

Załącznik nr 3

Autoreferat

1. Dane osobowe

1.1. Imię i nazwisko

Agata Iga Świątkowska

1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2008 **Doktor nauk chemicznych w zakresie biochemii**

Tytuł rozprawy doktorskiej: Zastosowanie rybozomu delta i rybonukleazy Dicer do ukierunkowanej degradacji cząsteczek RNA o silnie uporządkowanej strukturze przestrzennej.
Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

2002 **Magister biologii, specjalizacja biotechnologia**

Tytuł pracy magisterskiej: Analiza strukturalna regionów niekodujących wirusa zapalenia wątroby typu C.
Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2015 - obecnie **Adiunkt**

Zakład Biochemii RNA
Kierownik: Prof. Jerzy Ciesiołka
Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, Poznań

01-06. 2015 **Staż podoktorski**

Grupa Dr. Claudio Alonso
School of Life Science
Uniwersytet Sussex, Brighton, Wielka Brytania

2012 - 2014 **Adiunkt**

Zakład Biochemii RNA
Kierownik: Prof. Jerzy Ciesiołka
Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, Poznań

2008 - 2012 **Staż podoktorski**

Grupa Prof. David Tollervey
Institute of Cell Biology, Wellcome Trust Centre for Cell Biology
Uniwersytet Edynburski, Szkocja, Wielka Brytania

2002 - 2008 **Asystent**

Pracownia Biochemii RNA

Kierownik: Prof. Jerzy Ciesiołka

Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, Poznań

3. Omówienie osiągnięcia naukowego, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Określenie roli regionu terminalnego 5' mRNA p53 w ekspresji genu TP53

3.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Prace te powstały w latach 2013-2020 i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, specjalizujących się w tematyce biochemii i biologii molekularnej.

1. Świątkowska A*, Dutkiewicz M, Machtel P, Janecki DM, Kabacinska M, Zydowicz-Machtel P, Ciesiołka J*

Regulation of the p53 expression profile by hnRNP K under stress conditions.

RNA Biol. **2020**, May 29;1-14. doi: 10.1080/15476286.2020.1771944

IF₂₀₁₉ **5,350**; punkty ministerialne **100**; cytowania **0**

2. Świątkowska A*, Dutkiewicz M, Zydowicz-Machtel P, Szpotkowska J, Janecki D.M, Ciesiołka J*.

Translational control in p53 expression: the role of 5'-terminal region of p53 mRNA.

Intl J Mol Sci. **2019**, Oct 29;20(21). pii: E5382. doi: 10.3390/ijms20215382.

Praca przeglądowa

IF₂₀₁₉ **4,556**; punkty ministerialne **100**; cytowania **0**

3. Szpotkowska J, Świątkowska A, Ciesiołka J*.

Length and secondary structure of the 5' non-coding regions of mouse p53 mRNA transcripts - mouse as a model organism for p53 gene expression studies.

RNA Biol. **2019**, Jan 16(1);25-41. doi: 10.1080/15476286.2018.1556084.

IF₂₀₁₉ **5,350**; punkty ministerialne **100**; cytowania **1**

4. Zydowicz-Machtel P[^], Świątkowska A[^], Popenda Ł, Gorska A, Ciesiołka J*.

Variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA influence the ribosomal scanning and translation efficiency.

Sci Rep. **2018**, Jan 24;8(1):1533. doi: 10.1038/s41598-018-20010-2.

IF₂₀₁₈ **4,011**; punkty ministerialne **40[#]**; cytowania **3**

5. Świątkowska A*, Zydowicz P, Sroka J, Ciesiołka J*.

The role of the 5' terminal region of p53 mRNA in the p53 gene expression.

Acta Biochim Pol. **2016**; 63(4):645-651.

Praca przeglądowa

IF₂₀₁₆ **1,169**; punkty ministerialne **15[#]**; cytowania **6**

6. Świątkowska A, Zydowicz P, Gorska A, Suchacka J, Dutkiewicz M, Ciesiołka J*.

The Role of Structural Elements of the 5'-Terminal Region of p53 mRNA in Translation under Stress Conditions Assayed by the Antisense Oligonucleotide Approach.

PLoS One. **2015**, Oct 29;10(10):e0141676. doi: 10.1371/journal.pone.0141676.

IF₂₀₁₅ **3,057**; punkty ministerialne **40[#]**; cytowania **2**

7. Gorska A, Świątkowska A, Dutkiewicz M, Ciesiolka J*.

Modulation of p53 expression using antisense oligonucleotides complementary to the 5'-terminal region of p53 mRNA in vitro and in the living cells.

PLoS One. **2013**, Nov 11;8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0078863.

IF₂₀₁₃ **3,534**; punkty ministerialne **40[#]**; cytowania **8**

* - autor korespondencyjny, ^ - równorzędny pierwszy autor

- punkty ministerialne wg dawnego systemu punktacji, zgodnie z rokiem opublikowania artykułu

Sumaryczny Impact Factor (IF) przedstawionego cyklu publikacji: **27,027** (zgodnie z rokiem opublikowania).

Sumaryczna liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection (bez autocytowań): **20**

Kopie powyższych publikacji umieszczono w załączniku nr 7.

Oświadczenia dotyczące mojego wkładu, autorów głównych i autorów korespondencyjnych w powstanie poszczególnych publikacji znajdują się w załączniku nr 5, część A.

3.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

3.3.1. Wprowadzenie i zaprezentowanie celu naukowego

Moje zainteresowania strukturą cząsteczek RNA i ich funkcją w komórce zrodziło się w toku studiów biologicznych na Uniwersytecie im Adama Mickiewicza w Poznaniu. Zainteresowanie przerodziło się w pasję naukową, która znalazła swoje odbicie w badaniach, prowadzonych w ramach pracy magisterskiej, a następnie pracy doktorskiej, pod kierunkiem Prof. Jerzego Ciesiołki w Pracowni Biochemii RNA (obecnie Zakład Biochemii RNA) Instytutu Chemii Bioorganicznej, PAN, w Poznaniu. Dalsze badania dotyczące powiązania struktury i funkcji RNA realizowałam na stażu podoktorskim w pracowni Prof. Davida Tollervey'a na Uniwersytecie Edynburskim w Szkocji. W trakcie mojego trzyletniego pobytu skupiałam się na analizie zmian strukturalnych w rybosomalnym RNA w procesie jego dojrzewania i składania rybosomu. Po powrocie ze stażu, rozpoczęłam kolejny etap mojej drogi naukowej w Zakładzie Biochemii RNA, ICHB PAN.

Od kilku lat jestem zaangażowana w badania dotyczące struktury mRNA p53, w szczególności jego regionu terminalnego 5', w kontekście funkcji i wpływu na ekspresję białka p53 pełnej długości i jego izoformy, $\Delta 40p53$. W ramach prowadzonych badań związanych z tą tematyką byłam kierownikiem projektu finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, jak również wykonawcą dwóch grantów OPUS finansowanych z Narodowego Centrum Nauki. Uzyskane wyniki, dotyczące struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53 i

jego roli w ekspresji białka p53, zostały przedstawione w publikacjach, które stanowią moje główne osiągnięcie naukowe.

Moim głównym celem naukowym było określenie jaką funkcję pełni struktura regionu terminalnego 5' mRNA p53 w ekspresji genu *TP53*, w szczególności na etapie procesu syntezy białka p53 i jego izoformy, $\Delta 40p53$. W pracach **Gorska A, Swiatkowska A, et al. PloS One, 2013** i **Swiatkowska A, et al. PloS One, 2015**, wykorzystując strategię opartą na oligonukleotydach antysensowych, wykazałam, które elementy strukturalne regionu końcowego 5' mRNA p53 są istotne dla efektywnej syntezy białka p53 i jego izoformy $\Delta 40p53$ w warunkach *in vitro* oraz w komórce w obecności czynników stresowych.

W dalszych etapach swoich badań skupiłam się na zbadaniu zależności pomiędzy strukturą wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53, a efektywnością i szybkością procesu inicjacji translacji. Efektem tych działań była praca współautorska **Zydowicz-Machtel P, Swiatkowska A, et al. Sci Rep., 2018**. Natomiast, w publikacji **Szpotkowska J, Swiatkowska A, et al., RNA Biol. 2019**, przedstawiona została charakterystyka struktury regionu końcowego 5' mRNA p53 u myszy i jej porównanie do modelu ludzkiego.

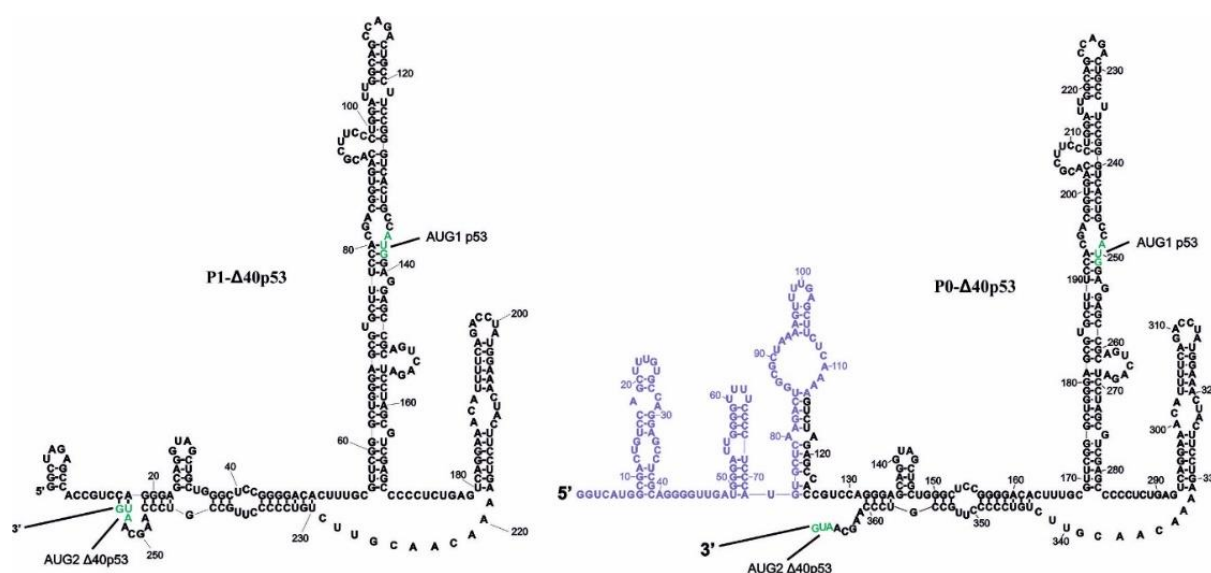
W ostatnich latach moje badania naukowe poszerzyłam o identyfikację białek, które oddziałując z regionem terminalnym 5' mRNA p53 wpływają na ekspresję genu *TP53*. Wykazałam, że białko hnRNP K ma zdolność przyłączania się do tego regionu wpływając na syntezę białka p53 w warunkach stresowych. Wykazałam również, że hnRNP K oddziałuje z regionem promotora genu *TP53*, regulując transkrypcję mRNA p53. Wyniki zostały przedstawione w pracy **Swiatkowska A, et al., RNA Biol. 2020**.

Problematyka dotycząca roli regionu terminalnego 5' mRNA p53 w ekspresji genu *TP53* oraz najnowsze doniesienia naukowe zostały przeze mnie również omówione w dwóch pracach przeglądowych: **Swiatkowska A, et al., Intl J Mol Sci., 2019** oraz **Swiatkowska A, et al., Acta Biochim Pol., 2016**.

3.3.2. Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA p53

Białko p53 określane jako „strażnik genomu” stanowi obiekt badawczy w szeregu laboratoriach od ponad pół wieku. Ogromne zainteresowanie tym białkiem wynika z obserwacji, że ponad połowa ludzkich nowotworów jest skorelowana z obecnością mutacji w genie *TP53*. Białko p53 jako czynnik transkrypcyjny aktywuje geny odpowiedzialne za odpowiedź komórki na czynniki stresowe prowadząc do naprawy DNA i przywrócenia homeostazy w komórce, zatrzymania cyklu komórkowego lub apoptozy. W warunkach normalnych białko p53 jest utrzymywane na niskim poziomie, gdyż ulega ono degradacji przy udziale białka HDM2 (1). Obecność czynnika stresowego powoduje aktywację białka p53, a następnie szlaków odpowiedzi komórkowej zależnych od tego białka. Oprócz p53 o pełnej długości w komórce zaobserwowano również szereg izoform tego białka, skrócone z N- lub C-końca bądź z obydwu końców jednocześnie (2). Jedną z głównych izoform jest $\Delta 40p53$, skrócona o 40 aminokwasów z N-końca, której synteza zaczyna się od drugiego kodonu AUG2. Izoforma ta, podobnie jak p53 o pełnej długości, działa jako czynnik transkrypcyjny aktywując geny w odpowiedzi na warunki stresowe. Co ciekawe, $\Delta 40p53$ aktywuje również inne geny niż p53 oraz może oddziaływać z białkiem p53 zmniejszając jego pulę w komórce, a tym samym modulując odpowiedź komórkową na stres.

Ostatnie lata badań pokazały, że ekspresja genu *TP53* jest kontrolowana na wielu poziomach: transkrypcji, obróbki po-transkrypcyjnej oraz translacji (3). Te obserwacje wraz z coraz licześniejszymi doniesieniami dotyczącymi roli RNA, w szczególności jego regionów terminalnych, w regulacji ekspresji genów dały początek badaniom struktury i funkcji regionu końcowego 5' mRNA p53 w Zakładzie Biochemii RNA, ICHB PAN, kierowanym przez Prof. Jerzego Ciesiołkę. Pierwsze lata badań zaowocowały zaproponowaniem modelu struktury II-rzędowej regionu terminalnego mRNA p53, P1- Δ 40p53 (Rysunek 1) (4).



Rysunek 1: Model struktury II-rzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53. Wariant P1- Δ 40p53 odpowiadający regionowi końcowemu mRNA p53, który rozpoczyna się od promotora P1 oraz wariant RNA P0- Δ 40p53 rozpoczynający się od regionu odpowiadającego sekwencji między promotorami transkrypcyjnymi, P0-P1. Kolorem zielonym zaznaczono kodony inicjacyjne AUG1 dla p53 i AUG2 dla Δ 40p53. Kolorem niebieskim zaznaczono region P0-P1 (wg Błaszczuk & Ciesiołka, *Biochemistry* 2011 (4) i Gorska *et al.* *RNA Biol.* 2013 (5), zmodyfikowano).

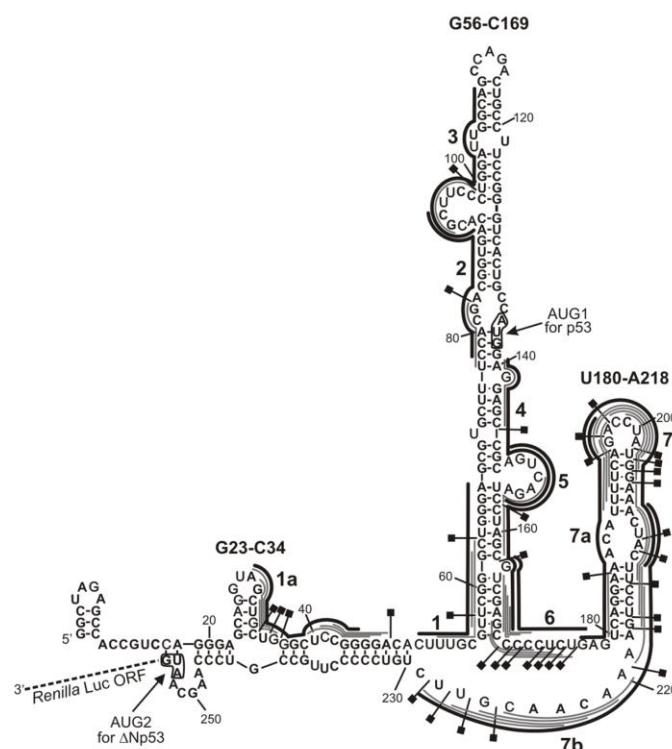
Wykazano, że początek regionu kodującego jest zaangażowany w prawidłowe zwinięcie terminalnego fragmentu 5' mRNA p53. Zaangażowanie części kodującej powoduje, że tworzy się stabilna termodynamicznie struktura typu spinki G56-C169 (Rysunek 1). W jej obrębie wyróżnić można jednonukleotydowe oraz wielonukleotydowe wybrzuszenia ulokowane po obydwu stronach trzonu spinki. W obrębie spinki G56-C169 umiejscowiony jest kodon inicjacyjny AUG1 dla białka p53 o pełnej długości. Otoczenie kodonu inicjacyjnego jest mniej ustrukturalizowane. Drugim charakterystycznym elementem strukturalnym regionu końcowego 5' mRNA p53 jest spinka U180-A218, która jest rozpoznawana przez białko HDM2 (6) (Rysunek 1).

Co istotne, zostało wykazane, że obydwie struktury typu spinki G56-C169 i U180-A218 są zachowane w dłuższych cząsteczkach mRNA p53, a także w mRNA p53 o pełnej długości (4). Wykazano również, że są zachowane w wariantach P0- Δ 40p53 odpowiadających końcowemu regionowi 5' mRNA p53, rozpoczynającemu się od promotora P0 (Rysunek 1). Region między-promotorowy, P0-P1, jest niezależny strukturalnie i nie wpływa na zwinięcie fragmentu RNA znajdującego się poniżej (5).

3.3.3. Rola elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie syntezy białka p53 o pełnej długości i jego izoformy, $\Delta 40p53$

Zaproponowany model struktury II-rzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 rozbudził moją naukową wyobraźnię i postanowiłam zbadać jaki wpływ ma struktura tego regionu na proces syntezy białka p53 jego izoformy $\Delta 40p53$. Badania prowadziłam w ramach projektu własnego, Homing Plus, pt. “*Expression of p53 protein and its N-truncated form, $\Delta Np53$ – towards better understanding the mechanism of p53 IRES-mediated translation process*” finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.

W pracy **Gorska A, Swiatkowska A, et al. PloS One, 2013**, wykorzystana została strategia oparta na oligonukleotydach antysensowych w celu określenia, które elementy struktury regionu końcowego 5' mRNA p53 są istotne dla procesu inicjacji translacji mRNA p53. W pierwszym etapie badań przeprowadzona została analiza dostępności tego regionu do hybrydyzacji komplementarnych oligomerów do tego regionu z zastosowaniem biblioteki kombinatorycznej 6-merów DNA i aktywności RNazy H w warunkach *in vitro* (Rysunek 2). Takie podejście eksperymentalne umożliwiło nam określenie, które fragmenty regionu terminalnego 5' mRNA p53 są potencjalnie dostępne do przyłączenia oligonukleotydów antysensowych (Rysunek 2). Na tej podstawie zaprojektowaliśmy zestaw oligomerów (Rysunek 2: 1-7, 1a, 7a, 7b), których wpływ na translację został przetestowany w lizacie z retikulocytów królika w warunkach *in vitro*, a następnie w linii komórkowej MCF-7.



Rysunek 2: Mapowanie dostępności do hybrydyzacji 6-merów DNA do regionu terminalnego 5' mRNA p53. Szara linia wskazuje najbardziej prawdopodobne miejsca przyłączenia oligomerów DNA. Linia czarna z kwadratem wskazuje cięcie RNazą H. Linia czarna wskazuje zaplanowane miejsca przyłączenia oligonukleotydów DNA ponumerowanych odpowiednio: 1-7, 1a oraz 7a-b (wg Gorska *et al.* PloS One, 2013 (7)).

Analiza w warunkach *in vitro* wykazała silne obniżenie translacji z kodonu AUG1 dla p53 i kodonu AUG2 dla $\Delta 40p53$ w obecności oligomeru nr 1 komplementarnego do podstawy dużej spinki G56-C169 (Figura 2). Co było zaskakujące, zaobserwowaliśmy, że obecność

oligomeru nr 7 powoduje spadek translacji z kodonu AUG1 przy równoczesnym wzroście efektywności translacji z kodonu AUG2. W celu pełniejszego zrozumienia obserwowanego efektu zaproponowałam przetestowanie wybranych oligomerów (nr 1 i 7b) z wprowadzoną grupą 2'-*O*-metylową w celu uniemożliwienia rozpoznania dupletu RNA-DNA przez RNazę H, której znikome ilości były obserwowane w lizacie z retikulocytów królika (8). Okazało się, że oligomer nr 7b, w wersji metylowanej, powodował inny efekt niż oligonukleotyd niemodyfikowany. Obserwowany był jedynie niewielki spadek ilości białka syntetyzowanego z kodonu AUG1. W ten sposób wykazaliśmy, że efekty związane z zastosowaniem oligomerów antysensowych w lizacie z retikulocytów królika mogą wynikać z działania mechanizmu zależnego bądź niezależnego od RNazy H. Jest to bardzo istotna obserwacja ponieważ lizaty komórkowe są powszechnie wykorzystywane w pierwszym etapie analizy efektywności działania oligomerów typu antysens, a także w badaniach mechanizmu przebiegu procesu translacji.

Wyniki otrzymane w warunkach *in vitro* wykazały, że w obrębie regionu końcowego 5' mRNA p53 spinka G56-C169, w szczególności jej dolna część, jak również fragment U180-U230, obejmujący małą spinkę oraz przyległy fragment jednoniciowy, są wrażliwe na przyłączenie oligomerów DNA.

Kolejnym krokiem było zastosowanie wybranych oligomerów (nr 1 i 7b) w komórkach MCF-7. Obok oligomerów metylowanych wykorzystałam oligomery typu gapmer LNA/PS, z modyfikacją typu LNA (ang. *Locked Nucleic Acid*) na końcach 3' i 5' i wiązaniami fosforotiłowymi (PS) w celu zwiększenia ich stabilności w komórce z jednoczesnym zachowaniem zdolności aktywowania RNazy H. Oba metylowane oligonukleotydy nr 1 i 7b osłabiały translację mRNA p53 w krótkim czasie. Dwadzieścia cztery godziny od podania oligomeru nr 7b zaobserwowaliśmy znaczący spadek poziomu białka p53 o ponad 50%. Była to bardzo interesująca obserwacja, gdyż w warunkach *in vitro* oligomer ten powodował jedynie bardzo nieznaczne obniżenie translacji z kodonu AUG1. Obydwa oligomery w wersji LNA/PS silnie obniżały translację z kodonu AUG1 dla białka p53. Tak znaczący spadek poziomu białka p53 był spowodowany obniżeniem poziomu mRNA p53 w wyniku indukcji aktywności RNazy H, co potwierdzone zostało techniką RT-PCR.

Analiza *in vitro* i w układzie komórkowym wykazała, że duża spinka G56-C169 oraz region 208-228 obejmujący ramię małej spinki i przyległy fragment jednoniciowy są wrażliwe na przyłączenie oligomerów typu antysens. To wskazuje na istotną rolę tych elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie translacji. W obrębie spinki G56-C169 znajduje się kodon inicjacyjny, AUG1 dla białka p53. Przypuszczalnie, przyłączenie oligomeru nr 1 powodowało zaburzenie procesu inicjacji translacji. Natomiast, przyłączenie oligonukleotydu nr 7b mogło zakłócić oddziaływanie spinki U180-A218 z białkami, których obecność jest ważna dla efektywności działania maszynerii translacyjnej. Już wcześniej wykazano, że spinka U180-A218 jest rozpoznawana m.in. przez białko HDM2 (6). Oligomer nr 7b przyłącza się też w dużej części do regionu jednoniciowego A219-U228. Nasze badania jako pierwsze pokazały, że ten fragment jest istotnym elementem regionu końcowego 5' mRNA p53 zaangażowanym w proces translacji, jako prawdopodobne miejsce oddziaływania w czynnikami białkowymi.

Wykorzystanie oligonukleotydów typu antysens pozwoliło mi również zaproponować potencjalne wsparcie dla terapii przeciwnowotworowej. Już wcześniej próbowano zastosować

oligomery DNA do czasowego obniżenia poziomu białka p53 w komórkach raka płuc, NSCLC, w celu zwiększenia apoptozy komórek poddanych radioterapii (9). Przetestowany przeze mnie oligomer nr 7b wersji LNA/PS gamer w stężeniu 150 nM, podobnym jak zastosowane wcześniej oligomery w komórkach NSCLC, powodował około 40% obniżenie poziomu białka p53 w 10 godzin od podania. Wyniki te mogą stanowić podwaliny do dalszych badań z wykorzystaniem oligomerów antysensowych ukierunkowanych na region terminalny 5' mRNA p53 w celu kontrolowanej inhibicji ekspresji białka p53, jako wsparcia dla określonych terapii przeciw rozwoju nowotworu.

Zastosowanie strategii opartej na oligomerach typu antysens w celu określenia, które elementy struktury regionu końcowego 5' mRNA p53 są istotne w procesie translacji, okazało się słuszną ścieżką badawczą. Postanowiłam wykorzystać to podejście eksperymentalne, aby dokładniej zbadać, jak struktura fragmentu terminalnego 5' mRNA p53 determinuje efektywność syntezy białka p53 i izoformy $\Delta 40p53$ w warunkach stresu komórkowego. Wyniki dotyczące tej problematyki zostały zaprezentowane w pracy **Swiatkowska A, et al. PloS One, 2015**.

Pierwszym krokiem było zbadanie jak przyłączenie się wybranych, wcześniej testowanych oligomerów (Rysunek 2) wpływa na strukturę docelowej cząsteczki RNA. Analiza strukturalna, w obecności określonego oligomeru, z zastosowaniem metody cięcia RNA jonami Pb^{2+} wykazała, że oligonukleotydy: 7, 7a oraz 7b przyłączają się do zaplanowanego miejsca oraz wpływają na zmianę struktury regionu przyległego do miejsca oddziaływania. Dodatkowo, w obecności oligomeru nr 7 i 7a spinka U180-A218 ulega częściowemu rozpleceniu. Mniejszy efekt na otoczenie miejsca wiązania był obserwowany dla oligomeru nr 1.

W kolejnym kroku zastosowałam oligomery w wersji metylowanej w trzech liniach komórkowych: HT-29, MCF-7 i HepG2 w różnych warunkach stresowych. Zastosowanie oligomerów z grupami 2'-O-metylowymi miało na celu uniknięcia indukcji RNazy H, aby obserwować efekt przyłączenia oligomerów do RNA jedynie na poziomie translacji. W linii komórkowej HT-29 żaden z zastosowanych oligomerów nie wpływał na poziom białka p53. Wynikało to prawdopodobnie z silnej nadekspresji tego białka będącej konsekwencją obecności punktowej mutacji w genie *TP53* w pozycji 273. Co ciekawe, wszystkie oligonukleotydy powodowały obniżenie syntezy izoformy $\Delta 40p53$ z kodonu AUG2 w stresie oksydacyjnym generowanym przez podanie nadtlenu wodoru do linii komórkowych. Silny efekt inhibicji, na poziomie około 50%, był obserwowany w obecności oligomerów nr 7, 7a i 7b, komplementarnych do regionu U180-U228. Również pozostałe oligomery wpływały negatywnie na syntezę z drugiego kodonu inicjacyjnego, AUG2.

Uzyskane przeze mnie wyniki pokazują, że cała nienaruszona struktura regionu terminalnego 5' mRNA p53 jest istotna dla optymalnej produkcji izoformy $\Delta 40p53$ w komórkach HT-29 w warunkach stresu. Już wcześniej zaobserwowano, że translacja z kodonu AUG2 przebiega niezależnie od obecności struktury kapu na końcu 5' mRNA (ang. 5' *cap*) (10). Zaproponowany został mechanizm inicjacji translacji mRNA p53 zależnej od IRES (ang. *Internal Ribosome Entry Site*), który wymaga odpowiedniego ustrukturalizowania regionu terminalnego 5' mRNA w celu prawidłowego umiejscowienia rybosomu w pobliżu kodonu inicjacyjnego.

Następnie, oligomery antysensowe zostały przetestowane w komórkach MCF-7 w warunkach stresu oksydacyjnego. W obecności oligonukleotydów komplementarnych do spinki U180-A218 i fragmentu A219-U228 (Rysunek 2) zaobserwowałam silne obniżenie poziomu białka p53 o pełnej długości. Natomiast pozostałe oligomery nie wpływały na poziom syntezy białka p53. Ponieważ region U180-U228 okazał się szczególnie wrażliwy na przyłączenie oligomerów postanowiłam sprawdzić, czy podobny efekt będzie obserwowany w innych warunkach stresowych. W obecności etoposydu, który wywołuje stres genotoksyczny, wszystkie trzy zastosowane oligomery powodowały obniżenie poziomu białka p53. Przyłączenie oligomeru nr 7b w sposób najbardziej efektywny działało inhibująco na translację mRNA p53. Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że nienaruszona struktura spinki U180-A218 oraz region przyległy A219-U228 w formie jednoniciowej są warunkiem efektywnej syntezy białka p53 w warunkach stresu w komórkach MCF-7.

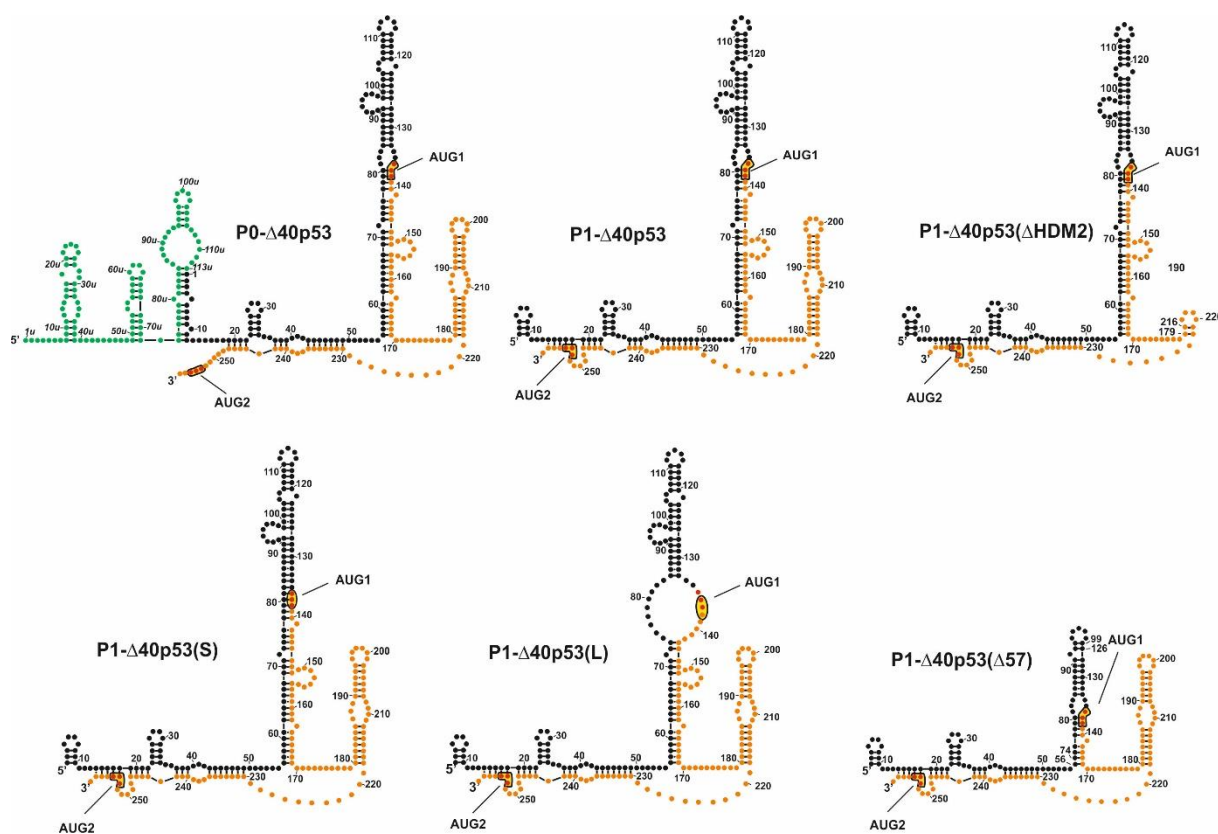
W kolejnym etapie badań postanowiłam zbadać efekt oligomerów antysensowych w komórkach HepG2. Żaden z testowanych oligomerów nie wpływał znacząco na syntezę białka p53 i izoformę $\Delta 40p53$ w stresie oksydacyjnym. Jedynie oligomer nr 7b komplementarny do regionu A219-U228 (Rysunek 2) obniżał syntezę obydwu białek o około 10-20%. Co ciekawe, w obecności etoposydu nie obserwowałam obniżenia poziomu białka p53 przy zastosowaniu oligomerów nr 7, 7a i 7b przyłączających się do regionu U180-U228 (Rysunek 2). Natomiast, oligomery nr 7 i 7a wpływały stymulująco na syntezę izoformy $\Delta 40p53$, czyli przeciwnie jak działały na p53 pełnej długości w komórkach MCF-7. W tym miejscu warto podkreślić, że oligomery nr 7 i 7a powodowały lokalną rearanżację struktury tego regionu poprzez częściowe rozplecenie spinki U180-A218. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że efektywna synteza białka p53 i izoformy $\Delta 40p53$ wymaga reorganizacji strukturalnej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w zależności od rodzaju komórek i zastosowanego czynnika stresowego. Dodatkowo, nie można wykluczyć, że odmienne czynniki białkowe oddziałują z elementami strukturalnymi takimi jak spinka U180-A218 czy region jednoniciowy A219-U228 w zastosowanych liniach komórkowych MCF-7 i HepG2.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że poszczególne elementy strukturalne regionu terminalnego 5' mRNA p53, w szczególności spinka U180-A218 i region przyległy A219-U228 są istotne dla procesu syntezy białka p53 i izoformy $\Delta 40p53$ w warunkach normalnych i stresu komórkowego. Nienaruszona struktura regionu terminalnego 5' mRNA p53 wydaje się być warunkiem koniecznym dla efektywnej translacji zależnej od elementu IRES. Warto podkreślić, że po raz pierwszy zostało eksperymentalnie pokazane, że region A219-U228 stanowi istotny element odpowiedzialny za wydajną translację z kodonu AUG1 i AUG2. Zaproponowałam, że spinka U180-A218 i przyległy region jednoniciowy A219-U228 mogą stanowić platformę dla czynników białkowych działających w układzie *cis* stymulując translację, w szczególności w warunkach stresu. Dodatkowo, obserwowane przez mnie odmienne efekty działania oligomerów antysensowych w różnych liniach komórkowych pozwoliły mi na wnioskowanie, że strukturalne ukształtowanie regionu końcowego 5' mRNA p53 prawdopodobnie ulega rearanżacji w zależności od typu komórki i rodzaju stresu, jaki na nią działa.

3.3.4. Wpływ wariantów strukturalnych regionu końcowego 5' mRNA p53 na proces skanowania i efektywność inicjacji translacji z kodonu AUG1 i AUG2

Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że struktura regionu końcowego 5' mRNA p53 jest bardzo istotna dla wydajnej translacji z kodonów AUG1 i AUG2 dla p53 i izoformy $\Delta 40p53$. Postanowiłam więc zbadać jak zmiany w obrębie struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53 wpływają na efektywność i czas translacji. Wyniki dotyczące tej problematyki zostały przedstawione w pracy współautorskiej **Zydowicz-Machtel P, Swiatkowska A, et al. Sci Rep., 2018**.

Pierwszym etapem badań było przygotowanie serii konstruktów RNA, które reprezentowały różne warianty strukturalne regionu terminalnego 5' mRNA p53 i posiadały taką samą część kodującą dla białka reporterowego lucyferazy *Renilla* (Rysunek 3). Następnie, skupiliśmy się na analizie wpływu struktury regionu końcowego 5' mRNA p53 na całkowity czas translacji (zamiennie używane: czas skanowania mRNA przez rybosom). W tym celu zastosowano metodę translacji *in vitro* w połączeniu z pomiarem rzeczywistej aktywności genu reporterowego lucyferazy *Renilla* (11). Zastosowanie takiego podejścia umożliwiło określenie całkowitego czasu translacji dla poszczególnych konstruktów RNA. Ponieważ wszystkie konstrukty posiadały tę samą sekwencję kodującą białko, różnice w całkowitym czasie translacji wynikały z odmiennej struktury regionów terminalnych 5' RNA.



Rysunek 3. Warianty strukturalne regionu terminalnego 5' mRNA p53. Kolor zielony - region międzypromotorowy P0-P1; kolor pomarańczowy - część kodująca zaczynająca się od kodonu AUG1 (wg Zydowicz-Machtel *et al. Sci Rep., 2018* (12), zmodyfikowano).

Analiza przebiegu translacji w lizacie z retikulocytów królika *in vitro* pokazała, że obecność regionu między-promotorowego P0-P1 prowadzi do osłabienia syntezy białka z kodonu AUG1 (Rysunek 3 - P0- Δ 40p53). Również, usunięcie małej spinki U180-A218 ma negatywny wpływ na efektywność translacji, natomiast skrócenie dużej spinki G56-C169 prowadzi do zwiększenia syntezy z obydwu kodonów (Rysunek 3 - P1- Δ 40p53(Δ HDM2) i P1- Δ 40p53(Δ 57) odpowiednio). Bardzo ciekawe wyniki uzyskaliśmy dla konstruktów RNA, które miały zmienioną strukturę regionu otaczającego kodon inicjacyjny (Rysunek 3 – P1- Δ 40p53(S) i P1- Δ 40p53(L)). Okazało się, że umiejscowienie kodonu AUG1 w dwuniciowym regionie bardzo obniżało efektywność translacji z tego kodonu, oraz dodatkowo z kodonu AUG2. Natomiast, prawie dwukrotne zwiększenie wydajności syntezy z AUG1 obserwowaliśmy gdy kodon inicjacyjny dla białka p53 był zlokalizowany w regionie jednoniciowym dużej pętli wewnętrznej (Rysunek 3 - P1- Δ 40p53(L)).

Dalsza analiza wykazała, że obecność dodatkowego odcinka między-promotorowego P0-P1 powoduje wydłużenie czasu skanowania mRNA przez rybosom porównując konstrukty P1- Δ 40p53 i P0- Δ 40p53. Porównując natomiast warianty strukturalne o tej samej długości, a różnej strukturze otaczającej kodon inicjacyjny AUG1 zaobserwowaliśmy, że kontekst strukturalny ma bardzo istotne znaczenie dla całkowitego czasu translacji. Ulokowanie kodonu inicjacyjnego w regionie dwuniciowym wydłużyło całkowity czas translacji w porównaniu do czasu obserwowanego dla konstruktu P1- Δ 40p53. To może wskazywać na utrudnienie wiązania się rybosomu i rozpoznania miejsca inicjacji translacji. Natomiast, umiejscowienie kodonu AUG1 w regionie jednoniciowym dużej pętli prowadziło do skrócenia całkowitego czasu translacji i zwiększenia efektywności translacji, co manifestowało się zwiększeniem maksymalnej aktywności luminescencji. Skrócenie dużej spinki w konstrukcie RNA P1- Δ 40p53(Δ 57) spowodowało wydłużenie całkowitego czasu skanowania przy jednoczesnym, ponad dwukrotnym, zwiększeniu efektywności translacji. Natomiast, usunięcie małej spinki w konstrukcie P1- Δ 40p53(Δ HDM2) spowodowało wydłużenie całkowitego czasu translacji o prawie 2 minuty, w porównaniu do czasu dla konstruktu P1- Δ 40p53. To wskazuje na istotną rolę małej spinki w procesie inicjacji translacji.

Dodatkowo wykazaliśmy, że szybkość skanowania jest różna dla określonych wariantach regionu końcowego 5' mRNA p53 zależnie od sposobu zwinięcia się RNA w obrębie odcinka między-promotorowego (Rysunek 3).

Następnie, postanowiliśmy sprawdzić jak skrócenie/usunięcie charakterystycznych elementów struktury II-rzędowej tj. spinki G56-C169 i spinki U180-A218 wpłynie na mechanizm inicjacji translacji. W tym celu wykonana została translacja *in vitro*, dla obydwu konstruktów P1- Δ 40p53(Δ HDM2) i P1- Δ 40p53(Δ 57), w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m⁷GpppG. Analogi kapu oddziałując z białkami zaangażowanymi w rozpoznanie końca 5' mRNA obniżają ich pulę w komórce powodując zahamowanie translacji zależnej od struktury kap. Okazało się, że obecność analogu kapu powodowała zahamowanie translacji z obydwu kodonów AUG1 i AUG2 w przypadku obydwu wariantów strukturalnych. Ponieważ postuluje się translację zależną od IRES dla drugiego kodonu inicjacyjnego, dla izoformy Δ 40p53, oznacza to, że zachowanie obydwu motywów strukturalnych jest niezbędne, aby translacja przebiegała wg tego mechanizmu.

Uzyskane wyniki potwierdzają moje wcześniejsze obserwacje dotyczące roli elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w ekspresji białka p53 i

izoformy $\Delta 40p53$. Zarówno podejście z wykorzystaniem oligomerów antysensowych jak i analiza całkowitego czasu translacji w układzie *in vitro* dla poszczególnych wariantów regionu końcowego 5' mRNA p53 pokazują, że struktura tego regionu odpowiada za efektywność i szybkość translacji. Obecność elementów strukturalnych wpływała również na mechanizm wg którego przebiega proces inicjacji translacji, w szczególności dla kodonu AUG2 dla izoformy $\Delta 40p53$.

3.3.5. Struktura regionu końcowego 5' mRNA p53 u myszy i jej porównanie z modelem ludzkim

Model myszy jest bardzo często wykorzystywany do badań dotyczących ekspresji ludzkiego białka p53. Jednak, niewiele jest informacji dotyczących mysiego mRNA p53. Postanowiliśmy określić miejsca startu transkrypcji mysiego mRNA p53 jak również scharakteryzować strukturę regionu terminalnego 5' mRNA p53 u myszy i porównać z modelem zaproponowanym dla tego regionu w ludzkim mRNA p53.

W pierwszym etapie, wykorzystując technikę szybkiej amplifikacji końca 5' (ang. *5' Rapid Amplification of cDNA Ends, 5', 5'RACE*), określiliśmy miejsca startu transkrypcji mysiego mRNA. Nasza analiza, wraz z zestawieniem danych z baz danych wykazała, że transkrypty z regionem niekodującym 5' o długości 122 nukleotydów (nazwane: mRNA-122) są najliczniej reprezentowane. Dodatkowo, analiza 5'RACE pozwoliła nam na wyłonienie transkryptów o regionie niekodującym o długości 247 nukleotydów (nazwane: mRNA-247). Co ciekawe, porównując sekwencję mysiego i ludzkiego regionu końcowego 5' mRNA p53 zaobserwowaliśmy, że miejsce startu mysiego transkryptu mRNA-122 różni się zaledwie o jeden nukleotyd w porównaniu do miejsca P1 ludzkiego mRNA p53 pomimo różnicy w długości regionów niekodujących. Sugeruje to podobieństwo pomiędzy ekspresją ludzką i mysiej formy p53. Natomiast, miejsce startu transkrypcji dla mRNA-247 różni się od P0 mRNA p53 o 21 nukleotydów, ale nadal cechuje się wysokim podobieństwem sekwencyjnym.

Następnie, na podstawie mapowania struktury z zastosowaniem metody SHAPE (ang. *Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension*) i mapowania chemicznego oraz przewidywania komputerowego zaproponowaliśmy model struktury II-rzędowej dla obydwu regionów niekodujących w obrębie mysich mRNA-122 i mRNA-247. W obydwu regionach obserwujemy obecność kilku motywów strukturalnych typu spinki. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku regionu niekodującego 5' ludzkiego mRNA p53 kodon AUG1 jest ulokowany w częściowo dwuniciowym regionie dużej spinki. Co ciekawe, u myszy region odpowiadający spinie U180-A218 w obrębie regionu końcowego 5' ludzkiego mRNA p53 może związać się w dwie mniejsze spinki lub w jedną większą. Możliwość rearanżacji struktury wskazuje na potencjalną regulatorową funkcję tego regionu. W ludzkim mRNA region ten oddziałuje z białkiem HDM2.

Dalsza analiza pokazała, że ludzki i myszy transkrypt mRNA-122 podlegają translacji z podobną efektywnością w wyniku czego powstaje białko p53 i izoforma $\Delta 41p53$ (odpowiednik ludzkiej izoformy $\Delta 40p53$). Interesujące wyniki przyniosła analiza translacji *in vitro* w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu. W przypadku mysiego transkryptu mRNA-122 obserwowaliśmy, że z obydwu kodonów AUG1 i AUG2 translacja przebiega wg mechanizmu zależnego od struktury kapu. Natomiast, dla transkryptu z dłuższym regionem niekodującym 5', mRNA-247, translacja zarówno dla pierwszego jak i drugiego kodonu

inicjacyjnego miała charakter kap niezależny. Zaobserwowaliśmy wyższą ekspresję mRNA-247 w takich tkankach jak mózg, serce czy rdzeń kręgowy, czyli cechujących się małą zdolnością regeneracji i namnażania u dorosłego osobnika. Wydaje się, że obecność mRNA-247 w tych tkankach pozwala na produkcję p53 w warunkach stresu kiedy kap-zależna translacja jest osłabiona lub wyłączona. Takie „zabezpieczenie” dla tkanek, które nie mają potencjału, aby łatwo się regenerować, może być bardzo istotne kiedy potrzebna jest szybka odpowiedź na niekorzystne warunki środowiska. Dalsze badania w tym kierunku są jednak potrzebne do pełniejszego zrozumienia procesu ekspresji mysiego p53 w określonych tkankach.

Analiza poziomu p53 w mysich fibroblastach pokazała, że w warunkach stresu genotoksycznego, generowanego przez doksorubicynę, zwiększa się ilość białka p53 bez zmian w poziomie p53 mRNA. To wskazuje na potencjalną regulację ekspresji genu *Trp53* na poziomie translacji, w której może być zaangażowany region niekodujący 5' mRNA p53 podobnie jak w przypadku ludzkiego odpowiednika. Nasze badania pokazały szereg podobieństw, ale i różnic w ekspresji mysiego i ludzkiego p53. Wiedza ta umożliwi lepsze zrozumienie regulacji ekspresji p53 w kontekście zastosowania myszy jako modelu badawczego.

3.3.6. Oddziaływania regionu terminalnego 5' mRNA p53 z białkami i ich wpływ na ekspresję genu *TP53*

Otrzymane przeze mnie wyniki wyraźnie pokazują jak istotną rolę odgrywa struktura II-rzędowa regionu końcowego 5' mRNA p53 w procesie translacji. Obecność określonych elementów strukturalnych jest wymagana dla efektywnej syntezy zarówno p53 jak i $\Delta 40p53$, prawdopodobnie stanowiąc platformę dla określonych czynników białkowych. Co było zaskakujące, pomimo tak szeroko zakrojonych badań dotyczących ekspresji genu *TP53*, jak dotąd scharakteryzowano tylko kilka białek, które oddziałując z regionu terminalnym 5' mRNA p53 wpływają na translację z kodonu AUG1 i/lub AUG2. Te obserwacje skłoniły mnie do dalszych badań w kierunku znalezienia czynników białkowych, które przyłączając się do regionu terminalnego 5' mRNA p53 mogłyby wpływać na wydajność i charakter procesu translacji. Ta problematyka została przedstawiona w pracy **Świątkowska A, et al. RNA Biol., 2020.**

W celu znalezienia nowych białek potencjalnie modulujących ekspresję p53 zastosowałam podejście eksperymentalne oparte na chromatografii powinowactwa do RNA wraz z identyfikacją białek techniką spektrometrii mas. Do badań zostały wybrane dwie cząsteczki RNA odpowiadające regionom terminalnym 5' mRNA p53: P0- $\Delta 40p53$ i P1- $\Delta 40p53$. Do chromatografii wykorzystywałam lizaty z trzech linii komórkowych: MCF-7, HepG2 i HT-29, które były hodowane w warunkach normalnych i stresu genotoksycznego generowanego przez podanie doksorubicyny. Analiza spektrometrii mas wykazała, że około 25% zidentyfikowanych białek to białka związane z procesem translacji np.: białka rybosomalne, czynniki inicjacji i elongacji translacji, tRNA syntetazy. Niewielką grupę, około 1-3%, stanowiły białka, już wcześniej opisane w literaturze jako oddziałujące z regionem terminalnym 5' mRNA p53, takie jak: PTB, hnRNP C1/C2 czy p53 (13). Najbardziej liczna była grupa białek określona przeze mnie jako „potencjalni kandydaci”. Do tej grupy zaliczyłam m.in. białka, które oddziałują z kwasami nukleinowymi, heterogenne jądrowe rybonukleoproteiny (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*, hnRNP), ATPazy,

czynniki transkrypcyjne i splicingowe. Wśród nich wyłoniłam 20 najlepszych kandydatów reprezentowanych przez najwyższą liczbę widm MS. Okazało się, że białko, które było w ścisłej czołówce to heterogenna jądrowa rybonukleoproteina K (hnRNP K). Białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym, ale również, jak pokazały ostatnie doniesienia, działa na etapie translacji regulując ekspresję niektórych genów (14). Dodatkowo, ostatnio wykazano, że hnRNP K współdziała z p53 aktywując geny odpowiedzi komórkowej na stres (15). Postanowiłam zbadać, czy hnRNP K ma również wpływ na ekspresję genu *TP53*.

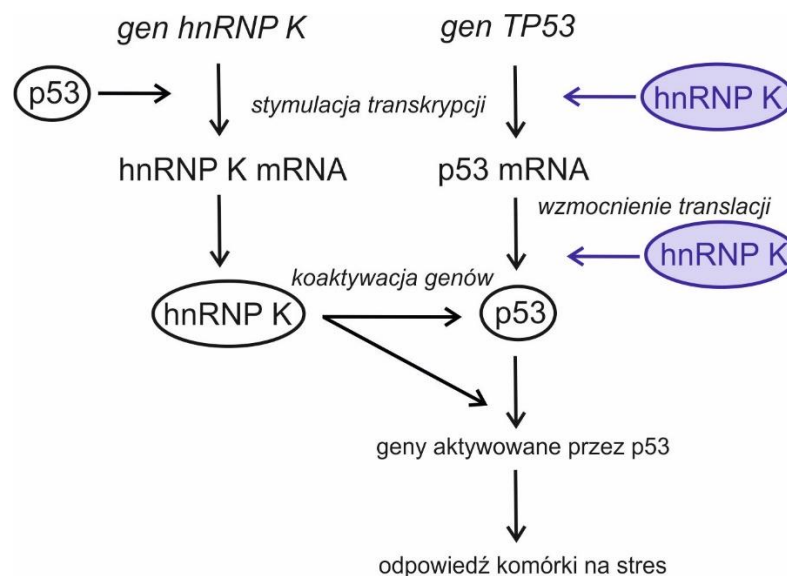
W pierwszym etapie badań potwierdziłam, że białko hnRNP K wiąże się bezpośrednio do regionu terminalnego 5' mRNA p53 wykorzystując technikę retardacji kompleksu RNA-białko w żelu w warunkach natywnych (ang. *Electrophoresis Mobility Shift Assays*, EMSA). Następnie, wykazałam, że obniżenie poziomu białka hnRNP K, za pomocą siRNA, prowadziło do obniżenia poziomu białka p53 zarówno w warunkach normalnych jak i stresowych w komórkach MCF-7. Warunki stresu genotoksycznego i jądrowego generowane były za pomocą odpowiednio doksorubicyny i aktynomycyny D. Natomiast, stres retikulum endoplasmatycznego był indukowany poprzez podanie tunikamycyny lub tapsigarginy. Zaobserwowałam, że zwiększona ekspresja hnRNP K, poprzez wprowadzenie plasmidu kodującego hnRNP K, prowadziła do zwiększonego poziomu białka p53 w komórkach MCF-7 i HepG2. Postanowiłam także sprawdzić, czy hnRNP K wpływa na ekspresję p53 na poziomie transkrypcji ponieważ wiadomo, że białko to jest czynnikiem transkrypcyjnym. Analiza ilościowa qRT-PCR wykazała, że obniżenie poziomu hnRNP K powoduje dwukrotne obniżenie poziomu mRNA p53 w warunkach bezstresowych jak i stresu komórkowego w komórkach MCF-7. Natomiast, nadekspresja hnRNP K powodowała dwukrotne podwyższenie poziomu mRNA p53 w warunkach stresu genotoksycznego w komórkach MCF-7.

Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, że hnRNP K reguluje ekspresję genu *TP53* na poziomie transkrypcji w warunkach normalnych oraz stresowych. Analiza miejsc potencjalnego przyłączenia się hnRNP K w obrębie regionu promotorowego genu *TP53* wykazała obecność sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez to białko w pobliżu miejsca startu P0 i P1 oraz w regionie pomiędzy kodonami AUG1 i AUG2.

Dalsza analiza wpływu hnRNP K na ekspresję p53 pokazała, że w warunkach stresu retikulum endoplasmatycznego indukowanego tapsigarginą lub tunikamycyną nadekspersja hnRNP K prowadziła do wzrostu ilości białka p53, nie wpływając na poziom mRNA p53 w komórkach HepG2. Podobnie, w obecności tapsigarginy, w komórkach MCF-7 przy nadekspresji hnRNP K nie obserwowałam zmian w poziomie mRNA p53 tylko wzrost ilości białka p53. Otrzymane przez mnie wyniki wskazują, że w warunkach stresu retikulum endoplasmatycznego hnRNP K może wpływać na ekspresję genu *TP53* na poziomie translacji stymulując syntezę białka p53.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowałam rozbudowany model oddziaływań pomiędzy p53 i hnRNP K (Rysunek 4). Już wcześniej wykazano, że p53 stymuluje hnRNP K na poziomie transkrypcji (16), a obydwie białka działają jako partnerzy aktywując geny odpowiedzi komórkowej na stres (15). Moje badania pokazują, że p53 i hnRNP K nie tylko współdziałają razem, ale również wpływają wzajemnie na swoją ekspresję na poziomie transkrypcji (Rysunek 4). Dodatkowo, hnRNP K może stymulować syntezę p53 poprzez oddziaływanie z regionem terminalnego 5' mRNA p53 w określonych warunkach

komórkowych. Bezpośrednia, wzajemna regulacja p53 i hnRNP K pozwala mi wnioskować o istotnej roli jaką pełnią te białka w odpowiedzi komórki na warunki stresowe.



Rysunek 4: Sieć interakcji pomiędzy p53 i hnRNP K. HnRNP K i p53 stymulują się nawzajem na etapie transkrypcji. Obydwa białka aktywują geny odpowiedzi komórkowej na stres (15, 16). Dodatkowo hnRNP K wpływa na syntezę p53 w określonych warunkach komórkowych. Nowe oddziaływania proponowane na podstawie wyników własnych zaznaczono na niebiesko (wg Świątkowska *et al.* RNA Biol. 2020, (17) zmodyfikowano).

Problematykę dotyczącą roli regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie regulacji ekspresji genu *TP53* oraz oddziaływanie tego regionu z czynnikami białkowymi przedstawiłam również w dwóch pracach przeglądowych: **Świątkowska A, *et al.*, *Intl J Mol Sci.* 2019** i **Świątkowska A, *et al.*, *Acta Biochim Pol.* 2016.**

3.3.6. Literatura uzupełniająca

1. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018;25(1):104-13.
2. Khoury MP, Bourdon JC. p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer.* 2011;2(4):453-65.
3. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):199-210.
4. Blaszczyk L, Ciesiolka J. Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry.* 2011;50(33):7080-92.
5. Gorska A, Blaszczyk L, Dutkiewicz M, Ciesiolka J. Length variants of the 5' untranslated region of p53 mRNA and their impact on the efficiency of translation initiation of p53 and its N-truncated isoform DeltaNp53. *RNA Biol.* 2013;10(11):1726-40.
6. Candeias MM, Malbert-Colas L, Powell DJ, Daskalogianni C, Maslon MM, Naski N, et al. P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol.* 2008;10(9):1098-105.
7. Gorska A, Świątkowska A, Dutkiewicz M, Ciesiolka J. Modulation of p53 expression using antisense oligonucleotides complementary to the 5'-terminal region of p53 mRNA in vitro and in the living cells. *PLoS One.* 2013;8(11):e78863.
8. Cazenave C, Frank P, Busen W. Characterization of ribonuclease H activities present in two cell-free protein synthesizing systems, the wheat germ extract and the rabbit reticulocyte lysate. *Biochimie.* 1993;75(1-2):113-22.

9. Sak A, Wurm R, Elo B, Grehl S, Pottgen C, Stuben G, et al. Increased radiation-induced apoptosis and altered cell cycle progression of human lung cancer cell lines by antisense oligodeoxynucleotides targeting p53 and p21(WAF1/CIP1). *Cancer Gene Ther.* 2003;10(12):926-34.
10. Candeias MM, Powell DJ, Roubalova E, Apcher S, Bourougaa K, Vojtesek B, et al. Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene.* 2006;25(52):6936-47.
11. Vassilenko KS, Alekhina OM, Dmitriev SE, Shatsky IN, Spirin AS. Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(13):5555-67.
12. Zydowicz-Machtel P, Swiatkowska A, Popenda L, Gorska A, Ciesiolka J. Variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA influence the ribosomal scanning and translation efficiency. *Sci Rep.* 2018;8(1):1533.
13. Haronikova L, Olivares-Illana V, Wang L, Karakostis K, Chen S, Fahraeus R. The p53 mRNA: an integral part of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(7):3257-71.
14. Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J. hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays.* 2004;26(6):629-38.
15. Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, Jackson SP. hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell.* 2005;123(6):1065-78.
16. Rahman-Roblick R, Roblick UJ, Hellman U, Conrotto P, Liu T, Becker S, et al. p53 targets identified by protein expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(13):5401-6.
17. Swiatkowska A, Dutkiewicz M, Machtel P, Janecki DM, Kabacinska M, Zydowicz-Machtel P, et al. Regulation of the p53 expression profile by hnRNP K under stress conditions. *RNA Biol.* 2020;17(10):1402-15.

3.3.7. Podsumowanie głównego osiągnięcia naukowego

- Wykazałam, że spinka U180-A218 i fragment jednoniciowy A219-U228 stanowią istotne elementy struktury II-rzędowej regionu końcowego 5' mRNA p53 dla translacji z kodonu AUG1 i AUG2, szczególnie w warunkach stresu komórkowego, co wskazuje na ich regulacyjną funkcję. Wykazałam również, że te elementy strukturalne mogą stanowić miejsce ataku dla narzędzi oligonukleotydowych w celu kontrolowanego modulowania ekspresji p53 jako potencjalne wsparcie dla terapii przeciwnowotworowych.
- Udowodniłam, że struktura II-rzędowa jest odpowiedzialna za czas i szybkość skanowania przez rybosom regionu terminalnego 5' mRNA p53. Zademonstrowałam także, że efektywność i całkowity czas translacji białka p53 ściśle zależy od otoczenia strukturalnego kodonu inicjacyjnego AUG1.
- Porównałam strukturę regionu końcowego 5' w mysim i ludzkim transkrypcie p53. Wykazałam podobieństwa, ale także różnice pomiędzy ekspresją mysiego i ludzkiego genu *Trp53/TP53*. Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w kontekście badań nad ludzkim białkiem p53 z zastosowaniem modelu mysiego.
- Zaproponowałam rozbudowany model wzajemnych relacji pomiędzy białkami p53 i hnRNP K. Wykazałam, że białko hnRNP K może regulować ekspresję *TP53* na poziomie transkrypcji oraz w określonych warunkach komórkowych, oddziałując z regionem terminalnym 5' mRNA p53, na poziomie translacji. Poznanie roli hnRNP K w kontekście

regulacji ekspresji genu *TP53* może pomóc w dalszych badaniach dotyczących odpowiedzi komórki na stres zależnej od białka p53.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

4.1. Wykaz publikacji nie wchodzących w skład głównego osiągnięcia naukowego

1. Dutkiewicz M, Stachowiak A, **Swiatkowska A**, Ciesiołka J.

Structure and function of RNA elements present in enteroviral genomes.

Acta Biochim Pol. **2016**, 63(4):623-630.

Praca przeglądowa.

IF₂₀₁₆ **1,169**; punkty ministerialne **15**; cytowania **5**

2. Dutkiewicz M, Ojdowska A, Gorska A, **Swiatkowska A**, Ciesiołka J.

The structural and phylogenetic profile of the 3' terminus of coxsackievirus B3 negative strand.

Virus Res. **2014**, Mar 24. doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.020.

IF₂₀₁₄ **2,324**; punkty ministerialne **25**; cytowania **1**

3. **Swiatkowska A**, Wlotzka W, Tuck A, Barrass J. D, Beggs J. D and Tollervey D.

Kinetic analysis of pre-ribosome structure *in vivo*.

RNA **2012**, Dec;18(12):2187-200. doi: 10.1261/rna.034751.112.

IF₂₀₁₂ **5,088**; punkty ministerialne **35**; cytowania **17**

4. Lebaron S, Schneider C, Nues R. W, **Swiatkowska A**, Granneman S, Watkins N.J., Tollervey D.

Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits.

Nat Struct Mol Biol. **2012**, 19, 744-753.

IF₂₀₁₂ **11,092**; punkty ministerialne **45**; cytowania **111**

5. Granneman S, Petfalski E, **Swiatkowska A**, Tollervey D.

Cracking pre-40S ribosomal subunit structure by systematic analyses of RNA-protein cross-linking.

EMBO J. **2010** Jun 16, 29(12), 2026-36.

IF₂₀₁₀ **10,124**; punkty ministerialne **32**; cytowania **98**

6. Dutkiewicz M, **Swiatkowska A**, Figlerowicz M and Ciesiołka J.

Structural domains of the 3'-terminal sequence of the HCV replicative strand.

Biochemistry, **2008**, nr 47, 12197-12207.

IF₂₀₀₈ **3,379**; punkty ministerialne **20**; cytowania **11**

Punkty ministerialne wg dawnego systemu punktacji, zgodnie z rokiem opublikowania artykułu.

Sumaryczny Impact Factor (IF) przedstawionego cyklu publikacji: **33,176** (zgodnie z rokiem opublikowania)

Sumaryczna liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection (bez autocytoowań): **243**

Oświadczenia dotyczące mojego wkładu w powstanie wymienionych wyżej publikacji znajdują się w załączniku nr 5, część B.

4.2. Rola struktury rRNA w jego dojrzewaniu i składaniu rybosomu

W trakcie mojego stażu podoktorskiego w grupie prof. David'a Tollervey'a na Uniwersytecie Edynburskim byłam zaangażowana w badania dotyczące dojrzewania rRNA i składania rybosomu u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Realizacja tej tematyki umożliwiła mi rozwijanie moich naukowych zainteresowań dotyczących roli struktury RNA jak również poszerzenie znajomości najnowszych technik badania RNA.

W pracy **Swiatkowska A, et al., RNA 2012** zaproponowałam metodę opartą na metabolicznym znakowaniu nowo-powstałych cząsteczek RNA z analizą struktury *in vivo*. Takie podejście umożliwiło mi śledzenie rearanżacji strukturalnych rRNA w procesie jego dojrzewania. Wykazałam, że koniec 3' 18S pre-rRNA jest nieustrukturalizowany podczas biogenezy małej podjednostki rybosomu 40S. Wykazałam również, że struktura regionu pomiędzy helisami 22 i 44 w pre-18S rRNA odzwierciedla oddziaływanie z końcem 3' U3 snoRNA, które były wcześniej postulowane. Dodatkowo, przeprowadzona przeze mnie analiza pozwoliła na zaobserwowanie dynamicznych zmian w obrębie regionu H18 rRNA związanych ze stopniowym przyłączeniem się białek rybosomalnych w czasie procesu dojrzewania rRNA.

W pracy Granneman S, Petfalski E, **Swiatkowska A, et al., EMBO 2010** byłam zaangażowana w charakterystykę miejsc oddziaływania białek z rybosomalnym RNA małej podjednostki 40S. Analizując strukturę niedojrzałego rRNA w kompleksie z białkami wykazałam, że miejsce cięcia D w pre-18S rRNA jest w niewielkim stopniu ustrukturalizowane. Wykazałam również, że endonukleaza Nob1, która jest odpowiedzialna za cięcie w miejscu D nie jest związana z regionem otaczającym. Ta obserwacja pozwoliła mi wnioskować, że dopiero rearanżacja strukturalna lub zmiana kompozycji białek oddziałujących z przyległą domeną H45 umożliwiają ułożenie Nob1 w odpowiedniej pozycji, aby doszło do cięcia i uwolnienia dojrzałego 18S rRNA.

Problematyka związana z dojrzewaniem podjednostki rybosomalnej 40S i rolą białka eIF5b/Fun12 w tym procesie została podjęta w pracy **Lebaron S, et al., Nat Struct Mol Biol., 2012**. W trakcie realizacji tego tematu byłam zaangażowana w badania prowadzące do udowodnienia, że białko Fun12, a nie wcześniej sugerowane białko Tsr1, które posiada również aktywność GTPazy, jest odpowiedzialne za stymulację cięcia w obrębie miejsca D przez endonukleazę Nob1 i uwolnienie dojrzałego 18S rRNA.

4.3. Struktura regionów niekodujących wirusowych RNA

W toku mojej działalności naukowej byłam również zaangażowana w badania dotyczące analizy struktury regionów niekodujących wirusowych RNA, w szczególności wirusów RNA(+).

W pracy **Dutkiewicz M, Swiatkowska A, et al., Biochemistry, 2008** uczestniczyłam w badaniach, które doprowadziły do zweryfikowania i uszczegółowienia modelu struktury II-

rzędowej regionu terminalnego 3' nici replikacyjnej wirusa zapalenia wątroby typu C, HCV (ang. *Hepatitis C Virus*). Znajomość struktury tego regionu ma istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia procesu namnażania się wirusa. Może również ułatwić planowanie narzędzi oligonukleotydowych takich jak, oligomery antysensowe lub siRNA, skierowanych na ten region jako alternatywne podejście w leczeniu, zwłaszcza, że do tej pory nie ma skutecznego leku na zapalenie wątroby typu C.

Zaangażowana byłam również w charakterystykę regionu terminalnego 3' wirusa Coxsackievirus B3, która została przedstawiona w pracy **Dutkiewicz M, et al., *Virus Res.* 2014**. Na podstawie badań mapowania struktury, analizy filogenetycznej i komputerowego przewidywania struktury został po raz pierwszy zaproponowany model struktury II-rzędowej tego regionu. Analiza wykazała obecność kilku konserwatywnych motywów strukturalnych jak również obecność struktury typu liść koniczyny (ang. *cloverleaf structure*). Zaproponowane elementy strukturalne wydają się być istotne dla procesu replikacyjnego wirusa.

Problematyka dotycząca struktury i roli elementów strukturalnych wirusów RNA, enterowirusów została także szeroko przez nas omówiona w pracy przeglądowej **Dutkiewicz M, et al., *Acta Biochim Pol.* 2016**.

5. Plany badawcze

Moje najbliższe plany badawcze dotyczą identyfikacji kolejnych czynników białkowych oddziałujących z regionem terminalnym 5' mRNA p53 i tym samym wpływającym na ekspresję genu *TP53*. Ta tematyka jest dopiero od niedawna poruszana przez badaczy, a stanowi bardzo ważny element w pełniejszym zrozumieniu regulacji ekspresji białka p53, w szczególności w warunkach stresu komórkowego. Uzyskane dane z chromatografii powinowactwa do RNA P0- Δ 40p53 i P1- Δ 40p53 wraz analizą spektrometrii mas stanowią bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych badań w tym kierunku. Obecnie, jedna z publikacji dotycząca tej tematyki jest na końcowym etapie przygotowań.

Swoją uwagę badawczą chcę również skierować na poznanie roli i zależności pomiędzy p53 i izoformami Δ 40p53 i Δ 133p53 w aktywacji genów w odpowiedzi na czynniki stresowe. Ostatnie doniesienia pokazują, że odpowiedź na stres zależna od p53 jest wypadkową działania nie tylko samego białka p53 i jej partnerów jak np. hnRNP K, ale również działania izoform p53. Zbadanie zależności pomiędzy p53 i poszczególnymi izoformami p53 wydaje się być kluczem do zrozumienia jak kształtuje się odpowiedź komórkowa na czynniki stresowe.

Kolejny nurt badawczy, którym chciałabym podążać dotyczy roli p53 w chorobach związanych z zaburzeniami dojrzewania rRNA i składania rybosomu, zwanych rybosomopatiami. Do niedawna uważano rybosomopatie jako choroby rzadkie, ale ostatnie lata badań pokazują, że zakłócenia w funkcjonowaniu rybosomu prowadząc początkowo do choroby mogą w dalszym życiu osobniczym prowadzić do rozwoju nowotworu w szczególności układu krwiotwórczego np. białaczek. Dojrzewanie rybosomu jest ściśle kontrolowane, a białko p53 wydaje się być zaangażowane w ten proces. Realizacja tej tematyki umożliwiłaby mi wykorzystanie i połączenie mojego doświadczenia zdobytego podczas stażu podoktorskiego z doświadczeniami jakie zdobyłam w toku działań badawczych dotyczących problematyki p53. Plan działań badawczych dotyczący tej tematyki został przeze mnie przedstawione w projekcie złożonym w konkursie OPUS19 organizowanym przez Narodowe Centrum Nauki.

6. Osiągnięcia dydaktyczne i sprawowanie opieki naukowej nad studentami

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, z którym jestem związana, nie prowadzi regularnych zajęć dla studentów, dlatego nie posiadam typowego dla pracowników naukowych dorobku dydaktycznego.

6.1. Opieka naukowa nad studentami i doktorantami

Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej

„Rola elementów strukturalnych w regionie terminalnym 5' transkryptów mRNA genu TP53 w procesie inicjacji translacji”, dr Paulina Żydowicz-Machtel

Promotor główny: Prof. Jerzy Ciesiołka

2018, Instytut Chemii Bioorganicznej, PAN, Poznań

Promotor pracy magisterskiej

„Proces translacji fragmentu białka p53 i jego izoformy $\Delta Np53$ w warunkach *in vitro*.”, mgr inż. Julia Suchacka

2014, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

6.2. Nieformalna opieka

Opieka nad magistrantami, doktorantami oraz praktykantami Zakładu Biochemii RNA ICHB PAN (wcześniej - Pracowni Biochemii RNA ICHB PAN).

Opieka nad doktorantami:

mgr Joanna Szpotkowska (w toku przygotowania pracy doktorskiej)

Opieka nad magistrantami:

2007- mgr Agnieszka Górka, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Temat pracy magisterskiej: „Badanie zmian w strukturze i funkcji biologicznej elementu IRES wirusa HCV wywołanych oddziaływaniem z komórkowym mikroRNA – 122.”

2007- mgr Marcin Pieczyński, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Temat pracy magisterskiej: „Zastosowanie oligonukleotydów antysensowych wiążących się do elementu IRES wirusa HCV, jako potencjalnych inhibitorów translacji *in vitro*”.

Opieka nad magistrantami i studentami na Uniwersytecie Edynburskim w grupie kierowanej przez Prof. David Tollervey'a.

6.3. Praktyki dla studentów

2002-2005

Współprowadziłam ćwiczenia laboratoryjne dla studentów IV roku Chemii UAM w ramach cyklu „Laboratoria”.

Pracownia Biochemii RNA, ICHB PAN. Poznań