

Region terminalny 5' mRNA p53 u myszy: struktura i funkcja

Joanna Szpotkowska

Streszczenie

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, które reguluje pulę genów odpowiedzialnych m. in. za odpowiedź na stres komórkowy, regulację cyklu komórkowego, apoptozę, starzenie, a także metabolizm, funkcjonowanie komórek macierzystych i metastazę. Badania nad rolą białka p53 w komórce oraz nad ekspresją genu *TP53* skupiają się głównie na ich funkcjonowaniu w organizmie ludzkim, chociaż w celu lepszego zrozumienia zachodzących procesów wytworzono i poddano badaniom liczne myszy transgeniczne. Jednakże, pomimo częstego wykorzystywania myszy jako organizm modelowy, w dostępnej literaturze istnieją jedynie nieliczne informacje dotyczące regulacji ekspresji genu *Trp53* u myszy. W szczególności, jak można było przypuszczać, w mRNA p53 u myszy istotnym elementem regulującym proces inicjacji translacji jest jego region niekodujący 5'.

Celem niniejszej pracy była kompleksowa analiza strukturalna i funkcjonalna regionu terminalnego 5' mRNA p53 u myszy.

Określono długość regionu niekodującego 5' mRNA p53 wykorzystując metodę 5' RACE. Stwierdzono, że badany region może mieć różną długość, a do dalszych badań wybrano dwa transkrypty: najczęściej występujący oraz najdłuższy zidentyfikowany transkrypt, zawierające region niekodujący 5' o długości odpowiednio 122 (mRNA(-122)) i 247 nukleotydów (mRNA(-247)).

Wykorzystując mapowanie biochemiczne przeprowadzono analizę struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' analizowanych mRNA oraz ich wybranych, izolowanych elementów struktury drugorzędowej. Dodatkowo, zbadano strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5', zawierającego 166-nukleotydowy region niekodujący (mRNA(-166)). Transkrypt ten nie został zidentyfikowany w eksperymencie 5' RACE, jednak był wykorzystywany we wcześniejszych pracach publikowanych w literaturze.

W kolejnej części pracy wykorzystano małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego do utworzenia struktur *ab initio* regionu terminalnego 5' mRNA(-122) oraz jego wybranych fragmentów. Następnie, otrzymane modele *ab initio* porównano z modelami wygenerowanymi za pomocą programu RNA Composer. Na podstawie pomiarów

spektroskopii dichroizmu kołowego wyznaczono temperatury przejść fazowych oraz podstawowe parametry termodynamiczne badanych cząsteczek RNA.

W wyniku przeprowadzonych reakcji translacji *in vitro* w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m⁷GpppG wykazano, że inicjacja translacji mRNA(-122) i mRNA(-166) jest procesem zależnym od obecności kapu na końcu 5' mRNA, natomiast inicjacja translacji mRNA(-247) przebiega w sposób niezależny od kapu.

Analiza porównawcza względnych ilości białka i mRNA p53 w linii komórkowej fibroblastów mysich wykazała, że stres siateczki śródplazmatycznej powoduje nieznaczne obniżenie ilości białka p53, natomiast stres genotoksyczny prowadzi do jego akumulacji. W obu analizowanych przypadkach poziom mRNA nie ulega zmianie. Otrzymane wyniki sugerują, że regulacja p53 w odpowiedzi na stres zachodzi na poziomie translacji.

Ponadto postanowiono zbadać, od którego z dwóch potencjalnych kodonów inicjacyjnych, zlokalizowanych w mRNA p53 w odległości zaledwie sześciu nukleotydów, rozpoczyna się synteza białka p53. W tym celu skonstruowano mutanty mRNA ze zmianami w trypletach nukleotydowych, od których inicjowana jest synteza białka i sprawdzono, jak wprowadzone mutacje wpływają na translację w warunkach *in vitro* oraz *in cellulo*.

Przeprowadzono analizę zachowawczości elementów strukturalnych zlokalizowanych w regionie terminalnym 5' badanych transkryptów mRNA(-122) i mRNA(-247). Wyróżniono pięć odcinków mRNA charakteryzujących się wysoką zachowawczością. W celu identyfikacji białek, które potencjalnie mogą oddziaływać z badanym regionem mRNA(-247), przeprowadzono analizę *in silico*, wykorzystując program RBPmap.