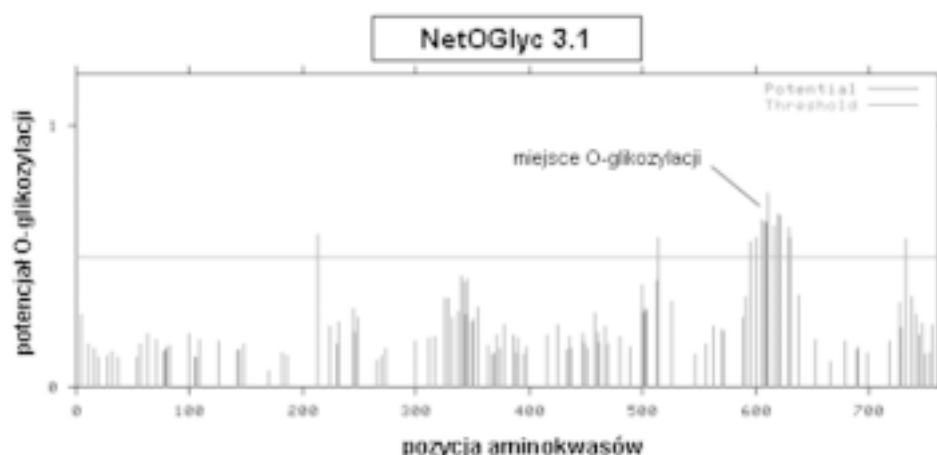
RYCINA 2. Predykcja miejsc ulegających *N*-glikozylacji w obrębie transbłonowej izoformy NCAM 140 kDa [NP_000606] przy pomocy programu NetNGlyc 1.0. Modyfikacji tej ulegają zaznaczone reszty asparaginowe obecne w motywach Asn-Xaa-Ser/Thr (pozycje aminokwasowe: 222, 315, 347, 423, 449, 478)

dwa blisko związane ze sobą enzymy, polisjalyltransferazy ST8SiaII (PST) i ST8SiaIV (STX) [22]. Obydwa enzymy należą do rodziny transferaz, która obejmuje siedem różnych enzymów wykazujących podobną aktywność. Wykazano również, że obydwie polisjalyltransferazy mogą funkcjonować równocześnie [2]. PST oraz STX oprócz zdolności polisjalylacji cząsteczki NCAM wykazują również zdolność do autopolisjalylacji [3, 4]. Proces autopolisjalylacji nie wpływa na aktywność enzymatyczną obydwu enzymów. Jednak autopolisjalowany STX zmienia cząsteczkę NCAM w większym stopniu niż STX nie podlegający autopolisjalylacji [11].

Nerwowa cząsteczka adhezyjna może także ulegać glikozylacji przebiegającej z powstaniem wiązania *O*-glikozylowego. Ten typ modyfikacji opisano w wariantcie NCAM, który w swojej strukturze wykazuje obecność eksonu MSD-1. Za pomocą wiązania *O*-glikozylowego do cząsteczki NCAM mogą być przyłączane glikany typu mucynowego oraz PSA. Wykazano, że *O*-glikany związane z MSD-1 ułatwiają łączenie mioblastów, podczas gdy polisjalylacja *N*-glikanów przyłączonych do NCAM ogranicza ten proces. Obecność PSA wraz z glikanami typu mucynowego połączonymi z cząsteczką NCAM wiązaniem *O*-glikozylowym wykazano w rakach piersi oraz w komórkach białaczkowych. *O*-glikany typu mucynowego z reguły są zgrupowane tworząc naturalną ochronę białka przed działaniem proteaz. Wykazano, że NCAM bez MSD jest relatywnie giętka, natomiast NCAM z *O*-glikozylowanym MSD jest bardziej sztywna i wykazuje zmiany konformacji, przez co ułatwia tworzenie połączeń pomiędzy komórkami [38]. W celu określenia miejsc *O*-glikozylacji można zastosować program NetOGlyc 3.1 Server [26]. Zastosowanie tego programu pozwoliło potwierdzić wcześniejsze dane zgodnie, z którymi liczne miejsca *O*-glikozylacji są skupione w obszarach występowania produktu białkowego alternatywnego eksonu MSD-1 (ryc. 3).

Fosforylacja i transdukcja sygnału

Szczególnie ważną modyfikacją potranslacyjną, która w istotny sposób determinuje funkcje biologiczne białek, jest fosforylacja. Polega ona na dostarczeniu do seryny, tyrozyny i treoniny *N*- i *O*-fosfopochodnych. Miejsce przyłączenia do łańcucha peptydowego fosforanu może stanowić receptor dla wielu kinaz białkowych, które mogą brać udział w wielu wewnątrzkomórkowych procesach sygnalizacyjnych. Wiadomo, że cząsteczki NCAM mogą ulegać fosforylacji. Wykorzystanie programu NetPhos 2.0 pozwala stwierdzić, które reszty w łańcuchach aminokwasowych poszczególnych wariantów NCAM mogą teoretycznie ulegać fosforylacji [7]. W ten sposób można wskazać zarówno reszty tyrozynowe, jak i serynowo/treoninowe. Aby dokładniej ustalić, które kinazy mogą wiązać się z badaną cząsteczką białka, można przeprowadzić analizę porównawczą, której celem jest poszukiwanie homologii pomiędzy badaną sekwencją aminokwasową a zawartymi w bazach danych motywami charakterystycznymi występującymi w obrębie innych znanych białek. Taką analizę wykonuje serwis internetowy *The Predict Protein Server* [34]. Przy pomocy tego serwisu ustalono obecność motywów homologicznych dla białkowej kinazy C (PKC), kinazy kazeinowej typu II (CK2) oraz kinazy tyrozynowej (TYR). Ostatnio przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę, która zakłada, że NCAM bierze aktywny udział w transdukcji sygnału. Cząsteczka ta może inicjować przynajmniej dwa różne szlaki przekazywania.



RYCINA 3. Predykcja miejsc ulegających *O*-glikozylacji w obrębie zakotwiczonej wiązaniem GPI w błonie komórkowej izoformy NCAM 120 kDa [P13592-2]. Modyfikacji tej ulegają reszty seryny i treoniny, ich duże zagęszczenie wyraźne jest w obrębie sekwencji kodowanej przez ekson MSD-1 (pozycje pomiędzy 595 a 630 aminokwasem)

Bezpośrednio poprzez związaną z tratwami lipidowymi w błonie komórkowej kinazę tyrozynową Fyn oraz pośrednio przy współdziałaniu receptora dla fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGFR) [19]. Ten schemat aktywacji ilustruje zdarzenia, które zachodzą w komórce od momentu aktywacji NCAM do transkrypcji lub zmian w dynamice cytoszkieletu [37]. Pobudzenie FGFR może przebiegać z jednoczesną aktywacją fosfolipazy $C\gamma$ (PLC γ) biorącej udział w wytwarzaniu diacyloglicerolu (DAG), który w wyniku działania lipazy DAG przekształca się w kwas arachidonowy (AA) aktywujący neuronowy kanał wapniowy [28]. Wykazano również możliwość aktywacji szlaku kinazy Ras-MAP, która może zachodzić z dwóch różnych kierunków. Z jednej strony w wyniku aktywacji kinazy FAK, która następnie przyłączana jest do białka adaptorowego p59fyn [9], bądź z drugiej strony w wyniku aktywacji cząsteczek adaptorowych ShcA, Frs2 oraz Grb2 [20]. Obydwa szlaki prowadzą do uruchomienia kinaz serynowych ERK, które z kolei aktywują transkrypcję genów odpowiedzialnych za procesy mitogenne oraz różnicowanie komórek. Ustalono między innymi, że fosforylacja cząsteczki NCAM w konsekwencji może prowadzić do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak GRE (*Glucocorticoid Responce Element*) oraz NF- κ B [12]. Wykazano również, że neurytogeneza zachodząca przy udziale NCAM może zachodzić w wyniku aktywacji czynników transkrypcyjnych CREB (*cAMP-Response-Element Binding Protein*) oraz c-Fos indukowanych przez cAMP/PKA [24].

Transbłonowa izoforma cząsteczki NCAM może stanowić również alternatywny receptor dla rodziny ligandów GDNF (GFL), do której należą czynniki neurotrofowe, takie jak: neurotrofiny, neurokininy oraz GDNF (*Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor*) [32]. Wykazano, że w normalnych warunkach cząsteczki GFL oddziałują ze swoistymi dla siebie receptorami GFR α 1. W przypadku ich nieobecności, ligandy GDNF mogą łączyć się z NCAM, tworząc wiązania o niskim powinowactwie. Jednak, gdy

nerwowym cząsteczkom adhezyjnym towarzyszy związany z nimi receptor $GFR\alpha 1$, wówczas GDNF wiąże się z NCAM wiązaniem o silnym powinowactwie, a następnie aktywuje znajdującą się w cytoplazmie Src-podobną kinazę Fyn oraz centralną kinazę adhezyjną FAK [37]. Taka możliwość interakcji pomiędzy sąsiadującymi z NCAM białkami obecnymi w tej samej błonie komórkowej określa ich zdolność do oddziaływań cis. Są to homo- i heterofilne interakcje występujące pomiędzy cząsteczkami zlokalizowanymi w błonie komórkowej tej samej komórki. Równocześnie cząsteczki NCAM wykazują zdolność do oddziaływań homo- i heterofilnych pomiędzy różnymi komórkami, czyli do tzw. oddziaływania trans [12]. Dzięki tym interakcjom możliwa jest adhezja, która zachodzi pomiędzy komórkami poprzez wiązania homofilne formowane pomiędzy zewnątrzkomórkowymi domenami Ig-podobnymi. Wykorzystując badania krystalograficzne, NMR oraz mikroskopię elektronową wykazano, że najsilniejsze wiązania homofilne występują pomiędzy pierwszą domeną Ig jednej cząsteczki NCAM i 5 domeną Ig drugiej cząsteczki. Wykazano również biologiczne znaczenie wiązania pomiędzy pierwszą Ig jednej i trzecią Ig drugiej. Nie określono jednak, jak dotąd, znaczenia wiązania występującego pomiędzy pierwszą Ig jednej i drugą Ig drugiej. Najprawdopodobniej wiązanie tego typu tworzy początkowy uchwyt na relatywnie dużej odległości pomiędzy błonami komórkowymi. Te wszystkie rodzaje wiązań pozwalają komórkom regulować wzajemne ułożenie w przestrzeni [25].

STRUKTURA I-, II- I III-RZĘDOWA BIAŁKA

Ze względu na strukturę trzeciorzędową, białka NCAM zalicza się do białek klasy II. Do tej klasy należą białka, w których dominują struktury tzw. β -harmonijkowe, najczęściej w postaci łańcuchów przeciwbieżnych. Trwałość tej strukturze nadają mostki dwusiarczkowe. Wiązania te należą do grupy wiązań kowalencyjnych, czyli najsilniejszych między resztami aminokwasów. Powstają one w wyniku odwodornienia grup $-SH$ pomiędzy cysteinami zawartymi w domenach immunoglobulinopodobnych. Takich mostków dwusiarczkowych w cząsteczce NCAM jest pięć, po jednym w każdej domenie Ig. Kształt pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej struktury badanego białka można określić przy pomocy programów zawartych np. w serwisie ExPASy. Są to między innymi ProtParam, program określający parametry fizyko-chemiczne sekwencji białkowej (budowę aminokwasową i atomową, punkt izoelektryczny pI , itd.) [16], The Predict Protein Server [34], bądź interaktywny serwer analizy struktury białka iMolTalk. Dostępne są również narzędzia umożliwiające modelowanie molekularne i wizualizację struktury trójwymiarowej białka, najpopularniejszymi są Swiss-PdbViewer [17] oraz Cn3D 4.1 [10].

INNE RODZAJE MODYFIKACJI

Serwis The Predict Protein Server obok możliwych miejsc homologicznych dla wybranych kinaz wskazał również obecność innych homologii. W obrębie drugiej domeny fibronektynowej zlokalizowano motyw A, czyli miejsce wiązania ATP/GTP, tzw. pętlę

P. Obecność tej sekwencji wskazuje na potencjalną możliwość wiązania i hydrolizy przez NCAM zewnątrzkomórkowego ATP, którą skojarzono z plastycznością synaptyczną zależną od adhezji stymulowanej przez NCAM [27]. Dyskusyjne pozostaje znaczenie tego motywu w trakcie różnych oddziaływań cis cząsteczki NCAM. W obrębie tej struktury wykazano również obecność domen homologicznych z rodziną fosfofruktokinaz (PFK) zależnych od ATP, czyli enzymów katalizujących transfer grup fosforylowych z ATP. Jednym z enzymów wykorzystujących tę reakcję jest fosfofruktokinaza, która katalizuje fosforylację fruktozo-6-fosforanu do fruktozo-1,6-bifosforanu, kluczowej reakcji regulacyjnej w szlaku glikolitycznym. Serwer Predict Protein wskazuje również, na teoretyczną możliwość występowania modyfikacji zachodzącej z przyłączeniem do cząsteczki NCAM innego lipidu, jakim jest mirystynian. Mirystylacja pozwala na zakotwiczenie białka jego końcem N w błonie komórkowej od strony cytozolu. Dodatkowo wskazano na możliwość występowania na końcu karboksylowym białka miejsca wiążącego mikrociałka (peroksosomy), czyli niewielkie organelle komórkowe zawierające enzymy z grupy oksydoreduktaz. Ten typ modyfikacji może świadczyć o ewentualnym uczestnictwie cząsteczki NCAM w rearanżacji cytoszkieletu w trakcie przemian metabolicznych zachodzących w komórce.

KORZYŚCI Z ZASTOSOWANIA NARZĘDZI BIOINFORMATYCZNYCH

Zastosowanie dostępnych w internecie narzędzi bioinformatycznych umożliwiających szczegółowe przewidywanie właściwości fizycznych, chemicznych i biochemicznych makrocząsteczek w znacznym stopniu przybliża badaczy do lepszego poznania struktury i biologii organizmów żywych. Możliwość wykorzystania konkretnych i sprawdzonych informacji dostępnych w bazach danych pozwala na bardziej szczegółowe zaplanowanie eksperymentów naukowych. Takie nowoczesne podejście umożliwia znacznie precyzyjniej określić nieznaną dotąd funkcję poszczególnych molekuł. Nie bez znaczenia pozostaje również fakt, że dzięki tym narzędziom będzie można znacznie dokładniej i szybciej określić działanie biologiczne i ewentualne skutki niepożądane naturalnych i syntetycznych biopreparatów, coraz częściej stosowanych w terapii, zarówno u ludzi jak i zwierząt.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALBACH C, DAMOC E, DENZINGER T, SCHACHNER M, PRZYBYLSKI M, SCHMITZ B. Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2004; **378**: 1129–1135.
- [2] ANGATA K, FUKUDA M. Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie* 2003; **85**: 195–206.
- [3] ANGATA K, SUZUKI M, FUKUDA M. ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 36808–36817.

- [4] ANGATA K, SUZUKI M, MCAULIFFE J, DING Y, HINDSGAUL O, FUKUDA M. Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha 2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J Biol Chem* 2000; **275**: 18594–18601.
- [5] BENDTSEN JD, JENSEN LJ, BLOM N, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 2004; **17**: 349–356.
- [6] BENDTSEN JD, NIELSEN H, VON HEIJNE G, BRUNAK S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; **340**: 783–795.
- [7] BLOM N, GAMMELTOFT S, BRUNAK S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; **294**: 1351–1362.
- [8] BLOM N, SICHERITZ-PONTEN T, GUPTA R, GAMMELTOFT S, BRUNAK S. Prediction of post translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004; **4**: 1633–1649.
- [9] BODRIKOV V, LESHCHYNS'KA I, SYTNYK V, OVERVOORDE J, DEN HERTOOG J, SCHACHNER M. RPTPalph is essential for NCAM-mediated p59fyn activation and neurite elongation. *J Cell Biol* 2005; **168**: 127–139.
- [10] CHEN J, ANDERSON JB, DEWEESE-SCOTT C, FEDOROVA ND, GEER LY, HE S, HURWITZ DI, JACKSON JD, JACOBS AR, LANCZYCKI CJ, LIEBERT CA, LIU C, MADEJ T, MARCHLER-BAUER A, MARCHLER GH, MAZUMDER R, NIKOLSKAYA AN, RAO BS, PANCHENKO AR, SHOEMAKER BA, SIMONYAN V, SONG JS, THIESSEN PA, VASUDEVAN S, WANG Y, YAMASHITA RA, YIN JJ, BRYANT SH. MMDB: Entrez's 3D-structure database. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 474–477
- [11] CLOSE BE, WILKINSON JM, BOHRER TJ, GOODWIN CP, BROOM LJ, COLLEY KJ. The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* 2001; **11**: 997–1008.
- [12] CROSSIN KL, KRUSHEL LA. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 2000; **218**: 260–279.
- [13] EISENHABER B, BORK P, EISENHABER F. Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. *Protein Eng*. 2001; **14**: 17–25.
- [14] EISENHABER F, EISENHABER B, KUBINA W, MAURER-STROH S, NEUBERGER G, SCHNEIDER G, WILDPANER M. Prediction of lipid posttranslational modifications and localization signals from protein sequences: big-Pi, NMT and PTS1. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 3631–3634.
- [15] GALLAGHER HC, MURPHY KJ, FOLEY AG, REGAN CM. Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J Neurochem* 2001; **77**: 425–434.
- [16] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, DUVAUD S, WILKINS MR, APPEL RD, BAIROCH A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. W: John M. Walker (red.) The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press 2005: 571–607.
- [17] GUEX N, PEITSCH MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997; **18**: 2714–2723.
- [18] HAMES BD, IHOOPER NM. Glikozylacja białek. W: Krótkie wykłady: Biochemia wyd. II, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004: 271–277.
- [19] HINSBY AM, BEREZIN V, BOCK E. Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci* 2004; **9**: 2227–2244.
- [20] HINSBY AM, LUNDFALD L, DITLEVSEN DK, KORSHUNOVA I, JUHL L, MEAKIN SO, BEREZIN V, BOCK E. ShcA regulates neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecule but not by fibroblast growth factor 2: evidence for a distinct fibroblast growth factor receptor response to neural cell adhesion molecule activation. *J Neurochem* 2004; **91**: 694–703.
- [21] HOFMANN K, STOFFEL W. TMbase – A database of membrane spanning proteins segments *Biol Chem. Hoppe-Seyler* 1993; **374**: 166.
- [22] HORSTKORTE R, MUHLENHOFF M, REUTTER W, NOHRING S, ZIMMERMANN-KORDMANN M, GERARDY-SCHAHN R. Selective inhibition of polysialyltransferase ST8SiaII by unnatural sialic acids. *Exp Cell Res* 2004; **298**: 268–274.
- [23] HUERTA S, SRIVATSAN ES, VENKATESAN N, PETERS J, MOATAMED F, RENNER S, LIVINGSTON EH. Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. *Surgery* 2001; **130**: 834–843.
- [24] JESSEN U, NOVITSKAYA V, PEDERSEN N, SERUP P, BEREZIN V, BOCK E. The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritogenesis in PC12 E2 cells. *J Neurochem* 2001; **79**: 1149–1160.

- [25] JOHNSON CP, FUJIMOTO I, PERRIN-TRICAUD C, RUTISHAUSER U, LECKBAND D. Mechanism of homophilic adhesion by the neural cell adhesion molecule: use of multiple domains and flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 6963–6968.
- [26] JULENIUS K, MOLGAARD A, GUPTA R, BRUNAK S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 2005; **15**: 153–164.
- [27] KISELYOV VV, SKLADCHIKOVA G, HINSBY AM, JENSEN PH, KULAHIN N, SOROKA V, PEDERSEN N, TSETLIN V, POULSEN FM, BEREZIN V, BOCK E. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure (Camb)*. 2003; **11**: 691–701.
- [28] KOLKOVA K, NOVITSKAYA V, PEDERSEN N, BEREZIN V, BOCK E. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 2000; **20**: 2238–2246.
- [29] KYTE J, DOOLITTLE RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; **157**: 105–132.
- [30] LIEDTKE S, GEYER H, WUHRER M, GEYER R, FRANK G, GERARDY-SCHAHN R, ZAHNINGER U, SCHACHNER M. Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* 2001; **11**: 373–384. Erratum w: *Glycobiology* 2001; **11**: 30G–31G.
- [31] ONG E, SUZUKI M, BELOT F, YEH JC, FRANCESCINI I, ANGATA K, HINDSGAUL O, FUKUDA M. Biosynthesis of HNK-1 glycans on O-linked oligosaccharides attached to the neural cell adhesion molecule (NCAM): the requirement for core 2 beta 1,6-N acetylglucosaminyltransferase and the muscle-specific domain in NCAM. *J Biol Chem* 2002; **277**: 18182–18190.
- [32] PARATCHA G, LEDDA F, IBANEZ CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 2003; **113**: 867–879.
- [33] PERSSON B, ARGOS P. Prediction of membrane protein topology utilizing multiple sequence alignments. *J Protein Chem* 1997; **16**: 453–457.
- [34] ROST B, YACHDAV G, LIU J. The PredictProtein Server. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: W321–326.
- [35] ROUGON G, HOBERT O. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu Rev Neurosci* 2003; **26**: 207–238.
- [36] SAHARA N, TAKESHITA A. Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens. *Leuk Lymphoma* 2004; **45**: 61–65.
- [37] SARIOLA H, SAARMA M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003; **116**: 3855–3862.
- [38] SUZUKI M, ANGATA K, NAKAYAMA J, FUKUDA M. Polysialic acid and mucin type o glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *J Biol Chem* 2003; **278**: 49459–49468.
- [39] TUSNADY GE, SIMON I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 2001; **17**: 849–850.
- [40] VAWTER MP, FRYE MA, HEMPERLY JJ, VANDERPUTTEN DM, USEN N, DOHERTY P, SAFFELL JL, ISSA F, POST RM, WYATT RJ, FREED WJ. Elevated concentration of N-CAM VASE isoforms in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2000; **34**: 25–34.
- [41] VAWTER MP. Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 2000; **405**: 385–395.
- [42] ŻEROMSKI J, JENEK R, NIEMIR Z, LIEBERT W. CD56 (N-CAM) antigen and mRNA expression in human endocrine glands. W: *Progress in Basic and Clinical Immunology* [red.] Mackiewicz A, Kurpisz M, Żeromski *J Adv Exp Med Biol* v. 495, Kluwer Acad Publ NY 2001; 336–339.
- [43] ŻEROMSKI J, NYCZAK E, DYSZKIEWICZ W. Significance of cell adhesion molecules, CD56/NCAM in particular, in human tumor growth and spreading. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; **39** Suppl 2: 36–37.
- [44] ŻEROMSKI J. Miejsce i rola molekuly CD56/NCAM w biologii i medycynie. *Post Biol Kom* 2000; **4**: 599–608.
- [45] ŻEROMSKI J, SZCZEPAŃSKI M, MOZER-LISEWSKA I. Obecność antygenu CD56/NCAM w układzie nerwowym, odpornościowym i gruczołach dokrewnych – przypadkowa zbieżność? *Endokrynol Pol* 2005; **1**: 78–82.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 05.08.2005 r.

Przyjęto: 20.11.2005 r.

ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

E.mail: markacz@amp.edu.pl

