

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

**Rola elementów strukturalnych w regionie
terminalnym 5' transkryptów mRNA genu *TP53*
w procesie inicjacji translacji**

Paulina Żydowicz-Machtel

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii RNA

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka

Promotor pomocniczy: dr Agata Świątkowska

Poznań 2018

Składam najserdeczniejsze podziękowania

*mojemu promotorowi Panu
prof. dr hab. Jerzemu Ciesiołce,
za opiekę naukową, cenne wskazówki oraz okazaną życzliwość,*

*dr Agacie Świątkowskiej za nieocenioną pomoc w trakcie realizacji
niniejszej pracy doktorskiej*

dr hab. Marioli Dutkiewicz za wszelkie rady i wskazówki

*dr Agnieszce Górskiej
dr Łukaszowi Popendzie
mgr Joannie Szpotkowskiej
mgr Barbarze Smólskiej
za okazaną pomoc*

*Wszystkim Współpracownikom z Zakładu Biochemii RNA
za miłą atmosferę*

Mojej rodzinie i przyjaciołom za wsparcie

Pracę dedykuję Piotrowi

**W trakcie realizacji pracy doktorskiej brałam udział w
następujących projektach badawczych:**

Projekt NCN OPUS nr 2013/09/B/NZ1/01884 (2014–2017)

„Rola regionów niekodujących 5' mRNA genu p53 syntetyzowanych z różnych promotorów transkrypcyjnych i wykorzystujących alternatywne miejsca inicjacji translacji w generowaniu izoform białka p53”

Kierownik projektu **prof. dr hab. Jerzy Ciesiolka**

Grant badawczy w ramach zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2017

*„Analiza efektywności translacji izoform białka p53: $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$ w warunkach *in vitro* oraz w wybranych liniach komórek ludzkich”*

Kierownik projektu **mgr Paulina Żydowicz-Machtel**

Projekt NCN OPUS nr 2016/21/B/NZ1/02832 (2017–2020)

„Rola czynników białkowych wiążących się do regionu niekodującego 5' ludzkiego mRNA p53 w regulacji ekspresji białka p53 na poziomie translacji”

Kierownik projektu **prof. dr hab. Jerzy Ciesiolka**

**Część wyników otrzymanych przeze mnie w trakcie realizacji pracy
doktorskiej została zawarta w następujących publikacjach:**

**Agata Swiatkowska, Paulina Zydowicz, Agnieszka Gorska, Julia Suchacka, Mariola
Dutkiewicz, Jerzy Ciesiolka**

*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 vol. 10(10) e0141676

Agata Swiatkowska, Paulina Zydowicz, Joanna Sroka, Jerzy Ciesiolka

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

Acta Biochimica Polonica 2016. vol. 63(4) str. 645-651

**Paulina Zydowicz-Machtel, Agata Swiatkowska, Łukasz Popena, Agnieszka Gorska,
Jerzy Ciesiolka**

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

Scientific Reports 2018 vol. 8(1) 1533

**Wyniki otrzymane w toku realizacji pracy doktorskiej prezentowałam
podczas krajowych i międzynarodowych konferencji:**

**Paulina Zydowicz-Machtel, Agata Swiatkowska, Łukasz Popena, Agnieszka Gorska,
Jerzy Ciesiolka**

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

RNA 2018, The Annual Meeting of the RNA Society, Uniwersytet Kalifornijski w Berkeley USA, 29.05-03.06.2018

**Paulina Zydowicz-Machtel, Agata Swiatkowska, Łukasz Popena, Agnieszka Gorska,
Jerzy Ciesiolka**

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

RNAtion! Computational and Experimental RNA Biology Conference for Young Scientists
Uniwersytet Adama Mickiewicza Poznań, 18-19.09.2017

**Agata Swiatkowska, Paulina Zydowicz, Agnieszka Gorska, Julia Suchacka, Mariola
Dutkiewicz, Jerzy Ciesiolka**

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

RNA Structure and Function, ICGEB Triest, Włochy, 21-24.03.2016

**Paulina Żydowicz, Agata Świątkowska, Agnieszka Górka, Łukasz Popena, Jerzy
Ciesiolka**

Length of the 5' terminal region and structural context of the AUG1 start codon influence the ribosomal scanning and translation initiation of p53 mRNA

Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący Poznańskie Konsorcjum RNA- GO Obrzycko,
16-18.09. 2015

Paulina Żydowicz, Agata Świątkowska, Agnieszka Górka, Łukasz Popena, Jerzy Ciesiolka

Length of the 5' terminal region and structural context of the AUG1 start codon influence the ribosomal scanning and translation initiation of p53 mRNA

Protein Synthesis and Translational Control EMBO conference, Heidelberg, Niemcy, 9-13.09.2015

Paulina Żydowicz, Agata Świątkowska, Agnieszka Górka, Łukasz Popena, Jerzy Ciesiolka

Length of 5'UTR and structural context of AUG1 codon influence translation initiation of p53 mRNA

EMBO Young Scientists Forum 2015, Warszawa, 2-3.07.2015

Agata Swiatkowska, Paulina Zydowicz, Agnieszka Gorska, Julia Suchacka, Mariola Dutkiewicz, Jerzy Ciesiolka

The role of structural elements of the 5'-terminal region of p53 mRNA in translation under stress conditions assayed by the antisense oligonucleotide approach

RNA 2015, The Twentieth Annual Meeting of the RNA Society, Madison, Wisconsin, USA, 26-31.05.2015

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	12
1. Wprowadzenie i cel pracy	18
2. Wstęp literaturowy	23
2.1. Białko p53- supresor nowotworowy	23
2.1.1. Aktywność transkrypcyjna białka p53	24
2.1.2. Mutacje w genie <i>TP53</i>	28
2.1.3. Białko p53 jako regulator translacji	29
2.1.4. Regulacja aktywności białka p53	31
2.2. Organizacja i ekspresja genu <i>TP53</i>	33
2.2.1. Alternatywne miejsca inicjacji transkrypcji genu <i>TP53</i>	33
2.2.2. Kodony inicjacji translacji AUG	34
2.2.3. Warianty splicingowe białka p53	37
2.3. Budowa białka p53	38
2.4. Izoforma $\Delta 40p53$	40
2.4.1. Synteza izoformy $\Delta 40p53$	41
2.4.2. Rola kompleksu białek $\Delta 40p53$ i p53	43
2.4.3. Rola izoformy $\Delta 40p53$ w chorobach nowotworowych	46
2.5. Izoforma $\Delta 133p53$	47
2.5.1. Rola kompleksu białek $\Delta 133p53$ i p53	51
2.5.2. Rola izoform $\Delta 133p53$ w procesie starzenia komórkowego	52
2.5.3. Rola izoform $\Delta 133p53$ w chorobach nowotworowych	55
2.5.4. Związek izoform $\Delta 133p53$ z komórkami macierzystymi	60
3. Wyniki i dyskusja	63
3.1. Rola elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie translacji, analizowana za pomocą oligonukleotydów antysensowych	63

3.1.1. Mapowanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 po związaniu oligonukleotydów antysensowych.....	65
3.1.2. Badanie efektywności transfekcji oligonukleotydów antysensowych do wybranych linii komórkowych.....	70
3.1.3. Wpływ struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na proces syntezy izoformy $\Delta 40p53$, analizowany w komórkach HT-29 po zastosowaniu stresu oksydacyjnego	72
3.1.4. Badanie wpływu oligonukleotydów antysensowych na efektywność syntezy białka p53 i izoformy $\Delta 40p53$ w linii komórkowej MCF-7 po zastosowaniu czynników indukujących stres	76
3.1.5. Analiza wpływu oligonukleotydów antysensowych na wydajność syntezy białka p53 oraz jego izoformy $\Delta 40p53$, pod wpływem czynników stresowych, w linii komórkowej HepG2	78
3.1.6. Badanie wpływu elementów struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na inicjację translacji zachodzącą z kodonu AUG1 i AUG2 w lizacie z retikulocytów króliczych.....	81
3.1.7. Dyskusja	86
3.2. Wpływ wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 na proces skanowania mRNA przez rybosom i efektywność translacji.....	91
3.2.1. Przygotowanie modelowych konstruktów regionu terminalnego 5' mRNA p53.....	92
3.2.2. Związek pomiędzy zmianą struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 a efektywnością translacji inicjowanej z kodonów AUG1 i AUG2.....	100
3.2.3. Wyznaczenie całkowitego czasu translacji.....	105
3.2.4. Wpływ zmiany struktury drugorzędowej regionu niekodującego mRNA p53 na inicjację translacji i czas skanowania tego regionu przez rybosom, dla wariantów mRNA z jednym kodonem inicjacyjnym – AUG1	107
3.2.5. Rola struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w inicjacji translacji i czas skanowania tego regionu przez rybosom, dla wariantów mRNA z dwoma kodonami inicjacyjnymi – AUG1 i AUG2	110
3.2.6. Rola struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w inicjacji translacji i czas skanowania tego regionu przez rybosom, dla wariantów mRNA pozbawionych ważnych elementów strukturalnych.....	114
3.2.7. Wpływ zmian w strukturze drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na inicjację translacji według mechanizmu kap-zależnego.....	116

3.2.8. Analiza formowania się inicjacyjnego kompleksu rybosomalnego 80S w obrębie kodonów start, w wybranych mRNA.....	120
3.2.9. Dyskusja	124
3.3. Badanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA Δ 133p53 oraz efektywności translacji zachodzącej z kodonów AUG3 i AUG4	129
3.3.1. Przygotowanie konstruktów mRNA Δ 133p53 zawierającego region terminalny 5'	131
3.3.2. Określenie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA Δ 133p53	132
3.3.3. Badanie efektywności translacji izoform Δ 133p53 i Δ 160p53	138
3.3.4. Analiza mechanizmu inicjacji translacji zachodzącej z kodonu AUG3	140
3.3.5. Dyskusja	142
4. Podsumowanie.....	146
5. Materiały i metody.....	151
5.1. Aparatura	151
5.2. Odczynniki i materiały.....	152
5.2.1. Związki promieniotwórcze	152
5.2.2. Enzymy	152
5.2.3. Zestawy odczynników	152
5.2.4. Odczynniki do hodowli komórek ludzkich.....	153
5.2.5. Oligonukleotydy	154
5.2.6. Plazmidy	154
5.2.7. Szczepy bakteryjne.....	154
5.2.8. Linie komórkowe.....	154
5.2.9. Przeciwciała.....	155
5.2.10. Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek	155
5.2.11. Bufory, roztwory i pożywki.....	155
5.3. Metody standardowe.....	158

5.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	158
5.3.2. Elektroforeza cząsteczek DNA i RNA w żelu agarozowym	159
5.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	159
5.3.4. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego	160
5.3.5. Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu.....	160
5.3.6. Ekstrakcja fenolem	161
5.3.7. Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ³² P.....	161
5.3.8. Izolacja RNA za pomocą odczynnika TriReagent.....	161
5.3.9. Hodowla ludzkich komórek nowotworowych.....	162
5.4. Metody stosowane w badaniach własnych	162
5.4.1. Przygotowanie modelowych konstruktów dsDNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 człowieka	163
5.4.2. Transkrypcja <i>in vitro</i>	167
5.4.3. Doświadczenia wykonywane w lizacie z króliczych retikulocytów (RRL)	167
5.4.4. Odwrotna transkrypcja z radioaktywnie znakowanym starterem DNA	173
5.4.5. Transfekcja komórek MCF-7, HT-29 i HepG2 oligonukleotydami antysensowymi.....	174
5.4.6. Analiza białek metodą Western blot.....	174
5.4.7. Półilościowa analiza poziomu mRNA metodą RT-PCR	175
5.4.8. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA	176
6. Literatura.....	180

Wykaz stosowanych skrótów

3'UTR – region nieulegający translacji 3' (ang. *3' untranslated region*)

5'UTR – region nieulegający translacji 5' (ang. *5' untranslated region*)

A – adenozyzna

ARCA – analog kapu (ang. *anti reverse cap analog*)

C – cytydyna

cDNA – DNA komplementarny (ang. *complementary DNA*)

Cx – cykloheksimid

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – trifosforan dowolnego deoksyrybonukleotydu

dsDNA – dwuniciowa cząsteczka DNA (ang. *double stranded DNA*)

eEF – czynnik elongacyjny (ang. *eukaryotic elongation factor*)

eIF – eukariotyczny czynnik inicjujący translację (ang. *eukaryotic initiation factor*)

G – guanozyzna

GDP – guanozynodifosforan

GTP – guanozynotrifosforan

IRES – wewnętrzne miejsce oddziaływania z rybosomem (ang. *internal ribosome entry site*)

ITAF – czynnik oddziałujący z IRES (ang. *IRES trans-acting factor*)

kDa – kilodaltony

kpz – tysiące par zasad

mRNA – RNA matrycowy (ang. *messenger RNA*)

NMIA – bezwodnik N-metyloisatoiczny (ang. *N-methylisatoic anhydride*)

nt – nukleotyd

ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)

PIC – rybosomalny kompleks preinicjacyjny (ang. *ribosomal preinitiation complex*)

pre-mRNA – mRNA prekursorowy (ang. *precursor mRNA*)

RBP – białko wiążące RNA (ang. *RNA-binding protein*)

RNA – kwas rybonukleinowy

rpm – obroty na minutę (ang. *rotations per minute*)

RRL – lizat z retikulocytów królika (ang. *rabbit reticulocyte lysate*)

RT-PCR – odwrotna transkrypcja z następującą po niej łańcuchową reakcją polimerazy

SHAPE – acylacja grup 2'-hydroksylowych analizowana za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*)

T – tymidyna

U – urydyna

Streszczenie

Białko p53 jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego i odpowiedź na stres. Gen *TP53* ulega ekspresji w postaci co najmniej dwunastu izoform białkowych powstających w wyniku wykorzystania alternatywnych promotorów transkrypcyjnych, różnych kodonów inicjacji translacji lub alternatywnego wycinania intronów. Co ważne, istnieje coraz więcej dowodów na to, że inicjacja translacji mRNA p53 może być regulowana przez strukturę i długość naturalnie występujących wariantów regionu terminalnego 5' transkryptów mRNA p53. W regionie tym obecne są dwa charakterystyczne motywy strukturalne typu spinki do włosów: G56–C169, gdzie zlokalizowany jest kodon AUG1 dla białka p53 i U180–A218, który oddziałuje z białkiem HDM2 (ang. *human double minute 2*). Dodatkowo w regionie terminalnym 5' mRNA p53 znaleziono element IRES, który bierze udział w regulacji translacji p53.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zastosowano oligonukleotydy antysensowne posiadające modyfikacje typu 2'-*OMe* hybrydujące do regionu terminalnego 5' mRNA p53 w celu określenia roli elementów strukturalnych w procesie inicjacji translacji w warunkach stresu komórkowego. Strukturalne zmiany w docelowym RNA występujące po wiązaniu oligomerów monitorowano metodą cięcia RNA indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} . Wpływ oligomerów antysensownych na syntezę dwóch białek, pełnej długości p53 i jej izoformy $\Delta 40p53$ analizowano w komórkach HT-29, MCF-7 i HepG2, w warunkach normalnych i pod wpływem stresu, a także w warunkach *in vitro*. Wyniki ujawniły, że spinka U180–A218 i sąsiadujący jednoniciowy region A219–U228 były głównie odpowiedzialne za wysoką wydajność translacji IRES-zależnej w obecności czynników stresowych. Motywy te odgrywają rolę elementów *cis*, które są w stanie modulować aktywność IRES, prawdopodobnie poprzez interakcje z czynnikami białkowymi.

W kolejnym podejściu, translację wariantów mRNA o zmiennej długości regionów końcowych p53 i kodujących białko reporterowe lucyferazy monitorowano w sposób ciągły *in situ* w lizacie z retikulocytów króliczych. Zsyntetyzowano kilka konstruktów mRNA: w dwóch z nich kontekst strukturalny kodonu inicjacyjnego AUG1 został

zmieniony, podczas gdy w pozostałych dwóch konstruktach zmieniono charakterystyczne motywy spinki do włosów obecne w regionie końcowym 5' mRNA p53. Dodatkowo translację dwóch konstruktów ze zmienionymi motywami strukturalnymi przeprowadzono również w obecności analogu kapu w celu określenia funkcji regionu terminalnego 5' w inicjacji translacji niezależnej od kapu. Szereg czynników strukturalnych związanych z długością regionu końcowego 5', stabilnymi elementami struktury drugorzędowej, środowiskiem strukturalnym kodonu inicjacyjnego jak i element IRES, znacząco wpłynęły na skanowanie mRNA przez rybosom i wydajność translacji.

Następnie, po raz pierwszy, określono strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ kodującego izoformy $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$. Stosując metodę SHAPE i cięcia RNA w obecności jonów Pb^{2+} , zdefiniowano strukturę i zaproponowano model struktury drugorzędowej regionu niekodującego 5' mRNA. Następnie przeprowadzono analizę translacji *in vitro* z mRNA $\Delta 133p53$ w RRL. Eksperyment wykazał, że translacja *in vitro* była inicjowana tylko z kodonu AUG3, dla $\Delta 133p53$, pomimo obecności dwóch kodonów start. Ponadto badanie translacji *in vitro* przeprowadzone w obecności analogu kapu wykazało, że inicjacja translacji zachodząca z kodonu AUG3 jest niezależna od struktury kap.

Abstract

The p53 protein is one of the major factors responsible for cell cycle regulation and stress response. The protein is expressed as at least twelve protein isoforms, resulting from the use of alternative promoters, alternative splicing or downstream initiation codons. Importantly, there is growing evidence that translation initiation of p53 mRNA may be regulated by the structure and length of the naturally occurring variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA transcripts. In the 5'-terminal region of p53 mRNA, an IRES element has been found which takes part in the translational regulation of p53 expression. Two characteristic hairpin motifs are present in this mRNA region: G56–C169, with the first AUG codon, and U180–A218, which interacts with the HDM2 protein (*human homolog of mouse double minute 2 protein*).

In this dissertation, 2'- *OMe* modified antisense oligomers hybridizing to the 5'-terminal region of p53 mRNA were applied in order to assess the role of these structural elements in translation initiation under conditions of cellular stress. Structural changes in the RNA target occurring upon oligomers' binding were monitored by the Pb²⁺-induced cleavage method. The impact of antisense oligomers on the synthesis of two proteins, the full-length p53 and its isoform Δ40p53 was analyzed in HT-29, MCF-7 and HepG2 cells, under normal and stress conditions, as well as *in vitro* conditions. The results revealed that the hairpin U180–A218 and adjacent single-stranded region A219–U228 were predominantly responsible for high efficacy of IRES-mediated translation in the presence of stress factors. These motifs play a role of *cis* acting elements which are able to modulate IRES activity, likely *via* interactions with protein factors.

In another approach, the translation of mRNA variants with variable length of the p53 5'- terminal regions and encoding luciferase reporter protein was monitored continuously *in situ* in a rabbit reticulocyte lysate system. Several mRNA constructs were synthesized: in two of them, the structural context of AUG1 initiation codon was altered while in the other two constructs, characteristic hairpin motifs present in the p53 5'- terminal region were changed. Additionally, translation of the two constructs with changed hairpin motifs was also performed in the presence of the cap analogue to test the

function of the 5'- terminal region in cap-independent translation initiation. Superposition of several structural factors connected with the length of the 5'- terminal region, stable elements of the secondary structure, structural environment of the initiation codon and IRES elements greatly influenced the ribosomal scanning and translation efficiency.

Finally, for the first time, the secondary structure of the 5' terminal region of mRNA $\Delta 133p53$ encoding $\Delta 133p53$ and $\Delta 160p53$ isoforms was determined. Using SHAPE method and mRNA cleavage in the presence of Pb^{2+} , the structure was defined, and the secondary structure model of 5' noncoding region of mRNA was proposed. Subsequently, *in vitro* translation analysis with the $\Delta 133p53$ mRNA was performed in RRL. The experiment revealed that *in vitro* translation was initiated only from AUG3 codon, for $\Delta 133p53$. Moreover, the study performed in the presence of the cap analogue showed that translation initiation from AUG3 codon is cap-independent.

1. Wprowadzenie i cel pracy

Badania ostatnich lat przyniosły ogromny postęp w zrozumieniu mechanizmów rozwoju chorób nowotworowych. Kluczowe znaczenie dla ewentualnej transformacji nowotworowej ma ekspresja genów kodujących białka supresorowe, a zwłaszcza proces translacji mRNA kodujących te białka (Silvera et al., 2010). Translacja jest procesem wyjątkowo złożonym, angażującym ogromną ilość czynników białkowych, ściśle kontrolowanym za pośrednictwem specyficznych sekwencji nukleotydowych oraz struktur drugorzędowych znajdujących się w transkryptach mRNA (Gebauer & Hentze 2004). Regulacja translacji odbywa się na wszystkich jej etapach, z czego najistotniejszy zdaje się być etap pierwszy – etap inicjacji (Gebauer & Hentze 2004; Jackson et al., 2010).

Inicjacja translacji rozpoczyna się od identyfikacji struktury kap znajdującej się na końcu 5' mRNA przez kompleks eIF4F (ang. *eukaryotic translation initiation factor*) (Sonenberg & Hinnebusch 2009). Czynniki eIF4F ułatwiają wiązanie się podjednostki rybosomalnej 40S, występującej w kompleksie preinicjacyjnym 43S PIC (ang. *pre-initiation complex*), do 5' kap mRNA. Czynniki eIF4F są także odpowiedzialne za rozplecenie struktur drugorzędowych mRNA, dzięki aktywności helikazowej. W konsekwencji mRNA staje się dostępny dla 43S PIC, który skanuje cząsteczkę mRNA w poszukiwaniu kodonu AUG. Identyfikacja kodonu inicjacyjnego AUG na drodze skanowania jest dominującym mechanizmem inicjacji translacji u organizmów eukariotycznych (Sonenberg & Hinnebusch 2009; Hinnebusch et al., 2016).

Proces inicjacji translacji zależny od struktury 5' kap jest najbardziej wydajnym mechanizmem syntezy białek dla większości transkryptów mRNA obecnych w komórce. Jednakże efektywność tego procesu może zostać obniżona w warunkach stresu komórkowego, gdy ograniczona zostaje większość funkcji życiowych komórki i dochodzi do zablokowania działania kompleksu eIF4F. W takiej sytuacji możliwe jest pominięcie inicjacji z udziałem 5' kapu i przeprowadzenie jej za pomocą wyspecjalizowanej struktury, zwanej wewnętrznym miejscem wiązania rybosomu – IRES (ang. *internal ribosome entry site*), która rekrutuje małą podjednostkę rybosomu do kodonu start (Pelletier & Sonenberg 1988; Spriggs et al., 2008). Dzięki strukturze IRES możliwe jest

zachowanie ciągłości syntezy niektórych białek bez względu na niekorzystne warunki fizjologiczne komórki, w szczególności białek regulujących cykl komórkowy, apoptozę, odpowiedź komórki na warunki stresowe czy proces nowotworzenia.

Białko p53 znane jest jako niezwykle ważny supresor nowotworowy, uczestniczący w kluczowych procesach regulacji cyklu komórkowego (Lane & Crawford 1979; Linzer & Levine 1979; Kastan et al., 1991). Działa ono jako czynnik transkrypcyjny stymulując ekspresję genów odpowiedzialnych za naprawę DNA lub apoptozę (Kastan et al., 1991). Jednym ze skutków mutacji w genie *TP53* jest nieprawidłowa jego ekspresja na poziomie białka, co prowadzi do zaburzenia przebiegu cyklu komórkowego, a w następstwie do nowotworzenia. Mutacje w *TP53* zostały znalezione w ponad 50% ludzkich nowotworów (Lane & Levine 2010).

Ludzki gen *TP53* ulega ekspresji w postaci co najmniej 12 różnych izoform białkowych, które powstają w rezultacie m.in. wykorzystania alternatywnych miejsc promotorowych transkrypcji, różnych miejsc inicjacji translacji, a także alternatywnego splicingu (Khoury & Bourdon 2010). Zaobserwowano, iż synteza poszczególnych izoform w komórkach zależy od rodzaju tkanki, jak i może być regulowana w różnych warunkach stresu komórkowego (Powell et al., 2008; Bourougaa et al., 2010; Marcel et al., 2011). Co więcej, badania dowodzą, iż izoformy białka p53 mogą mieć istotne znaczenie w regulacji aktywności p53 w komórce (Bourdon et al., 2005).

Pierwszą, dobrze scharakteryzowaną izoformą białka p53, powstającą na drodze alternatywnej inicjacji translacji, była izoforma $\Delta 40p53$ (Courtois et al., 2002). Synteza $\Delta 40p53$ zachodzi z kodonu inicjacyjnego AUG2, znajdującego się w egzonie 4 genu *TP53*, wskutek tego izoforma ta jest skrócona o pierwsze 39 aminokwasów w stosunku do p53 pełnej długości. Co niezwykle istotne, synteza izoformy $\Delta 40p53$ w warunkach stresu komórkowego może zachodzić niezależnie od struktury 5' kap, lecz poprzez wiązanie się rybosomu bezpośrednio w miejscu inicjacji translacji z wykorzystaniem elementu IRES (Ray et al., 2006; Candeias et al., 2006).

W obrębie intronu 4 ludzkiego genu *TP53* znajduje się miejsce inicjacji transkrypcji P2. Transkrypt ten koduje kolejne dwie izoformy p53: $\Delta 133p53$, której translacja rozpoczyna się od kodonu AUG3 oraz $\Delta 160p53$, inicjowanej od kodonu AUG4 (Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010a). Izofomy te potencjalnie biorą udział

w procesie nowotworzenia, jednakże ich biologiczna funkcja nie została jak dotąd w pełni poznana (Arsic et al., 2015; Gadea et al., 2016).

Proces biosyntezy białka p53, jak i jego izoform, jest ściśle kontrolowany poprzez obecność stabilnych elementów struktury drugorzędowej, znajdujących się w obrębie regionu niekodującego 5' mRNA p53 (Vilborg et al., 2010; Gorska et al., 2013ab). Struktura drugorzędowa tego regionu ma istotny wpływ na migrację kompleksu 43S PIC, który skanuje region terminalny 5' mRNA w celu identyfikacji kodonu inicjacyjnego AUG (Leppek et al., 2018). Regiony 5'UTR, wysoce ustrukturyzowane i o dużej stabilności termodynamicznej mogą powodować opóźnienie skanowania przez kompleks rybosomalny oraz spadek wydajności translacji. Dodatkowo inicjacja translacji izoform p53 może być także kontrolowana za pośrednictwem elementów IRES, występujących w regionie terminalnym 5' mRNA p53 (Ray et al., 2006; Candeias et al., 2006). Ponadto wysokie ustrukturyzowanie regionu 5'UTR wpływa także na interakcję z białkami wiążącymi się do RNA (RBP), co również reguluje inicjację translacji (Takagi et al., 2005; Leppek et al., 2018).

Głównym celem badań wykonanych w ramach mojej pracy doktorskiej było określenie wpływu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA różnych transkryptów p53 na proces inicjacji translacji. W trakcie wykonywania niniejszej pracy doktorskiej realizowałam trzy główne zadania:

Analiza wpływu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na efektywność syntezy izoform p53 oraz $\Delta 40p53$, z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensowych

W naszym laboratorium zostało wcześniej zaprojektowane kilka oligonukleotydów antysensowych wiążących się efektywnie do regionu terminalnego 5' mRNA p53 (Gorska et al., 2013b). Wykazano, że oligonukleotydy te, nakierowane na ważne elementy strukturalne tego regionu, powodują istotne zmiany w jego strukturze drugorzędowej w warunkach *in vitro*, a także mogą powodować zmiany w efektywności syntezy białka p53 (Gorska et al., 2013b). Celem moich badań była analiza wpływu wybranych elementów strukturalnych znajdujących się w regionie terminalnym 5' mRNA p53 na

efektywność translacji, poprzez zastosowanie oligonukleotydów antysensowych wiążących się do tego regionu. Badania zamierzałam przeprowadzić w liniach komórek ludzkich, które zostały poddane działaniu czynników stresowych: stresu oksydacyjnego oraz genotoksycznego. Następnie po wprowadzeniu oligonukleotydów zamierzałam zbadać efektywność syntezy białek p53 i $\Delta 40p53$ metodą Western blot po to, by określić wpływ elementów strukturalnych obecnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53 na wydajność translacji.

Określenie zależności pomiędzy szybkością skanowania regionu terminalnego 5' mRNA p53 przez kompleks rybosomalny, a długością oraz strukturą drugorzędową tego regionu

Celem kolejnego etapu moich badań było określenie wpływu długości, a także struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA na proces inicjacji translacji, a w szczególności na proces skanowania mRNA przez rybosomalny kompleks inicjacyjny. W pierwszym etapie zamierzałam zaprojektować i przygotować warianty sekwencyjne regionu terminalnego 5' mRNA p53, poprzedzające sekwencję kodującą białko reporterowe. Przygotowane warianty miały posłużyć do badania mechanizmu inicjacji translacji, a przede wszystkim pomiarów szybkości migracji kompleksu rybosomalnego w trakcie skanowania mRNA. Zamierzałam określić zależność między szybkością migracji kompleksu rybosomalnego, a długością regionu niekodującego 5', jego strukturą drugorzędową i kontekstem strukturalnym, w jakim znajduje się kodon inicjacyjny AUG. Aby określić efektywność syntezy białka p53 oraz jego izoformy $\Delta 40p53$ dla otrzymanych wariantów mRNA p53 postanowiłam zastosować reakcję translacji w warunkach *in vitro* w lizatach z retikulocytów króliczych. Dodatkowo wykorzystując przygotowane konstrukty, zamierzałam zbadać wpływ drugorzędowych elementów strukturalnych RNA na możliwość zachodzenia translacji według mechanizmu zależnego od elementu IRES. W tym celu planowałam przeprowadzić reakcję inhibicji translacji *in vitro* w obecności analogu kapu.

Zbadanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' transkrypty mRNA $\Delta 133p53$ kodującego izoformy $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$ oraz określenie właściwości tego regionu w procesie translacji

Następnym celem moich badań było scharakteryzowanie struktury drugorzędowej regionu niekodującego 5' transkrypty mRNA powstającego z miejsca inicjacji transkrypcji P2. Do badań strukturalnych zamierzałam wykorzystać biochemiczne metody mapowania struktur RNA *in vitro*: SHAPE oraz cięcie RNA indukowane w obecności jonów Pb(II). W oparciu o wyniki mapowania, za pomocą programu *RNAstructure 5.6*, zamierzałam wygenerować prawdopodobną strukturę drugorzędową regionu niekodującego 5' transkrypty mRNA kodującego izoformy $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$. Dodatkowo postanowiłam wykonać analizę efektywności translacji białek $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$ w warunkach *in vitro* w lizatach z retikulocytów króliczych.

2. Wstęp literaturowy

2.1. Białko p53- supresor nowotworowy

Białko p53, powszechnie nazywane „strażnikiem genomu”, jest czynnikiem transkrypcyjnym niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórki. Pełni niezwykle istotną rolę w aktywacji odpowiedzi komórkowej na bodźce stresowe. Stymulując ekspresję szeregu genów odpowiedzialnych m.in. za naprawę DNA, kontrolę cyklu komórkowego czy apoptozę, białko p53 jest jednym z najistotniejszych regulatorów homeostazy komórki jak i całego organizmu (Levine & Oren 2009; Kruiswijk et al., 2015; Kasthuber & Lowe 2017).

Ze względu na swoje znaczenie kliniczne białko p53 już od blisko 40 lat znajduje się w centrum zainteresowania naukowców (Lane & Crawford 1979; Linzer & Levine 1979; Lane & Levine 2010). Duża część badań dotyczy patogenezy chorób, stanowiących jedno z największych medycznych wyzwań XXI wieku, takich jak nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne. Badania pokazują, że p53 ulega dezaktywacji w ponad 50% ludzkich nowotworów (Lane & Levine 2010). Główną przyczyną są mutacje występujące w genie *TP53* (ang. *tumor protein p53*), prowadzące do nieprawidłowej jego ekspresji, skutkującej na przykład destabilizacją struktury białka p53, co wyklucza jego prawidłowe funkcjonowanie (Muller & Vousden 2014). Do najczęstszych czynników mutagennych zaliczamy: promieniowanie UV, czynniki chemiczne, czy też infekcje patogenne. Niefunkcjonalne białko p53, powstałe z uszkodzonego genu *TP53*, prowadzi do niekontrolowanych podziałów komórek, które w przypadku obecności prawidłowego białka zostałyby skierowane na ścieżkę apoptozy.

Zmiany w genie *TP53* występują powszechnie w licznych przypadkach nowotworów złośliwych, ze szczególnym uwzględnieniem raka pęcherza moczowego, jelita grubego, płuc i piersi (Olivier et al., 2009). Istnieją coraz mocniejsze dowody na to, że w niektórych typach nowotworów zmiany w p53 związane są ze złym rokowaniem u pacjentów. Dysfunkcja białka p53, spowodowana mutacją germinálną genu *TP53*

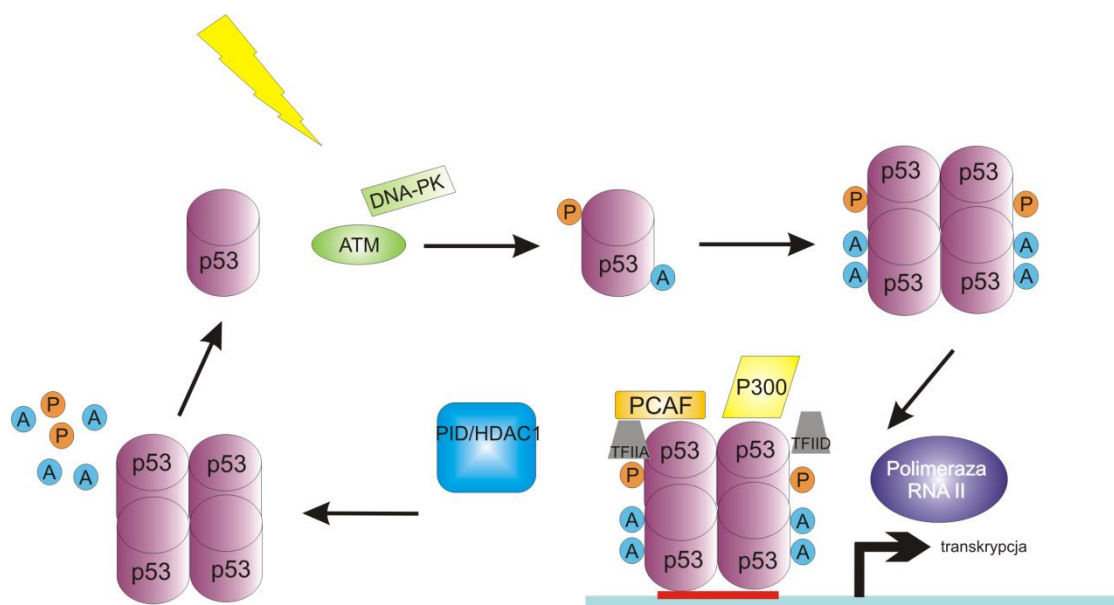
związana jest z poważną chorobą genetyczną nazwaną zespołem Li-Fraumeni (Li & Fraumeni 1969). Zwiększa ona znacząco zapadalność na różne nowotwory i prowadzi do intensywnego rozwoju guzów, głównie mięsaków, raka piersi, mózgu oraz nadnerczy. Choroba dotyczy szczególnie młodych pacjentów, a diagnoza często jest związana z istotnie krótszym czasem przeżycia (Li & Fraumeni 1969).

Badania na myszach wykazały, że brak białka p53, spowodowany usunięciem mysiego genu *Trp53*, znacznie zwiększył ich podatność na rozwój różnych typów nowotworów złośliwych, co pokazuje, że rola białka p53 w kancerogenezie jest ewolucyjnie zachowana (Donehower et al., 1992). Innym eksperymentem potwierdzającym powyższą tezę było wprowadzenie białka p53 typu dzikiego do mysiej linii komórkowej białaczki, w wyniku czego nastąpił natychmiastowy spadek żywotności komórek rakowych (Yonish-Rouach et al., 1999). Badania na kolejnym organizmie modelowym jakim jest danio pręgowany (łac. *Danio rerio*) potwierdziły, że mutacja w genie *TP53* destabilizuje kontrolę cyklu komórkowego, uniemożliwiając jego zatrzymanie, niezależnie od zastosowanych czynników stresu komórkowego (Storer & Zon 2010). Ze względu na funkcję białka p53 w ludzkim organizmie, określenie mechanizmów regulujących syntezę p53 jest niezwykle istotne dla zrozumienia molekularnego podłoża rozwoju nowotworu.

2.1.1. Aktywność transkrypcyjna białka p53

Indukcja aktywności transkrypcyjnej białka p53 w komórce zachodzi z chwilą pojawienia się czynników wywołujących stres (Beckerman & Prives 2010). Pod wpływem stresu komórkowego, takiego jak: stres genotoksyczny, oksydacyjny czy też termiczny, białko p53 ulega potranslacyjnej modyfikacji, a następnie aktywacji (Rys. 1). W przypadku stresu genotoksycznego (gdy DNA ulega uszkodzeniu) reszty serynowe w pozycjach 15 oraz 37 białka p53 są fosforylowane przez kinazy DNA-PK oraz ATM. W konsekwencji białko staje się bardziej stabilne, ulega tetrameryzacji i akumulacji w komórce. Tak powstały tetramer stanowi formę aktywną białka, ma wyższe powinowactwo do DNA i w konsekwencji uruchamia transkrypcję genów odpowiedzialnych za jego naprawę (Khosravi et al., 1999; Ashcroft et al., 1999). Białko p53 może ulegać także innym potranslacyjnym modyfikacjom takim jak acetylacja, która wzmaga aktywację p53,

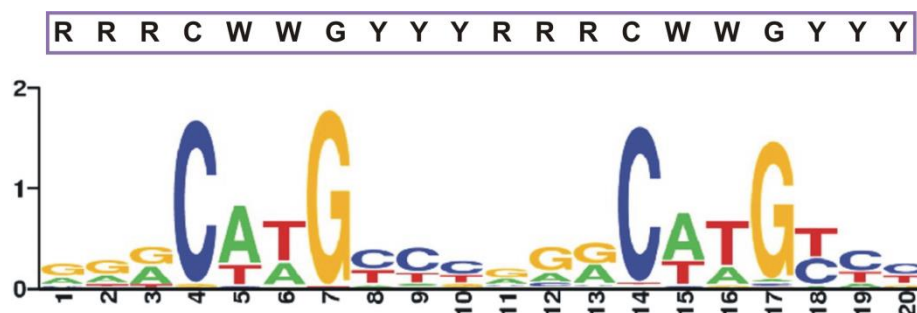
czy też ubikwitynacja, w efekcie której białko ulega degradacji (Thompson et al., 2004; Sakaguchi et al., 1998). Wzór modyfikacji potranslacyjnych białka p53 różni się w zależności od stresu komórkowego, co powoduje zróżnicowaną aktywność kompleksu białkowego p53. Modyfikacje potranslacyjne p53 determinują powinowactwo do docelowych genów (Laptenko & Prives 2006; Powell et al., 2008).



Rysunek 1. Schemat aktywacji białka p53. W wyniku uszkodzenia DNA, białko p53 zostaje fosforylowane i tworzy formę tetrameru, która aktywuje transkrypcję genów docelowych. Następnie białko p53 jest deacetylowane m.in. przez deacetylazę PID oraz HDAC1 (ang. *histone deacetylase 1*) i ulega degradacji. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Brooks & Gu 2003).

W celu zainicjowania transkrypcji docelowego genu, białko p53 musi rozpoznać i związać się do elementów rozpoznawanych - RE (ang. *recognition elements*) (Hoh et al., 2002). Są to specyficzne sekwencje nukleotydowe znajdujące się w obrębie genu aktywowanego, stanowiące najczęściej dwukrotnie powtórzony motyw sekwencyjny: 5'- RRRCWWGYYY -3' (gdzie R oznacza adeninę lub guaninę, W- adeninę lub tyminę, a Y- cytozynę lub tyminę) oddzielony o 0–13 nukleotydów (Rys. 2). Sądzi się, że istnieje kilka możliwych mechanizmów, za pomocą których p53 aktywuje transkrypcję genów. Jeden z nich zakłada, że region promotorowy genu aktywowanego przez p53 jest niedostępny dla czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA. Białko p53 wiążąc się do elementu RE, rekrutuje czynniki białkowe remodelujące chromatynę CRF (ang. *chromatin*

remodeling factors), a także białka takie jak p300 oraz PCAF (ang. *P300/CBP-associated factor*), mające aktywność transacetylazy histonowej HAT (ang. *histone transacetylases*) (Rys. 1). Powoduje to udostępnienie regionu promotorowego genu dla maszyny transkrypcyjnej. Kolejnym mechanizmem aktywacji transkrypcji jest oddziaływanie p53 z kompleksem preinicjacyjnym. Dodatkowo, rekrutacja podstawowych czynników transkrypcyjnych, takich jak TFIIA (ang. *transcription factor II A*) i TFIID (ang. *transcription factor II D*), poprzez bezpośrednią interakcję lub indukowanie zmian konformacyjnych w kompleksach białkowych, może prowadzić do aktywacji transkrypcji genów docelowych (Hoh et al., 2002; Laptenko & Prives 2006).



Rysunek 2. Schemat sekwencji RE dla białka p53. Wielkość liter koresponduje z prawdopodobieństwem wystąpienia danego nukleotydu. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Wang et al., 2009).

Szacuje się, że białko p53 odpowiada za kontrolę transkrypcji ponad 3600 genów, których wybrane przykłady przedstawione są w tabeli 1 (Surget et al., 2013). Najlepiej zbadanymi procesami komórkowymi, regulowanymi przez białko p53 są apoptoza oraz kontrola cyklu komórkowego (Levine & Oren 2009; Olivares-Illana & Fahraeus 2010). Do genów docelowych białka p53 inicjujących apoptozę komórki należą m.in. *PUMA* (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*) oraz *BAX* (ang. *Bcl-2-associated X protein*) (Miyashita & Reed 1995; Nakano & Vousden 2001). Geny te wchodzą w skład rodziny *Bcl-2* (ang. *B-cell lymphoma 2*), a syntetyzowane z nich białka oddziałują ze sobą i uczestniczą w przeprowadzaniu apoptozy. Docelowe geny białka p53, regulujące procesy cyklu komórkowego, to m.in. *p21* oraz *miR-34a* (ang. *micro RNA 34a*). Białko p21 jest inhibitorem kinaz zależnych od cyklin- CDK (ang. *cyclin-dependent kinase*) i może kontrolować starzenie komórkowe, natomiast miR-34a, oprócz procesu starzenia, reguluje

także zatrzymywanie cyklu komórkowego (El-Deiry et al., 1993; Tokino & Nakamura 2000; Navarro & Lieberman 2015). Mechanizm, za pomocą którego aktywacja p53 może prowadzić do indukcji określonych genów powodujących zdefiniowane efekty w komórkach wciąż jest intensywnie badany.

Tabela 1. Przykłady najlepiej zbadanych genów docelowych białka p53 (na podstawie Fischer 2017).

Nazwa genu	Funkcja białka	Proces komórkowy	Referencje
<i>BAX</i>	komponent szlaku apoptotycznego	apoptoza	Miyashita & Reed 1995
<i>PUMA</i>	komponent szlaku apoptotycznego		Nakano & Vousden 2001
<i>APAF1</i>	aktywator kaspaz		Fortin et al., 2001
<i>PCNA</i>	kofaktor polimerazy δ DNA	naprawa DNA	Saifudeen et al., 2002
<i>DDB2</i>	komponent szlaku naprawy nukleotydów		Tan & Chu 2002
<i>RRM2B</i>	reduktaza rybonukleotydowa		Tanaka et al., 2000
<i>GADD45A</i>	komponent szlaku zatrzymania cyklu komórkowego	zatrzymanie cyklu komórkowego	Kastan et al., 1992
<i>P21</i>	inhibitor CDK		El-Deiry et al., 1993
<i>miR-34a</i>	RNA niekodujące- miRNA		Navarro & Lieberman 2015
<i>SESN2</i>	komponent szlaku mTOR	autofagocytoza	Maiuri et al., 2009
<i>DRAM1</i>	białko lizosomalne		Maiuri et al., 2009
<i>PRKAB1</i>	kinaza białkowa		Feng et al., 2007

2.1.2. Mutacje w genie *TP53*

Gen *TP53* jest jednym z najczęściej mutujących genów w ludzkim organizmie. Pomimo zidentyfikowania ponad 30 000 mutacji somatycznych w *TP53* (Olivier et al., 2004; www.p53.iarc.fr), niewiele zostało dokładnie przebadanych pod kątem ich udziału w procesie nowotworzenia.

Do najczęściej występujących typów mutacji w genie *TP53* należą mutacje punktowe, takie jak substytucje pojedynczych nukleotydów, czy też delecje większej ilości nukleotydów (Muller & Vousden 2014). Delecje mogą prowadzić do przesunięcia ramki odczytu (ang. *frameshift mutation*), a w konsekwencji do syntezy niefunkcjonalnego białka o zmienionym składzie amiokwasowym, co jest typowe dla większości genów supresorowych. W przypadku *TP53* znacznie częściej dochodzi jednak do mutacji punktowych, gdzie substytucji ulega pojedynczy nukleotyd, powodując włączenie innego aminokwasu w tej pozycji (ang. *missense mutation*). Mutacje te stanowią około 75% wszystkich zmutowanych form *TP53* (Olivier et al., 2004; Muller & Vousden 2014). Przeważająca większość z nich jest skupiona w centralnym regionie genu, w którym zlokalizowanych jest sześć trójek nukleotydowych, podlegających mutacjom z niezwykle wysoką częstotliwością (ang. *hot spot*) (Freed-Pastor & Prives 2012; Muller & Vousden 2014). Zmutowane białko p53 traci swoją funkcję supresora nowotworowego, a nawet może zyskać zupełnie nowe funkcje pro-onkogenne (ang. *gain of function*) poprzez oddziaływanie z innymi białkami, a także poprzez aktywację ekspresji nowych genów docelowych. Dodatkowo zmutowane białko hamuje zdolność funkcjonalnej formy p53 do zapobiegania transformacji nowotworowej. Tworzy ono tetramer z prawidłową formą p53 i inhibuje jej działanie jako aktywatora transkrypcji genów i supresora nowotworowego (Freed-Pastor & Prives 2012). Zatem przywrócenie prawidłowej funkcji białka p53 jest najistotniejszym celem badań terapeutycznych.

Różne typy nowotworów wykazują odmienny wzór mutacji w genie *TP53*, a także inną ich częstotliwość. Jednym z nowotworów, w którym niezwykle często występują mutacje genu, jest surowiczy rak jajnika. Aż w 96% przypadków tego nowotworu występuje mutacja w genie *TP53* (Chambers & Martinez 2012). W nowotworach jelita grubego mutacja w *TP53* występuje u około 60% pacjentów (Rodrigues et al., 1990).

Całkowicie odmiennie prezentuje się wzór mutacji w nowotworach piersi, ponieważ jedynie w 25% przypadków występuje mutacja w genie *TP53* (Bourdon 2007).

Konsekwencje pojawiających się mutacji są zróżnicowane i mają różny wpływ na procesy komórkowe (Bourdon 2007). Często mutanty p53 są rozpatrywane w dwóch kategoriach. Pierwsze, znane jako mutanty kontaktowe, charakteryzują się zmianami w obrębie aminokwasów, które „kontaktują się” z DNA. W rezultacie zapobiegają przyłączaniu się zmutowanego białka p53 do genów docelowych. Drugą kategorię stanowią mutacje, które wyraźnie zmieniają trzecio- i czwartorzędową strukturę białka. Takie zmutowane białka p53 określane są, jako mutanty konformacyjne (Bourdon 2007; Freed-Pastor & Prives 2012).

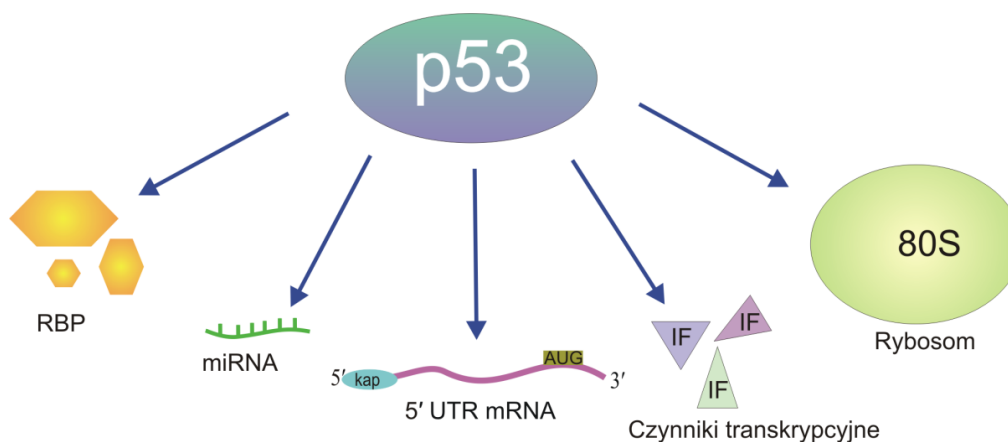
2.1.3. Białko p53 jako regulator translacji

Rola białka p53 jako aktywatora transkrypcji została dobrze poznana, jednak dopiero od niedawna badany jest jego udział w regulacji procesu translacji (Rys. 3). Wykazano, że białko p53 może kontrolować translację m.in. poprzez oddziaływanie z czynnikami inicjacji translacji, miRNA (ang. *micro RNA*) oraz białkami wiążącymi RNA – RBPs (ang. *RNA binding proteins*) (Marcel et al., 2015). Mechanizmy molekularne, za pomocą których białko p53 wpływa na translację poszczególnych mRNA, jak i globalną syntezę białek, są intensywnie badane (Marcel et al., 2010b; Marcel et al., 2015).

Białko p53 może kontrolować translację mRNA kodujących RBPs. Ujawniono, że w linii komórkowej raka piersi – MCF-7, pod wpływem czynników stresu genotoksycznego, około 100 cząsteczek mRNA kodujących RBP, może podlegać kontroli translacji przez białko p53. Potwierdzeniem tego, jest p53-zależna inhibicja translacji transkryptu *DDX17* (ang. *DEAD-Box helicase 17*), kodującego helikazę (Marcel et al., 2015). Co istotne, białko p53 może także działać jak RBP, kontrolując bezpośrednio translację poszczególnych mRNA. Przykładem jest mRNA *FGF2* (ang. *human fibroblast growth factor 2*), do którego białko p53 wiąże się w regionie 5'UTR, a następnie blokuje jego translację poprzez uniemożliwienie przyłączenia się rybosomu (Galy et al., 2001). Kolejnym dowodem jest kontrola translacji mRNA *CDK4* (ang. *cyclin dependent kinase 4*). Inhibicja translacji mRNA *CDK4* promuje zatrzymanie cyklu

komórkowego w fazie G1, w komórkach nabłonkowych płuc, co może prowadzić do nowotworzenia. Jednakże wpływ takiej kontroli translacji na kancerogenezę nie został jeszcze w pełni poznany (Ewen et al., 1995; Marcel et al., 2015).

Białko p53 ma także zdolność do regulacji translacji poszczególnych mRNA w sposób pośredni. Przykładem jest kontrola metylacji rRNA (ang. *ribosomal RNA*), występującego w rybosomach (Marcel et al., 2013). Regulacja odbywa się poprzez bezpośrednie wiązanie się i zahamowanie ekspresji genu *FBL* (ang. *methyl-transferase fibrillar*), odpowiedzialnego za metylację rRNA. W przypadku, gdy w komórce występuje wadliwe białko p53, ekspresja genu *FBL* nie zostaje zahamowana i rRNA ulega nieprawidłowej metylacji, a w konsekwencji rybosom nie jest w stanie przeprowadzić prawidłowej translacji. Dodatkowo wzrasta poziom inicjacji translacji kap-niezależnej onkogenów, co prowadzi do nowotworzenia (Marcel et al., 2015).



Rysunek 3. Funkcja białka p53 w regulacji translacji. Białko p53 może kontrolować translację poprzez oddziaływanie z sekwencją 5'UTR transkryptów mRNA, z czynnikami inicjacji translacji, przez wiązanie RBP, oddziaływanie z miRNA, a także reguluje biogenezę rybosomu. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Marcel et al., 2015).

Białko p53 wpływa również na globalną syntezę białek poprzez regulację aktywności polimeraz RNA niezbędnych do powstania funkcjonalnego rybosomu (Budde & Grummt 1999). Poprzez modulację aktywności polimeraz RNA, białko p53 inhibuje transkrypcję genów kodujących komponenty rybosomu. Natomiast, gdy gen *TP53* ulegnie mutacji, rybosomy są poddane niekontrolowanej syntezie, a w konsekwencji poziom translacji w komórce wzrasta. Prowadzi to do wzmożonej syntezy także

onkogenów. To wskazuje, że deregulacja translacji odgrywa kluczową rolę w procesie nowotworzenia (Loayza-Puch et al., 2013; Marcel et al., 2015).

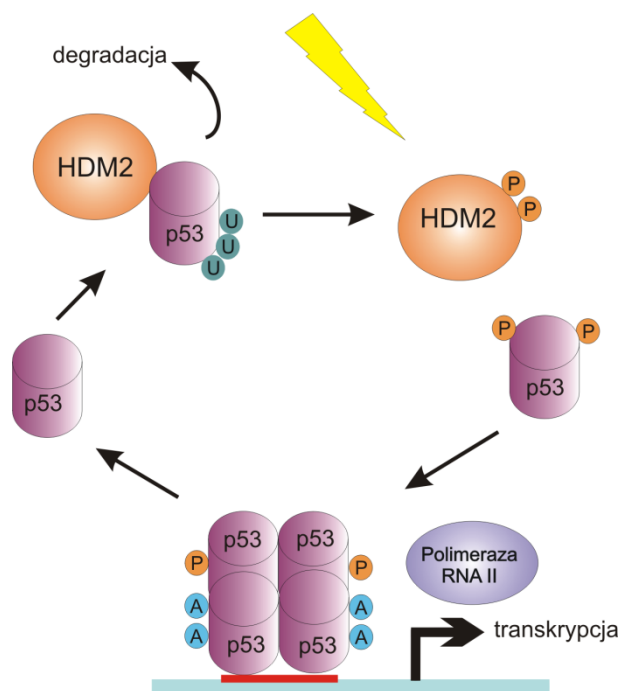
2.1.4. Regulacja aktywności białka p53

Istnieje wiele mechanizmów kontroli aktywności białka p53 w komórce. Głównym antagonistą p53 jest białko HDM2 (ang. *Human double minute 2*), znane również jako ligaza ubikwitynowa E3 (Momand et al., 1992; Yang et al., 2004). Regulacja p53 przez HDM2 może odbywać się na kilka sposobów. Jednym z nich jest wiązanie się do domeny transaktywacyjnej p53, a tym samym hamowanie jego zdolności do promowania transkrypcji poprzez blokowanie oddziaływania z maszyną transkrypcyjną. Dodatkowo HDM2 może powodować degradację p53 (Kussie et al., 1996; Michael & Oren 2003). Ubikwitynując reszty lizynowe, HDM2 inicjuje proces degradacji p53, dzięki czemu w komórkach nie poddanych działaniu czynników stresowych białko p53 jest utrzymywane na niskim poziomie i ma okres półtrwania zaledwie od 5 do 30 minut (Moll & Petrenko 2003). Jednakże, kiedy w warunkach stresu komórkowego niezbędna jest akumulacja p53, interakcja pomiędzy białkami musi zostać przerwana. Fosforylacja reszty serynowej w pozycji 15 i reszty treoninowej w pozycji 18 białka p53 powoduje zmniejszenie powinowactwa do HDM2. Zmniejszone powinowactwo białek może być także spowodowane przez potranslacyjne modyfikacje białka HDM2. Prowadzi to do uwolnienia p53, jego zahamowanej degradacji i akumulacji w komórce. Modyfikacje HDM2 obejmują głównie fosforylację reszty serynowej w pozycji 395 oraz tyrozynowej w pozycji 394 (Rys. 4) (Yang et al., 2004).

Ekspresja genu *HDM2* może także podlegać regulacji przez białko p53. Interakcja białka p53 z dwoma sąsiadującymi elementami sekwencyjnymi RE, obecnymi w genie *HDM2*, promuje transkrypcję HDM2 (Michael & Oren 2003). W konsekwencji, dochodzi do zwiększonej syntezy białka HDM2, które wiąże się z p53 i zmniejsza jego zdolność do stymulacji ekspresji genu *HDM2*. W ten sposób białka p53 i HDM2 wzajemnie oddziałując tworzą regulacyjną pętlę sprzężenia zwrotnego (Wu et al., 1993; Moll & Petrenko 2003).

Niezwykle istotna jest regulacja ilości białka p53 w komórce na poziomie translacji jego mRNA (Mosner et al., 1995; Takagi et al., 2005). Ujawniono, że białko rybosomalne

RPL26 (ang. *ribosomal protein 26*) ma kluczowy wpływ na translację mRNA p53 (Takagi et al., 2005; Chen & Kastan 2010). Zaobserwowano, że w komórkach poddanych promieniowaniu jonizującemu, prowadzącego do zniszczenia DNA, RPL26 przyłącza się do 5'UTR mRNA p53 i stymuluje jego translację. Akumulacja i aktywacja białka p53 prowadzi do zatrzymania wzrostu i apoptozy komórki. Co ciekawe, białko RPL26 ma istotnie większy wpływ na translację mRNA p53 typu dzikiego niż na mRNA p53 posiadającego mutacje. Ponadto zaobserwowano, że mutacje w genie *RPL26* powodują kancerogenezę jak i anemię, co podkreśla kluczową rolę białka RPL26 w stymulacji aktywności anty-nowotworowej białka p53 (Takagi et al., 2005; Chen & Kastan 2010; Gazda et al., 2012). Dodatkowo p53 ma zdolność do autoregulacji ekspresji. Poprzez oddziaływanie z własnym transkrypcyjnym mRNA, z regionem 5'UTR, regulowany jest proces jego translacji (Mosner et al., 1995).



Rysunek 4. Schemat regulacji p53 przez białko HDM2. HDM2 hamuje aktywność p53, poprzez jego ubiquitylację i degradację. Fosforylacja HDM2 i p53 wstrzymuje interakcję pomiędzy białkami (na podstawie Moll & Petrenko 2003).

Szczególnie ciekawym przykładem kontroli poziomu p53 w komórce jest interakcja z jego naturalnym, antysensowym transkrypcyjnym – Wrap53. Wykazano, że transkrypty RNA

Wrap53 i p53 oddziałują ze sobą poprzez nachodzące na siebie, w pełni komplementarne sekwencje. Egzon 1 mRNA Wrap53 wiąże się do egzonu 1 mRNA p53, w regionie 5'UTR. W konsekwencji, pozytywnie stymulowana jest translacja białka p53 (Mahmoudi et al., 2009).

2.2. Organizacja i ekspresja genu *TP53*

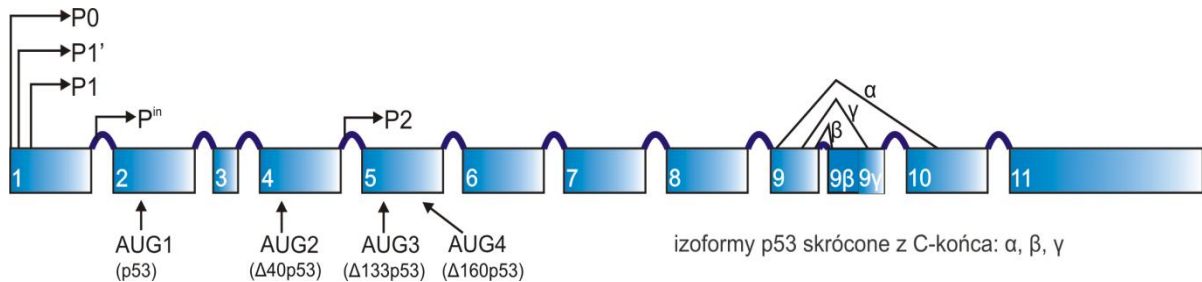
Gen *TP53* jest wysoce zakonserwowany wśród organizmów eukariotycznych. U człowieka znajduje się on na chromosomie 17 (17p13.1) (Lane et al., 2010) i składa się z około 20 000 par zasad, wśród których możemy wyróżnić 11 egzonów i 10 intronów. Egzon pierwszy i część egzonu drugiego stanowią region nieulegający translacji 5' (5'UTR, ang. *5' untranslated region*), natomiast większa część egzonu 11 stanowi 3'UTR (ang. *3' untranslated region*).

W latach 80 ubiegłego wieku zaobserwowano, że z genu *TP53* mogą powstawać skrócone warianty mRNA, z których syntetyzowane są odmienne białka. Doprowadziło to do powstania teorii o występowaniu kilku izoform białka p53. Kolejne lata badań nad ekspresją genu *TP53* dowiodły, iż w rezultacie wykorzystania różnych promotorów transkrypcyjnych, różnych miejsc inicjacji translacji oraz alternatywnego splicingu, możliwa jest synteza wielu izoform białka p53. Jak dotąd, zostało zidentyfikowanych aż 12 izoform.

2.2.1. Alternatywne miejsca inicjacji transkrypcji genu *TP53*

Początkowo uważano, że miejsce inicjacji transkrypcji P0 znajdujące się w egzonie 1 genu *TP53* jest jedynym promotorem transkrypcyjnym. Obecnie znanych jest przynajmniej 5 miejsc promotorowych: P0, P1 i P1' mieszczących się w egzonie 1, P1ⁱⁿ oraz P2 położonych odpowiednio w intronach 2 i 4 (Rys. 5). Różne położenie promotorów w regionie terminalnym 5' genu *TP53* sprawia, że generowane są transkrypty RNA o odmiennej długości. Z miejsca inicjacji transkrypcji P0, położonego najbliżej końca 5', powstaje transkrypt o najdłuższym 5'UTR – 248 nukleotydów, natomiast z promotora

P1 transkrypt o długości 5'UTR równej 144 nt. Pomiędzy P0 i P1 znajduje się promotor P1', długość 5'UTR dla transkryptu rozpoczynającego się od tego promotora wynosi 190 nt (Tuck & Crawford 1989; Strudwick et al., 2003). Funkcja transkryptu powstałego z promotora P1ⁱⁿ nie została jak dotąd określona. Pomimo występowania w komórkach transkryptów o różnej długości, w przeważającej większości białko p53 w tkankach prawidłowych jest syntetyzowane z transkryptu inicjowanego z promotora P0 (Strudwick et al., 2003).



Rysunek 5. Struktura genu *TP53*. W egzonie pierwszym zlokalizowane są trzy miejsca inicjacji transkrypcji: P0, P1, P1', w intronach 1 oraz 4 występują odpowiednio regiony promotorowe Pⁱⁿ i P2. Kodony inicjacji translacji dla białek p53, Δ40p53, Δ133p53 i Δ160p53 znajdują się odpowiednio w egzonach 2, 4 i 5. Na rycinie zaznaczono także warianty splicingowe egzonu 9. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Swiatkowska et al., 2016).

Ilość różnych transkryptów mRNA p53 w poszczególnych typach komórek może znacznie odbiegać od siebie (Strudwick et al., 2003). Dodatkowo, zaobserwowano dużą rozbieżność w występowaniu transkryptów p53 między rakowymi a zdrowymi liniami komórkowymi. Komórki nie rakowe cechują się występowaniem głównie transkryptów inicjowanych z promotorów P0 oraz P1'. Natomiast transkrypty zainicjowane z promotora P1 pojawiają się w liniach komórkowych nowotworowych: MCF-7, H460 i MSK-Leuk1 lub nienowotworowych nieśmiertelnych liniach komórkowych takich jak BEAS-2B (Strudwick et al., 2003; Swiatkowska et al., 2016).

2.2.2. Kodony inicjacji translacji AUG

Regulacja ekspresji genu *TP53* może odbywać się nie tylko poprzez wykorzystanie różnych promotorów transkrypcyjnych, lecz także na poziomie translacji. Występowanie

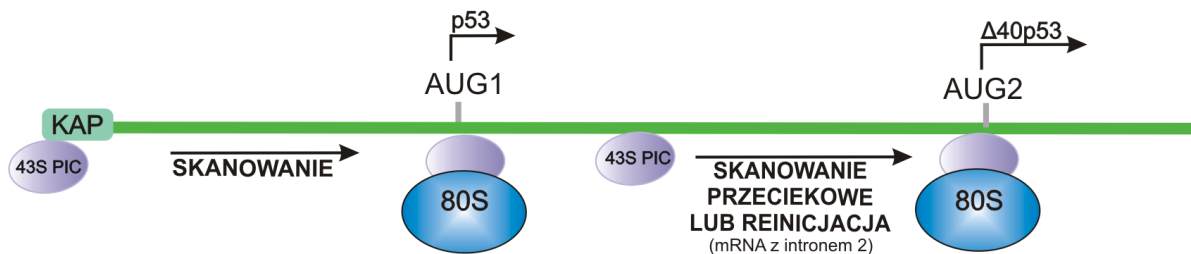
kilku kodonów AUG w mRNA p53 powoduje syntezę izoform białkowych skróconych z końca aminowego (Rys. 5, 7). Do izoform najliczniej występujących w komórkach ludzkich należą p53 pełnej długości oraz izoforma $\Delta 40p53$ pozbawiona pierwszych 39 aminokwasów. Kodon AUG1 inicjujący syntezę p53 znajduje się w egzonie 2 genu *TP53*, natomiast kodon AUG2 dla izoformy $\Delta 40p53$ zlokalizowany jest w egzonie 4 (Rys. 5) (Bourdon et al., 2005). W dalszej części genu, w egzonie 5, wykazano obecność kolejnych kodonów inicjacyjnych – AUG3 i AUG4. Z kodonu AUG3 zachodzi synteza izoformy $\Delta 133p53$, skróconej o pierwsze 132 aminokwasy, tymczasem od oddalonego o 84 nukleotydy, kodonu inicjacyjnego AUG4 generowana jest izoforma $\Delta 160p53$ (Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010a).

Postuluje się, że inicjacja translacji mRNA p53 może przebiegać także niezależnie od struktury kap, lecz z wykorzystaniem elementu wewnętrznego wiązania rybosomu – IRES (ang. *internal ribosome entry site*) (Candeias et al, 2006; Yang et al., 2006). Jest to element struktury drugorzędowej mRNA, do którego bezpośrednio wiąże się rybosom i rozpoczyna identyfikację kodonu inicjacyjnego (Rys. 6) (Pelletier & Sonenberg 1988). Mechanizm IRES-zależnej translacji jest aktywny głównie w komórkach poddanych działaniu czynników stresowych. W takich warunkach kap-zależna inicjacja translacji zostaje zahamowana z powodu braku stabilności kompleksu preinicjacyjnego wywołanego m.in. przez fosforylację czynników inicjacji translacji (Grover et al., 2009). Co ciekawe, szacuje się, że około 10% wszystkich komórkowych mRNA posiada w regionie terminalnym 5' elementy IRES (Candeias et al, 2006).

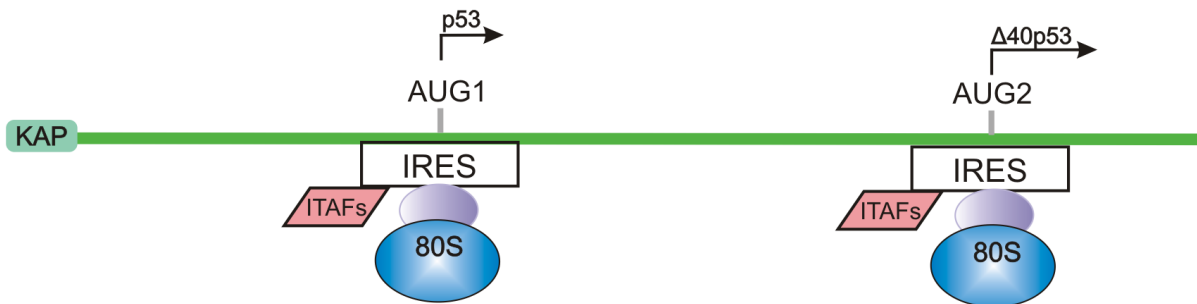
Wyniki badań nad mechanizmem translacji mRNA p53 przeprowadzone przez Candeias i współpracowników sugerują, że IRES zlokalizowany jest w obrębie nukleotydów +1 do +120 sekwencji kodującej mRNA p53 (Candeias et al, 2006). Wskazuje to na syntezę izoformy $\Delta 40p53$ w sposób zależny od elementu IRES. Ponadto, badania *in vitro* inhibicji syntezy białek p53 i $\Delta 40p53$ w obecności wolnego analogu kapu wykazały, że inicjacja translacji rozpoczynająca się od AUG1 jest zahamowana, podczas gdy zachodząca z kodonu AUG2 jest tylko nieznacznie obniżona. To wskazuje na kap-niezależny przebieg translacji z kodonu AUG2 dla izoformy $\Delta 40p53$ (Górska et al., 2013). Dodatkowo, wysoka zawartość par GC w regionie 5'UTR mRNA p53 i obecność termodynamicznie stabilnych struktur spinki do włosów wspierają hipotezę występowania

elementu IRES (Błaszczyk & Ciesiolka 2011). Co więcej, usunięcie niektórych elementów strukturalnych z regionu terminalnego 5' mRNA p53 powoduje zahamowanie IRES-zależnej translacji, co sugeruje, że motywy typu spinki do włosów znajdujące się w tym regionie odpowiadają za translację niezależną od kapu (Zydowicz-Machtel et al., 2018).

Translacja kap-zależna



Translacja IRES-zależna



Rysunek 6. Inicjacja translacji zależnej od struktury kapu i elementu IRES dla pełnej długości p53 oraz izoformy $\Delta 40p53$. W translacji kap-zależnej, 43S PIC skanuje region terminalny 5' mRNA p53 w poszukiwaniu pierwszego kodonu inicjacyjnego dla białka p53 o pełnej długości. Skanowanie przeciekowe lub reinicjacja umożliwiają inicjację translacji z AUG2 dla $\Delta 40p53$. Translacja IRES-zależna dla białek: p53 i $\Delta 40p53$, opiera się na rozpoznaniu motywów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 przez rybosomalny kompleks inicjacyjny. Proces ten wspierany jest przez czynniki pomocnicze, ITAF (na podstawie Swiatkowska et al., 2016).

2.2.3. Warianty splicingowe białka p53

Pierwsze doniesienia literaturowe na temat alternatywnego splicingu mRNA p53 pojawiły się w późnych latach 80-tych ubiegłego wieku (Arai et al., 1986; Joruz & Bourdon 2016). Początkowo zaobserwowano zjawisko alternatywnego wycinania intronów u myszy, gdzie po transfekcji komórek mysim *Trp53* wykryto białka różniące się składem aminokwasowym na końcu karboksylowym (Arai et al., 1986). W późniejszych latach zjawisko to zostało odkryte również u człowieka. Obecnie wiadomo jest, że alternatywny splicing egzonu 9 prowadzi do powstania izoform białkowych α , β oraz γ (Rys. 7) (Flaman et al., 1996; Surget et al., 2013). Poprzez całkowite wycięcie intronu 9 powstaje forma α o najdłuższym końcu karboksylowym. Niepełne wycięcie intronu 9, jak i znajdujące się w intronie kodony stop, prowadzą do powstania izoform β oraz γ , krótszych odpowiednio o 76 oraz 71 aminokwasów. Przypuszcza się, że izoformy te mogą posiadać odmienną od formy α funkcję w komórce, jednakże molekularne podłoże alternatywnego splicingu intronu 9 mRNA p53 wciąż pozostaje niewyjaśnione (Surget et al., 2013).

Co ciekawe, alternatywny splicing zaobserwowano również w przypadku intronu 2. Gdy dochodzi do niepełnego wycięcia intronu 2, w którym znajdują się trzy kodony terminacji translacji, z kodonu AUG1 syntetyzowane jest skrócone białko. Następnie, dochodzi do reinicjacji translacji z kodonu AUG2 prowadzącej do powstania izoformy $\Delta 40p53$ pozbawionej pierwszych 39 aminokwasów (Ghosh et al., 2004; Marcel & Hainaut 2009).

Izoformy białka p53 skrócone z końca karboksylowego charakteryzują się różną lokalizacją subkomórkową (Bourdon et al., 2005). W większości komórek p53, $\Delta 133p53$ oraz p53 β znajdują się głównie w jądrze komórkowym, lecz możliwe jest wykrycie ich niewielkiej ilości również w cytoplazmie. Izoforma p53 γ może być zlokalizowana zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, natomiast izoforma $\Delta 133p53\gamma$ występuje jedynie w cytoplazmie. Zróżnicowane występowanie izoform skróconych z końca karboksylowego wskazuje, że C-terminalne aminokwasy mogą determinować lokalizację subkomórkową tych izoform (Bourdon et al., 2005).

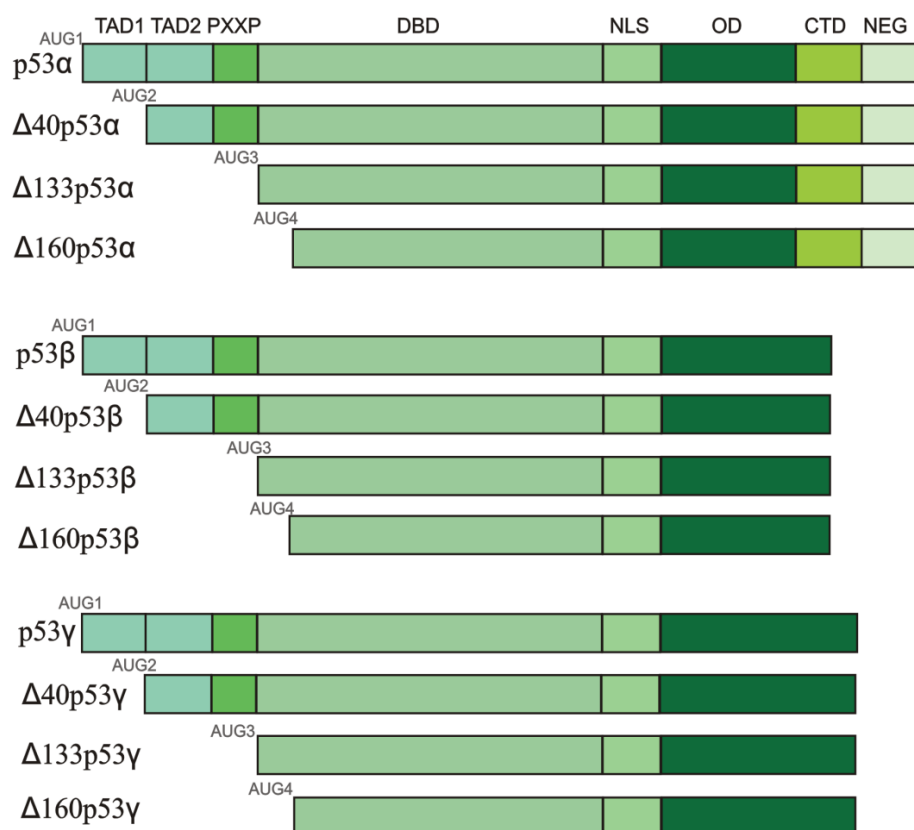
2.3. Budowa białka p53

Gen *TP53* koduje białko zawierające 393 aminokwasy, składające się z siedmiu domen funkcjonalnych (Jänicke et al., 2009; Marcel et al., 2013; Surget et al., 2013). Białko p53 zawiera N-kończącą domenę transaktywacyjną (TAD, ang. *transactivation domain*), domenę bogatą w proliny (PXXP), centralnie zlokalizowaną domenę wiążącą DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*), domenę lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*), domenę oligomeryzacyjną (OD, ang. *oligomerization domain*) oraz C-kończącą domenę negatywnej regulacji (ang. *negative-regulation domain*) (Surget et al., 2013) (Rys. 7). Na podstawie migracji w żelu poliakrylamidowym oszacowano wielkość białka p53 na 53 kDa (skąd nazwa białka), choć jego faktyczna masa cząsteczkowa wynosi 43,7 kDa. Przymuszcza się, że taka migracja jest konsekwencją dużej zawartości reszt proliny (Levine & Oren 2009).

N-kończąca domena transaktywacyjna, TAD, jest niezbędna do prawidłowej aktywacji transkrypcji genów, regulowanych przez białko p53 (Marcel et al., 2013; Surget et al., 2013). Składa się z dwóch różnych poddomen: TAD1, która obejmuje aminokwasy od 1 do 42 i TAD2, która obejmuje aminokwasy od 43 do 63. Badania wykazały, że cztery hydrofobowe aminokwasy: leucyna w pozycji 22, tryptofan w pozycji 23, tryptofan w pozycji 53 oraz fenyloalanina w pozycji 54 są szczególnie istotne dla zachowania transaktywacyjnej funkcji białka p53 (Freed-Pastor & Prives 2012). Ponadto, domena ta stanowi miejsce oddziaływania z białkami regulatorowymi, takimi jak: acetylaza p300 czy ubikwitynaza HDM2. Wiążąc się do TAD1, białko HDM2 inhibuje oddziaływanie białka p53 z genem docelowym i czynnikami inicjacji transkrypcji powodując zahamowanie aktywności transkrypcyjnej białka p53 (Freed-Pastor & Prives 2012).

Domena wiążąca DNA, DBD, obejmująca aminokwasy od 102 do 306, jest najbardziej zachowaną ewolucyjnie domeną białka p53 (Joriz & Bourdon 2016). Jej wysoce zakonserwowane cysteiny oraz histydyny wiążą koordynacyjnie jony Zn^{2+} i Mg^{2+} , niezbędne do utrzymania prawidłowej struktury białka oraz zdolności wiązania DNA (Pavletich et al., 1993; Joriz & Bourdon 2016). Dodatkowo domena ta może

podlegać acetylacji w warunkach stresu genotoksycznego uszkodzającego DNA. Acetylowana jest reszta lizynowa w pozycji 120, aminokwas podlegający częstej mutacji. Zmiana z lizyny na argininę wyklucza możliwość acetylacji i w rezultacie nie jest aktywowana ścieżka apoptozy związanej z p53. Ta mutacja jest bardzo częsta w ludzkich nowotworach. Większość mutacji w p53 to mutacje punktowe, skupione w domenie wiążącej DNA (Sykes et al., 2006). Dodatkowo, domena ta stanowi miejsce wiązania białka HDM2. Oddziaływanie N-terminalnego końca białka HDM2 z aminokwasami w pozycjach od 234 do 286 jest niezbędne do prawidłowej ubikwitinacji białka p53 (Poyurovsky et al. 2010).



Rysunek 7. Izofomy białka p53 wraz z zaznaczonymi domenami. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Surget et al., 2013).

Wysoce zakonserwowana domena lokalizacji jądrowej, NLS, jest bogata w leucyny i obejmuje aminokwasy od 316 do 325. Odpowiada za migrację zsyntetyzowanego białka p53 z cytoplazmy do jądra komórkowego. Zdolność do zatrzymania p53 w jądrze ma

kluczowe znaczenie dla komórki, gdyż tylko białko w nim zlokalizowane jest aktywne i może pełnić funkcję regulatorową w odpowiedzi na czynniki stresowe (Stommel et al., 1999).

Za aktywację transkrypcyjnej funkcji białka p53 odpowiada domena oligomeryzacyjna – OD. Obejmuje ona aminokwasy od 307 do 355 i pośredniczy w tworzeniu IV-rzędowej struktury białka w formie tetrameru. Monomery białkowe łączą się ze sobą poprzez domenę oligomeryzacyjną stanowiąc formę dimeru, natomiast dwa oddziałujące ze sobą dimery tworzą tetramer o strukturze nazywanej pęczkiem helis (ang. *helix bundle*) (Rustandi et al., 2000).

C-końcowa domena negatywnej regulacji, nazywana również C-końcową domeną – CTD (ang. *C-terminal domain*), obejmuje aminokwasy od 363 do 393. Podlega ona wielu modyfikacjom potranslacyjnym, głównie fosforylacji, stabilizującej białko oraz ubikwitynacji regulującej ilość p53 w komórce. Wysoka zawartość reszt serynowych i lizynowych sprawia, że region ten podlega licznym modyfikacjom. Co więcej, domena ta ma istotne znaczenie dla aktywności transkrypcyjnej białka p53 poprzez zwiększanie jego powinowactwa do specyficznych sekwencji RE docelowego genu (Surget et al., 2013). Co istotne, dowiedziono, że białko HDM2 może również bezpośrednio oddziaływać z domeną CTD (Poyurovsky et al., 2010). Postuluje się, że interakcja pomiędzy tą domeną, a N-końcowym regionem białka HDM2, ułatwia zmianę struktury HDM2 do formy otwartej i stymuluje wiązanie się do TAD1. Formowanie się takiego kompleksu jest regulowane przez modyfikacje potranslacyjne w C-terminalnym końcu białka p53. Prawdopodobnie modyfikacje przerywają interakcje nie tylko z HDM2, lecz także zmieniają ogólną strukturę białka, uniemożliwiając również oddziaływanie HDM2 z TAD1 (Poyurovsky et al., 2010).

2.4. Izoforma $\Delta 40p53$

Izoforma $\Delta 40p53$ była pierwszą odkrytą izoformą białka p53 u człowieka (Courtois et al., 2002). Nazywana jest również p47 ze względu na jej masę 47 kDa, a także $\Delta Np53$, ponieważ początkowo sądzono, że $\Delta 40p53$ jest jedyną izoformą białka p53

skróconą z końca aminowego. $\Delta 40p53$ pozbawiona jest domeny transaktywacyjnej, zatem jej zdolność do aktywacji transkrypcji genów jest ograniczona. Ponadto nieobecność tej domeny uniemożliwia również oddziaływanie z białkiem HDM2, a w konsekwencji sprawia, że izoforma nie jest degradowana przez proteasom, w przeciwieństwie do p53. Dzięki temu, okres półtrwania $\Delta 40p53$ w komórce jest znacznie dłuższy i wynosi 9,5 godziny (Marcel & Hainaut 2009). Podobnie jak p53, izoforma $\Delta 40p53$ posiada domenę DBD, dzięki której ma zdolność do wiązania DNA. Jednakże brak końca aminowego, umożliwiającego rekrutację czynników remodelujących chromatynę, nie pozwala $\Delta 40p53$ na równie efektywne regulowanie ekspresji genów (Courtois et al., 2002; Powell et al., 2008; Olivares-Illana & Fahraeus 2010).

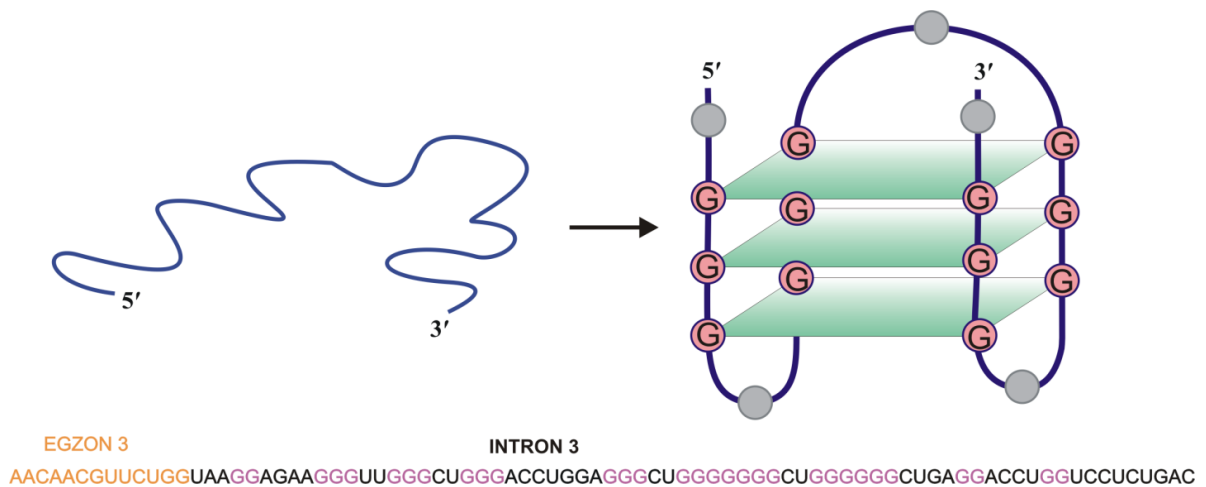
2.4.1. Synteza izoformy $\Delta 40p53$

Zaproponowano kilka mechanizmów syntezy izoformy $\Delta 40p53$. Jednym z nich jest translacja izoformy rozpoczynająca się bezpośrednio od kodonu AUG2 z udziałem elementu IRES. Pierwsze doniesienia literaturowe na temat wewnętrznej inicjacji translacji zostały przedstawione w 1987 roku, kiedy wysoce zakonserwowana sekwencja Kozak (konsensus -GCC GCC (A/G)CC ATG G) została zidentyfikowana w obrębie kodonu 40 (Kozak 1987; Rovinski et al., 1987). W tym samym roku pojawiły się dowody na istnienie alternatywnego splicingu intronu 2 (Matlashewski et al., 1987). Po analizie danych uzyskanych z biblioteki cDNA (ang. *complementary DNA*) ludzkich fibroblastów napletka, wykryto mRNA genu *TP53* zawierające intron 2. W kolejnych latach udowodniono, że izoforma $\Delta 40p53$ może być generowana z transkryptu posiadającego intron 2, a także, że translacja zachodząca z kodonu AUG2 może przebiegać w sposób IRES-zależny (Candeias et al., 2006; Ray et al., 2006).

Najnowsze badania wykazały, że izoforma $\Delta 40p53$ może powstawać także na drodze cięcia białka p53 przez proteasom 20S (Solomon et al., 2017). Okazało się, że proteasom 20S nie degraduje p53 do końca, lecz tnie białko dokładnie w pozycji 40, wytwarzając produkt o takiej samej sekwencji aminokwasowej jak $\Delta 40p53$. Dodatkowo ujawniono, że w warunkach stresu oksydacyjnego zwiększa się ilość izoformy $\Delta 40p53$

powstałej na drodze cięcia proteolitycznego, co prowadzi do atenuacji aktywności transkrypcyjnej p53 (Solomon et al., 2017).

W ostatnich latach zaproponowano, że drugorzędowa struktura RNA, taka jak G-kwadrupleks, może pełnić istotną rolę w regulowaniu splicingu (Marcel et al., 2011). Jest to struktura powstająca z powodu dużej zawartości reszt guanozyny, które w wyniku oddziaływania tworzą cztero-niciową strukturę. Zaobserwowano, że w intronie 3 genu *TP53* znajduje się sekwencja nukleotydowa bogata w zasady guaninowe, która może formować G-kwadrupleks (Rys. 8). Motywy G-kwadrupleksu mogą kontrolować syntezę $\Delta 40p53$ poprzez stymulację pełnego wycinania intronu 2, przy czym mutacje tego motywu powodują zachowanie intronu 2 i prowadzą do syntezy mRNA $\Delta 40p53$ (Marcel et al., 2011).



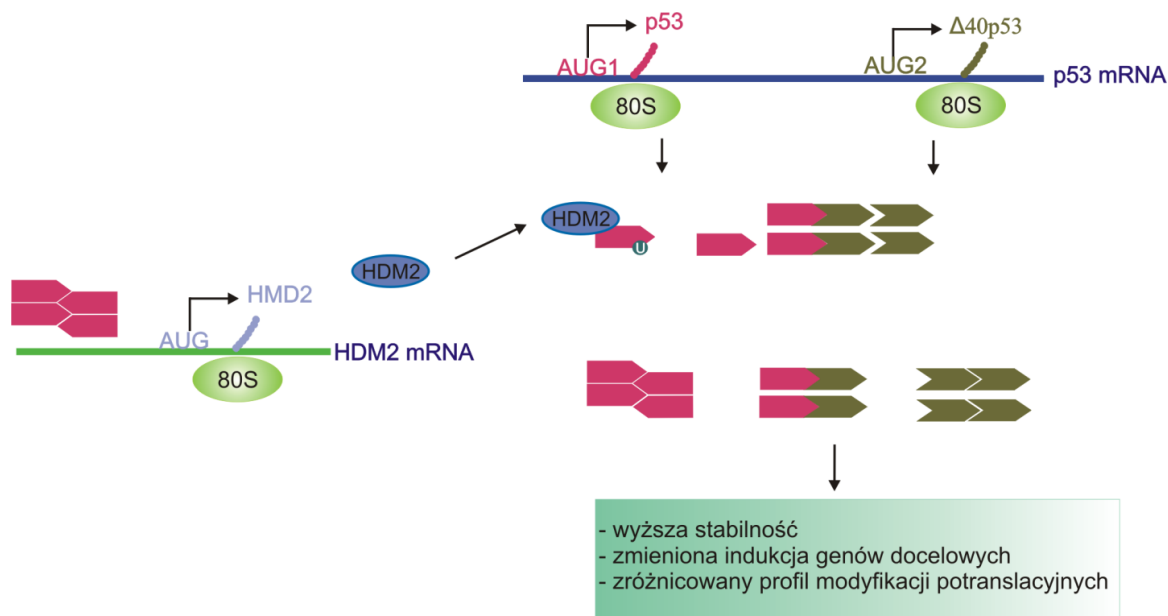
Rysunek 8. Schematyczne przedstawienie struktury kwadrupleksu odcinków sekwencji nukleotydowej bogatej w guanozyny w intronie 3 genu *TP53*. Sekwencja egzonu 3 zaznaczona jest na pomarańczowo, sekwencja intronu oznaczona jest kolorem czarnym, a powtórzenia guanozyn kolorem różowym. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Marcel et al., 2011).

Początkowo twierdzono, że proces translacji zachodzący od kodonu AUG2, dla izoformy $\Delta 40p53$, nie jest indukowany w odpowiedzi na czynniki stresowe (Courtois et al., 2002). Jednakże dalsze badania udowodniły aktywację kap-niezależnej translacji zachodzącej z kodonu AUG2 w odpowiedzi na stres siateczki śródplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum*) wywołany tapsygarginą i tunikamycyną

(Schroder & Kaufman 2005; Bourougaa et al., 2010). Ponadto, kolejne badania wykazały wzrost syntezy $\Delta 40p53$ wywołany poprzez stres głodu, związany z obniżeniem zawartości substancji odżywczych w komórce (Khan et al., 2015). Wzrost syntezy $\Delta 40p53$ spowodowany może być również czynnikami stresu genotoksycznego, które stymulują akumulację tej izoformy w komórce (Powell et al., 2008).

2.4.2. Rola kompleksu białek $\Delta 40p53$ i p53

Izoforma $\Delta 40p53$ może tworzyć oligomery z białkiem p53 (Ghosh et al., 2004; Powell et al., 2008). Oddziałując z C-terminalną domeną oligomeryzacyjną białka p53, $\Delta 40p53$ tworzy kompleksy heterooligomerów z p53, a także homooligomerów z samym sobą (Rys. 9) (Ghosh et al., 2004; Grover et al., 2009). Zaproponowano również, że $\Delta 40p53$ może kontrolować degradację oraz ubikwitynację p53, poprzez osłabienie jego oddziaływania z HDM2 (Ghosh et al., 2004). Tworząc heterotetramery z p53, $\Delta 40p53$ uniemożliwia wiązanie się do genu *HDM2* i aktywację jego transkrypcji, co skutkuje obniżoną syntezą HDM2 (Ghosh et al., 2004; Grover et al., 2009).



Rysunek 9. Wpływ izoformy $\Delta 40p53$ na aktywność białka p53. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Grover et al., 2009).

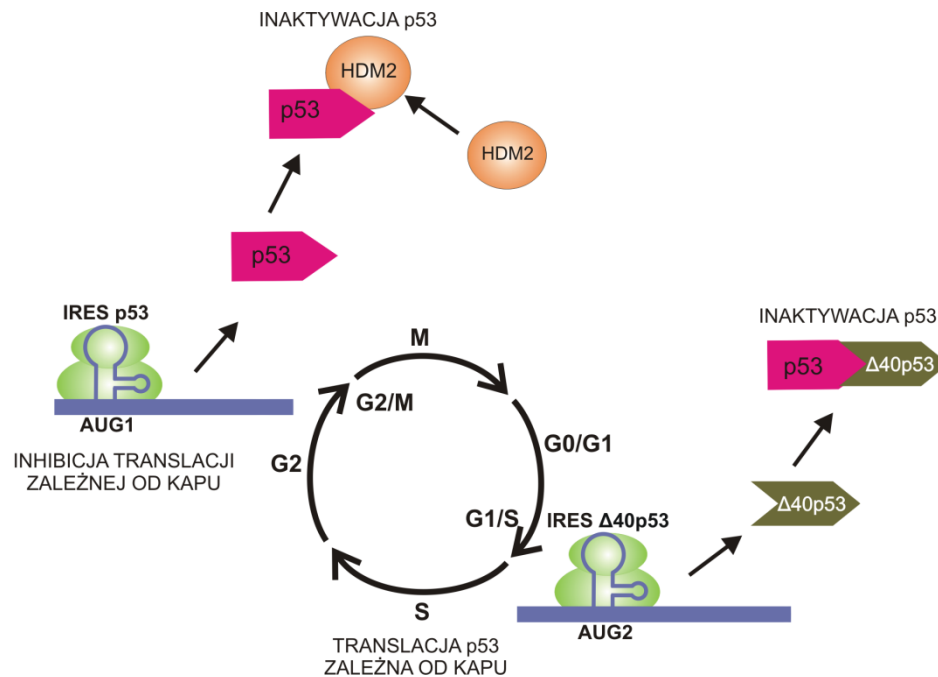
Wykazano, że izoforma $\Delta 40p53$ może hamować zdolność białka p53 do transaktywacji genów docelowych (Rys. 9). Modulacja może odbywać się poprzez bezpośrednie wiązanie $\Delta 40p53$ z genami aktywowanymi przez p53, co nie powoduje aktywacji transkrypcji genów (Ghosh et al., 2004; Olivares-Illana & Fahraeus 2010). Zaproponowano także, że $\Delta 40p53$ może wpływać na profil modyfikacji potranslacyjnych tetrameru p53, co utrudnia rekrutację koaktywatorów inicjacji transkrypcji. Zmiany te mogą również hamować wiązanie z regionami promotorowymi i interakcję z maszyną transkrypcyjną, co ostatecznie zmienia wzór indukcji transkrypcji genów docelowych (Powell et al., 2008; Grover et al., 2009). Ponadto, badania na mysim homologu izoformy $\Delta 40p53$ – p44, pokazały, że zwiększenie tej ilości izoformy w komórce skutkuje starzeniem się komórek zależnym od p53 i znacznie obniżoną żywotnością myszy (Maier et al., 2004).

Wydaje się, że poziom izoformy $\Delta 40p53$ w komórce wpływa na jej funkcje (Hafsi et al., 2013). W badaniu przeprowadzonym przez Hafsi i współpracowników wykazano, że gdy poziom izoformy $\Delta 40p53$ jest wyższy niż poziom białka p53, $\Delta 40p53$ hamuje funkcje p53. Jednak, gdy ilość $\Delta 40p53$ jest niższa lub równa p53, $\Delta 40p53$ działa jako wzmacniacz lub inhibitor aktywności transkrypcyjnej p53, w zależności od badanej linii komórkowej (Hafsi et al., 2013). Sugerowano, że te sprzeczne efekty wynikają z modulacji aktywności p53, w następstwie zmiany wiązania podstawowej maszyny transkrypcyjnej do heterotetrameru $\Delta 40p53/p53$, a tym samym obniżenia aktywności transkrypcyjnej p53 pełnej długości (Avery-Kiejda et al., 2013; Hafsi et al., 2013). Badania te podkreślają, że $\Delta 40p53$ pełni ważną rolę fizjologiczną w organizmie oraz, że równowaga pomiędzy ilością białek p53 i $\Delta 40p53$ jest niezbędna dla kontrolowania procesów przebiegających w komórce (Grover et al., 2009; Olivares-Illana & Fahraeus 2010).

Izoforma $\Delta 40p53$ może także pełnić alternatywne funkcje, bowiem podobnie jak białko p53, może indukować ścieżkę apoptotyczną w komórce. Odbywa się to poprzez indukcję transkrypcji genów odpowiedzialnych za apoptozę: P53BP2 (ang. *tumor protein p53 binding protein 2*) oraz TIAL1 (ang. *TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein-like 1*), które nie są aktywowane przez białko p53. Co więcej, analizy transkryptomyczne komórek raka kości wskazują na zdolność $\Delta 40p53$ do regulacji około 30% genów docelowych p53, włączając gen *BAX*. W rezultacie oprócz inhibitora

transaktywacyjnej funkcji p53, $\Delta 40p53$ ma także zdolność do indukcji jego genów docelowych (Ohki et al., 2007; Marcel & Hainaut 2009).

Wykazano, że poziom białek, zarówno p53 jak i $\Delta 40p53$, wzrasta w odpowiedzi na różne czynniki stresowe, bez wzrostu poziomu mRNA (Bourougaa et al., 2010; Yin et al., 2002; Candeias et al., 2006). Ponadto, poziom białek p53 oraz $\Delta 40p53$ zmienia się w różnych fazach cyklu komórkowego (Rys. 10). Wyniki te wskazują, że translacja mRNA p53 odgrywa ważną rolę w zmianie względnych poziomów ekspresji p53 i $\Delta 40p53$ w warunkach stresowych. Klasycznym mechanizmem odpowiedzi komórki na stres jest wzmożona synteza białka p53, a następnie aktywacja genu *p21* oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Czynniki stresowe mogą jednak zahamować translację kap-zależną dla białka p53 i aktywować mechanizm IRES-zależnej translacji dla białka $\Delta 40p53$, które jest silnym supresorem ekspresji *p21* zależnej od p53. Zatem izoforma $\Delta 40p53$ ma zdolność do zapobiegania zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G1 (Bourougaa et al., 2010; Olivares-Illana & Fahraeus 2010).



Rysunek 10. Schemat regulacji translacji mRNA p53 z wykorzystaniem elementów IRES obecnych w jego regionie niekodującym 5'. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Blaszczyk et al., 2007).

Białko p53 może powodować również zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2. Zatrzymanie cyklu wywołane jest przez nadekspresję genu *14-3-3 σ* , zależną od białka p53. Sądzi się, że białko 14-3-3 σ może dodatkowo stymulować IRES-zależną syntezę, głównie białka p53, a w mniejszym stopniu również izoformy Δ 40p53, poprzez blokowanie czynników inicjacji translacji (Wilker et al., 2007). Silnym inhibitorem kap-zależnej translacji jest stres siateczki śródplazmatycznej, prowadzący do wzmożonej translacji IRES-zależnej, w efekcie której powstają białko p53 jak i Δ 40p53. Białka te stymulują również syntezę białka 14-3-3 σ , które w rezultacie hamuje cykl komórkowy w fazie G2 (Bourougaa et al., 2010; Olivares-Illana & Fahraeus 2010).

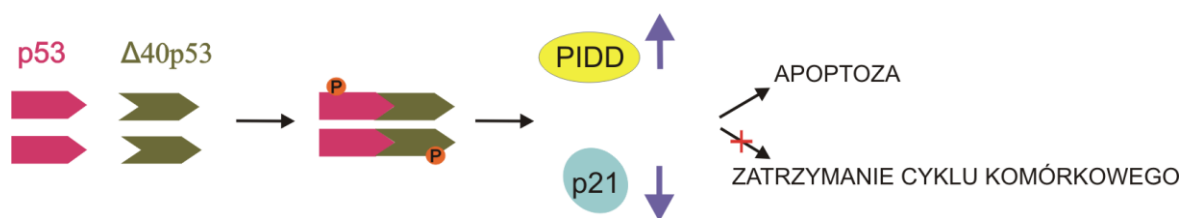
Postuluje się, że izoforma Δ 40p53 może modyfikować lokalizację komórkową białka p53 (Ghosh et al., 2004). W warunkach normalnych, gdy komórka nie jest poddana czynnikom stresowym, p53 znajduje się głównie w cytoplazmie, lecz niski poziom tego białka obserwuje się także w jądrze komórkowym. Izofорма Δ 40p53 znajduje się w jądrze komórkowym, co umożliwia jej działanie, jako inhibitora p53. Natomiast, w warunkach stresowych, Δ 40p53 zmienia swoją lokalizację z jądrowej na cytoplazmatyczną, gdzie nie pełni już swojej funkcji inhibitorowej. Białko p53 w warunkach stresu migruje z cytoplazmy do jądra gdzie jest aktywowane i uruchamia ekspresję genów. Jednakże, ujawniono, że w wyniku stresu genotoksycznego wywołanego doksorubicyną, Δ 40p53 ulega akumulacji, a następnie migruje do cytoplazmy kierując do niej także białko p53. Sądzi się, że obydwie białka tworzą wtedy heterooligomer, przez co regulacja ekspresji genów przez białko p53 jest nieaktywna (Ghosh et al., 2004; Marcel & Hainaut 2009).

2.4.3. Rola izoformy Δ 40p53 w chorobach nowotworowych

W wielu rodzajach ludzkich komórek nowotworowych zidentyfikowano zwiększoną ilość białka Δ 40p53 (Avery-Kiejda et al., 2013). Znacznie wyższy poziom Δ 40p53 wykryto w komórkach raka piersi, w porównaniu do łagodnych komórek nabłonkowych piersi, a także w komórkach glejaka wielopostaciowego w porównaniu do komórek zdrowej kory mózgowej (Hofstetter et al., 2012; Avery-Kiejda et al., 2013). Zwiększony poziom Δ 40p53 jest obecny również w komórkach czerniaka skóry (Takahashi et al., 2014). Co ciekawe, zwiększając syntezę Δ 40p53 w tych komórkach zauważono

wzmocnienie transaktywacyjnej funkcji białka p53. Stwierdzono, że po wprowadzeniu do komórek $\Delta 40p53$, poziom zaktywowanego białka p53 jest wyższy. Aktywowana została także ścieżka apoptotyczna, zależna od białka p53, poprzez indukcję transkrypcji genu *PIDD* (ang. *p53-induced death domain-containing protein 1*) oraz inhibicję transkrypcji genu *p21* (Rys. 11). Wyniki tych badań ujawniły istotę działania $\Delta 40p53$ jako modulatora właściwości supresyjnych białka p53 (Takahashi et al., 2014).

Z kolei, obecność znacznie zwiększonej ilości $\Delta 40p53$ w komórkach raka piersi, w porównaniu do zdrowych komórek, może świadczyć o udziale tej izoformy w rozwoju raka. Dodatkowo, wykazano akumulację $\Delta 40p53$, przy braku mutacji w genie *TP53* i prawidłowej jego ekspresji, w śluzowatym raku jajnika (Hofstetter et al., 2012).



Rysunek 11. Wpływ izoformy $\Delta 40p53$ na procesy komórkowe. Endogenne białko p53 może być aktywowane przez izoformę $\Delta 40p53$, co promuje apoptozę komórek nowotworowych. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Takahashi et al., 2014).

2.5. Izoforma $\Delta 133p53$

Izoforma $\Delta 133p53$ została zidentyfikowana w 2005 roku przez Bourdon i współpracowników (Bourdon et al., 2005). Synteza $\Delta 133p53$ rozpoczyna się z kodonu AUG3 znajdującego się w egzonie 5 genu *TP53*, co skutkuje skróceniem tego białka z końca aminowego o 132 aminokwasy. W konsekwencji $\Delta 133p53$ nie posiada domeny transaktywacyjnej, domeny bogatej w proliny, oraz części domeny wiążącej DNA. Oprócz izoformy $\Delta 133p53$, nazywanej również $\Delta 133p53\alpha$, zdefiniowano także izoformy skrócone z końca karboksylowego - $\Delta 133p53\beta$ oraz $\Delta 133p53\gamma$ (Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010b).

Izoforma $\Delta 133p53$ kodowana jest przez mRNA, którego transkrypcja inicjowana jest z promotora P2. Początkowo sądzono, że promotor ten, znajdujący się w genie *TP53*,

obejmuje region od intronu 1 do bliższej części eksonu 5, pokrywając około 1500 par zasad (Bourdon et al., 2005). Dalsze badania wykazały jednak, że obszar promotora obejmuje zaledwie 250 końcowych par zasad intronu 4 (Aoubala et al., 2011). Powstały transkrypt mRNA $\Delta 133p53$ zawiera koniec 3' intronu 4 oraz wszystkie egzony od 5 do 11 (Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010b).

Funkcja izoform $\Delta 133p53$ nie została jak dotąd dobrze scharakteryzowana, jednak badania przeprowadzone na organizmach modelowych ujawniają, iż izoformy te mogą regulować wiele istotnych procesów komórkowych (Chen & Peng 2009). Wykazano, że $\Delta 113p53$, ortolog izoformy $\Delta 133p53$ zidentyfikowany u danio pręgowanego, może hamować apoptozę indukowaną przez białko p53. Co więcej, wykazano, że $\Delta 113p53$ jest zaangażowany w modulację ekspresji docelowych genów białka p53 (Chen & Peng 2009). Doniesienia te są zgodne z wynikami badań przeprowadzonych na mysim odpowiedniku izoformy $\Delta 133p53$ – $\Delta 122p53$ (Slatter et al., 2011). Zwiększona synteza $\Delta 122p53$ w komórkach mysich powodowała wzmożoną proliferację i obniżoną apoptozę komórek. Osobniki, u których zidentyfikowano wysoki poziom $\Delta 122p53$, cechowały się zwiększoną predyspozycją do różnego typu nowotworów oraz wysoką śmiertelnością (Slatter et al., 2011).

W organizmie człowieka także wykazano zdolność izoform $\Delta 133p53$ do regulacji ekspresji genów, w tym genów docelowych białka p53 (Hofstetter et al., 2011). Takim przykładem może być indukcja ekspresji genu *Bcl2*, odpowiedzialnego za regulację apoptozy czy też wyciszenie ekspresji genu *p21*. W odpowiedzi na stres komórkowy, wywołany doksorubicyną, także gen *HDM2* jest indukowany przez izoformy $\Delta 133p53$. Przyjmuje się, że istnieje korelacja pomiędzy poziomem izoformy $\Delta 133p53$ w komórce, a regulacją funkcji pełnej długości białka p53 (Aoubala et al., 2011). Niski poziom $\Delta 133p53$ negatywnie reguluje funkcję białka p53, natomiast wysoki poziom tej izoformy stymuluje aktywacyjną funkcję białka p53.

Transkrypty mRNA $\Delta 133p53$ zidentyfikowano zarówno w zdrowych komórkach, jak i komórkach nowotworowych, przy czym nie w każdym typie komórek transkrypt $\Delta 133p53$ występuje. Zaobserwowano, że obecność mRNA jest zależna od rodzaju linii komórkowej. Ponadto, sugeruje się, iż różne izoformy $\Delta 133p53$: α , β i γ , mogą podlegać zróżnicowanej regulacji w odpowiedzi na czynniki stresowe (Bourdon et al., 2005).

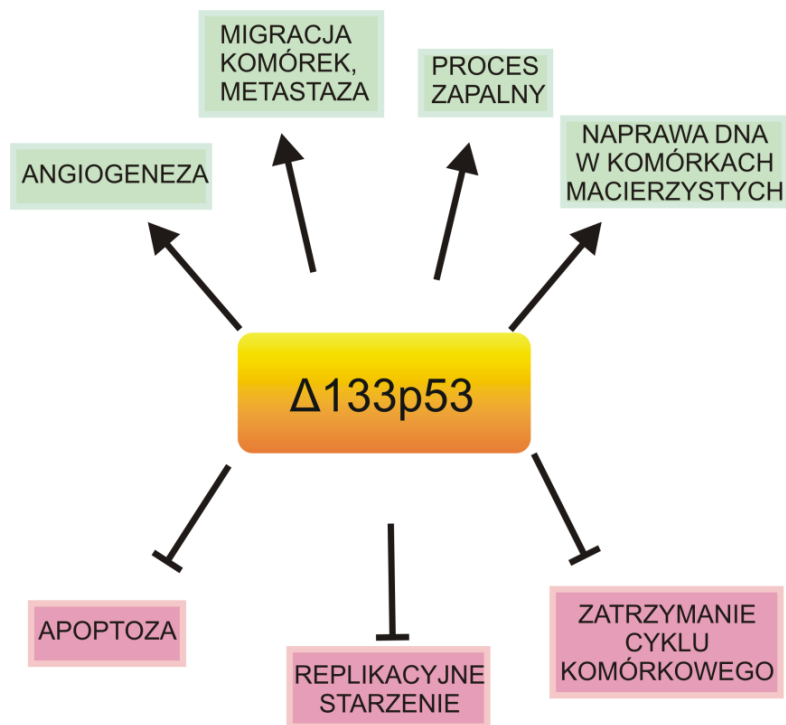
Przykładem jest zwiększona synteza izoform $\Delta 133p53\alpha$ oraz $\Delta 133p53\gamma$ w linii komórkowej raka piersi – MCF7 poddanej działaniu aktynomycyny D, przy jednoczesnym braku indukcji syntezy $\Delta 133p53\beta$ (Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010b).

Zróżnicowane zmiany zarówno jakościowe jak i ilościowe poszczególnych izoform $\Delta 133p53$ w komórkach różnych typów nowotworów w stosunku do komórek zdrowych sugerują ich potencjalny udział w procesie nowotworzenia (Boldrup et al., 2007; Hofstetter et al., 2011). Zwiększona ilość mRNA $\Delta 133p53$ została oznaczona w komórkach: raka piersi, jajnika, raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, raka nerek oraz czerniaka (Boldrup et al., 2007). Korelacja między poziomem mRNA $\Delta 133p53$ a progresją nowotworu została wykazana także w przypadku ostrej białaczki szpikowej. Istotnie podwyższony poziom transkryptów mRNA $\Delta 133p53$ zidentyfikowano również w większości typów złośliwych nowotworów płuc. Prawie czterokrotnie zwiększoną ilością mRNA $\Delta 133p53$ charakteryzują się komórki raka płuc w stosunku do komórek zdrowych (Boldrup et al., 2007; Fragou et al., 2017). Ponadto, wiele badań wskazuje na występowanie związku pomiędzy zwiększoną syntezą $\Delta 133p53$, a krótszym czasem przeżycia pacjentów cierpiących na różne choroby nowotworowe. Jednakże, znaczenie kliniczne izoform $\Delta 133p53$ w kancerogenezie nie zostało dokładnie określone (Nutthasirikul et al., 2015).

Wysoki poziom izoform $\Delta 133p53$ jak i ich transkryptów mRNA oznaczono także w niektórych komórkach nienowotworowych (Bourdon et al., 2005). Przykładem mogą być ludzkie astrocyty (komórki glejowe mózgu), charakteryzujące się istotnie podwyższonym poziomem zarówno białka $\Delta 133p53\alpha$ jak i odpowiednio transkryptu mRNA (Turnquist et al., 2016). Powyższa obserwacja ma duże implikacje fizjologiczne. Okazało się, że zwiększona synteza $\Delta 133p53\alpha$ stymuluje proliferację astrocytów, natomiast obniżony poziom tej izoformy promuje proces starzenia tych komórek. Sądzi się, że izoforma $\Delta 133p53\alpha$, poprzez proliferację astrocytów, pełni funkcję ochronną dla komórek układu nerwowego, przez co przyczynia się do spowolnienia postępu chorób neurodegeneracyjnych (Turnquist et al., 2016).

Opisane powyżej wyniki badań, przeprowadzonych zarówno na komórkach ludzkich jak i modelach zwierzęcych pokazują, jak istotne funkcje komórkowe mogą pełnić izoformy $\Delta 133p53$ (Rys. 12). Co niezwykle ważne, nie wszystkie funkcje izoform

$\Delta 133p53$ zostały w sposób jednoznaczny określony, czego częściową przyczyną są ograniczenia dotychczas stosowanych metod badawczych. Analiza ilościowa poziomu transkryptów RNA opiera się w zdecydowanej większości na metodzie PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real time PCR*). Metoda ta, choć pozwala na dokładne określenie nawet niewielkich ilości transkryptów, bywa niewystarczająco czuła do oznaczenia bardzo niskiego poziomu transkryptów mRNA $\Delta 133p53$. Jeszcze trudniejsze jest określenie poziomu białek $\Delta 133p53$ w komórkach, ponieważ ich synteza zachodzi na bardzo niskim poziomie (Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010b). Jedną z metod wykorzystywanych do pół-ilościowej analizy białek w komórce jest Western blot. Zastosowanie tej metody, w przypadku izoform $\Delta 133p53$ jest utrudnione, ze względu na brak komercyjnie dostępnych przeciwciał specyficznych względem poszczególnych izoform. W rezultacie, w badaniach przedstawionych w literaturze dominują dwa inne rodzaje doświadczeń: nadekspresja $\Delta 133p53$ poprzez transfekcję odpowiedniego wektora ekspresyjnego do komórek oraz wyciszenie transkryptu mRNA $\Delta 133p53$ poprzez siRNA (ang. *small interfering RNA*).

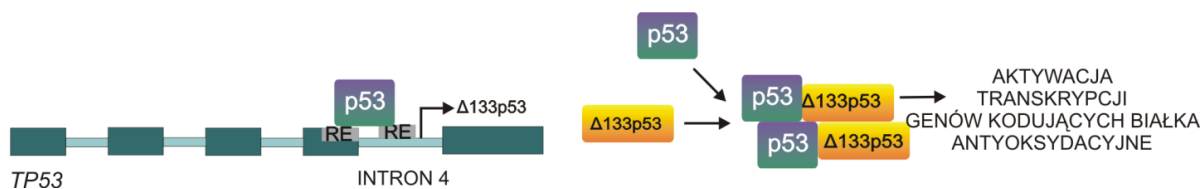


Rysunek 12. Funkcje izoformy $\Delta 133p53$ w komórce. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Terrier et al., 2012).

2.5.1. Rola kompleksu białek $\Delta 133p53$ i p53

Synteza izoform $\Delta 133p53$ może być aktywowana przez białko p53 (Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010b). Analiza bioinformatyczna genu *TP53* wykazała obecność elementów rozpoznawanych – RE dla białka p53, zlokalizowanych w obrębie promotora P2, analogicznych do tych znajdujących się w genach docelowych białka p53 (Menendez et al., 2007; Marcel et al., 2010b). Dwie z czterech sekwencji RE, zlokalizowane na końcu 3' egzonu 4 oraz w intronie 4, są szczególnie istotne, stanowią bowiem miejsce przyłączenia się białka p53, które aktywuje transkrypcję mRNA $\Delta 133p53$ (Rys. 13). Co ważne, tylko białko p53 typu dzikiego, syntetyzowane z niezmutowanego genu *TP53* ma zdolność do aktywacji syntezy $\Delta 133p53$. Ponadto zastosowanie czynników stresowych, takich jak dokсорubicyna oraz promieniowanie gamma, powoduje akumulację białka p53 w komórce, a w konsekwencji także wzrost poziomu $\Delta 133p53$ (Marcel et al., 2010b).

Izoformy $\Delta 133p53$ mają zasadniczy wpływ na regulację funkcji białka p53. Wykazano, iż mogą łączyć się z p53 i utworzyć formę tetrameryczną (Gong et al., 2016; Horikawa & Harris 2017). Powoduje to dezaktywację białka p53 i uniemożliwia aktywację docelowych genów p53. Doświadczenia przeprowadzone na różnych typach linii komórkowych ujawniły, że stres oksydacyjny stymuluje oddziaływanie izoformy $\Delta 133p53\alpha$ z białkiem p53 (Gong et al., 2016). Pod wpływem niskiego stężenia nadtlenu wodoru, białka te tworzą kompleks, który aktywuje ekspresję genów kodujących białka antyoksydacyjne, nie będących genami docelowymi p53 (Rys. 13). Brak p53 w komórkach hamuje syntezę $\Delta 133p53\alpha$ jak i białek antyoksydacyjnych. Natomiast brak $\Delta 133p53\alpha$ skutkuje wyciszeniem ekspresji niektórych genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny. To potwierdza, że obydwa białka działają synergistycznie w aktywacji ekspresji genów kodujących białka antyoksydacyjne. Model wzajemnej interakcji zakłada, że p53 oddziałując z $\Delta 133p53\alpha$, przyłącza się do sekwencji RE docelowych genów i aktywuje ich ekspresję. Co istotne, kompleks obydwu białek podnosi znacznie przeżywalność komórek w odpowiedzi na obecność nadtlenu wodoru (Gong et al., 2016).



Rysunek 13. Schematyczne przedstawienie aktywacji syntezy $\Delta 133p53$ przez białko p53, oraz tetrameryzacji białek $\Delta 133p53$ i p53 a następnie aktywacji transkrypcji genów docelowych. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Marcel et al., 2010b).

Wykazano także, że $\Delta 133p53\alpha$, oddziałując z p53, może regulować cykl rozwojowy wirusa grypy (Terrier et al., 2012). Komórki infekowane wirusem grypy wykazują zwiększoną syntezę $\Delta 133p53\alpha$. Wykazano, że $\Delta 133p53\alpha$ kooperuje z p53 i może wzmacniać jego aktywność, aby przejawiało pro-wirusowe funkcje. W rezultacie wirus ulega wzmożonej replikacji (Terrier et al., 2012).

Izofорма $\Delta 133p53\alpha$ może także uczestniczyć w modulacji odpowiedzi komórki na stres powodujący uszkodzenie DNA (Aoubala et al., 2011). Komórki poddane czynnikom stresu genotoksycznego, takim jak dokсорubicyna, wchodziły w fazę zatrzymania cyklu komórkowego w G2, zależną od białka p53, bez promowania zatrzymania cyklu w fazie G1 i apoptozy. Przy braku syntezy $\Delta 133p53\alpha$, komórki przechodziły w fazę zatrzymania cyklu G1 i apoptozę. Natomiast zwiększony poziom $\Delta 133p53\alpha$ wstrzymał apoptozę i stymulował zatrzymanie cyklu w fazie G1. Komórki nie wchodziły w fazę zatrzymania cyklu komórkowego w G2, zależną od p53. To pozwala sądzić, że $\Delta 133p53\alpha$ działa jako regulator funkcji białka p53, lecz nie zawsze, ponieważ zwiększona synteza izoformy $\Delta 133p53$ w komórce nie doprowadziła do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 (Aoubala et al., 2011).

2.5.2. Rola izoform $\Delta 133p53$ w procesie starzenia komórkowego

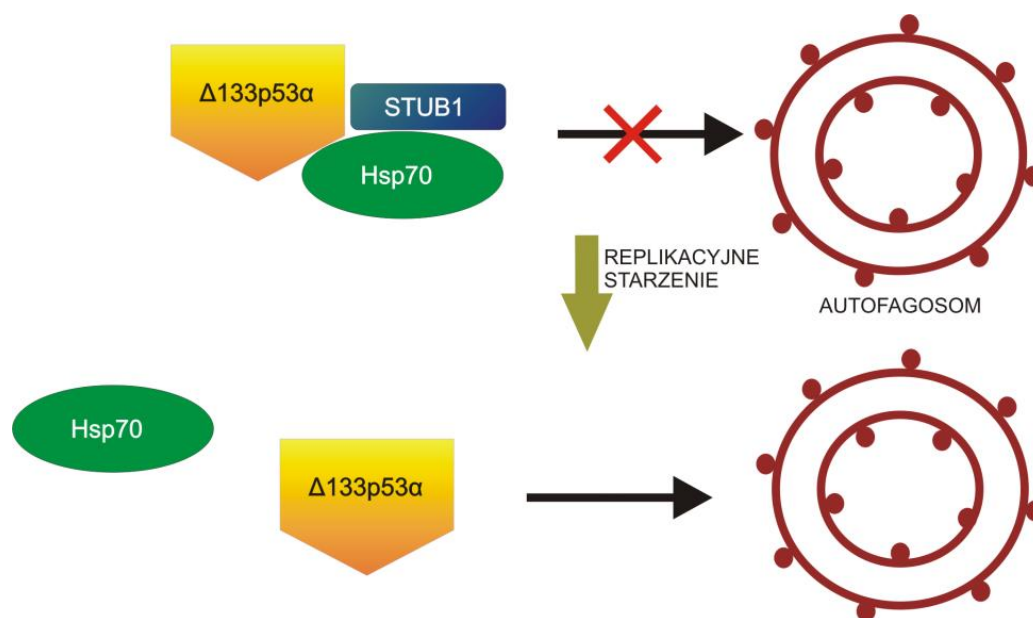
Izoformy $\Delta 133p53$ biorą udział w regulacji wielu procesów komórkowych związanych z proliferacją, starzeniem jak i apoptozą komórek w organizmie człowieka (Bourdon et al., 2005; Fujita et al., 2009). Replikacyjne starzenie komórek następuje gdy komórki somatyczne osiągają maksymalną liczbę podziałów i przestają proliferować (Sosinska et al., 2016). Wykazano, że $\Delta 133p53\alpha$ uczestniczy w regulacji procesu starzenia

się komórek (Fujita et al., 2009; Horikawa et al., 2017). Badania przeprowadzone na linii komórkowej ludzkich fibroblastów pokazały, że w komórkach starzejących się, poziom $\Delta 133p53\alpha$ jest wyraźnie obniżony w stosunku do komórek niestarzejących się. Natomiast, całkowite zredukowanie $\Delta 133p53\alpha$ powoduje natychmiastowe zatrzymanie wzrostu komórek i ich przyspieszone starzenie. Dodatkowo, efekt ten jest również zauważalny w tkance gruczołaka jelita grubego, gdzie starzenie się komórek silnie koreluje z niskim poziomem $\Delta 133p53\alpha$. Zgodnie z oczekiwaniami, gwałtowne zahamowanie procesu starzenia obserwowane było przy zwiększonej syntezie $\Delta 133p53\alpha$ w linii komórkowej fibroblastów. Komórki, w których poziom $\Delta 133p53\alpha$ jest znacznie wyższy kontynuują proliferację. To ukazuje, że endogenna izoforma $\Delta 133p53\alpha$ pełni ważną rolę w prawidłowym przebiegu procesu starzenia komórkowego (Fujita et al., 2009).

Regulacja procesu replikacyjnego starzenia się komórek jest ściśle zależna od interakcji pomiędzy białkami p53 oraz $\Delta 133p53\alpha$. Starzejące się komórki charakteryzują się podwyższoną syntezą miR-34a, indukowaną przez białko p53. Obniżenie ilości tego miRNA w komórkach, powoduje znaczne opóźnienie starzenia. Badania pokazują, że zwiększona ilość $\Delta 133p53\alpha$ blokuje ekspresję *miR-34a*, co w konsekwencji opóźnia starzenie. Brak ekspresji miR-34a jest rezultatem wpływu $\Delta 133p53\alpha$ na białko p53. Proponuje się, że w tym przypadku $\Delta 133p53\alpha$ osłabia funkcje białka p53, jako aktywatora transkrypcji, przez co białko to nie jest zdolne do indukcji ekspresji *miR-34a*. Mechanizm ten jest znakomitym przykładem regulacji białka p53 przez izoformę $\Delta 133p53\alpha$ i ukazuje, jak ważną rolę pełni równowaga obydwu białek w procesie starzenia komórkowego (Fujita et al., 2009).

Mechanizm starzenia komórkowego stanowi jeden z głównych mechanizmów supresji nowotworowej, gdyż jest to obronna reakcja komórki na czynniki stresowe powodujące uszkodzenie DNA (Sosinska et al., 2016). Dlatego też, ilość izoformy $\Delta 133p53\alpha$ w komórce jest kluczowa w prawidłowym przebiegu starzenia komórkowego i obroną przed kancerogenezą (Fujita et al., 2009; Horikawa et al., 2017). W przypadku przewagi $\Delta 133p53\alpha$, p53 nie może pełnić swojej aktywacyjnej funkcji, co w konsekwencji prowadzi do nadmiernej proliferacji komórek (starzenie jest zahamowane). Wykazano, że izoforma ta nie jest ubikwitynowana przez białko HDM2, dlatego poszukiwane były procesy odpowiadające za jej degradację. Pokazanie, że poziom endogennego $\Delta 133p53\alpha$

może być kontrolowany poprzez mechanizm autofagocytozy, stanowiło znaczące odkrycie (Horikawa et al., 2014). Autofagocytoza to proces, w którym degradowane są obumarłe fragmenty komórek, skupiska białek, a także patogeny (Mizushima & Komatsu 2011). Izoforma może być poddana autofagocytozie, zależnej od ligazy ubikwitynowej E3 związanej z białkiem opiekuńczym - STUB1 (ang. *STIP1 homology and U-Box containing protein 1*). Białko STUB1 wiąże się do $\Delta 133p53\alpha$ i wraz z białkiem opiekuńczym Hsp70 tworzy kompleks, hamujący degradację autofagosomalną tej izoformy. W starzejących się komórkach poziom STUB1 zostaje obniżony, a w konsekwencji interakcja pomiędzy STUB1, $\Delta 133p53\alpha$, a Hsp70 zostaje przerwana. Izoforma $\Delta 133p53\alpha$ kierowana jest do autofagosomu i jej degradacja, niezależna od proteasomu, powoduje dalszą stymulację replikacyjnego starzenia komórek. To podkreśla kluczową rolę STUB1, oraz mechanizmu autofagii, w kontroli poziomu $\Delta 133p53\alpha$ w komórce i co kluczowe - w regulacji mechanizmu starzenia komórkowego (Rys. 14) (Horikawa et al., 2014).



Rysunek 14. Schemat kontroli poziomu izoformy $\Delta 133p53\alpha$ przez białko STUB1. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Horikawa et al., 2014).

2.5.3. Rola izoform $\Delta 133p53$ w chorobach nowotworowych

2.5.3.1. Nowotwór mózgu

Komórki nowotworowe charakteryzują się m.in. wzmożoną proliferacją i ograniczoną apoptozą. Proces angiogenezy jest aktywowany w większości guzów w wyniku niedotlenienia komórek, które stymuluje syntezę angiogennych czynników wzrostu VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), a w konsekwencji inicjuje powstawanie nowych naczyń włosowatych (Hoeben et al., 2004).

Białko p53, jako główny czynnik chroniący przez kancerogenezą, ma za zadanie hamowanie rozwoju guza i angiogenezy poprzez m.in. inhibicję syntezy VEGF. Jednakże, wykazano, że izoformy $\Delta 133p53$ mają działanie przeciwstawne. Badania przeprowadzone na komórkach glejaka wielopostaciowego GBM (łac. *glioblastoma multiforme*), jednego z najbardziej angiogennych nowotworów, wykazały, że izoformy $\Delta 133p53$ stymulują powstawanie nowych naczyń krwionośnych (Bernard et al., 2013). Brak $\Delta 133p53\alpha$ powoduje znaczną indukcję syntezy p53 w komórkach glejaka, co wskazuje na modulację poziomu p53 zależną od $\Delta 133p53\alpha$. Niezwykle istotny w progresji angiogenezy jest również stosunek ilości p53 do izoformy $\Delta 133p53\alpha$. Wyższy poziom $\Delta 133p53\alpha$ w stosunku do p53 znacznie przyspiesza proces powstawania nowych naczyń krwionośnych, natomiast wyższy poziom p53 w stosunku do $\Delta 133p53\alpha$ hamuje angiogenezę jak i rozwój nowotworu glejaka wielopostaciowego (Bernard et al., 2013).

Dodatkowo, izoforma $\Delta 133p53\alpha$ ma zdolność do indukcji ekspresji genów związanych ze stymulacją angiogenezy, niezależnych od VEGF, takich jak: ANG (ang. *angiopoietin*) i HGF (ang. *hepatocyte growth factor*). Zwiększona ekspresja tych genów prowadzi do wzmożonej migracji i proliferacji komórek śródbłonna (Bernard et al., 2013).

2.5.3.2. Nowotwory układu pokarmowego

Wykazano, że wysoki poziom transkryptu mRNA $\Delta 133p53\alpha$ znajduje się w liniach komórkowych raka żołądka, a także tkankach pobranych od pacjentów z tym nowotworem

(Ji et al., 2015). Obserwowano wzrastającą ilość mRNA $\Delta 133p53\alpha$ gdy tkanka ulegała progresji z powierzchownego zapalenia żołądka do zmiany rakowej żołądka. To potwierdza, że izoforma $\Delta 133p53\alpha$ bierze udział w rozwoju choroby nowotworowej żołądka (Ji et al., 2015).

Nowotwór żołądka może zostać spowodowany przez patogenną bakterię *Helicobacter pylori*, która wywołuje chroniczne stany zapalne i stymuluje powstawanie zmian nowotworowych (Wei et al., 2012). Wykazano, że bakteria powoduje wzmożoną syntezę izoformy $\Delta 133p53\alpha$ oraz wzmacnia jej powinowactwo do białka p53. Izofoma $\Delta 133p53\alpha$ przyłącza się do p53 i hamuje jego aktywność transkrypcyjną. W rezultacie, zwiększona zostaje przeżywalność i proliferacja komórek zakażonych *H. pylori* (Wei et al., 2012).

Dodatkowo, izoforma $\Delta 133p53\alpha$ może wywoływać reakcję zapalną komórek raka żołądka (Wei et al., 2012; Zhang et al., 2017). Zwiększona synteza $\Delta 133p53\alpha$ prowadzi do indukcji NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Jest to kompleks białkowy pełniący funkcję czynnika transkrypcyjnego, regulujący odpowiedź immunologiczną na infekcję. Aktywacja NF- κ B powoduje ekspresję anti-apoptotycznych genów rodziny *Bcl-2*, jak i genów kodujących cytokiny, co przyspiesza kancerogenezę. Zatem, izoforma $\Delta 133p53\alpha$ ma zdolność wstrzymania apoptozy komórki nie tylko poprzez interakcję z białkiem p53, lecz również poprzez oddziaływanie z NF- κ B (Wei et al., 2012). Obserwacje te, zostały potwierdzone poprzez dezaktywację białka NF- κ B w linii komórkowej raka żołądka (Zhang et al., 2017). Zaobserwowano, że doprowadziło to do zatrzymania proliferacji komórek oraz zahamowania wzrostu guza. Co ciekawe, ilość transkryptu mRNA $\Delta 133p53$ po inhibicji NF- κ B również uległa znacznemu zmniejszeniu, potwierdzając, że izoforma $\Delta 133p53\alpha$, współdziałając z NF- κ B, jest zaangażowana w szlak procesu zapalnego komórek żołądka prowadzącego do nowotworzenia (Wei et al., 2012; Zhang et al., 2017).

Wykazano, że w linii komórkowej raka jelita grubego, izoforma $\Delta 133p53\beta$ reguluje apoptozę poprzez interakcję z białkiem RhoB, niezależnie od białka p53 (Arsic et al., 2017). Pro-apoptotyczne właściwości RhoB zostają zahamowane, gdy oddziałuje z $\Delta 133p53\beta$, natomiast brak $\Delta 133p53\beta$ w komórkach uwalnia RhoB i przywraca

jego apoptotyczne działanie. W ten sposób izoforma $\Delta 133p53\beta$ chroni komórki nowotworowe przed apoptozą i pogłębia tworzenie guza (Arsic et al., 2017).

Jednym z najczęstszych problemów terapii nowotworowych jest oporność komórek rakowych na chemioterapię (Nutthasirikul et al., 2015). Brak skutecznego leku na raka dróg żółciowych sprawia, że jest on jednym z najbardziej śmiertelnych nowotworów. W krajach mniej rozwiniętych związek chemiczny- 5-fluorouracyl (5-FU) stosowany jest jako lek pierwszego wyboru w leczeniu różnych guzów litych, w tym raka dróg żółciowych. Jest to inhibitor replikacji DNA prowadzący do jej zatrzymania i śmierci komórki. Niestety, terapia 5-FU jest niewystarczająco skuteczna, gdyż odsetek pacjentów, u których lek wywołał pozytywną reakcję wynosi mniej niż 10%. Co ciekawe, u pacjentów, jak również w liniach komórkowych, którym podano 5-FU i nie wywołał on terapeutycznego skutku, zidentyfikowano bardzo wysoki poziom izoformy $\Delta 133p53\alpha$. Badania przeprowadzone na liniach komórkowych nowotworu dróg żółciowych ujawniły, że po zahamowaniu syntezy $\Delta 133p53\alpha$, a następnie po podaniu 5-FU, wrażliwość komórek na lek znacznie wzrosła. Podanie wielokrotnie niższego stężenia 5-FU spowodowało szybką odpowiedź komórkową powodującą apoptozę. To sugeruje zaangażowanie izoformy $\Delta 133p53\alpha$ w odpowiedź komórek rakowych na 5-FU, a także możliwość modulowania wrażliwości komórek na chemioterapię za pomocą izoformy $\Delta 133p53\alpha$. Obserwacje te, mogą otworzyć nowe możliwości w poszukiwaniu leczenia nowotworu dróg żółciowych poprzez zastosowanie izoformy $\Delta 133p53\alpha$, jako potencjalnego kandydata do celowanej terapii (Nutthasirikul et al., 2015).

2.5.3.3. Nowotwór piersi oraz jajnika

Rak piersi jest jednym z najczęściej występujących nowotworów u kobiet, gdzie mutacje w genie *TP53* związane są często ze złym rokowaniem. Mutacje te występują jednak tylko u 25% wszystkich nowotworów piersi, podczas gdy u pozostałych 75% występuje prawdopodobnie mechanizm alternatywny deregulujący funkcję białka p53 (Olivier et al., 2004; Moore et al., 2010). Jednym z kandydatów, który potencjalnie pełni rolę pro-onkogenną w komórce jest izoforma $\Delta 133p53\alpha$, której zwiększoną syntezę zaobserwowano w komórkach nowotworowych piersi. Co ciekawe, zwiększona synteza

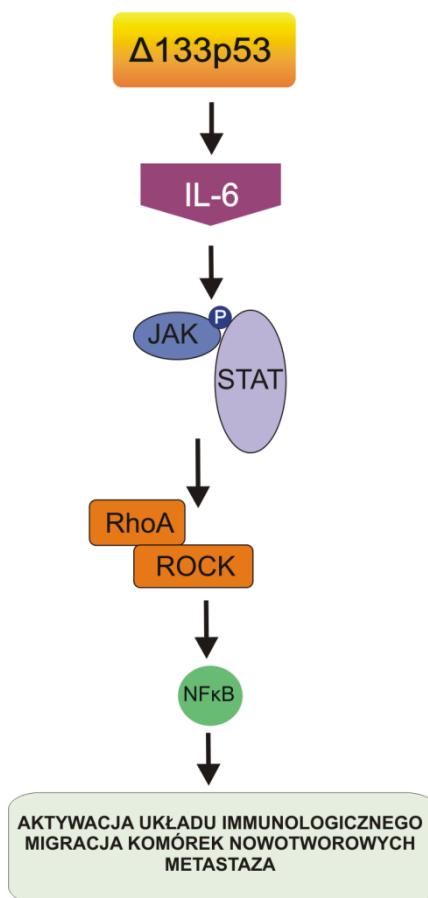
$\Delta 133p53\alpha$ koreluje z niskim poziomem helikazy p68. Ta zależność została wykorzystana do modulacji poziomu $\Delta 133p53$. Zaobserwowano, że pod wpływem etopozydu – czynnika wywołującego stres genotoksyczny, białko p68 hamuje syntezę $\Delta 133p53$ na poziomie mRNA. W konsekwencji, przywrócona zostaje funkcja białka p53 typu dzikiego. Natomiast, przy usunięciu helikazy p68, ilość mRNA $\Delta 133p53$ natychmiast wzrasta. Mechanizm ten ma kluczowe znaczenie dla komórek nowotworowych, poddanych chemioterapii, ponieważ obniżenie syntezy $\Delta 133p53$ powoduje przywrócenie funkcji białka p53. Jest to znaczące odkrycie, które może potencjalnie wspomóc działanie chemioterapii w przypadku nowotworów piersi (Moore et al., 2010).

Izoforma $\Delta 133p53\beta$ jest kolejnym białkiem mogącym modyfikować funkcje białka p53 typu dzikiego w komórkach raka piersi (Milicevic et al., 2014; Gadea et al., 2016). Wykazano, że $\Delta 133p53\beta$ ośmiokrotnie zwiększa ryzyko wznowienia nowotworu, oraz trzykrotnie zwiększa ryzyko śmierci u pacjentów z nowotworem piersi (Gadea et al., 2016).

Zupełnie inną funkcję izoformy $\Delta 133p53\alpha$ zidentyfikowano w surowiczym raku jajnika (Hofstetter et al., 2011). Przeprowadzono badania na grupie pacjentów z surowiczym rakiem jajnika, stanowiącym zdecydowaną większość nowotworów jajnika. Pokazały one, że wysoki poziom izoformy $\Delta 133p53\alpha$ spowodował 43% redukcję ryzyka nawrotów i 64% redukcję ryzyka śmierci w porównaniu z niskim poziomem $\Delta 133p53\alpha$. Analiza dotyczyła pacjentów posiadających zmutowany gen *TP53*. Funkcja izoformy $\Delta 133p53\alpha$ w tym przypadku nie jest jasna, prawdopodobnie tworzy ona heterotetramer ze zmutowanym białkiem p53 i w ten sposób niweluje jego negatywne, pro-onkogenne funkcje. Analiza ilości izoformy $\Delta 133p53\alpha$ u pacjentów z surowiczym rakiem jajnika może stać się niezależnym markerem rokowania pacjentów, jednak wymagane są dalsze badania (Hofstetter et al., 2011).

2.5.3.4. Rola izoform $\Delta 133p53$ w procesie metastazy komórek

Jednym z kluczowych problemów pacjentów z chorobami nowotworowymi jest ryzyko powstania przerzutów, czyli metastazy. Jest to proces migracji komórek nowotworowych guza pierwotnego, poprzez układ krążenia, do oddalonych tkanek, gdzie mogą zapoczątkować formację guza wtórnego (Chambers et al., 2002).



Rysunek 15. Model aktywacji układu immunologicznego, związanego z metastazą, przez izoformy $\Delta 133p53$. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Campbell et al., 2018).

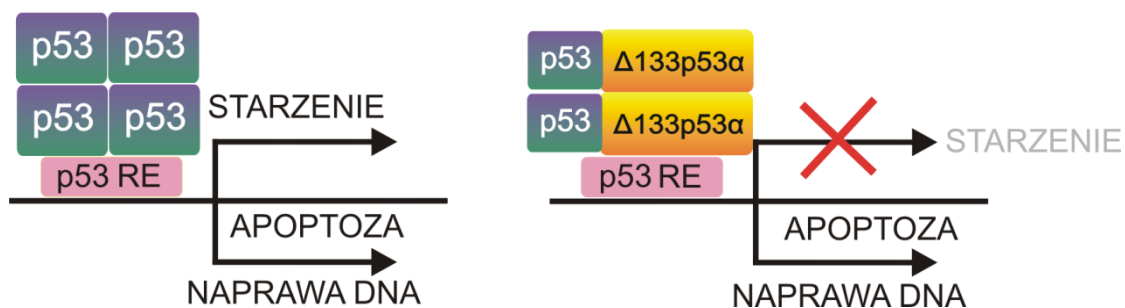
Badania wykazały, że izoformy $\Delta 133p53$, a w szczególności $\Delta 133p53\beta$, stymulują inwazyjność komórek nowotworowych prowadząc do metastazy. Niezależnie od występowania w komórce genu *TP53* z mutacją czy genu typu dzikiego. Analizy przeprowadzone na liniach komórkowych raka piersi oraz jelita grubego wykazały pozytywną korelację pomiędzy zwiększonym poziomem transkryptu mRNA $\Delta 133p53\beta$, a zwiększoną inwazyjnością komórek rakowych (Gadea et al., 2016). Co ważne, zaproponowano, że metastaza komórek nowotworowych wywołana przez $\Delta 133p53$ jest silnie związana z aktywacją układu immunologicznego (Rys. 15) (Campbell et al., 2012; Campbell et al., 2018). Podwyższony poziom mRNA izoform $\Delta 133p53$ podnosi poziom interleukiny 6, cytokiny pobudzającej procesy zapalne. Następnie, interleukina 6 aktywuje szlaki JAK-STAT3 i RhoAROCK28,

co w konsekwencji pobudza szlak NF κ B i generuje wiele prozapalnych chemokin, które przyczyniają się do migracji komórek nowotworowych. Co więcej, oprócz metastazy, zwiększona ilość mRNA $\Delta 133p53$ w komórkach raka jelita grubego związana jest ze wzmożoną agresywnością guza oraz złym rokowaniem (Campbell et al., 2018). U 24-36% pacjentów, u których zidentyfikowano podwyższony poziom izoform $\Delta 133p53$, wystąpiła metastaza komórek nowotworowych (Arsic et al., 2017). Podkreśla to potencjalną rolę izoformy $\Delta 133p53\beta$ jako prognostycznego wskaźnika nawrotu choroby nowotworowej i wystąpienia przerzutów w innych narządach (Gadea et al., 2016).

2.5.4. Związek izoform $\Delta 133p53$ z komórkami macierzystymi

Dynamiczny rozwój badań nad komórkami macierzystymi doprowadził do uzyskania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych iPS (ang. *human induced pluripotent stem cells*) (Yamanaka, 2012). Stanowią one potencjalne narzędzie terapeutyczne w medycynie regeneracyjnej. Jednakże, proces wyhodowania komórek macierzystych z fibroblastów może wprowadzać zaburzenia genetyczne, co stanowi jeden z największych problemów w wykorzystaniu komórek iPS. Jedną z możliwych przyczyn zaburzeń jest wywołanie stresu genotoksycznego prowadzącego do uszkodzenia DNA, w wyniku wykorzystania w hodowli komórkowej określonych czynników transkrypcyjnych, tzw. czynników Yamanaki (Yamanaka 2012). Dlatego, naprawa uszkodzeń DNA podczas przeprogramowywania ma kluczowe znaczenie dla zachowania integralności genomu. Co ciekawe, izoforma $\Delta 133p53\alpha$ ulega zwiększonej syntezie podczas stresu prowadzącego do uszkodzenia DNA (Gong et al., 2016). W odpowiedzi na stres komórkowy, $\Delta 133p53\alpha$ nie tylko inhibuje apoptozę, lecz także indukuje kolejne ścieżki naprawy uszkodzonego DNA, aktywując ekspresję genów *RAD51*, *LIG4* i *RAD52*. Dodatkowo zmniejszenie ilości $\Delta 133p53\alpha$ skutkuje dwukrotnym obniżeniem efektywności przeprogramowania komórek, oraz czterokrotnym wzrostem aberracji chromosomowych. Naprawa uszkodzonego DNA stymulowana przez $\Delta 133p53\alpha$ zapewnia większą stabilność genetyczną komórek iPS i zwiększenie syntezy izoformy $\Delta 133p53\alpha$ może zmniejszyć poziom mutacji w genomie komórek iPS (Gong et al., 2016).

Naturalnie występujące, embrionalne komórki macierzyste ESC (ang. *embryonic stem cells*) także cechują się występowaniem wysokiej ilości izoformy $\Delta 133p53\alpha$ (Horikawa & Harris 2017). Przynajmniej dziesięciokrotnie większa ilość $\Delta 133p53\alpha$ znajduje się w komórkach macierzystych niż w ludzkich fibroblastach. Badania pokazały, że izoforma $\Delta 133p53\alpha$ ma zdolność do regulowania genów docelowych białka p53 odpowiedzialnych za starzenie, apoptozę oraz naprawę DNA. Wysoki poziom $\Delta 133p53\alpha$ w ESC korelował ze zwiększoną ekspresją genów odpowiedzialnych za naprawę DNA oraz apoptozę, natomiast z niską ekspresją genów odpowiedzialnych za starzenie. Sugeruje się, że izoforma $\Delta 133p53\alpha$ oddziałuje z białkiem p53, regulując ekspresję genów, w szczególności tych odpowiedzialnych za naprawę DNA. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że zwiększona synteza izoformy $\Delta 133p53$ ułatwia komórkom somatycznym przekształcanie się w samoodnawiające się pluripotencjalne komórki macierzyste z utrzymaniem aktywności apoptotycznej i naprawy DNA (Rys. 16) (Horikawa & Harris 2017; Horikawa et al., 2017).



Rysunek 16. Schemat regulacji procesów przeprogramowania w ESC przez $\Delta 133p53\alpha$. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie Horikawa & Harris 2017).

Hipoteza rakowych komórek macierzystych - CSC (ang. *cancer stem cells*) sugeruje, że każdy nowotwór posiada pulę komórek zdolnych do odnowy (Clevers et al., 2011). Są one niezbędne do utrzymania i wzrostu guza, są również odpowiedzialne za oporność na konwencjonalną chemioterapię. Uważa się, że CSC mogą powstawać zarówno z odróżnicowania komórek somatycznych jak i w wyniku mutacji w istniejących komórkach macierzystych organizmu. Wykazano, że izoforma $\Delta 133p53\beta$ ma wpływ na regulację pluripotencji rakowych komórek macierzystych (Clevers et al., 2011; Arsic et al., 2015). Badania przeprowadzono na liniach komórkowych raka piersi

i ujawniono, że izoforma $\Delta 133p53\beta$ powoduje wzrost proliferacji komórek rakowych. Co ciekawe, po eliminacji wszystkich innych izoform białka p53 z komórek, proliferacja wciąż była duża, co potwierdza specyficzność izoformy $\Delta 133p53\beta$ w promowaniu proliferacji CSC. Ponadto, wysoki poziom $\Delta 133p53\beta$ stymuluje syntezę kluczowych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za pluripotencję, natomiast, inhibicja $\Delta 133p53\beta$ spowodowała spadek ilości czynników transkrypcyjnych. Zastosowanie w komórkach czynnika stresowego - etopozydu jeszcze bardziej zwiększyło syntezę izoformy $\Delta 133p53\beta$ a w konsekwencji syntezę czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za pluripotencję. Co istotne, badania przeprowadzone na mysim modelu raka piersi potwierdziły, że wszystkie izoformy $\Delta 133p53$ są zaangażowane w proces metastazy, a zmniejszenie ilości $\Delta 133p53$ spowodowało obniżenie zdolności do formowania przerzutów (Arsic et al., 2015).

3. Wyniki i dyskusja

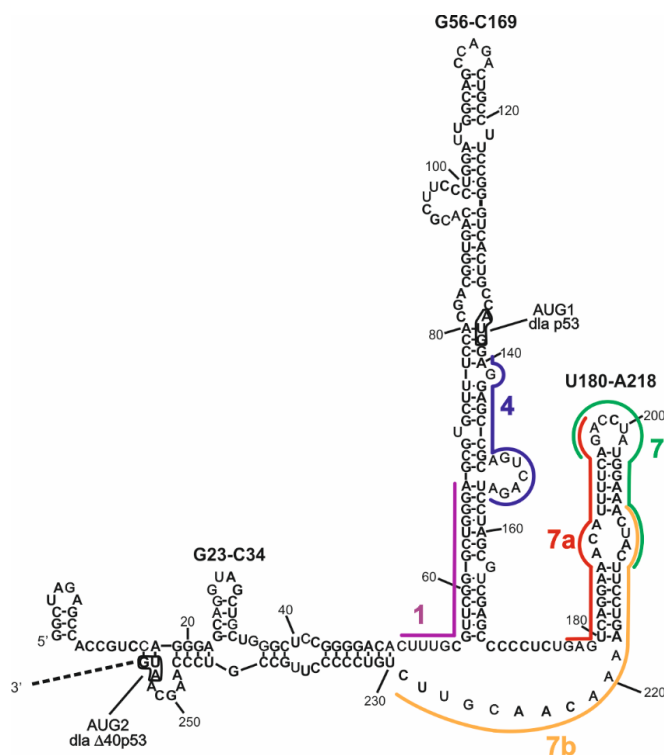
3.1. Rola elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie translacji, analizowana za pomocą oligonukleotydów antysensowych

Synteza białka p53 jest kontrolowana na wielu etapach, a w szczególności na poziomie inicjacji translacji jego mRNA. Uważa się, że inicjacja syntezy białka p53 i jego głównej izoformy – $\Delta 40p53$ może odbywać się w sposób kap-zależny, jak i na drodze mechanizmu niezależnego od struktury kap na końcu 5' mRNA (Ray et al., 2006). Dowodem na to jest odkrycie elementu IRES w regionie terminalnym 5' mRNA p53, który umożliwia wewnętrzne wiązanie się rybosomu i inicjację bez udziału kapu (Ray et al., 2006; Candeias et al., 2006). Proces IRES-zależnej syntezy białka p53 i izoformy $\Delta 40p53$ zachodzi głównie w warunkach stresu komórkowego, gdy kanoniczna inicjacja zostaje zahamowana. Szczególną rolę w procesie inicjacji według mechanizmu zależnego od elementu IRES pełnią specyficzne białka komórkowe – ITAF (ang. *IRES trans-acting factor*), które oddziałując z rybosomem i motywami struktury drugorzędowej mRNA ułatwiają przebieg inicjacji translacji. Pomimo intensywnych badań procesu translacji mRNA kodującego białko p53 i izoformę $\Delta 40p53$, wciąż nieznana pozostaje zależność pomiędzy strukturą IRES, a efektywnością syntezy obydwu białek.

Celem badań opisanych w tym rozdziale było określenie roli elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie inicjacji translacji zależnej od kap oraz od elementu IRES, z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensowych hybrydujących do tego regionu, w warunkach stresu komórkowego.

Oligonukleotydy antysensowe mogą modulować proces translacji, ponieważ wiążąc się do docelowego regionu mRNA, zmieniają jego strukturę drugorzędową lub stanowią zawadę przestrzenną dla rybosomu, hamując proces syntezy białka (Uhlmann & Peyman 1990; Gorska et al., 2013b). Pierwszym etapem przeprowadzonych badań było określenie wpływu oligonukleotydów antysensowych, nakierowanych na region terminalny 5' mRNA p53, na efektywność translacji zachodzącej z kodonu AUG1 dla

białka p53 oraz AUG2 dla izoformy $\Delta 40p53$. Wykorzystane przeze mnie oligonukleotydy antysensowe zostały zaprojektowane wcześniej w naszym laboratorium w oparciu o określoną strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53 (Rys. 17) (Błaszczuk & Ciesiolka 2011; Gorska et al., 2013a). Co ważne, zastosowane oligonukleotydy to 2' *O*-metylowane fragmenty DNA, nie aktywujące enzymu RNazy H, który mógłby spowodować hydrolizę mRNA po przyłączeniu się oligomerów. W moich badaniach zastosowałam pięć oligonukleotydów antysensowych. Ich sekwencje, wraz z miejscami docelowymi regionu terminalnego 5' mRNA oraz z obliczoną energią swobodną wiązania z sekwencją docelową, są przedstawione w tabeli 2.



Rysunek 17. Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA p53. Za pomocą kolorowych linii zaznaczone zostało położenie zaplanowanych oligonukleotydów antysensowych (struktura drugorzędowa mRNA na podstawie Błaszczuk & Ciesiolka 2011).

Wykorzystane przeze mnie oligonukleotydy antysensowe są nakierowane na następujące motywy strukturalne: oligomery nr 1 oraz 4 są komplementarne do regionu spinki G56–C169, oligonukleotydy nr 7 oraz 7a przyłączają się do spinki U180–A218, natomiast oligomer nr 7b hybryduje do regionu jednoniciowego A219–C229.

Oligonukleotydy te, po związaniu z sekwencją mRNA, posiadają zbliżoną energię swobodną, po to by żaden z oligomerów nie był faworyzowany w wiązaniu do badanego RNA.

Tabela 2. Lista testowanych oligonukleotydów antysensowych wraz z sekwencją docelową w regionie terminalnym 5' mRNA p53 oraz z wartością $\Delta G_{\text{overall}}$.

Oligonukleotyd antysensowy	Długość	Sekwencja nukleotydowa	Miejsce hybrydyzacji w regionie terminalnym 5'	$\Delta G_{\text{overall}}$ [kcal/mol]
Nr 1	19	TCCCAGCCCGAACGCAAAG	50-68	-18,3
Nr 4	17	TCCTCGGCGTCAGTCTA	140-156	-15,6
Nr 7a	21	TCTGAAAATGTTTCCTGACTC	177-197	-12,4
Nr 7	19	GAAGTAGTTTCCATAGGTC	196-214	-11,2
Nr 7b	21	AACGTTGTTTTTCAGGAAGTAG	208-228	-11,1
k	21	ACCAGGGCGTATCTCTCCATA	Sekwencja kodująca lucyferazy <i>Firefly</i>	

3.1.1. Mapowanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 po związaniu oligonukleotydów antysensowych

W celu potwierdzenia specyficznego przyłączenia się oligonukleotydów do regionu terminalnego 5' mRNA p53, a także określenia zmian strukturalnych wywołanych przez oligomery w tym regionie, zbadana została struktura drugorzędowa mRNA po ich związaniu. W badaniu mapowania struktury drugorzędowej wykorzystany został modelowy konstrukt mRNA P1-554 obejmujący region terminalny 5' mRNA p53 o długości 554 nukleotydów, zaczynający się od miejsca promotorowego P1, zawierający kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2 oraz część sekwencji kodującej białko p53 (Błaszczak & Ciesiolka 2011).

W analizie strukturalnej RNA wykorzystałam technikę cięcia RNA indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} , w której dwuwartościowy jon ołowiu stosowany jest jako sonda strukturalna przecinająca RNA w obrębie regionów jednoniciowych (Gornicki et al., 1989; Ciesiolka et al., 1992; Ciesiolka et al., 1998). Mechanizm cięcia opiera się na reakcji transestryfikacji, podczas której rozerwaniu ulega wiązanie fosfodiesterowe z utworzeniem

dwóch fragmentów RNA zawierających 2', 3'-cykliczny fosforan oraz wolną grupę 5' OH. Na podstawie cięć indukowanych w obecności jonów ołowiu (II), możliwa jest identyfikacja reszt znajdujących się w regionach jednoniciowych RNA, podczas gdy cięcia w obszarach dwuniciowych są słabsze lub nieobecne (Ciesiolka et al., 1998).

Pierwszym etapem analizy była hybrydyzacja konstruktów mRNA z poszczególnymi oligonukleotydami antysensowymi, a następnie dodane zostały jony Pb^{2+} (dokładny opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.8.2.). Miejsca cięć indukowanych jonami Pb^{2+} były identyfikowane za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji, z wykorzystaniem enzymu Super Script III, metodą wydłużania startera znakowanego na końcu 5' radioaktywnym izotopem fosforu – ^{32}P (dokładny opis przedstawiony jest w rozdziale 5.4.4, sekwencja startera znajduje się w tabeli 7.). Fragmenty cDNA rozdzielane były elektroforetycznie w warunkach denaturujących w 8% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7 M mocznika.

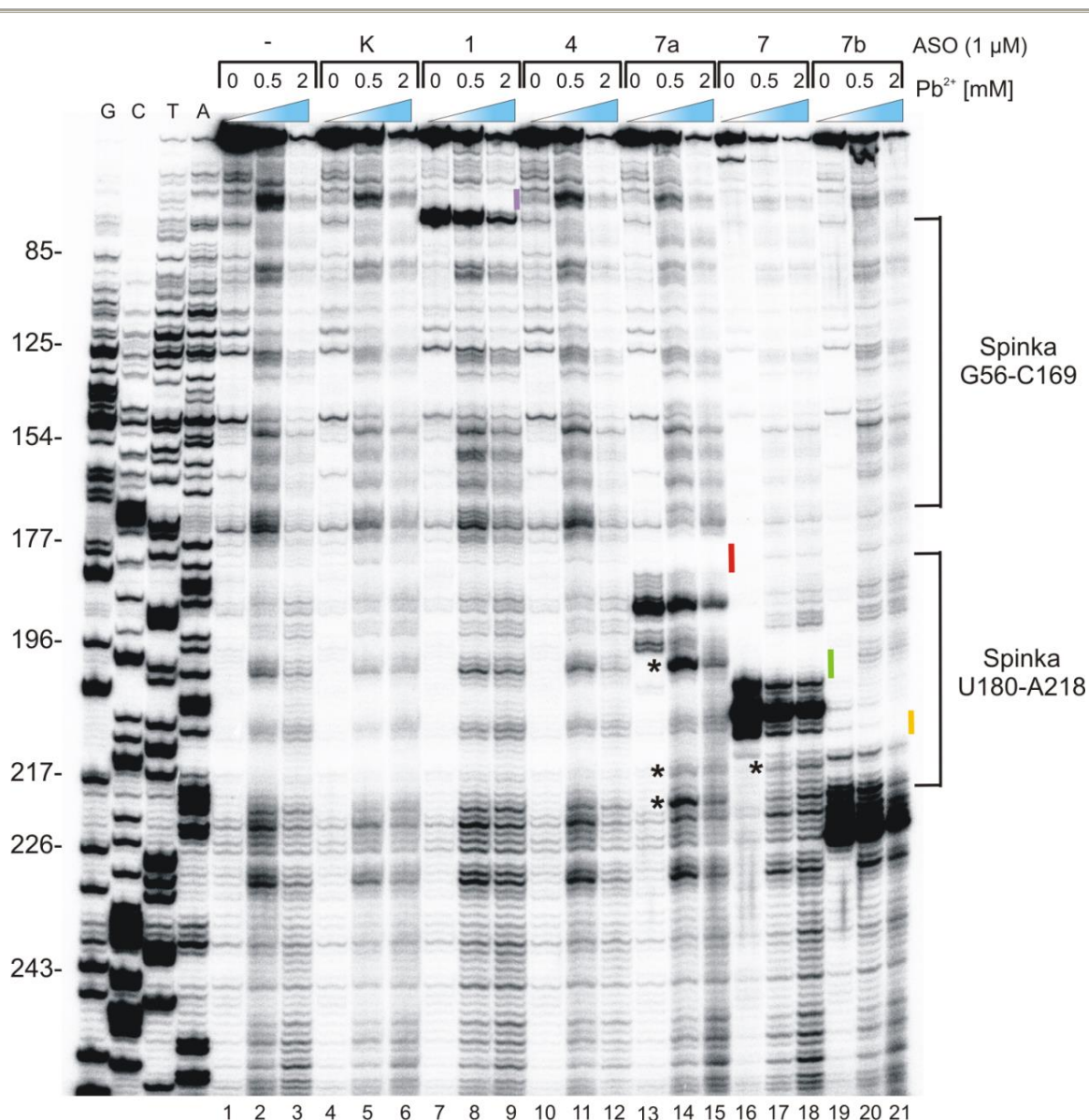
Metoda cięcia RNA indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} pozwoliła na określenie miejsc wiązania oligonukleotydów antysensowych do mRNA. Silne wiązanie oligomeru do mRNA było manifestowane poprzez brak jakichkolwiek prążków na żelu poliakryloamidowym w regionie przewidywanego miejsca wiązania. Ponadto, wiązanie oligonukleotydu indukowało zmiany struktury drugorzędowej w obrębie jego przyłączenia. Wówczas, na żelu poliakryloamidowym widoczne były nowe prążki, niewidoczne w reakcjach bez oligomeru oraz z oligomerem kontrolnym, odpowiadające cięciom w obrębie regionów jednoniciowych mRNA.

Rysunek nr 18 przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji odwrotnej transkrypcji poprzedzonej reakcją cięcia mRNA jonami ołowiu (II). Mapowanie struktury drugorzędowej w obecności oligonukleotydów antysensowych wykazało, że oligonukleotyd nr 7 hybryduje do mRNA z dużym powinowactwem. Prążki na żelu nie były obserwowane w obrębie reszt C198–A201 (Rys. 18, ścieżki 17, 18, zielona linia), co oznacza, że oligonukleotyd, nakierowany na pętlę apikalną spinki U180–A218 przyłączył się do niej i uniemożliwił indukcję cięć, w porównaniu do reakcji kontrolnej z oligonukleotydem kontrolnym oraz w reakcji bez oligonukleotydów (Rys. 18, ścieżki 2, 3, 5 i 6). Co więcej, silne prążki na żelu widoczne były w obrębie reszt U202–U212, we wszystkich stężeniach jonów ołowiu (II) (Rys. 18, ścieżki 16-18), gdyż odwrotna transkryptaza zatrzymywała się w miejscu przyłączonego oligonukleotydu. Ponadto,

po związaniu oligonukleotydu nr 7 do mRNA, na żelu zaobserwowałam dodatkowe prążki w obrębie reszt U216–A218, niewystępujące w reakcji kontrolnej (Rys. 18, ścieżki 17 i 18). Świadczy to o przerwaniu wiązań fosfodiesterowych w tym regionie, u podstawy spinki U180–A218 i wskazuje na częściowe rozplecenie dwuniciowej struktury mRNA spowodowane hybrydyzacją oligonukleotydu nr 7.

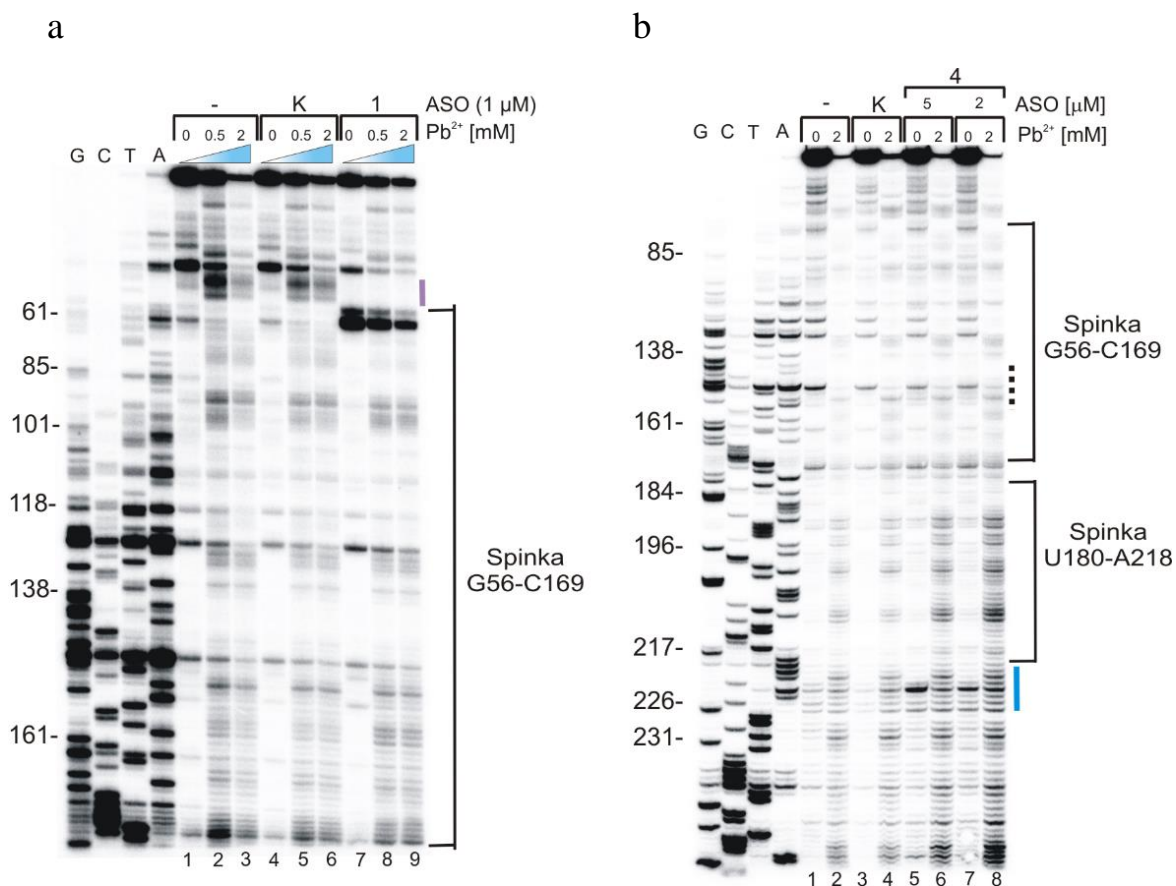
Oligonukleotyd antysensowy nr 7b także wykazywał duże powinowactwo względem docelowej sekwencji mRNA. Po jego hybrydyzacji nie obserwowałam cięć zlokalizowanych w wewnętrznej pętli (region C208–C211) znajdującej się w spince U180–A218 (Rys. 18, ścieżki 20 i 21, żółta linia) w porównaniu do reakcji kontrolnych (Rys. 18, ścieżki 2, 3, 5 i 6). Różnice w rozkładzie indukowanych cięć są skutkiem zmian w strukturze regionu terminalnego 5' mRNA p53 wywołanych przez wiązanie oligonukleotydu. Ponadto, w obrębie reszt A218–U228 widoczne były silne prążki na żelu, co było spowodowane zatrzymaniem odwrotnej transkryptazy w miejscu przyłączenia się oligonukleotydu (Rys. 18, ścieżki 19–21).

Mniejsze powinowactwo do mRNA posiadał oligonukleotyd nr 7a, gdyż po reakcji wydłużania startera, na żelu nie był obserwowany zanik prążków w regionach jednoniciowych, w porównaniu do reakcji kontrolnych (Rys. 18, ścieżki 14 i 15, czerwona linia, oraz 2, 3, 5 i 6). Nie były obserwowane także silne prążki oznaczające zatrzymanie odwrotnej transkryptazy spowodowane hybrydyzacją oligonukleotydu. Oligomer nr 7a wykazywał jednak powinowactwo do regionu bliżej końca 3' spinki U180–A218, co spowodowało indukcję cięć w pętli apikalnej G196–A201, manifestowane przez silne prążki na żelu (Rys. 18, ścieżki 13–15 oraz). Podobnie jak w przypadku oligomeru nr 7, po hybrydyzacji oligomeru nr 7a obserwowane były silniejsze cięcia w obrębie podstawy spinki U180–A218. Oligonukleotydy nr 7, 7a oraz 7b przyłączające się do sekwencji U180–U228 są nie tylko odpowiedzialne za lokalne zmiany w strukturze drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53, lecz zmieniają również strukturę drugorzędową poza miejscami, do których się przyłączają.



Rysunek 18. Mapowanie zmian w strukturze drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 po związaniu oligonukleotydów antysensowych metodą cięcia RNA indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} . Autoradiogram przedstawia produkty po przeprowadzeniu reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanym starterem. Elektroforeza prowadzona była w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7 M mocznika (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.1.). Linie 1–3 na autoradiogramie oznaczają reakcje kontrolne bez oligonukleotydów, linie 4–6 oznaczają reakcje z kontrolnym oligonukleotydem, linie 7–21 oznaczają reakcje z testowanymi oligomerami. G, C, T, A określa reakcje sekwencjonowania. Stężenie jonów Pb^{2+} w reakcjach wynosiło 1 i 2 mM, 0 oznacza reakcję kontrolną bez jonów ołowiu (II). Liniami fioletową, czerwoną, zieloną i żółtą zaznaczono miejsce przyłączenia się oligomerów odpowiednio: 1, 7a, 7 i 7b do fragmentów jednoniciowych, natomiast gwiazdkami (*) oznaczono wystąpienie dodatkowych cięć. Po lewej stronie autoradiogramu zaznaczono wybrane reszty guanozyny, natomiast po prawej wyróżniono motywy spinki.

Analiza reakcji wydłużania startera wykazała, że oligonukleotyd nr 1 hybryduje do regionu spinki G56–C169 (Rys. 18, ścieżki 7–9, Rys. 19a, linie 7–9). Na żelu poliakryloamidowym nie obserwowałam żadnych cięć w obrębie reszt C50–G56, co było spowodowane przyłączeniem się oligomeru.



Rysunek 19. Autoradiogramy przedstawiające rozdział produktów cDNA po mapowaniu regionu terminalnego 5' mRNA p53 metodą cięć indukowanych jonami Pb²⁺. Elektroforeza prowadzona była w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7 M mocznika (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.1.). Linie sekwencyjne oznaczone są jako: G, C, T, A. Po lewej stronie autoradiogramu zaznaczono wybrane reszty guanozyny, natomiast po prawej wyróżniono motywy strukturalne spinki do włosów. (a) ścieżki 1–3 na autoradiogramie oznaczają reakcje kontrolne bez oligonukleotydów, linie 4–6 oznaczają reakcje z kontrolnym oligonukleotydem, linie 7–9 reprezentują reakcje z oligonukleotydem nr 1. Stężenie jonów Pb²⁺ w reakcjach wynosiło 0,5 i 2 mM, 0 oznacza reakcję kontrolną bez jonów ołowiu (II). Fioletową linią zaznaczono miejsce przyłączenia się oligomeru 1 do fragmentu jednociowego (b) linie 1–2 na autoradiogramie oznaczają reakcje kontrolne bez oligonukleotydów, linie 4–5 oznaczają reakcje z kontrolnym oligonukleotydem, linie 5–8 reprezentują reakcje z oligonukleotydem nr 1 testowanym w stężeniu 2 i 5 μM. Niebieską linią zaznaczono na żelu miejsce przyłączenia się oligomeru. Przerywaną linią zaznaczono miejsce wiązania się oligonukleotydu przewidziane komputerowo.

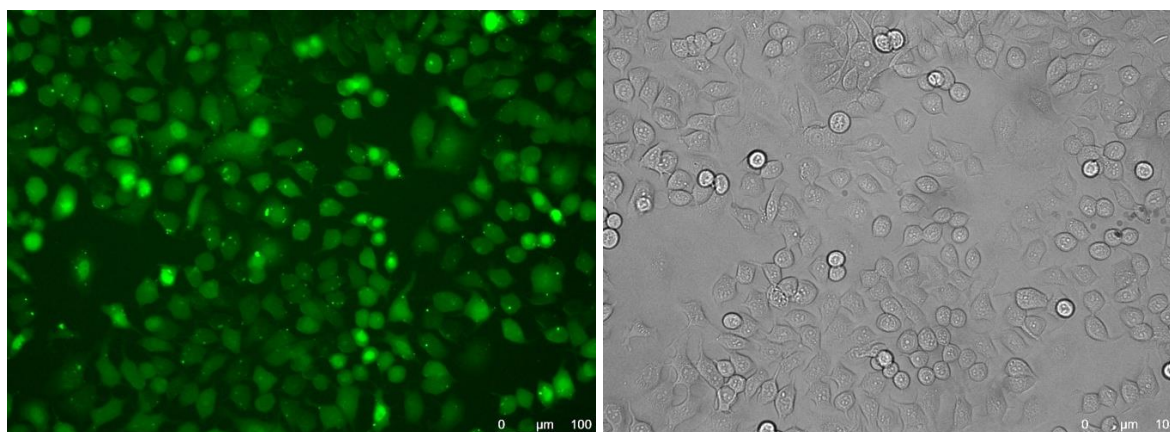
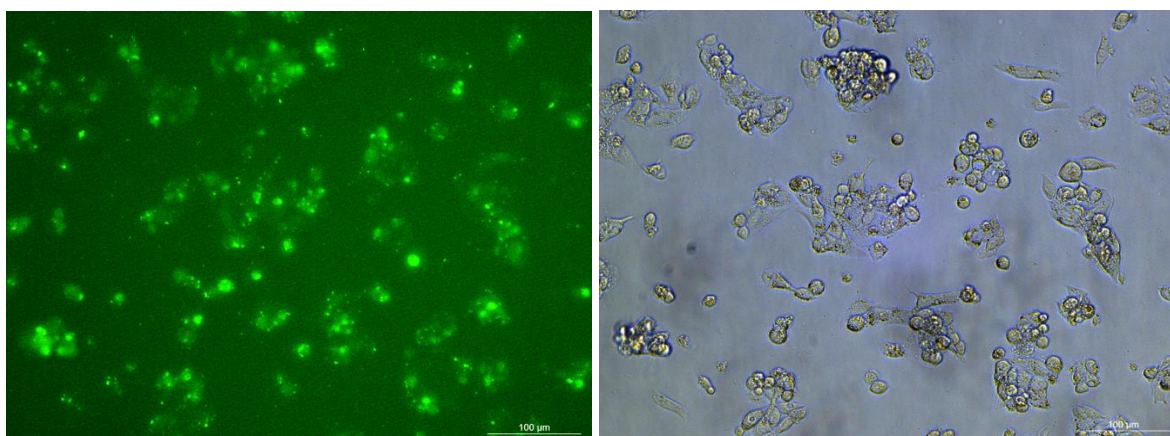
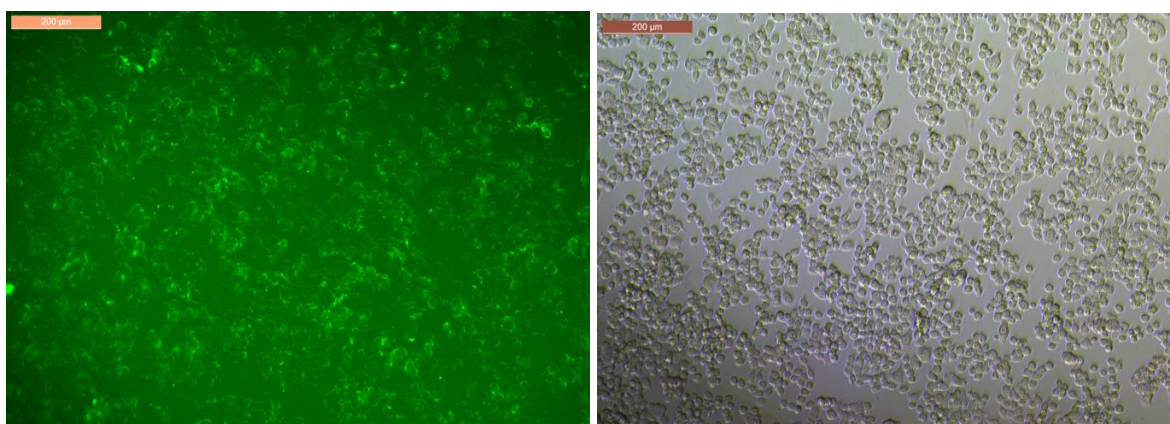
W przypadku oligonukleotydu nr 4, nie obserwowałam żadnych dodatkowych prążków na żelu po przeprowadzeniu reakcji. Co więcej, nie obserwowałam również zaniku prążków, obecnych w reakcjach kontrolnych, spowodowanego przyłączeniem się oligomeru do regionów jednoniciowych (Rys. 18, ścieżki 10–12). W celu określenia przyczyny braku hybrydyzacji, zwiększone zostało stężenie oligomeru nr 4 dodanego do reakcji, do 2 μM oraz 5 μM . Podwyższone stężenie spowodowało jednak niespecyficzne przyłączenie się oligonukleotydu do RNA w regionie okalającym nukleotyd A220 (Rys. 19b, ścieżki 6–8). Dodatkowa analiza komputerowa hybrydyzacji oligomeru nr 4 do RNA, z wykorzystaniem oprogramowania *Oligo 6* potwierdziła możliwość jego niespecyficznego wiązania się.

3.1.2. Badanie efektywności transfekcji oligonukleotydów antysensowych do wybranych linii komórkowych

W pierwszej kolejności, postanowiłam określić wydajność transfekcji oligomerów antysensowych w wybranych liniach komórkowych: HT-29, MCF-7 i HepG2, użytych w dalszych analizach. Do tego celu wykorzystywałam oligomer nr 7, z dołączonym barwnikiem fluorescencyjnym – FAM (ASO 7 FAM), dzięki czemu możliwa była obserwacja wydajności transfekcji w mikroskopie fluorescencyjnym.

Transfekcja była prowadzona za pomocą odczynnika Lipofectamine RNAi-MAX (Invitrogen), z wykorzystaniem komórek znajdujących się na pasażu od 4 do 20, natomiast ich konfluencja wynosiła od 50% do 80%. Inkubacja komórek z oligonukleotydem o stężeniu 0,5 μM trwała 24 godziny (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.5.). Następnie, przeprowadzona była analiza mikroskopowa fluorescencyjnych oligonukleotydów wprowadzonych do komórek.

Eksperyment wykazał, że oligomer ASO 7 FAM wnika do komórek HT-29, MCF-7 i HepG2 z dużą wydajnością. Na przedstawionej fotografii wykonanej przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego widoczny jest efekt przeprowadzonej transfekcji (Rys. 20).

MCF-7 + ASO 7 FAM**HepG2 + ASO 7 FAM****HT-29 + ASO 7 FAM**

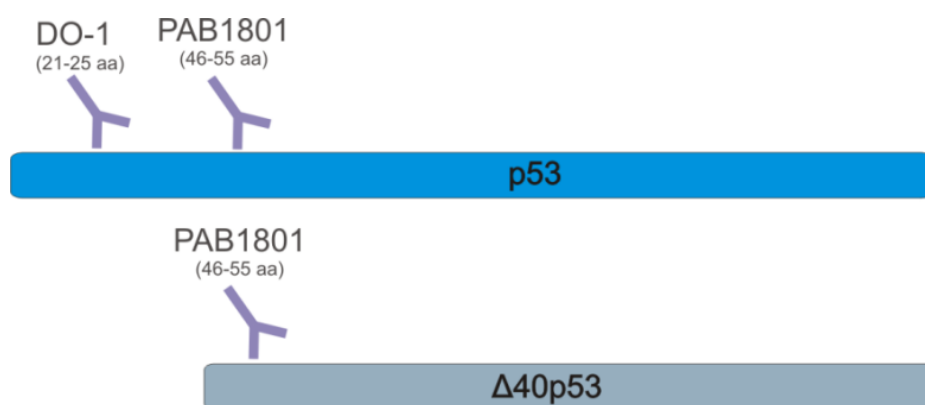
Rysunek 20. Analiza wydajności transfekcji linii komórkowych MCF-7, HepG2 i HT-29 oligonukleotydem nr 7 z dołączonym barwnikiem fluorescencyjnym (ASO 7 FAM). Transfekcja trwała 24 godziny (dokładny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.4.5.), po czym zostało wykonane zdjęcie przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Fotografie po lewej stronie przedstawiają komórki naświetlone promieniowaniem o długości fali 494 nm, zdjęcia po prawej stronie pokazują komórki w świetle białym.

3.1.3. Wpływ struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na proces syntezy izoformy $\Delta 40p53$, analizowany w komórkach HT-29 po zastosowaniu stresu oksydacyjnego

W celu określenia wpływu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na efektywność translacji, oligonukleotydy antysensowe nr 1, 4, 7, 7a oraz 7b zostały wprowadzone do linii komórkowej raka jelita grubego – HT-29. W komórkach HT-29 z powodu mutacji w genie *TP53*, zlokalizowanej w pozycji 273, zmieniającej argininę na histydynę (R273H), występuje silna nadekspresja genu skutkująca zwiększoną syntezą białka. W konsekwencji, detekcja zarówno białka p53 jak i izoformy $\Delta 40p53$ jest znacznie ułatwiona. Oligonukleotydy antysensowe były dostarczane do komórek poprzez transfekcję odczynnikami Lipofectamine RNAi-MAX. Transfekcja była przeprowadzana z wykorzystaniem komórek znajdujących się na pasażu od 4 do 20, natomiast ich konfluencja wynosiła od 50% do 80%. Transfekcja komórek poszczególnymi oligonukleotydami prowadzona była przez 4 godziny. Następnie komórki potraktowane zostały nadtlenkiem wodoru, o stężeniu końcowym 200 μM , który wywołuje stres oksydacyjny w komórkach, wzrost stężenia reaktywnych form tlenu i prowadzi do aktywacji i akumulacji białka p53 (szczegółowy opis transfekcji znajduje się w rozdziale 5.4.5.). Komórki inkubowane były kolejne 6 godzin, po czym poddawałam je lizie w Buforze Laemmli o składzie: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT, 0,02% błękit bromofenolowy. Lizat komórkowy rozdzielany był elektroforetycznie w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego, w obecności 0,1% SDS. Następnie przeprowadzono transfer białek z żelu na membranę PVDF w celu analizy poziomu białek p53 i $\Delta 40p53$ metodą Western blot (szczegółowy opis metody Western blot znajduje się w rozdziale 5.4.6.).

Do analizy Western blot, wykorzystano specyficzne przeciwciało pierwszorzędowe PAB1801. Rozpoznaje ono epitop składający się z reszt aminokwasowych w pozycji 46–55, obecny w białku p53 jak i izoformie $\Delta 40p53$ (Rys. 21). Wizualizacja odbywała się z wykorzystaniem reakcji chemiluminescencji, dzięki użyciu drugorzędowego przeciwciała mysiego IgG z kozy skoniugowanego z peroksydazą chrzanową. W celu kontroli nałożenia prób na żel, a także normalizacji wyników przeprowadziłam również detekcję poziomu α -tubuliny za pomocą przeciwciała TU-02.

W reakcji z wykorzystaniem przeciwciała PAB1801, na autoradiogramie widoczne były dwa prążki: główny, o wielkości 52 kDa, odpowiadający białku p53 o pełnej długości, oraz słabszy, odpowiadający izoformie $\Delta 40p53$, o wielkości około 44–46 kDa (Rys. 22). Dodatkowym potwierdzeniem specyficzności działania przeciwciała PAB1801, było przeprowadzenie kolejnej reakcji z wykorzystaniem przeciwciała DO-1. Przeciwciało to, nakierowane jest na reszty aminokwasowe w pozycji 21–25, umożliwiające detekcję jedynie białka p53 o pełnej długości, posiadającego w pełni zachowaną domenę transaktywacyjną (Rys. 21). Zgodnie z oczekiwaniami, po zastosowaniu DO-1 na autoradiogramie pojawił się jeden prążek, odpowiadający tylko białku p53 pełnej długości (Rys. 22). Posiadał tę samą wielkość, co główny prążek na autoradiogramie po reakcji z przeciwciałem PAB1801.

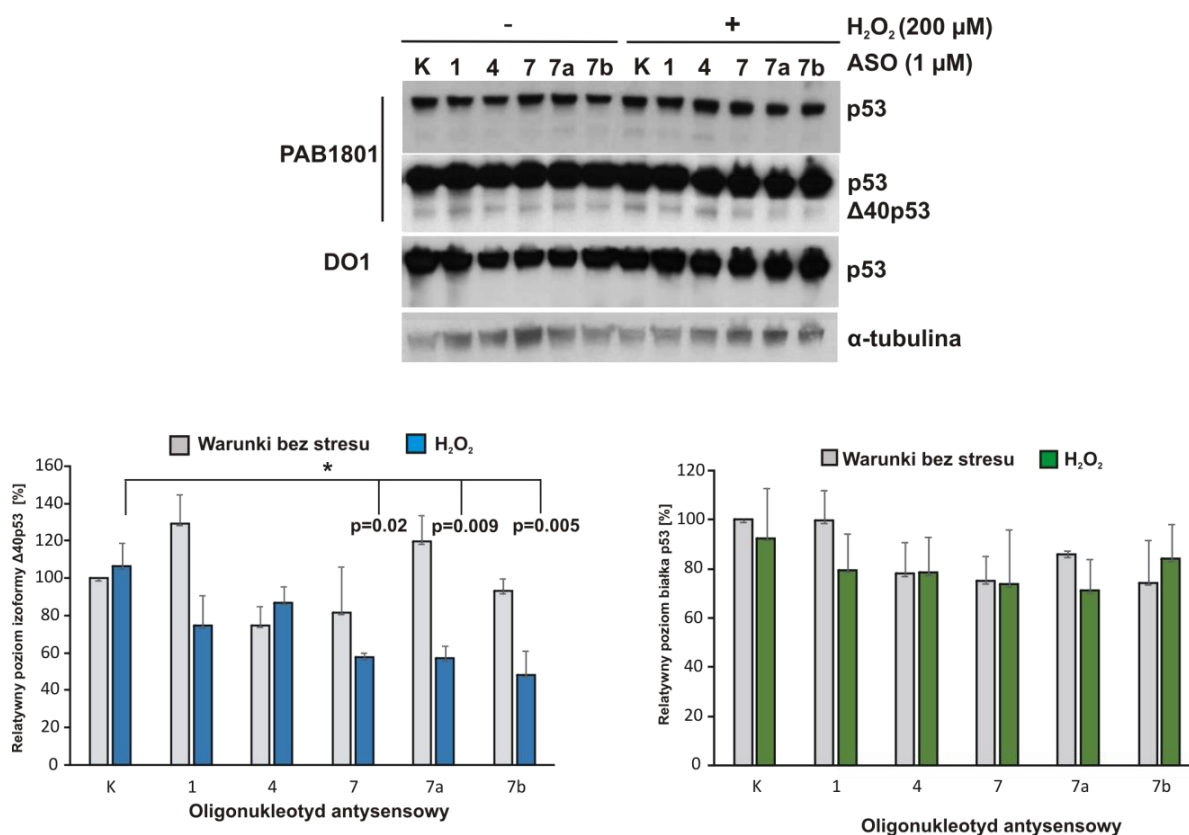


Rysunek 21. Schematyczna prezentacja detekcji białek przez przeciwciała. DO-1 oraz PAB1801 oznaczają pierwszorzędowe przeciwciała rozpoznające specyficznymi sekwencjami reszt aminokwasowych (zaznaczonych w nawiasach) znajdujących się w białku p53 i/lub $\Delta 40p53$.

Okazało się, że żaden z zastosowanych oligonukleotydów antysensowych nie wywołał zmian w efektywności syntezy białka p53 pełnej długości. Możliwe, że przy tak wysokiej nadekspresji genu *TP53* w komórkach HT-29, zmiany w wydajności translacji są zbyt małe (Rys. 22). W przypadku izoformy $\Delta 40p53$ obserwowana była zmiana efektywności translacji, w komórkach poddanych stresowi oksydacyjnemu. Największy spadek poziomu izoformy $\Delta 40p53$ zauważony był w obecności oligonukleotydów nr 7, 7a oraz 7b, hybrydujących do regionu U180–U228. Obecność oligomerów antysensowych spowodowała zmniejszenie się ilości izoformy $\Delta 40p53$ o około 50% w porównaniu do

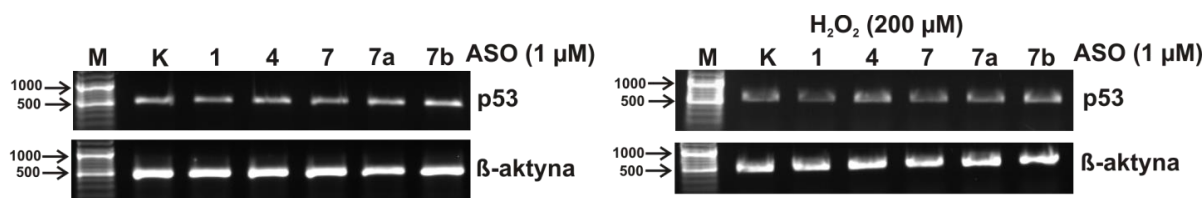
reakcji z oligonukleotydem kontrolnym. W obecności oligonukleotydu nr 1 natomiast, synteza $\Delta 40p53$ została obniżona o około 20%, w porównaniu z reakcją kontrolną. Pomimo, iż oligonukleotyd nr 4 nie wykazywał dużej specyficzności wiązania do badanego regionu mRNA (Rys. 19 B), on także wywołał obniżenie poziomu izoformy $\Delta 40p53$ o około 10%. W przypadku braku czynników stresu oksydacyjnego w komórkach, zastosowanie oligonukleotydów nie wywołało znacznych zmian w efektywności translacji. Wszystkie wyniki uzyskane poprzez zastosowanie metody Western blot zostały znormalizowane w oparciu o reakcję wykonaną z przeciwciałem TU-02 skierowanym na białko α -tubulinę (Rys. 22).

W kolejnym doświadczeniu określono poziom mRNA w komórkach przy zastosowaniu metody półilościowej RT-PCR (ang. *reverse transcription polymerase chain reaction*). Dzięki temu potwierdziłam, że poziom mRNA nie zmienił się w obecności oligomerów w warunkach normalnych i stresowych oraz dodatkowo potwierdziłam brak cięcia RNA przez RNazę H. Pierwszym etapem analizy było przepisanie RNA wyizolowanego z komórek, za pomocą odczynnika TriReagent, na cDNA, poprzez reakcję odwrotnej transkrypcji. Następnie, przy użyciu powstałego cDNA jako matrycy, przeprowadzona była reakcja PCR ze starterami specyficznymi dla danego transkryptu (dokładny opis metody przedstawiony jest w rozdziale 5.4.7.). Wyniki, analizowano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym (szczegółowy opis elektroforezy znajduje się w rozdziale 5.3.2.). Reakcja ta, przeprowadzona ze starterami specyficznymi dla mRNA p53 pokazała, że RNaza H nie była przyczyną obniżonej syntezy izoformy $\Delta 40p53$. Poziom mRNA p53 nie zmienił się, pomimo zastosowania warunków stresowych, oraz w obecności poszczególnych oligomerów, w tym oligomeru kontrolnego (Rys. 23). Dodatkowo, przeprowadziłam kontrolną reakcję PCR z wykorzystaniem starterów nakierowanych na mRNA β -aktyny, w celu normalizacji wyników uzyskanych w reakcji RT-PCR.



Rysunek 22. Efektywność syntezy białka p53 i izoformy Δ40p53 w obecności oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na region terminalny 5' mRNA p53, w warunkach stresu oksydacyjnego, w linii komórkowej HT-29. Autoradiogram przedstawia poziom endogennych białek p53 i Δ40p53 analizowany za pomocą metody Western blot przy użyciu specyficznych przeciwciał: DO-1 i PAB1801. Detekcja α-tubuliny stanowiła reakcję kontrolną. Linia K oznacza reakcję z oligomerem kontrolnym, +/- oznacza obecność lub brak nadtlenku wodoru, ASO oznacza oligomer antysensowy. Wykresy przedstawiają efektywność syntezy białka p53 i izoformy Δ40p53, będącą średnią z trzech powtórzeń, znormalizowaną względem reakcji z oligomerem kontrolnym (k), w warunkach bez stresu, oznaczonego jako 100%.

W przedstawionych przeze mnie wynikach badań, synteza izoformy Δ40p53 w komórkach HT-29 została obniżona w obecności oligonukleotydów antysensowych, pod wpływem stresu oksydacyjnego. To może sugerować inhibicję IRES-zależnej translacji, spowodowaną przez przyłączenie się oligonukleotydów antysensowych. Co więcej, zastosowanie oligonukleotydów nakierowanych na mRNA w regionie nukleotydów U180–U228 pokazało, że struktura drugorzędowa tego regionu jest szczególnie istotna dla wysokiej wydajności syntezy izoformy Δ40p53.

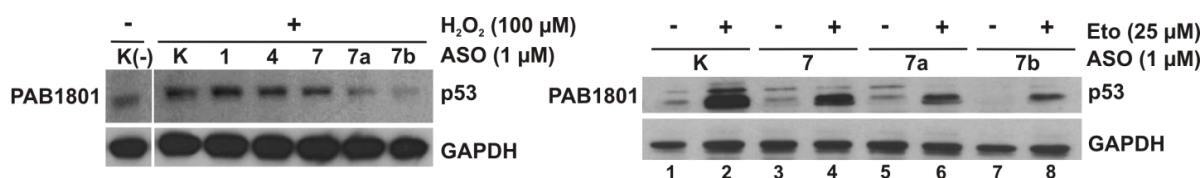


Rysunek 23. Poziom mRNA p53 i β -aktyny analizowany po transfekcji komórek HT-29 metylowanymi oligomerami antysensowymi, w warunkach stresu oksydacyjnego lub bez stresu. Zdjęcie przedstawia produkty DNA otrzymane po reakcji RT-PCR, po analizie elektroforetycznej w 1% żelu agarozowym (rozdział 5.3.2.). Linia M oznacza marker wielkości fragmentów DNA, K oznacza reakcję z oligomerem kontrolnym, ASO oznacza oligomer antysensowy.

3.1.4. Badanie wpływu oligonukleotydów antysensowych na efektywność syntezy białka p53 i izoformy $\Delta 40$ p53 w linii komórkowej MCF-7 po zastosowaniu czynników indukujących stres

W celu dokładniejszego zbadania roli elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie translacji, zastosowałam oligonukleotydy antysensowe także w linii komórkowej raka piersi – MCF-7. Zastosowanie stresu indukowanego nadtlaniem wodoru spowodowało aktywację i akumulację białka p53, dzięki czemu ułatwiona była jego detekcja. Transfekcja komórek poszczególnymi oligonukleotydami trwała 4 godziny, a następnie komórki inkubowane były z nadtlaniem wodoru o stężeniu 100 μ M przez 6 godzin. Po przeprowadzeniu analizy Western blot przy użyciu przeciwciała PAB1801, na otrzymanym autoradiogramie obserwowany był tylko jeden prążek – odpowiadający białku p53 (Rys. 24) (szczegółowy opis metody Western blot znajduje się w rozdziale 5.4.6.). Brak detekcji izoformy $\Delta 40$ p53 w komórkach MCF-7 jest zgodny z danymi opublikowanymi w literaturze (Courtois et al., 2002). Przeprowadzona analiza nie wykazała znacznych różnic w wydajności translacji pomiędzy zastosowaniem poszczególnych oligomerów (Rys. 24). W obecności oligonukleotydów nr 7a oraz 7b wydajność syntezy białka p53 pełnej długości uległa obniżeniu, w porównaniu do reakcji z oligomerem kontrolnym. Oligomer nr 7 także spowodował niewielkie obniżenie efektywności translacji. Wprowadzenie oligonukleotydów nr 1 oraz 4 nie wpłynęło na ilość syntetyzowanego białka p53 w komórkach MCF-7, będących pod wpływem stresu oksydacyjnego. Równocześnie analiza RT-PCR nie wykazała zmian w ilości mRNA p53 w komórkach po zastosowaniu oligonukleotydów antysensowych (Rys. 25).

W celu określenia czy powyższe obserwacje są podobne do tych w innych warunkach stresu komórkowego, zastosowałam czynnik stresu genotoksycznego – etopozyd. Podobnie jakw przypadku nadtlenu wodoru, zastosowanie 25 μM etopozydu w komórkach MFC-7 spowodowało znaczny wzrost poziomu białka p53. Co więcej, analiza danych otrzymanych metodą Western blot ujawniła, że wprowadzenie oligonukleotydu nr 7b powoduje znaczne zahamowanie syntezy białka p53, porównując do reakcji z oligomerem kontrolnym (Rys. 24). Obniżoną efektywność translacji, w porównaniu do kontroli, obserwowano również w przypadku oligonukleotydów nr 7 i 7a, lecz ich wpływ na translację był mniejszy niż po zastosowaniu oligomeru nr 7b.

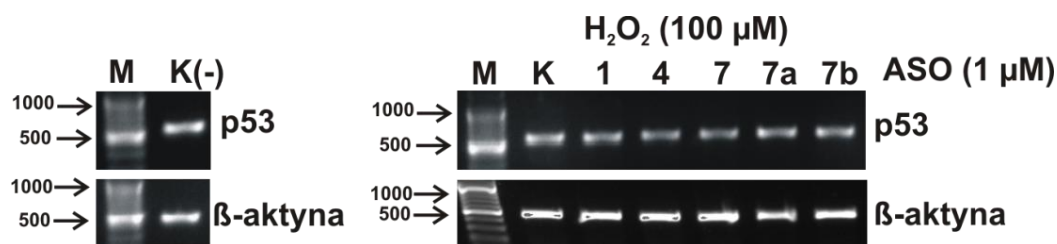


Rysunek 24. Poziom białka p53 analizowany w obecności oligonukleotydów antysensowych, w warunkach stresu oksydacyjnego i genotoksycznego, w linii komórkowej MCF-7. Autoradiogram przedstawia wyniki analizy przeprowadzonej metodą Western blot z wykorzystaniem przeciwciała PAB1801 wykrywającego białko p53. GAPDH stanowi reakcję kontrolną. Linia K(-) oznacza reakcję kontrolną bez nadtlenu wodoru, Eto wskazuje obecność lub brak etopozydu, ASO oznacza oligonukleotyd antysensowy.

Dla każdej analizy typu Western blot przeprowadziłam reakcję kontrolną z pierwszorzędownym przeciwciałem A3, nakierowanym na białko komórkowe GAPDH. Analiza została wykonana w celu kontroli nałożenia prób na żel, a także normalizacji otrzymanych wyników (Rys. 24).

Zastosowałam także metodę RT-PCR ze starterami nakierowanymi na mRNA p53, w celu wykluczenia możliwości wystąpienia efektów związanych z hydrolizą RNA przez RNazę H, a także potwierdzenia, że poziom mRNA nie zmienił się w obecności oligomerów w warunkach normalnych i indukowanych czynnikiem stresowym. Rysunek 25 przedstawia zdjęcie po rozdziale elektroforetycznym w 1% żelu agarozowym, na którym widnieją produkty DNA po reakcji RT-PCR. Analiza wyników wykazała, że poziom mRNA p53 nie zmienił się pomimo zastosowania oligonukleotydów antysensowych oraz warunków stresowych. Wykonana została także reakcja kontrolna ze starterami nakierowanymi na mRNA β -aktyny.

Przedstawione wyniki sugerują, że efektywność translacji mRNA p53 w linii komórkowej MCF-7, w warunkach stresu, silnie zależy od zachowania w regionie 5' terminalnym motywu struktury drugorzędowej – spinki do włosów, obejmującej region U180–A218. Zależy także od fragmentu jednoniciowego znajdującego się w pozycji A219–U228. Ponadto, analiza otrzymanych wyników wykazała niewielkie różnice w wydajności syntezy białka p53 w warunkach stresu oksydacyjnego i genotoksycznego.

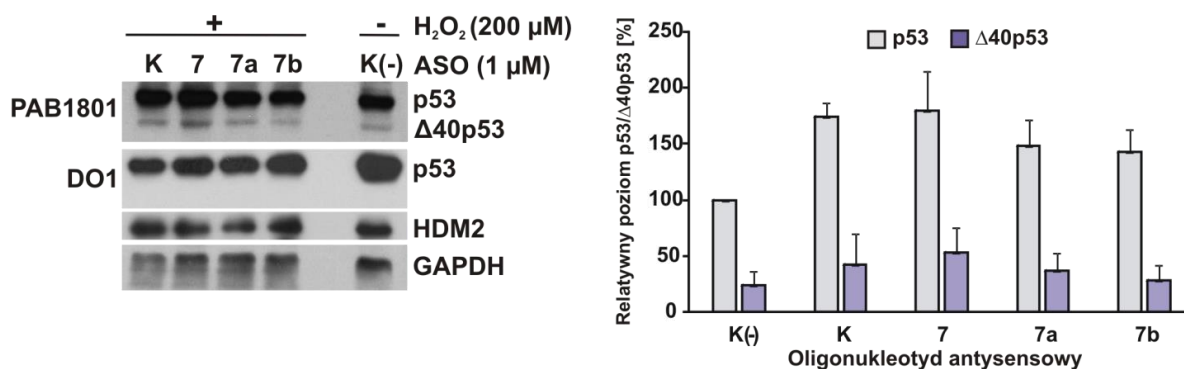


Rysunek 25. Poziom mRNA p53 i β -aktyny analizowany po transfekcji komórek MCF-7 metylowanymi oligomerami antysensowymi, w warunkach stresu oksydacyjnego lub bez stresu. Zdjęcie przedstawia produkty DNA otrzymane po reakcji RT-PCR, analizowane elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym (rozdział 5.3.2.). Linia M oznacza marker wielkości fragmentów DNA, K oznacza reakcję z oligomerem kontrolnym, ASO oznacza oligomer antysensowy.

3.1.5. Analiza wpływu oligonukleotydów antysensowych na wydajność syntezy białka p53 oraz jego izoforny $\Delta 40p53$, pod wpływem czynników stresowych, w linii komórkowej HepG2

W poprzednich analizach wykazałam, że po zastosowaniu oligonukleotydów antysensowych, w komórkach MCF-7 poziom białka p53 pełnej długości zmienia się, natomiast w linii komórkowej HT-29 zmienia się ilość izoforny $\Delta 40p53$. W kolejnych analizach skoncentrowałam się na badaniu wpływu zmiany struktury drugorzędowej mRNA wywołanej przez hybrydyzację oligonukleotydów na syntezę obydwu białek, z genu *TP53* nieposiadającego mutacji. W tym celu wykorzystałam linię komórkową raka wątroby – HepG2, w której możliwa jest detekcja zarówno białka p53 jak i izoforny $\Delta 40p53$. Oligonukleotydy nr 7, 7a oraz 7b zostały wprowadzone do komórek, a następnie komórki zostały poddane stresowi oksydacyjnemu wywołanego za pomocą nadtlenu wodoru o stężeniu końcowym 200 μM . Analiza poziomu białek została wykonana metodą Western blot, przy użyciu przeciwciał pierwszorzędowych PAB1801 oraz DO-1 (szczegółowy opis metody Western blot znajduje się w rozdziale 5.4.6.). Analiza ilości obydwu białek pokazała, że największy wpływ na syntezę, zarówno p53 jak

i $\Delta 40p53$, miała hybrydyzacja oligomeru nr 7b (Rys. 26). Spadek efektywności syntezy białek o prawie 20% został zaobserwowany w przypadku tego oligomeru w porównaniu do reakcji z oligomerem kontrolnym.

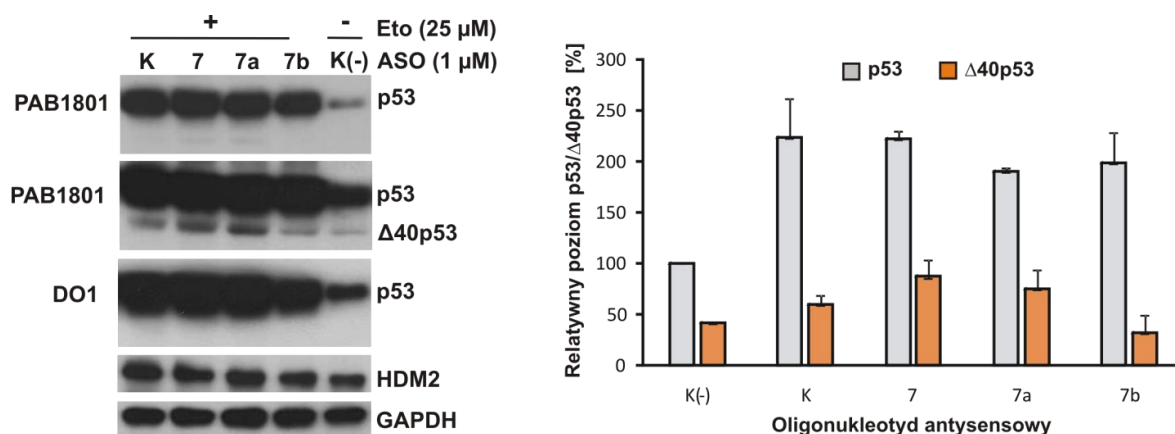


Rysunek 26. Analiza efektywności syntezy białek p53, $\Delta 40p53$ i HDM2 zachodzącej w linii komórkowej HepG2, w obecności wybranych oligonukleotydów antysensowych, pod wpływem stresu oksydacyjnego. Komórki były transfekowane oligonukleotydami nr 7, 7a i 7b oraz kontrolnym K. Detekcja białek p53 i $\Delta 40p53$ odbyła się na drodze analizy Western blot, z przeciwciałami PAB1801 i/lub DO-1, natomiast HDM2 za pomocą przeciwciała SMP14. Linia K(-) oznacza reakcję kontrolną bez nadtlenku wodoru, ASO oznacza oligonukleotyd antysensowy. Na wykresie przedstawiono średnie wartości wraz z odchyleniem standardowym, pochodzące z trzech niezależnych eksperymentów. Ilość białek p53 oraz $\Delta 40p53$ syntetyzowanych w obecności oligomerów antysensowych określano w stosunku do poziomu białka p53 w transfekcji oligomerem kontrolnym i normalizowano w stosunku do poziomu GAPDH.

Dodatkowo została wykonana analiza poziomu białka HDM2, przy użyciu przeciwciała SMP14. Spośród wprowadzonych oligonukleotydów: 7, 7a oraz 7b, żaden nie spowodował znaczących zmian w efektywności syntezy HDM2 (Rys. 26). Zatem, obniżenie efektywności syntezy białek p53 pełnej długości i $\Delta 40p53$ za pomocą oligomerów, w warunkach stresu oksydacyjnego, nie wpłynęło na syntezę białka HDM2.

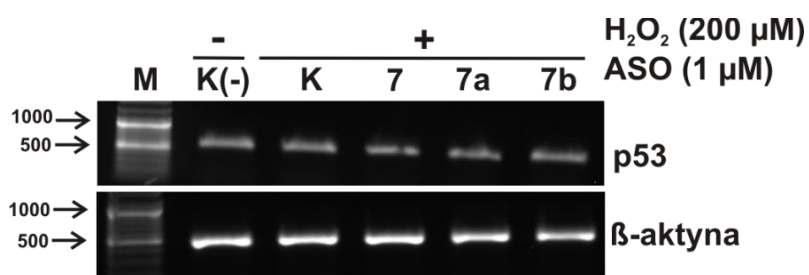
Kolejną reakcję przeprowadziłam w warunkach stresu genotoksycznego, z wykorzystaniem etopozydu. Ponownie wybrane oligonukleotydy zostały wprowadzone do linii komórkowej HepG2, a następnie podany został etopozyd w stężeniu końcowym 25 μM . Po przeprowadzeniu analizy poziomu białek metodą Western blot okazało się, że oligonukleotyd 7b nie spowodował zmian w efektywności syntezy białka p53, natomiast obniżył efektywność syntezy $\Delta 40p53$ o około 40%, w porównaniu do reakcji z oligonukleotydem kontrolnym (Rys. 27). W odróżnieniu od oligonukleotydu 7b, oligomery 7 oraz 7a wywołały wzrost syntezy izoformy $\Delta 40p53$ o około 25–30%,

zestawiając z reakcją kontrolną. Natomiast poziom białka p53 nie zmienił się w obecności oligonukleotydów 7 oraz 7a w warunkach stresu genotoksycznego.



Rysunek 27. Efektywność syntezy białka p53 i izoformy Δ40p53 w obecności oligonukleotydów antysensowych nakierowanych na region terminalny 5' mRNA p53, w warunkach stresu genotoksycznego, w linii komórkowej HepG2. Autoradiogram przedstawia poziom endogennych białek p53, Δ40p53 i HDM2 analizowanych metodą Western blot przy użyciu specyficznych przeciwciał – DO-1, PAB1801. GAPDH stanowił reakcję kontrolną. Linia K(-) oznacza reakcję kontrolną bez stresu, Eto oznacza obecność lub brak etopozydu, ASO oznacza oligonukleotyd antysensowy. Wykresy przedstawiają efektywność syntezy białka p53 i izoformy Δ40p53, będącą średnią z trzech powtórzeń, znormalizowaną względem reakcji z kontrolnym oligomerem w warunkach bez stresu.

Dla każdej analizy typu Western blot przeprowadziłam reakcję kontrolną z przeciwciałem nakierowanym na białko komórkowe GAPDH. Analiza została wykonana w celu kontroli nałożenia prób na żel, a także normalizacji wyników (Rys. 27).



Rysunek 28. Analiza poziomu mRNA p53 i mRNA β-aktyny po transfekcji komórek HepG2 wybranymi oligonukleotydami, w warunkach stresu oksydacyjnego lub w warunkach normalnych. Zdjęcie przedstawia produkty DNA otrzymane po reakcji RT-PCR, analizowane elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym (rozdział 5.3.2.). Linia M oznacza marker wielkości fragmentów DNA, K oznacza reakcję z oligomerem kontrolnym, K(-) oznacza reakcję bez stresu, ASO stanowi oligomer antysensowy.

Analiza wyników po RT-PCR wykazała, że poziom mRNA p53 nie zmienił się, pomimo zastosowania oligonukleotydów antysensowych oraz czynnika indukującego stres komórkowy (Rys. 28).

Powyższe wyniki wskazują, że hybrydyzacja oligonukleotydów antysensowych do regionu regionu terminalnego 5' mRNA: w obrębie U180–U228 w komórkach HepG2, będących pod wpływem stresu genotoksycznego, ułatwia inicjację syntezy izoformy $\Delta 40p53$. Najprawdopodobniej przyłączenie się oligonukleotydów wywołuje rozplecenie struktury drugorzędowej mRNA, co udostępnia region dla czynników ITAF, które wiążąc się powodują wzrost wydajności IRES-zależnej translacji.

3.1.6. Badanie wpływu elementów struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na inicjację translacji zachodzącą z kodonu AUG1 i AUG2 w lizacie z retikulocytów króliczych

Wcześniejsze badania przeprowadzone w naszym laboratorium pokazały, że obecność termodynamicznie stabilnej struktury drugorzędowej typu spinki do włosów, na końcu terminalnym 5' mRNA p53 hamuje kap-zależną inicjację translacji (Błaszczuk & Ciesiolka 2011). Zgodnie z oczekiwaniami, kap-zależną inicjację translacji hamuje również brak struktury kap na końcu 5' mRNA. Zważywszy na te obserwacje, w celu zablokowania kap-zależnej translacji i określenia wydajności IRES-zależnej syntezy białka, do dalszych analiz wykorzystałam wariant mRNA Hp53-554. Jest to modelowy konstrukt zawierający pierwsze 554 nukleotydy regionu terminalnego 5' mRNA p53, który dodatkowo posiada motyw spinki do włosów na końcu 5' i jednocześnie pozbawiony jest struktury kap. Poprzednio prowadzone badania translacji *in vitro* z wykorzystaniem tego wariantu potwierdziły IRES-zależną translację zachodzącą z kodonu AUG2 (Błaszczuk & Ciesiolka 2011).

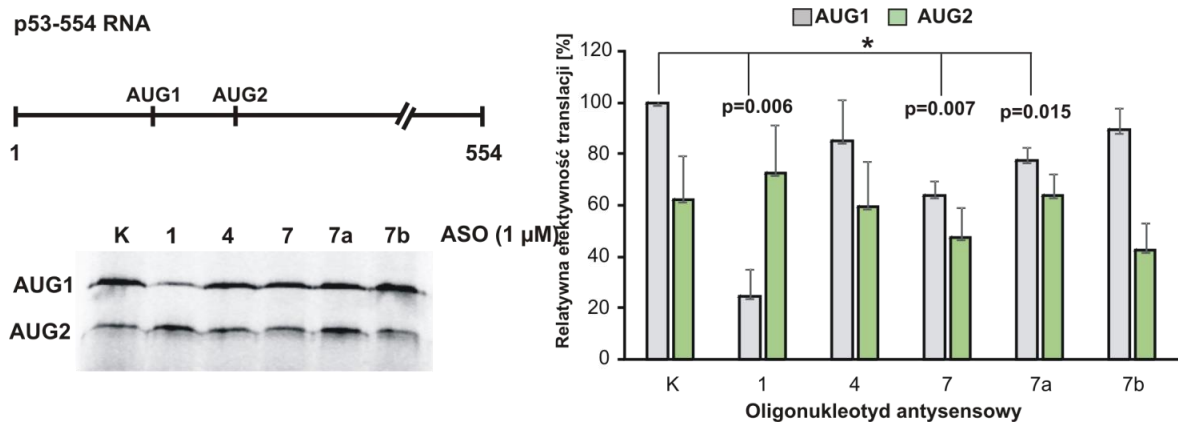
Celem kolejnego etapu badań było określenie wpływu oligonukleotydów antysensowych na proces inicjacji translacji zachodzącej z kodonu AUG1 i AUG2 w warunkach *in vitro*. Dodatkowo zamierzałam porównać wyniki z rezultatami otrzymanymi w badaniach wykonanych na liniach komórkowych. Przeprowadziłam reakcję translacji *in vitro* z wykorzystaniem dwóch wariantów regionu terminalnego 5' mRNA

o długości 554 nukleotydów, schematycznie przedstawionych na rysunku 29. Są to pozbawione struktury kap na końcu 5' mRNA: Hp53-554 (Rys. 29b), oraz jego odpowiednik pozbawiony motywu spinki do włosów na końcu 5' – p53-554 (Rys. 29a). Reakcja translacji prowadzona była w lizacie z retikulocytów króliczych – RRL (ang. *rabbit reticulocyte lysate*) w obecności metioniny znakowanej izotopem siarki [³⁵S]-Met (szczegółowy opis metody opisany jest w rozdziale 5.4.3.1.). RRL jest uproszczonym systemem do przeprowadzania translacji *in vitro*, pozbawionym wielu białek komórkowych. Ze względu na ich brak, system ten jest odpowiedni do oceny wpływu struktury drugorzędowej na proces inicjacji translacji, ze zminimalizowanym wpływem białek komórkowych o charakterze regulatorowym. Produkty białkowe po translacji analizowane były elektroforetycznie w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego, z dodatkiem 0,1% SDS (metoda opisana została w rozdziale 5.3.3.). Dzięki zastosowaniu w reakcji translacji metioniny znakowanej izotopem siarki [³⁵S]-Met możliwa była detekcja produktów białkowych na drodze autoradiografii.

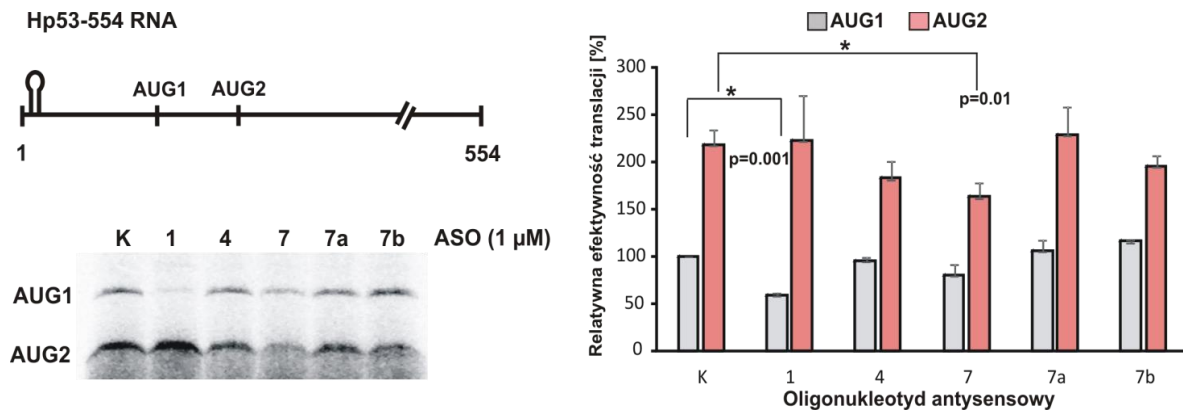
Analiza otrzymanych wyników pokazała, że w obecności oligonukleotydu kontrolnego, nieprzyłączającego się do modelowych wariantów mRNA, stosunek ilościowy produktów syntetyzowanych z kodonu AUG1 do AUG2, w przypadku wariantu p53-554 wynosi około 2:1 (Rys. 29a). W przypadku wariantu Hp53-554, natomiast, stosunek białek powstających z AUG1:AUG2 wynosi 1:2,5, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Rys. 29b) (Błaszczyk & Ciesiolka 2011). Po zastosowaniu oligomeru nr 1, przyłączającego się do motywu strukturalnego G56–C169, translacja zachodząca z kodonu AUG1, w obydwu wariantach mRNA, została istotnie obniżona (Rys. 29). Prawdopodobnie, jest to rezultat uboższego składu RRL oraz mniejszej ilości białek helikalnych. Obserwacje te, są jednak odmienne od wyników otrzymanych w doświadczeniach przeprowadzonych na liniach komórkowych, gdzie oligonukleotyd nr 1 nie wpłynął na syntezę białka p53. Prawdopodobnie, przyczyną jest brak wpływu oligonukleotydu na strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA w warunkach komórkowych, która mogłaby zmieniać efektywność translacji. Świadczą o tym badania struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 po związaniu się oligonukleotydów antysensowych, w których nie obserwowałam zmiany struktury

drugorzędowej pod wpływem wiązania oligomeru 1. Kolejnym prawdopodobnym uzasadnieniem inhibicji translacji zachodzącej z kodonu AUG1 jest zahamowanie IRES-zależnej translacji po związaniu oligonukleotydu nr 1. Spekuluje się, że inicjacja translacji IRES-zależnej może zachodzić nie tylko z kodonu AUG2, lecz także z kodonu AUG1 (Ray et al., 2006). Brak obserwacji takiego efektu w liniach komórkowych może wskazywać na udział dodatkowych białek typu ITAF występujących w żywych komórkach, które ułatwiają przebieg tego typu inicjacji translacji.

a



b

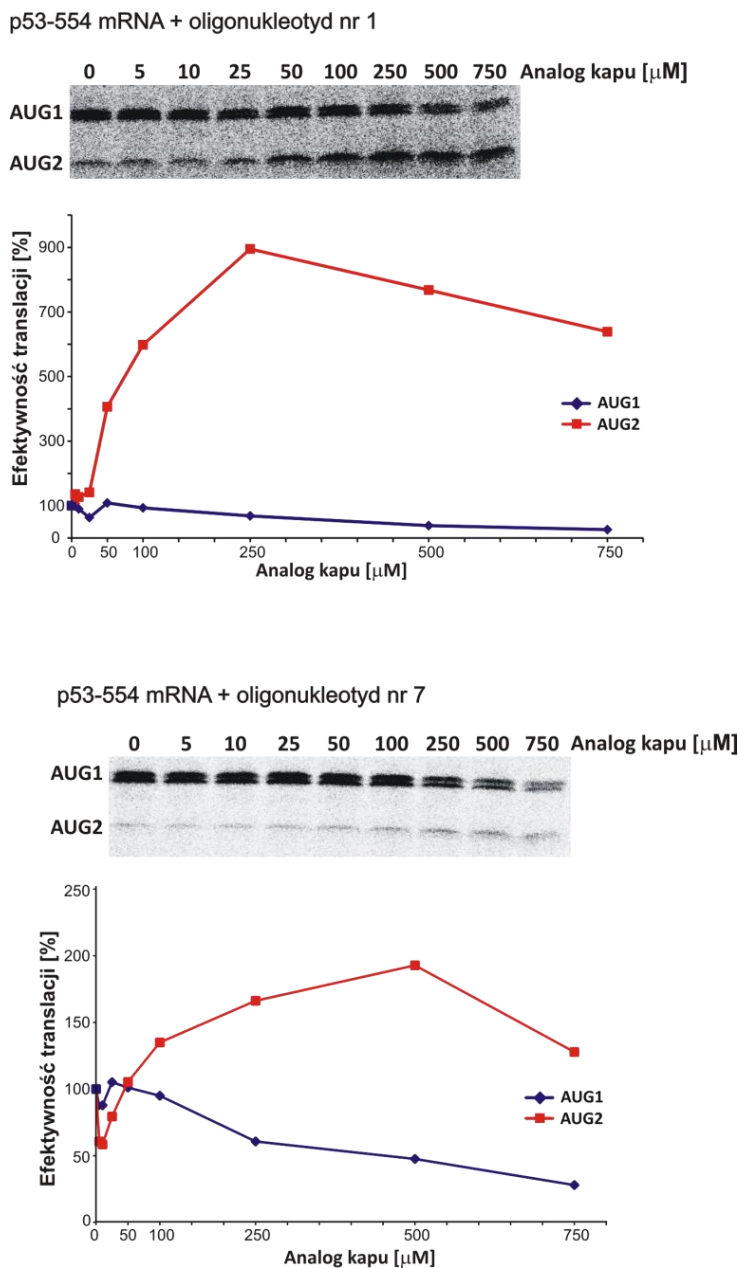


Rysunek 29. Translacja *in vitro* (a) mRNA p53-554 i (b) mRNA Hp53-554 w obecności oligonukleotydów antysensowych nr 1, 4, 7, 7a i 7b oraz kontrolnego K, wraz ze schematycznym przedstawieniem modelowych mRNA. Autoradiogramy przedstawiają rozdział elektroforetyczny produktów białkowych, w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego z dodatkiem 0,1% SDS (pełny opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3.). ASO oznacza oligonukleotyd antysensowy. Wykres obrazuje wpływ oligonukleotydów na wydajność translacji inicjowanej z AUG1 i AUG2. Wszystkie wartości są średnimi pochodzącymi z trzech powtórzeń, znormalizowanymi w stosunku do reakcji kontrolnej – K bez oligomeru.

W przypadku mRNA p53-554, zastosowanie oligonukleotydu nr 7 obniżyło syntezę białka zachodzącą z kodonu AUG1 o około 35% (Rys. 29a), natomiast translacja mRNA Hp53-554 z kodonu AUG1 została zredukowana o około 20% (Rys. 29b). Translacja mRNA p53-554 zachodząca z kodonu AUG1 została zahamowana o 20% także przy użyciu oligonukleotydu nr 7a. Powyższe obserwacje są zgodne z danymi otrzymanymi w badaniach na linii komórkowej MCF-7, gdzie oligomery nr 7 i 7a obniżyły efektywność syntezy białka p53 w warunkach stresowych. Jednakże po przeprowadzeniu translacji *in vitro* zarówno mRNA p53-554 jak i Hp53-554, w obecności oligonukleotydu 7b, nie zaobserwowałam żadnych zmian w efektywności translacji, pomimo iż były one widoczne w eksperymencie przeprowadzonym na komórkach.

Translacja zachodząca z kodonu AUG2, w przypadku mRNA p53-554, była obniżona o około 30% w obecności oligonukleotydu nr 7b i o około 15% w obecności oligomeru nr 7 (Rys. 29a). Silniejszy efekt, mianowicie obniżenie wydajności o około 25%, obserwowano po przeprowadzeniu translacji z mRNA Hp53-554 w obecności oligonukleotydu nr 7 (Rys. 29b). Synteza zachodząca z kodonu AUG2 w przypadku mRNA p53-554 i Hp53-554 nie została zahamowana po zastosowaniu oligomeru nr 7a. Natomiast badania przeprowadzone na linii komórkowej HepG2 pokazały, że przy wykorzystaniu oligonukleotydu nr 7a efektywność translacji zachodzącej z kodonu AUG2 wzrasta. Wprowadzenie do reakcji oligonukleotydu nr 4 obniżyło efektywność translacji w przypadku wariantu Hp53-554 zachodzącej z kodonu AUG2 o około 15%, co jest porównywalne z danymi otrzymanymi z doświadczeń przeprowadzonych na linii komórkowej HT-29.

Kolejnym eksperymentem była translacja *in vitro* wariantu mRNA p53-554 posiadającego strukturę kap na końcu terminalnym 5' mRNA, przeprowadzona w obecności wolnego analogu kapu m^7GpppG . Analog kapu jest inhibitorem kap-zależnej inicjacji translacji, a badania przy jego użyciu były już wcześniej prowadzone w naszym laboratorium (Błaszczuk & Ciesiolka 2011; Gorska et al., 2013a). Zastosowanie w reakcji m^7GpppG ma na celu związanie czynników inicjacji translacji znajdujących się w lizacie, tak aby nie mogły wiązać się do kapu obecnego na końcu 5' mRNA, co w konsekwencji powoduje inhibicję kap-zależnego procesu translacji.



Rysunek 30. Analiza ilościowa efektywności translacji wariantu mRNA p53-554, po zastosowaniu oligonukleotydów nr 1 i 4, w obecności wzrastającego stężenia wolnego analogu kapu $m^7\text{GpppG}$. Autoradiogram przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów białkowych syntetyzowanych z kodonów AUG1 i AUG2, przeprowadzony w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego, z dodatkiem 0,1% SDS (pełny opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3.).

Reakcja translacji *in vitro* prowadzona była w RRL, w obecności metioniny znakowanej izotopem siarki [^{35}S]-Met, do którego dodany został analog kapu o wzrastającym stężeniu od 0 do 750 μM , po czym do każdej próby dodana została taka

sama ilość mRNA p53-554 (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.3.1.). Następnie na podstawie rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących z dodatkiem 0,1% SDS, określona została ilość produktów białkowych powstających z obydwu kodonów, AUG1 i AUG2, w odniesieniu do reakcji kontrolnej prowadzonej bez dodatku wolnego analogu kapu. Po przeprowadzeniu translacji *in vitro* wariantu mRNA p53-554 w obecności analogu kapu oraz oligonukleotydów nr 1 i 7 synteza zachodząca z kodonu AUG1 została zahamowana (Rys. 30). W miarę wzrostu stężenia analogu malała efektywność translacji, a przy najwyższym jego stężeniu – 750 μM wydajność wynosiła jedynie 30%, w porównaniu do próby, do której nie dodano analogu kapu. Co interesujące, w przypadku translacji zachodzącej z kodonu AUG2, przy wzrastającym stężeniu analogu kapu, wzrastała też efektywność syntezy białka. W próbie, gdzie dodany został oligonukleotyd nr 1, przy maksymalnym stężeniu analogu kapu, efektywność translacji przekroczyła 900%, w porównaniu z reakcją bez analogu kapu. Natomiast po zastosowaniu oligonukleotydu nr 7, przy najwyższym stężeniu analogu, efektywność syntezy wynosiła 200%, zestawiając z reakcją kontrolną (Rys. 30).

Powyższe wyniki analizy pokazują, jak duży wpływ ma struktura drugorzędowa mRNA na translację zachodzącą z kodonu AUG1 dla białka p53 oraz AUG2 dla izoformy $\Delta 40\text{p}53$. Ponadto dowodzą, że elementy struktury drugorzędowej w obrębie U180–U228 w regionie terminalnym 5' mRNA p53, są niezbędne dla prawidłowej syntezy tych białek. Dodatkowo struktura drugorzędowa spinki do włosów obejmująca region G56–C169, jest kluczowa dla zachowania wysokiej wydajności translacji zachodzącej z kodonu AUG2. Jednakże porównując wpływ oligonukleotydów na reakcję translacji przeprowadzoną *in vitro* w RRL oraz w komórkach można zaobserwować pewne różnice. Mogą one być wynikiem różnego składu białkowego lizatu z retikulocytów króliczych i zestawu białek obecnych w żywych komórkach.

3.1.7. Dyskusja

Zaproponowano, że inicjacja syntezy białka p53 oraz izoformy $\Delta 40\text{p}53$ może zachodzić w sposób IRES-zależny, z wykorzystaniem elementów struktury drugorzędowej znajdujących się w regionie terminalnym 5' mRNA p53. Liczne analizy porównawcze

sekwencji RNA obejmującej region niekodujący 5' wraz z 40 nukleotydami sekwencji kodującej wykazały wysoką zachowawczość ewolucyjną tego regionu (Błaszczak & Ciesiolka 2011). Co więcej, informacje zgromadzone w bazach danych pokazują, że w komórkach nowotworowych znacznie mniej mutacji znajdowano w tym regionie, niż w sekwencji kodującej (Leroy et al., 2013).

Do określenia roli elementów struktury drugorzędowej zlokalizowanych w regionie terminalnym 5' mRNA p53 wykorzystałam oligonukleotydy antysensowe modulujące translację (Rys. 17). Na podstawie otrzymanych wyników wnioskuję, że zachowana struktura drugorzędowa w obrębie nukleotydów U180–U228 jest konieczna dla wysokiej wydajności translacji mRNA p53. Oligonukleotydy nr 7, 7a, i 7b, nakierowane na ten region, spowodowały obniżenie efektywności syntezy białka p53 i/lub izoformy $\Delta 40p53$ (Rys. 22 i 24). Jedną z przyczyn może być zmiana struktury drugorzędowej tego regionu wywołana przyłączeniem się oligonukleotydów, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia oddziaływania z czynnikami ITAF. Jest to zgodne z obserwacjami Sharathchandra i współpracowników, którzy wykazali, że struktura drugorzędowa typu spinki, obejmująca nukleotydy U180–U228, stanowi miejsce oddziaływania białek i czynników ITAF biorących udział w procesie IRES-zależnej inicjacji translacji (Sharathchandra et al., 2014). Dodatkowo, badania ujawniły, że naturalnie występująca mutacja L22L (zmiana kodonu CUA na CUG w pozycji 22), która znajduje się w apikalnej pętli spinki U180–A218, osłabia syntezę p53 i $\Delta 40p53$ (Candeias et al., 2008; Grover et al., 2011). Najprawdopodobniej jest to rezultat zredukowanego oddziaływania białka HDM2 z tym regionem. Ponadto mutacja ta wpływa na zmianę struktury trzeciorzędowej mRNA w tym regionie, co potwierdzono w badaniach mapowania struktury RNA (Candeias et al., 2008; Grover et al., 2011).

Badania mapowania struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53, w obecności oligonukleotydów antysensowych wykazały, że oligomer nr 7a powoduje zmiany struktury drugorzędowej w obrębie pętli apikalnej spinki U180–A218, a także jej ekspozycję na cięcie indukowane w obecności jonów ołowiu (II). Zaburzenie struktury drugorzędowej spowodowało znaczne obniżenie efektywności syntezy białka p53 w linii komórkowej MCF-7 oraz izoformy $\Delta 40p53$ w komórkach HT-29 w warunkach stresowych (Rys. 22 i 24). Zupełnie odwrotny był wpływ oligonukleotydu nr 7, ponieważ

oligonukleotyd nakierowany na pętlę apikalną uniemożliwił cięcie jonami ołowiu (II) w tym regionie (Rys. 18). Pomimo to obserwowano zmniejszenie efektywności syntezy białka p53 oraz izoformy $\Delta 40p53$, podobnie jak w przypadku użycia oligonukleotydu nr 7a (Rys. 22). Powyższe rezultaty podkreślają istotne znaczenie pętli apikalnej w potencjalnych oddziaływaniach z czynnikami ITAF, które mogą wpłynąć na IRES- zależną syntezę p53 i $\Delta 40p53$.

Wykazano, że zmiany struktury drugorzędowej w obrębie centralnego regionu spinki U180–A218, spowodowane przez mutacje synonimiczne w kodonach 17, 18 i 19, wywołują zmiany w oddziaływaniu z białkami HDM2 i hnRNP C1/C2 (Candeias et al., 2008; Grover et al., 2011). Niemniej jednak wystąpienie mutacji w tym obrębie może prowadzić do zaburzenia oddziaływań również z innymi czynnikami białkowymi. Niedawno zaproponowano, że białko PTB (ang. *polypyrimidine-track-binding*) oddziałuje z regionem A189–U194 (Khan et al., 2013). Co interesujące, region ten stanowi jednocześnie miejsce przyłączania się oligonukleotydu nr 7a (Rys. 17). Otrzymane przeze mnie wyniki sugerują zatem, że oligonukleotyd nr 7a, oprócz modyfikacji struktury drugorzędowej mRNA, może także konkurować z białkiem PTB o wiązanie do miejsca docelowego na mRNA. Powyższe obserwacje są bardzo istotne, ponieważ wykazano, że białko PTB stymuluje aktywność IRES-zależnej translacji. Z tego też powodu, motywy struktury drugorzędowej regionu U180–A218, muszą pozostać niezmienione, aby oddziaływania z czynnikami ITAF były prawidłowe i proces IRES-zależnej translacji zachodził efektywnie.

Okazało się, że w obecności oligonukleotydu nr 7b synteza zarówno białka p53 jak i izoformy $\Delta 40p53$ jest silnie obniżona (Rys. 22 i 24). Efekt ten był zauważalny nie tylko w warunkach stresu komórkowego, lecz także bez użycia czynników stresowych, co jest zgodne z naszymi wcześniejszymi obserwacjami (Gorska et al., 2013b). Nieoczekiwanie, obniżenie efektywności translacji nie było zauważalne, w warunkach reakcji *in vitro* w RRL (Rys. 29). Co ciekawe, region, do którego wiąże się oligomer 7b tj. A219–U228, nie był do tej pory uznawany za istotny region regulatorowy. Przedstawione przeze mnie wyniki sugerują, iż region ten może stanowić miejsce oddziaływania mRNA z białkami, lub długimi niekodującymi RNA, które wpływają na proces inicjacji syntezy białka p53. Podobnie jest w przypadku wirusa HCV, u którego do regionu 5'UTR przyłącza się

miR122 regulując jego translację poprzez zmianę struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA (Ji et al., 2004). Dlatego też możemy przypuszczać, iż oligonukleotyd 7b konkuruje w wiązaniu się czynników, które są niezbędne w translacji zarówno IRES- jak i kap-zależnej zachodzącej w komórkach. Czynniki te mogą być jednak nieobecne w RRL, co skutkuje brakiem konkurencji o miejsce wiązania. W rezultacie, proces translacji zachodzący w obecności oligomeru nr 7b może różnić się w komórkach i w warunkach *in vitro*.

Otrzymane wyniki wskazały, że oligonukleotydy antysensowe wpływają w istotny sposób na proces translacji. Jednakże wyniki znacznie różniły się dla poszczególnych linii komórkowych oraz po zastosowaniu czynników stresowych. W obecności oligomerów nr 7 oraz 7a efektywność syntezy izoformy $\Delta 40p53$ w komórkach HepG2 wzrosła, w warunkach zarówno stresu oksydacyjnego jak i genotoksycznego (Rys. 26). Ta sama para oligomerów spowodowała obniżenie syntezy izoformy $\Delta 40p53$ w linii komórkowej HT-29 w stresie oksydacyjnym (Rys. 22). Ponadto oligonukleotydy te obniżają efektywność syntezy białka p53 w linii komórkowej MCF-7 w obecności czynników stresowych. Rozbieżność otrzymanych wyników może być rezultatem odmiennej odpowiedzi linii komórkowej na dany czynnik stresowy (Candeias et al., 2006). W przypadku oligonukleotydów nr 7 i 7a, których przyłączenie do regionu terminalnego 5' mRNA p53 powodowało rozplecenie struktury drugorzędowej spinki U180–A218, efekt wzrostu efektywności syntezy izoformy $\Delta 40p53$ w linii komórkowej HepG2 może być skutkiem ułatwionego przyłączania się białek (Rys. 26).

W przypadku zastosowania oligonukleotydu nr 1, nakierowanego na strukturę drugorzędową spinki G56–C169, efektywność syntezy białek p53 i $\Delta 40p53$ nie uległa dużej zmianie. Zauważono jedynie niewielki spadek syntezy izoformy $\Delta 40p53$ w linii komórkowej HT-29, a także brak zmian w efektywności syntezy białka p53 w komórkach MCF-7 w warunkach stresu oksydacyjnego (Rys. 22 i 24). Co ciekawe, spadek syntezy białka p53 był obserwowany jedynie w RRL. Wcześniejsze badania pokazały, że mutacja punktowa zmieniająca cytozynę na tyminę w pozycji 119 w regionie terminalnym 5' mRNA p53 w komórkach czerniaka skóry, znacząco wpływa na kap-niezależną translację (Khan et al., 2013). Mutacja ta, prawdopodobnie osłabia oddziaływanie białka PTB ze strukturą IRES. Porównanie efektywności translacji różnych wariantów mRNA p53

posiadających odmienne fragmenty regionu terminalnego 5' pokazało, że 5'UTR wpływa na wydajność syntezy białek. Jest to związane z interakcją białka RPL26 z tym regionem w warunkach stresu genotoksycznego. Co więcej, wiązanie białka RPL26 wymaga zgodności nukleotydowej w pozycji G82–G102 5'UTR mRNA p53, a także komplementarności w regionie 3'UTR (Chen & Kastan 2010). Wskazuje to na istotną rolę funkcjonalną motywu strukturalnego spinki do włosów G56–C169.

W poprzednich badaniach przeprowadzonych w naszym laboratorium wykazano, że translacja inicjowana z kodonu AUG2 przebiega w sposób kap-niezależny. Pokazano, że zatrzymanie kap-zależnej translacji zachodzącej z kodonu AUG1, poprzez umieszczenie stabilnej termodynamicznie spinki do włosów w regionie niekodującym 5'mRNA nie wpływa na translację inicjowaną z kodonu AUG2 (Gorska et al., 2013b). Co więcej przeprowadzenie reakcji translacji *in vitro* w obecności analogu kapu m⁷GpppG spowodowało wzrost translacji zachodzącej z kodonu AUG2, co silnie wskazuje na mechanizm kap-niezależny inicjacji translacji z udziałem elementu IRES (Błaszczak & Ciesiolka 2011). Wzrost efektywności translacji po zastosowaniu analogu kapu wskazuje na możliwą konkurencję pomiędzy inicjacją zależną od kap, a IRES-zależnym mechanizmem inicjacji w warunkach *in vitro*. Dlatego też, zaobserwowany przeze mnie znaczący wzrost wydajności translacji w przypadku wariantu mRNA p53-554, w obecności oligonukleotydów antysensowych nr 1 i 7 oraz po zastosowaniu analogu kapu, świadczy o obecności motywu IRES w regionie terminalnym 5' mRNA p53 (Rys. 30).

Podsumowując, wykorzystanie oligonukleotydów antysensowych umożliwiło modulację efektywności inicjacji syntezy białka p53 i izoformy Δ40p53 w komórkach, poprzez zmianę struktury drugorzędowej mRNA w regionie terminalnym 5'. Udowodniło to bardzo ważną rolę tego regionu w procesie translacji. W warunkach stresu komórkowego, region U180–A218 stanowiący motyw spinki do włosów pełni rolę elementu działającego w układzie *cis*, który pozwala na regulowanie aktywności IRES poprzez oddziaływanie z białkami pomocniczymi.

3.2. Wpływ wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 na proces skanowania mRNA przez rybosom i efektywność translacji

Translacja jest złożonym, kilkietapowym procesem pozwalającym na rozszyfrowanie informacji genetycznej zawartej w DNA oraz jej ekspresję w postaci różnych białek. Proces składa się z trzech głównych etapów – inicjacji, elongacji oraz terminacji, a każdy z nich wymaga precyzyjnego i skoordynowanego działania setek cząsteczek, a także podlega dokładnej kontroli. Niezwykle ważnym etapem jest inicjacja translacji, w której kodon inicjacyjny AUG w mRNA jest identyfikowany przez rybosomalny kompleks pre-inicjacyjny 43S PIC (ang. *pre-initiation complex*), składający się z małej podjednostki rybosomu 40S, tRNA_i^{Met}, GTP oraz czynników inicjacyjnych eIF1, eIF1A, eIF3 i eIF2. Następnie, w chwili rozpoznania AUG, podjednostka rybosomalna 60S łączy się z PIC, tworząc kompleks inicjacyjny 80S zdolny do rozpoczęcia fazy elongacji. W procesie tym, co najmniej dwanaście różnych czynników inicjujących jest wymaganych do prawidłowego rozpoczęcia translacji (Hershey et al., 2012).

Mechanizm skaningowy jest głównym mechanizmem, według którego dochodzi do rozpoznania kodonu inicjacyjnego. Obejmuje on wiązanie się kompleksu PIC z końcem 5' mRNA w miejscu struktury kap – m⁷GpppN. Następnie odbywa się migracja kompleksu wzdłuż mRNA w kierunku 3' aż do rozpoznania kodonu start AUG. Szybkość z jaką rybosom migruje skanując sekwencję 5'UTR jest indywidualna dla każdego mRNA. Zważywszy na fakt, iż 43S PIC może przyłączyć się jedynie do jednoniciowej struktury RNA, wysokie ustrukturyzowanie regionu terminalnego 5' nie jest korzystne dla rybosomu. W szczególności niepożądana jest obecność motywów strukturalnych o dużej trwałości termodynamicznej, znajdujących się w tym regionie, które muszą zostać rozplecone przez liczne białka helikalne, co może opóźnić proces skanowania (Kozak 1987; Pisareva et al., 2008).

Pomimo, iż proces biosyntezy białek został dość dobrze zbadany, wciąż jednak nie do końca poznany jest mechanizm inicjacji translacji pojedynczych mRNA. Choć czynniki inicjacji translacji i formacja kompleksu w kap-zależnej inicjacji zostały dobrze scharakteryzowane, jak dotąd niewiele wiadomo o migracji rybosomu podczas procesu

skanowania. Badania przedstawione przeze mnie w poprzednim rozdziale wykazały, że efektywność syntezy białka p53 jest silnie zależna od struktury drugorzędowej znajdującej się w regionie terminalnym 5' jego mRNA. Dlatego też postanowiłam rozszerzyć te badania o bardziej szczegółową analizę mechanizmu inicjacji translacji. Zatem, kolejnym celem moich badań było określenie wpływu struktury drugorzędowej oraz długości 5'UTR mRNA na szybkość skanowania mRNA przez rybosom z wykorzystaniem modelowych konstruktów mRNA p53.

3.2.1. Przygotowanie modelowych konstruktów regionu terminalnego 5' mRNA p53

Pierwszym etapem badań było zaprojektowanie a następnie zsyntetyzowanie modelowych mRNA zawierających warianty sekwencyjne regionu terminalnego 5' mRNA p53. Warianty te, różniły się od siebie długością a także strukturą drugorzędową, jaką przyjmuje ten region mRNA p53. Celem takiego podejścia było określenie wpływu wprowadzonych zmian w regionie niekodującym 5' mRNA na efektywność translacji, a w szczególności na czas skanowania mRNA przez rybosom. Modelowe mRNA powstały w wyniku reakcji transkrypcji *in vitro*, na bazie zsyntetyzowanych wcześniej w naszym zakładzie konstruktów dsDNA zawierających warianty regionu niekodującego 5': P1-Δ40p53 oraz P0-Δ40p53 (Rys. 31a). P1-Δ40p53 obejmuje region niekodujący 5' mRNA p53 rozpoczynający się od miejsca promotorowego P1, natomiast P0-Δ40p53 zawiera dodatkowo 113-nt region między-promotorowy P0-P1. Obydwa konstrukty mRNA posiadają kodon inicjacyjny AUG1 oraz kodon AUG2, za którym zlokalizowana jest sekwencja kodująca białko lucyferazę *Renilla* (Błaszczak & Ciesiolka 2011; Gorska et al., 2013ab). Szczegółowy opis przygotowania wszystkich konstruktów dsDNA znajduje się w rozdziale 5.4.1.

Pierwsza para opracowanych przeze mnie wariantów została przygotowana na podstawie konstruktu P1-Δ40p53. Założeniem było zsyntetyzowanie wariantów mRNA posiadających zmienioną strukturę drugorzędową mRNA w obrębie kodonu inicjacyjnego AUG1. Warianty zostały zaprojektowane tak aby P1-Δ40p53(L) zawierał kodon AUG1 w jednoniciowej strukturze typu pętli wewnętrznej, natomiast P1-Δ40p53(S) posiadał kodon AUG1 w dwuniciowym regionie struktury drugorzędowej. Konstrukty dsDNA

uzyskałam poprzez wprowadzenie substytucji punktowych na drodze ukierunkowanej mutagenezy, za pomocą startera DNA niosącego mutacje (sekwencje starterów podane są w tabeli 6 rozdziału 5.4.1.). W rezultacie, w przypadku wariantu mRNA P1-Δ40p53(L) nukleotydy: U, C, C, A w pozycjach 77, 78, 79, 80 zostały zamienione na nukleotydy A, A, G, C, natomiast w wariantcie mRNA P1-Δ40p53(S) nukleotydy C oraz A w pozycjach 81 i 83 zostały zamienione na U oraz G.

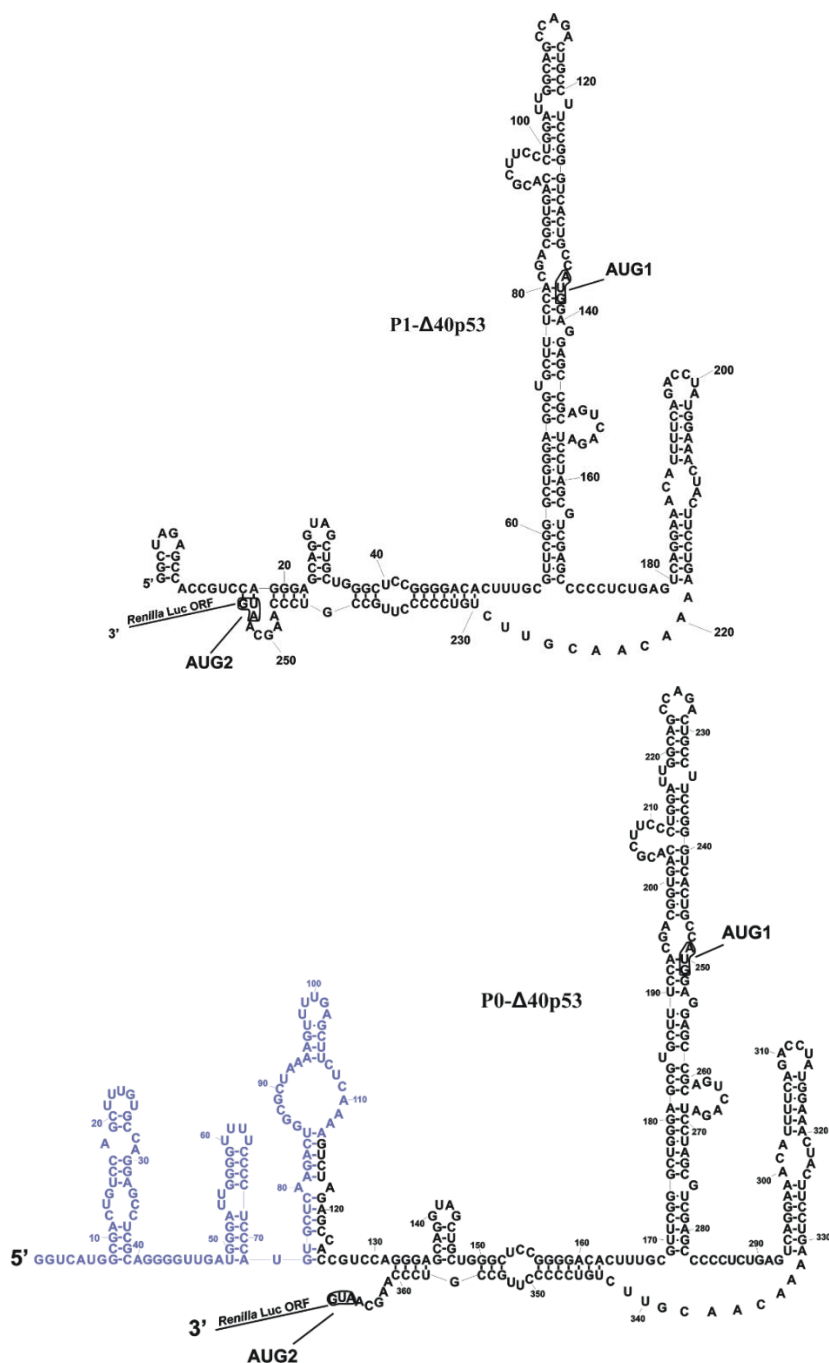
Kolejną parę przygotowanych wariantów stanowiły mRNA posiadające nieaktywny kodon inicjacyjny AUG2: P1-Δ40p53(gUG2) oraz P0-Δ40p53(gUG2). Powstały one na podstawie konstruktów P1-Δ40p53 i P0-Δ40p53. Przy wykorzystaniu metody ukierunkowanej mutagenezy, na miejsce adenozyliny znajdującej się w pozycji 253 w przypadku wariantu P1-Δ40p53, oraz 366 w przypadku wariantu P0-Δ40p53, w obrębie kodonu AUG2 została wprowadzona guanozyna, tak aby kodowany aminokwas był zmieniony z metioniny na walinę (sekwencje zastosowanych starterów DNA znajdują się w tabeli 6). W rezultacie, inicjacja translacji z tego kodonu miała zostać zahamowana.

Następną parą wariantów były P1-Δ40p53(Δ57) oraz P1-Δ40p53(ΔHDM2), które posiadały większe zmiany wprowadzone do struktury drugorzędowej. Zostały one przygotowane na podstawie konstruktów P1-Δ40p53. W przypadku modelowego mRNA P1-Δ40p53(Δ57) trzon spinki G56–C169 oraz jej pętla apikalna zostały skrócone poprzez delecję nukleotydów w pozycjach: 57–73, 100–125 oraz 145–168. Natomiast wariant P1-Δ40p53(ΔHDM2) został pozbawiony motywu strukturalnego spinki do włosów U180–A218 poprzez usunięcie nukleotydów w pozycjach 180–215.

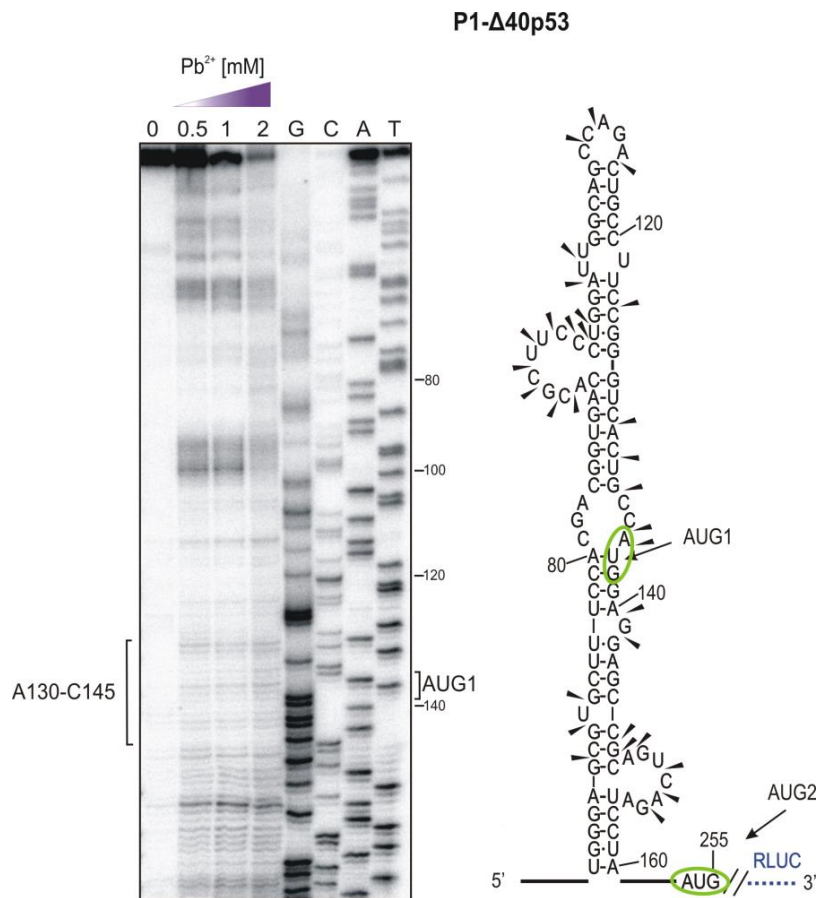
Dodatkowo przygotowanym wariantem był P1-Δ40p53(ΔA224), posiadający delecję adeniny w pozycji 224. Konstruktor ten, powstały na bazie P1-Δ40p53, posiadał dwa kodony inicjacyjne, lecz w wyniku delecji pojedynczego nukleotydu przesunięta została ramka odczytu dla translacji zachodzącej z kodonu AUG1.

Kolejnym etapem przygotowania modelowych wariantów mRNA do badań przebiegu translacji była eksperymentalna analiza ich struktur drugorzędowych. Po przeprowadzeniu ukierunkowanej mutagenezy, przygotowane konstrukty dsDNA, zawierające warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53, linearyzowałam za pomocą trawienia enzymem restrykcyjnym NotI, tuż za sekwencją kodującą białko reporterowe. Następnie, dzięki obecności sekwencji promotora dla polimerazy T7 na końcu 5' każdego

z wariantów, przeprowadziłam reakcję transkrypcji *in vitro*. Szczegółowy opis procedur trawienia dsDNA enzymem restrykcyjnym jak i transkrypcji *in vitro* znajduje się w rozdziale odpowiednio 5.4.1.3 oraz 5.4.2.



Rysunek 31a. Struktura drugorzędowa wariantów regionu niekodującego 5' mRNA p53: P0-Δ40p53 oraz P1-Δ40p53. Region między-promotorowy P0-P1 zaznaczony jest kolorem niebieskim (na podstawie Blaszczyk & Ciesiolka 2011; Gorska et al., 2013b).



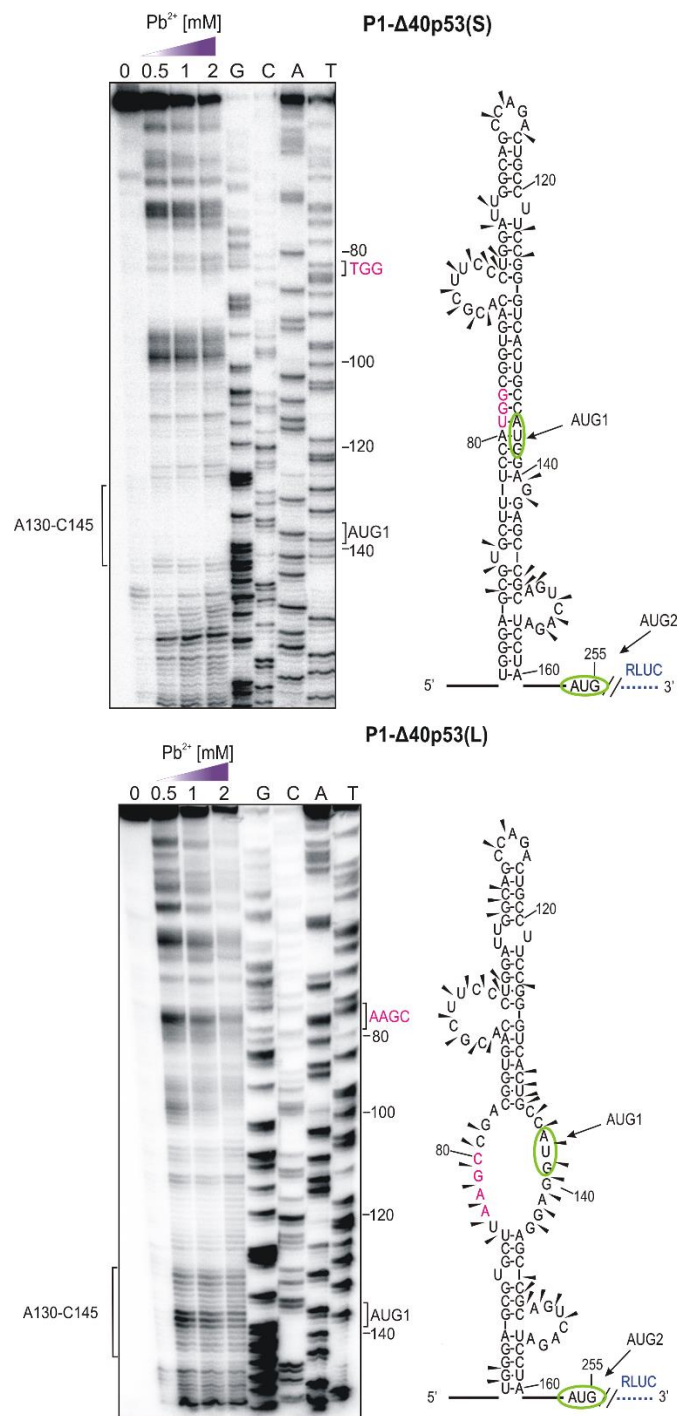
Rysunek 31b. Analiza struktury drugorzędowej konstrukt mRNA P1-Δ40p53 przy użyciu metody cięcia indukowanego w obecności jonów Pb²⁺. Po lewej stronie przedstawiono autoradiogram po rozdziale elektroforetycznym w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7 M mocznika (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.1.), obrazujący wyniki reakcji cięcia Pb²⁺. Ścieżki G, C, A i T wskazują linie sekwencyjne, podczas gdy 0, 0,5, 1 i 2 mM wskazują na rosnące stężenie jonów ołowiu (II). Wybrane pozycje nukleotydów zaznaczono po prawej stronie autoradiogramu. Region z kodonem AUG1 jest oznaczony na żelu, jako A130–C145. Po prawej stronie przedstawiono uproszczony model struktury drugorzędowej mRNA. Kodony inicjacyjne AUG zaznaczone są na zielono, cięcia indukowane przez Pb²⁺ są oznaczone czarnymi strzałkami, natomiast na niebiesko oznaczono sekwencję lucyferazy *Renilla*.

Otrzymane modelowe konstrukty mRNA poddałam reakcji cięcia indukowanego w obecności jonów ołowiu i/lub acylacji grup 2'-hydroksylowych analizowanej za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji – SHAPE (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*). Reakcja SHAPE polega na zastosowaniu bezwodnika *N*-metyloizatoicznego (NMIA), który acyluje grupy 2' OH reszt rybozy w regionach jednoniciowych RNA. Miejsca modyfikacji identyfikowałam za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji, z wykorzystaniem enzymu odwrotnej transkryptazy Super Script III, przy pomocy startera DNA znakowanego na końcu 5' izotopem ³²P (sekwencja nukleotydoma

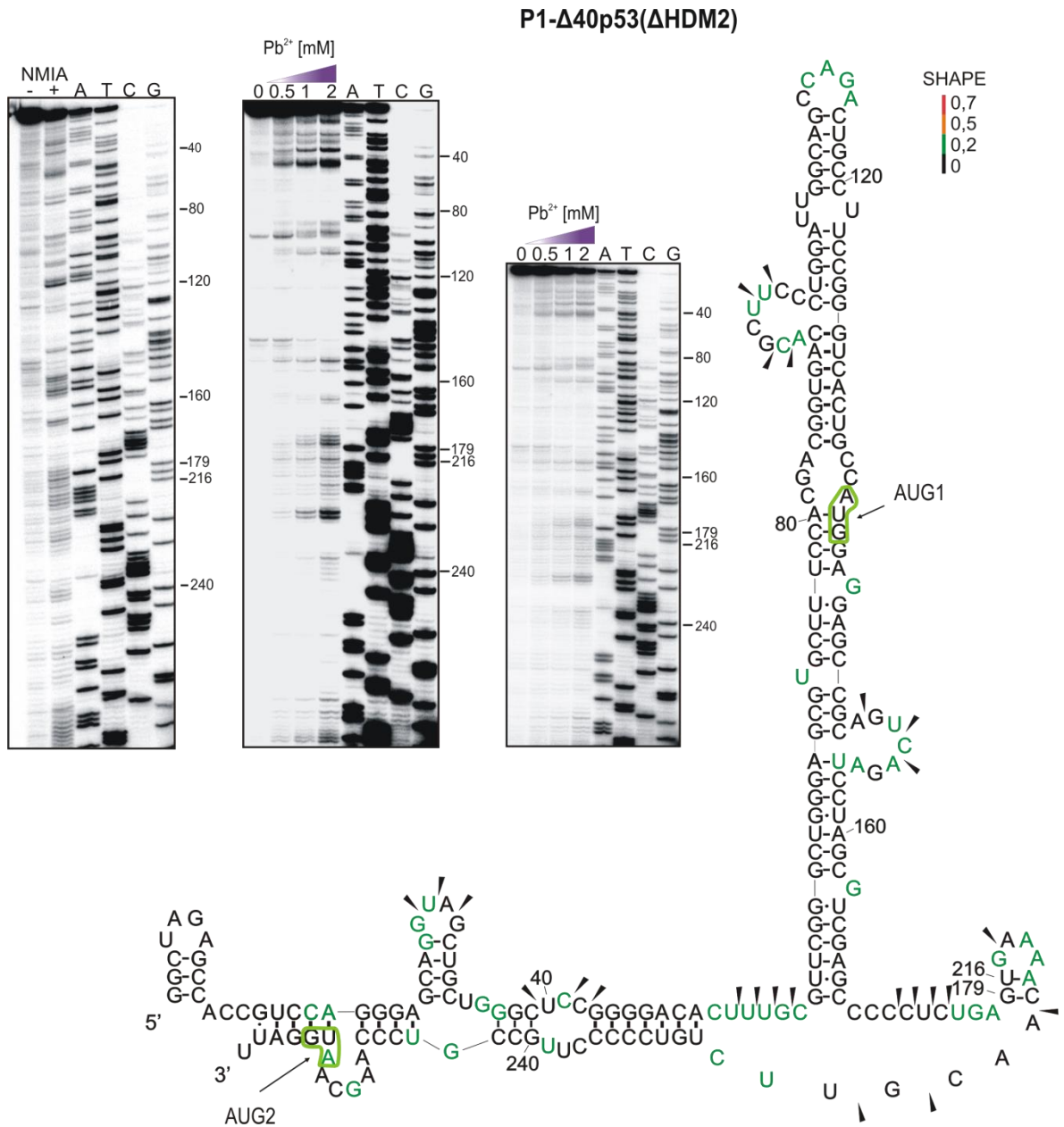
startera zawarta jest w tabeli. 7 w rozdziale 5, natomiast szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.8.1.). Fragmenty cDNA były rozdzielane elektroforetycznie, w warunkach denaturujących w 8% żelu poliakryloamidowym z 7 M mocznikiem oraz w buforze elektroforetycznym 1x TBE. Model struktury drugorzędowej został wygenerowany przez program *RNAstructure 5.6* z uwzględnieniem danych mapowania struktury, otrzymanych za pomocą metody SHAPE. Cięcia indukowane jonami Pb^{2+} naniosłam na model struktury drugorzędowej, po określeniu względnej intensywności cięć w odniesieniu do cięć w reakcji kontrolnej.

Rysunki 31b, 32, 33 i 34 przedstawiają autoradiogramy po reakcji cięcia RNA indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} i/lub modyfikacji SHAPE wraz z modelami struktury drugorzędowej otrzymanych wariantów mRNA, wygenerowanymi komputerowo na podstawie wyników mapowania.

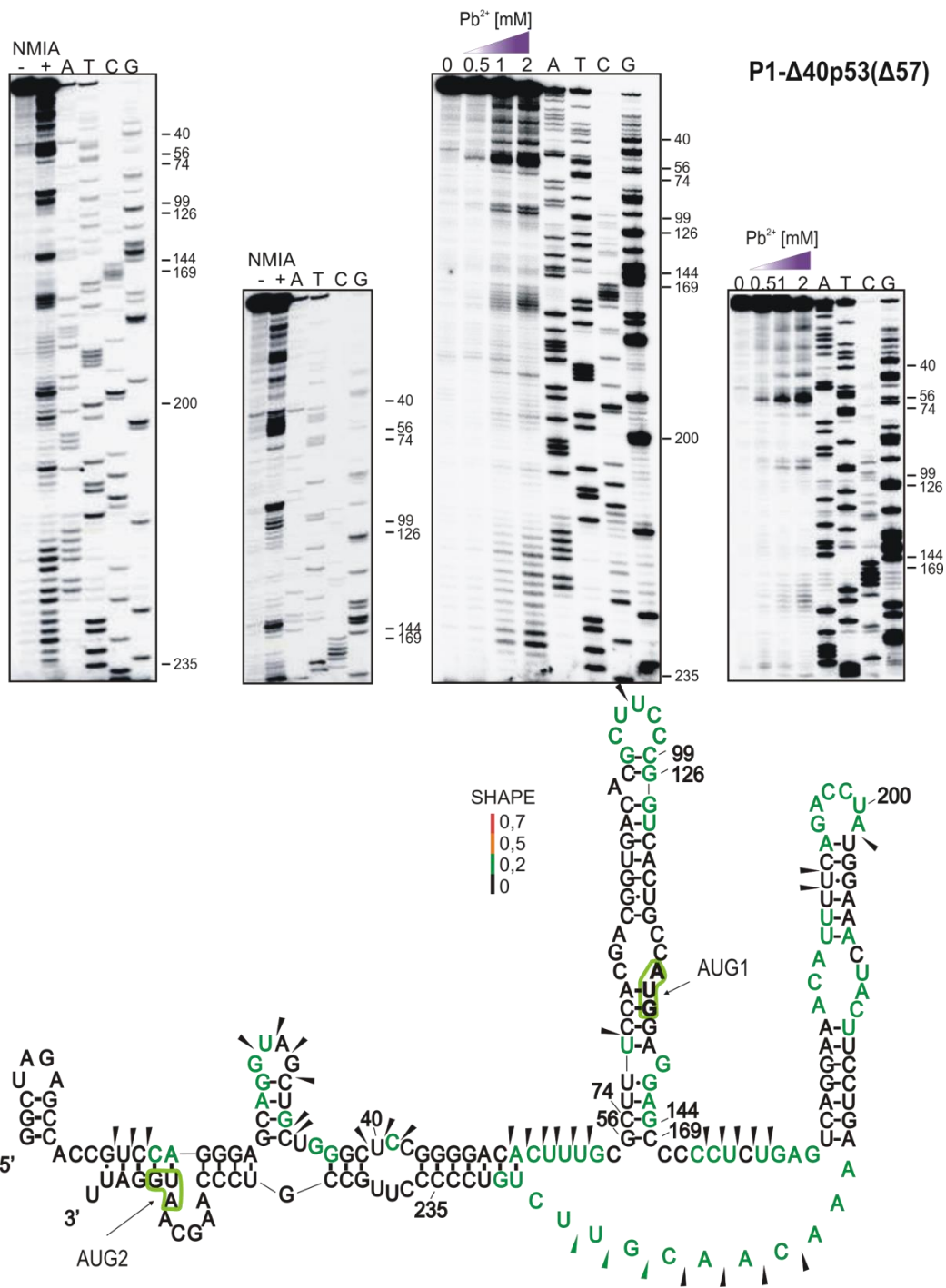
Analiza przeprowadzonej reakcji cięcia RNA za pomocą jonów ołowiu wykazała, zgodnie z oczekiwaniami, że w przypadku konstruktu P1- Δ 40p53(S) struktura drugorzędowa w obrębie kodonu AUG1 jest dwuniciowa (Rys. 32). Porównując z wariantem typu dzikiego P1- Δ 40p53 (Rys. 31b), pozostałe elementy strukturalne zostały zachowane. W przypadku wariantu P1- Δ 40p53(L) także potwierdzona została przewidziana struktura drugorzędowa. Kodon AUG1 znajduje się w jednoniciowym odcinku struktury drugorzędowej (Rys. 32). W wyniku analizy SHAPE oraz cięcia Pb^{2+} , określona została struktura drugorzędowa przygotowanych wariantów P1- Δ 40p53(Δ HDM2) oraz P1- Δ 40p53(Δ 57) (Rys. 33 i 34). Wycięcie fragmentu stanowiącego spinkę U180–A218 w konstrukcie P1- Δ 40p53(Δ HDM2) nie zaburzyło struktury drugorzędowej pozostałych motywów strukturalnych obecnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53 (Rys. 33). Natomiast usunięcie nukleotydów w obrębie regionu G56–C169 spowodowało skrócenie trzonu spinki, lecz bez zmian w strukturze drugorzędowej części apikalnej oraz w obrębie kodonu AUG1 (Rys. 34).



Rysunek 32. Mapowanie struktury drugorzędowej konstruktów P1-Δ40p53(S) oraz P1-Δ40p53(L) metodą cięcia RNA indukowanego w obecności Pb²⁺. Autoradiogramy przedstawiają rozdzielanie elektroforetyczne w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7 M mocznika (szczegółowy opis metody przedstawiony jest w rozdziale 5.3.1.), opis autoradiogramów jest analogiczny do Rysunku 31b. Uproszczone modele struktury drugorzędowej mRNA przedstawiają warianty: P1-Δ40p53(S), w którym kodon AUG1 znajduje się w regionie dwuniciowym, oraz P1-Δ40p53(L), gdzie AUG1 zlokalizowany jest w strukturze jednoniciowej. Zmutowane nukleotydy zaznaczono na żelach i na modelach struktury drugorzędowej na różowo, kolorem zielonym oznaczone są kodony inicjacyjne natomiast niebieskim oznaczono sekwencję lucyferazy *Renilla*.



Rysunek 33. Badanie struktury drugorzędowej konstruktu P1-Δ40p53(ΔHDM2) metodą cięcia indukowanego jonami Pb²⁺ i metodą SHAPE. Autoradiogramy przedstawiają rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7 M mocznika, pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.3.1. Ścieżki "-" i "+" na autoradiogramie wskazują na brak lub dodanie odczynnika NMIA, podczas gdy G, C, A i T oznaczają reakcje sekwencjonowania odpowiednio z nukleotydami guanozynowymi, cytozynowymi, adeninowymi i tyminowymi. Reaktywność SHAPE oznaczono kolorami na uproszczonym modelu struktury drugorzędowej, miejsca cięcia indukowane przez Pb²⁺ oznaczone są czarnymi strzałkami, kodony inicjacyjne AUG zaznaczone są na zielono.

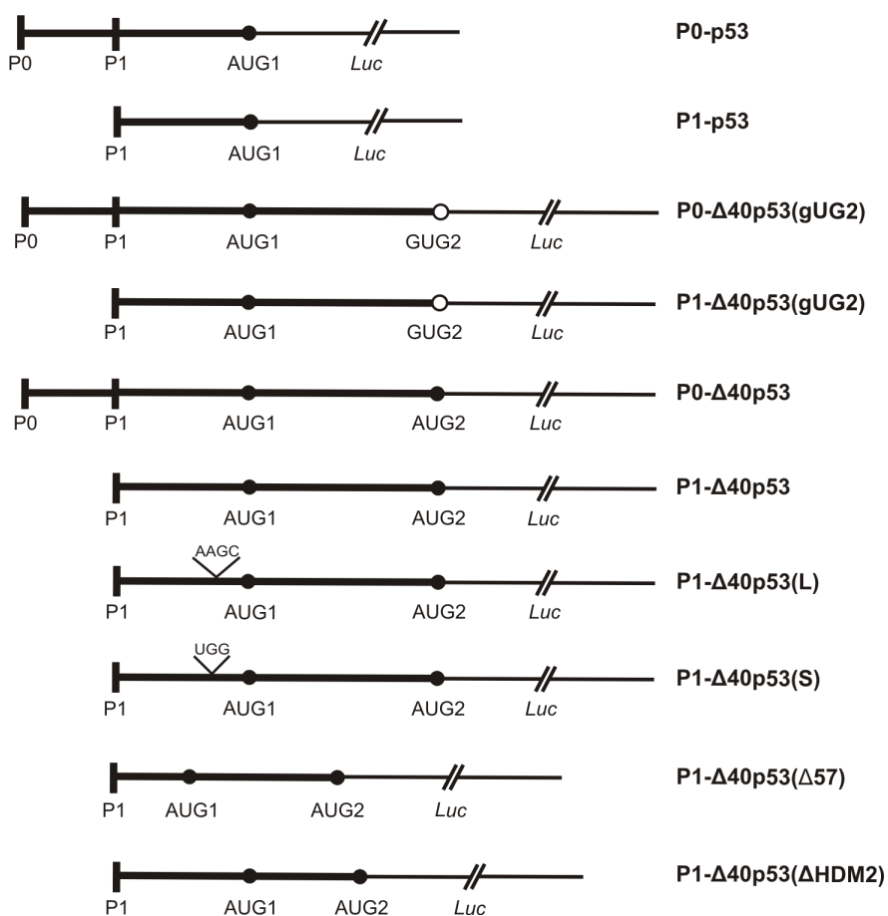


Rysunek 34. Mapowanie struktury drugorzędowej konstruktu P1-Δ40p53(Δ57) metodą cięcia indukowanego przez Pb²⁺ i metodą SHAPE. Autoradiogramy przedstawiają rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7 M mocznika, pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.3.1. Ścieżki "-" i "+" na autoradiogramach wskazują na brak lub dodanie odczynnika NMIA, podczas gdy G, C, A i T oznaczają reakcje sekwencjonowania, odpowiednio z nukleotydami guanozynowymi, cytozynowymi, adeninowymi i tyminowymi. Reaktywność SHAPE oznaczono kolorami na uproszczonym modelu struktury drugorzędowej, miejsca cięcia indukowanego przez Pb²⁺ oznaczone są czarnymi strzałkami, kodony inicjacyjne AUG zaznaczone są na zielono.

3.2.2. Związek pomiędzy zmianą struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 a efektywnością translacji inicjowanej z kodonów AUG1 i AUG2

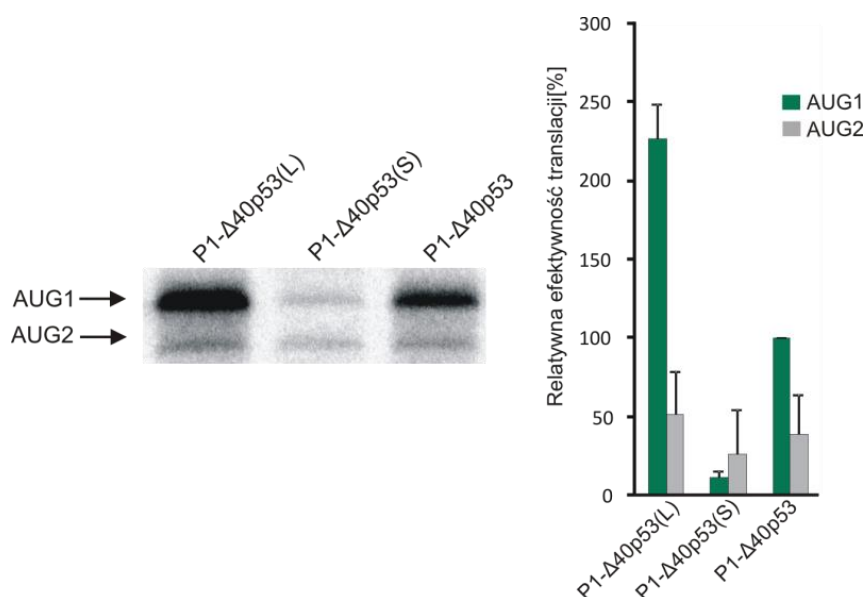
W kolejnym etapie badań postanowiłam określić, jaki jest wpływ wprowadzonych zmian w strukturze drugorzędowej regionu niekodującego 5' mRNA p53, na efektywność translacji. Translację *in vitro* przeprowadziłam w systemie bezkomórkowym – RRL, w obecności metioniny znakowanej izotopem siarki [³⁵S]-Met, z wykorzystaniem zsyntetyzowanych przeze mnie modelowych mRNA posiadających kap na 5' końcu (opis procedury zawarty jest w rozdziale 5.4.3.1.). Po reakcji translacji *in vitro* przeprowadziłam rozdzielanie elektroforetyczne otrzymanych produktów białkowych, w warunkach denaturujących w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego z 0,1% SDS. Wizualizacja produktów białkowych odbyła się na drodze autoradiografii, poprzez zastosowanie w reakcji znakowanej radioaktywnie [³⁵S]-metioniny. Dzięki obecności sekwencji kodującej białko lucyferazę *Renilla* w każdym z wariantów, możliwa była detekcja produktu białkowego generowanego z kodonu AUG1 lub AUG2. Na rysunku 35 schematycznie przedstawione są modelowe mRNA, które testowałam w reakcji translacji w RRL.

W pierwszej kolejności przeprowadziłam reakcję translacji *in vitro* wariantów mRNA P1-Δ40p53(S) oraz P1-Δ40p53(L), posiadających zmianę w obrębie kodonu inicjacyjnego AUG1 (Rys. 36). Dodatkowo wykonałam reakcję kontrolną z wariantem mRNA typu dzikiego P1-Δ40p53. Przedstawiony na rysunku 36 autoradiogram ilustruje, jak istotny wpływ na wydajność translacji ma kontekst strukturalny kodonu inicjacyjnego. Efektywność translacji zachodzącej z kodonu AUG1 dla mRNA P1-Δ40p53(S), jest znacznie niższa niż dla mRNA typu dzikiego – P1-Δ40p53. Jest to rezultat umieszczenia kodonu start w dwuniciowej strukturze drugorzędowej, a tym samym ograniczenia jego dostępności dla maszynerii inicjującej translację. Zgodnie z oczekiwaniami wydajność translacji inicjowanej z kodonu AUG1 zlokalizowanego w jednoniciowej strukturze drugorzędowej, dla P1-Δ40p53(L) była wyższa niż dla mRNA P1-Δ40p53 typu dzikiego. Niezwykle ciekawą obserwacją był wzrost efektywności translacji zachodzącej z kodonu AUG2 o około 30% w przypadku wariantu P1-Δ40p53(L) w porównaniu do translacji mRNA P1-Δ40p53 (Rys. 36).



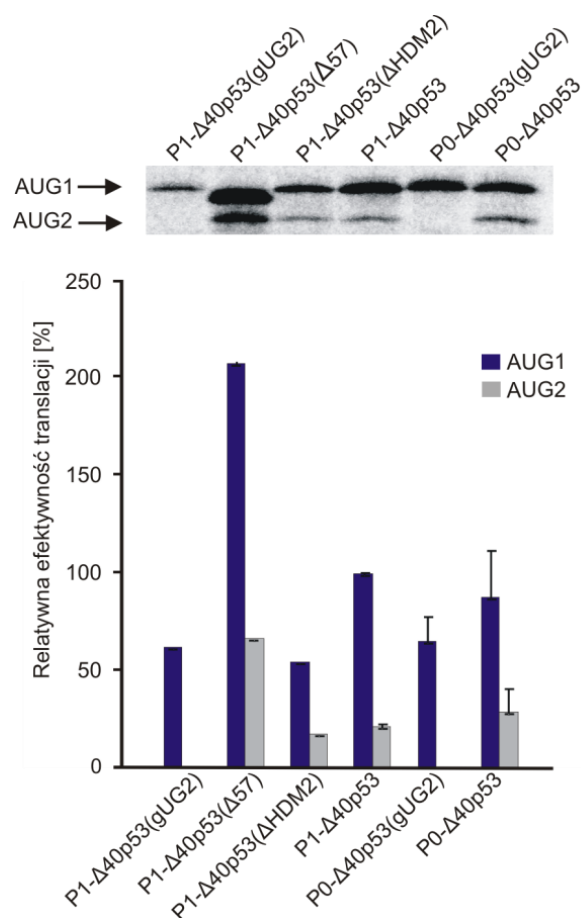
Rysunek 35. Schematyczne przedstawienie konstrukcji składających się z różnych regionów terminalnych 5' mRNA p53 i regionu kodującego lucyferazę *Renilla*. P0 i P1 oznaczają miejsca startu transkrypcji, AUG1 i AUG2 wskazują kodony inicjacji translacji. Kodon AUG2 zmutowano do kodonu GUG dla waliny w konstrukcjach P1-Δ40p53(gUG2) i P0-Δ40p53(gUG2). Podstawienia nukleotydów w konstrukcjach P1-Δ40p53(L) i P0-Δ40p53(S) zaznaczono na schemacie. W konstrukcjach P1-Δ40p53(Δ57) i P1-Δ40p53(ΔHDM2) zmutowano dwa motywy spinki do włosów. Szczegółowy opis przygotowania konstrukcji dsDNA znajduje się w rozdziale 5.4.1.

Dalsze analizy efektywności translacji wykazały, że brak kodonu AUG2 może wpływać na translację inicjowaną z kodonu AUG1. Eksperyment przeprowadzony z wykorzystaniem konstruktu P1-Δ40p53(gUG2) wykazał około 40% niższą efektywność syntezy białka inicjowanej z kodonu AUG1, w porównaniu do wariantu typu dzikiego P1-Δ40p53. Badanie przeprowadzone dla wariantu P0-Δ40p53(gUG2) także wykazało obniżenie efektywności translacji zachodzącej z kodonu AUG1, w porównaniu do P0-Δ40p53 (Rys. 37).



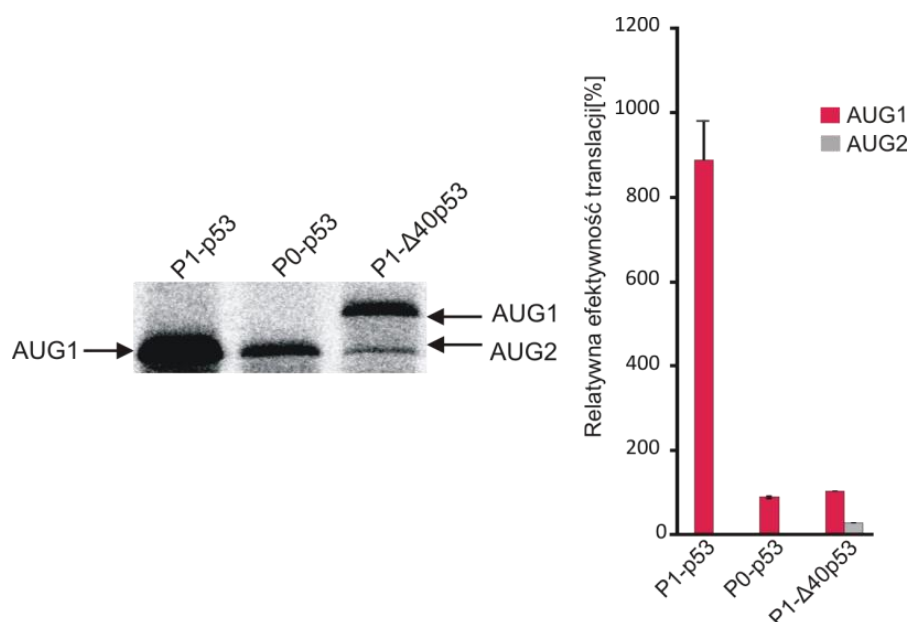
Rysunek 36. Translacja *in vitro* modelowych konstruktów mRNA: P1-Δ40p53(L), P1-Δ40p53(S) oraz P1-Δ40p53 przeprowadzona w RRL. Przykładowy autoradiogram, uzyskany po rozdiale elektroforetycznym, przedstawia produkty translacji zachodzącej z kodonów inicjacyjnych AUG1 i AUG2. Elektroforeza prowadzona była w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z 0,1% SDS, pełny opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3. Wykresy słupkowe przedstawiają wydajność syntezy białek. Wszystkie wartości są wartościami średnimi, z co najmniej trzech niezależnych doświadczeń i zostały znormalizowane do wydajności produktu zsyntetyzowanego z AUG1 w mRNA P1-Δ40p53.

Szczególnie duży wpływ na syntezę białka przeprowadzaną w warunkach *in vitro* mają elementy strukturalne G56–C169 oraz U180-A18. Efektywność translacji zachodzącej z kodonu AUG1, dla wariantu P1-Δ40p53(Δ57) ze skróconą spinką G56–C169 jest znacznie wyższa niż dla mRNA kontrolnego P1-Δ40p53 (Rys. 37). Co ciekawe, wydajność translacji inicjowanej z kodonu AUG2 dla konstruktu P1-Δ40p53(Δ57) także wzrosła. W przypadku obydwu kodonów efektywność syntezy białka jest wyższa około 2-krotnie. Natomiast w przypadku konstruktów mRNA P1-Δ40p53(ΔHDM2), wydajność procesu inicjowanego z kodonu AUG1 została obniżona o około 50%, w porównaniu do typu dzikiego P1-Δ40p53. Co ciekawe, translacja z kodonu AUG2 w modelowym mRNA P1-Δ40p53(ΔHDM2) także uległa niewielkiej redukcji (Rys. 37).



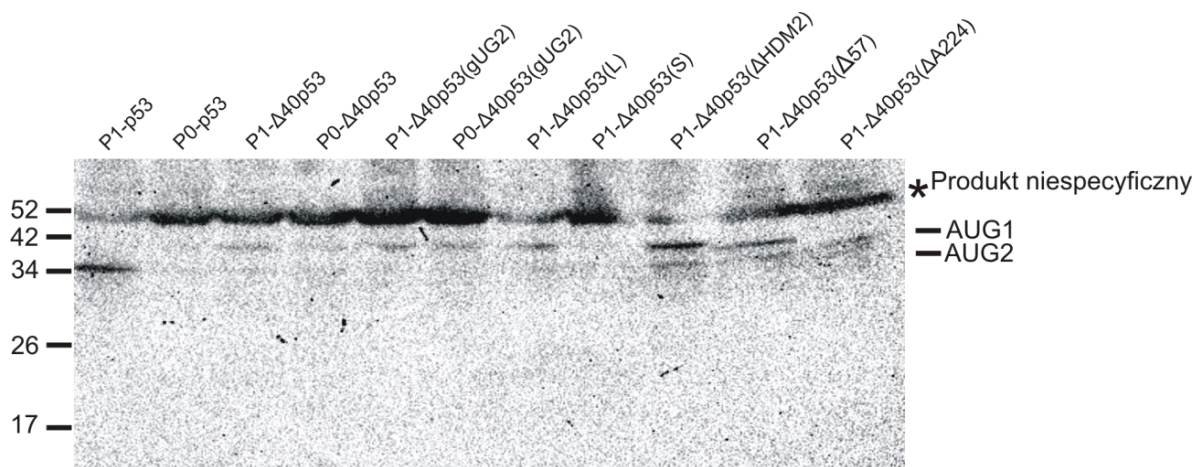
Rysunek 37. Translacja *in vitro* modelowych wariantów mRNA przeprowadzona w RRL. Przykładowy autoradiogram, uzyskany po rozdziale elektroforetycznym, przedstawia produkty translacji zachodzącej z kodonów inicjacyjnych AUG1 i AUG2. Elektroforeza prowadzona była w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego z 0,1% SDS, pełny opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3. Wykresy ilustrują średnie wartości efektywności translacji otrzymane z co najmniej trzech eksperymentów i zostały znormalizowane do wydajności translacji produktu zsyntetyzowanego z AUG1 w mRNA P1-Δ40p53.

Dodatkowo analizę efektywności translacji przeprowadziłam także dla wariantów wcześniej zsyntetyzowanych w naszym laboratorium – P1-p53 i P0-p53 (Rys. 38). Konstrukty te charakteryzują się krótszym regionem terminalnym 5' mRNA, ponieważ nie posiadają kodonu AUG2 i sekwencja kodująca lucyferazę *Renilla* znajduje się tuż za kodonem AUG1 (Rys. 35). Badanie ujawniło, że wydajność translacji *in vitro* dla wariantu P1-p53 jest około 9 razy wyższa niż dla translacji zachodzącej z kodonu AUG1 dla wariantu P1-Δ40p53. Efektywność syntezy białka dla wariantu P0-p53 jest podobna do tej zachodzącej z kodonu AUG1 dla P1-Δ40p53 (Rys. 38).



Rysunek 38. Badanie efektywności syntezy białek przeprowadzone w RRL z wykorzystaniem modelowych wariantów mRNA: P1-p53, P0-p53 i P1-Δ40p53. Przykładowy autoradiogram, uzyskany po rozdziale elektroforetycznym, prezentuje produkty translacji zachodzącej z kodonów inicjacyjnych AUG1 i AUG2. Elektroforeza prowadzona była w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z 0,1% SDS, pełny opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3. Wykresy przedstawiają średnie wartości otrzymane z co najmniej trzech eksperymentów i zostały znormalizowane do wydajności produktu zsyntetyzowanego z AUG1 w mRNA P1-Δ40p53.

Zgodność otrzymanych wyników analizy efektywności syntezy białek została potwierdzona także metodą Western blot (Rys. 39). Przeprowadzona została reakcja translacji *in vitro* w RRL z wykorzystaniem modelowych mRNA. Produkty po reakcji rozdzielane były elektroforetycznie w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z dodatkiem 0,1% SDS, a następnie przeprowadzono transfer białek z żelu na membranę PVDF. Syntetyzowane białka były identyfikowane poprzez zastosowanie przeciwciała pierwszorzędowego rozpoznającego białko lucyferazę *Renilla* (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.6.). Otrzymane wyniki, przedstawione na autoradiogramie, były zgodne z uzyskanymi metodą translacji *in vitro*, w obecności metioniny znakowanej radioaktywnym izotopem siarki [³⁵S]-Met. Względne ilości syntetyzowanych białek wykrytych za pomocą obydwu metod korespondowały ze sobą (Rys. 39).



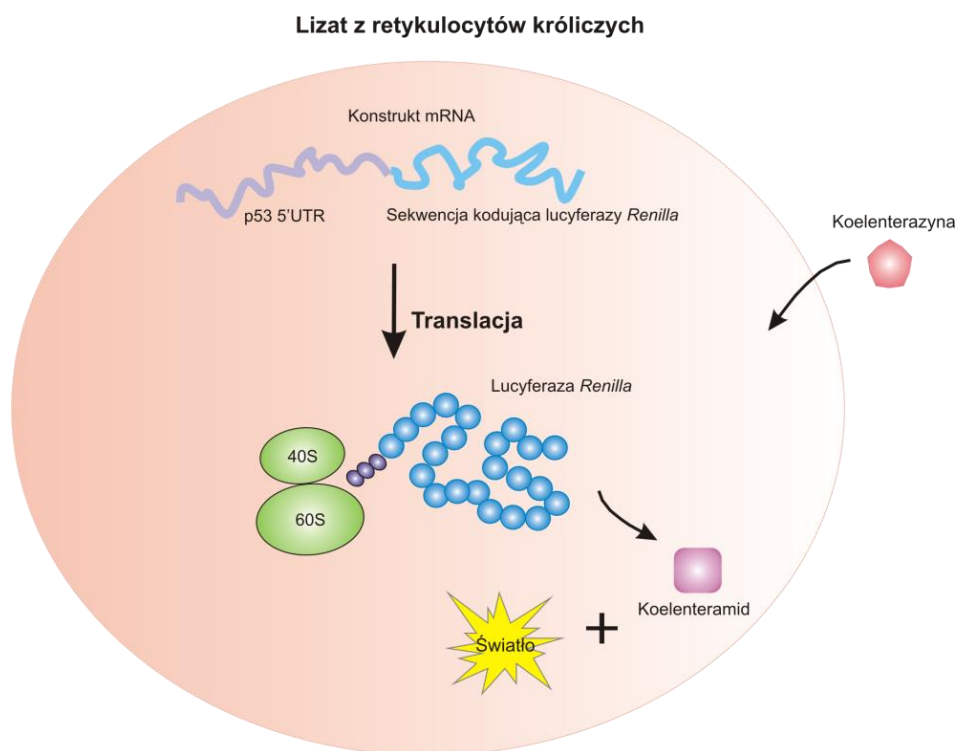
Rysunek 39. Analiza efektywności translacji metodą Western blot z wykorzystaniem modelowych wariantów mRNA. Po lewej stronie autoradiogramu oznaczono wielkość białek, z prawej strony zaznaczono produkty syntetyzowane z kodonów AUG1 i AUG2. Szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.6.

Przedstawione wyniki pokazują, jak ważną rolę w procesie translacji pełni długość oraz struktura drugorzędowa regionu niekodującego 5' mRNA. Każda zmiana w strukturze drugorzędowej wprowadzona w tym regionie moduluje wydajność syntezy białek inicjowanej od kodonów AUG1 i AUG2.

3.2.3. Wyznaczenie całkowitego czasu translacji

Dalsze badania miały na celu głębszą analizę przebiegu procesu translacji, w szczególności etapu inicjacji. W tym celu zastosowałam metodę translacji *in vitro* z wykorzystaniem genu reporterowego lucyferazy *Renilla*, opartą na procedurze opracowanej przez grupę Spirina (Vassilenko et al., 2011). Metoda ta umożliwia pomiar nowo syntetyzowanego białka reporterowego – lucyferazy w czasie rzeczywistym, podczas translacji *in vitro*. Reakcja przeprowadzana jest w RRL, z wykorzystaniem modelowych wariantów mRNA zawierających sekwencję kodującą lucyferazę, z dodatkiem koelenterazyny. Jest to substrat dla lucyferazy, enzymu katalizującego reakcję utlenienia koelenterazyny do koelenteramidu z równoczesną emisją fali świetlnej. Pomiar przyrostu luminescencji pozwala na określenie aktywności enzymu *Renilla*, co informuje o przyroście ilości tego białka w trakcie reakcji (Rys. 40), szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.3.3.

Zastosowana metoda pozwala na określenie całkowitego czasu translacji dla poszczególnych wariantów mRNA. Pojawienie się pierwszego sygnału świetlnego informuje o przeprowadzeniu całkowitego cyklu translacji (z uwzględnieniem etapów inicjacji, elongacji i terminacji). Zsyntetyzowany zostaje pierwszy produkt białkowy, zdolny do przeprowadzenia reakcji enzymatycznej. Zważywszy na to, iż wszystkie testowane konstrukty mRNA posiadają tę samą sekwencję kodującą białko, różnice w całkowitym czasie translacji będą wynikać z odmiennych sekwencji i struktur drugorzędowych regionu końcowego 5'. Dzięki temu, możliwe jest określenie wpływu tego regionu na inicjację translacji i szybkość skanowania mRNA przez kompleks rybosomalny 43S, a także porównanie otrzymanych wartości między poszczególnymi wariantami mRNA. W związku z tym, dla uproszczenia, w dalszej części mojej pracy pojęcia „całkowity czas translacji” oraz „czas skanowania mRNA przez rybosom” będę stosowała naprzemiennie.



Rysunek 40. Schematyczne przedstawienie metody translacji *in vitro* zachodzącej w RRL z wykorzystaniem genu reporterowego lucyferazy *Renilla*, umożliwiającej pomiar przyrostu syntetyzowanego białka w czasie rzeczywistym. Do reakcji translacji wraz z mRNA posiadającym sekwencję kodującą białko lucyferazy dodawany jest substrat koelenterazyna, która po przekształceniu do koelenteramidu emituje wiązkę światła.

Obliczenie całkowitego czasu translacji dla poszczególnych wariantów mRNA przeprowadzono przy użyciu metody drugiej pochodnej maksymalnej w oprogramowaniu *Mathematica 8.0* (pełny opis obliczeń jest w rozdziale 5.4.3.3.). Dodatkowo dzięki określeniu maksymalnych wartości aktywności lucyferazy, możliwe jest porównanie wydajności translacji modelowych mRNA. Jednakże wadą tego podejścia jest brak możliwości oddzielenia i oceny ilościowej produktów translacji zsyntetyzowanych z różnych kodonów AUG, pochodzących z tego samego konstruktów mRNA.

Po przeprowadzeniu reakcji translacji *in vitro* konstruktów mRNA z dwoma kodonami inicjacyjnymi: AUG1 i AUG2, z kodonu AUG1 syntetyzowana jest lucyferaza fuzyjna z dodatkowymi 40 aminokwasami przyłączonymi na N-końcu. Natomiast z kodonu AUG2 zachodzi synteza pełnej długości lucyferazy. Co istotne, wykazano, że dodatkowe reszty aminokwasowe na N-końcu białka nie wpływają na aktywność enzymatyczną lucyferazy. W eksperymentach przeprowadzonych ze zmodyfikowaną lucyferazą *Renilla*, posiadającą dodatkowe 11 aminokwasów przyłączone na jej N-końcu, enzym zachował swoją pełną aktywność (Farzannia et al., 2015). Co więcej, także lucyferaza typu *Firefly* z dodatkowymi 23 aminokwasami nie utraciła swojej aktywności enzymatycznej (Tatsumi et al., 1996). Dlatego też założyłam, że obecność 40 dodatkowych aminokwasów nie pochodzących z lucyferazy, ma niewielki wpływ na aktywność enzymatyczną lucyferazy fuzyjnej syntetyzowanej z kodonu AUG1 wybranych konstruktów mRNA.

3.2.4. Wpływ zmiany struktury drugorzędowej regionu niekodującego mRNA p53 na inicjację translacji i czas skanowania tego regionu przez rybosom, dla wariantów mRNA z jednym kodonem inicjacyjnym – AUG1

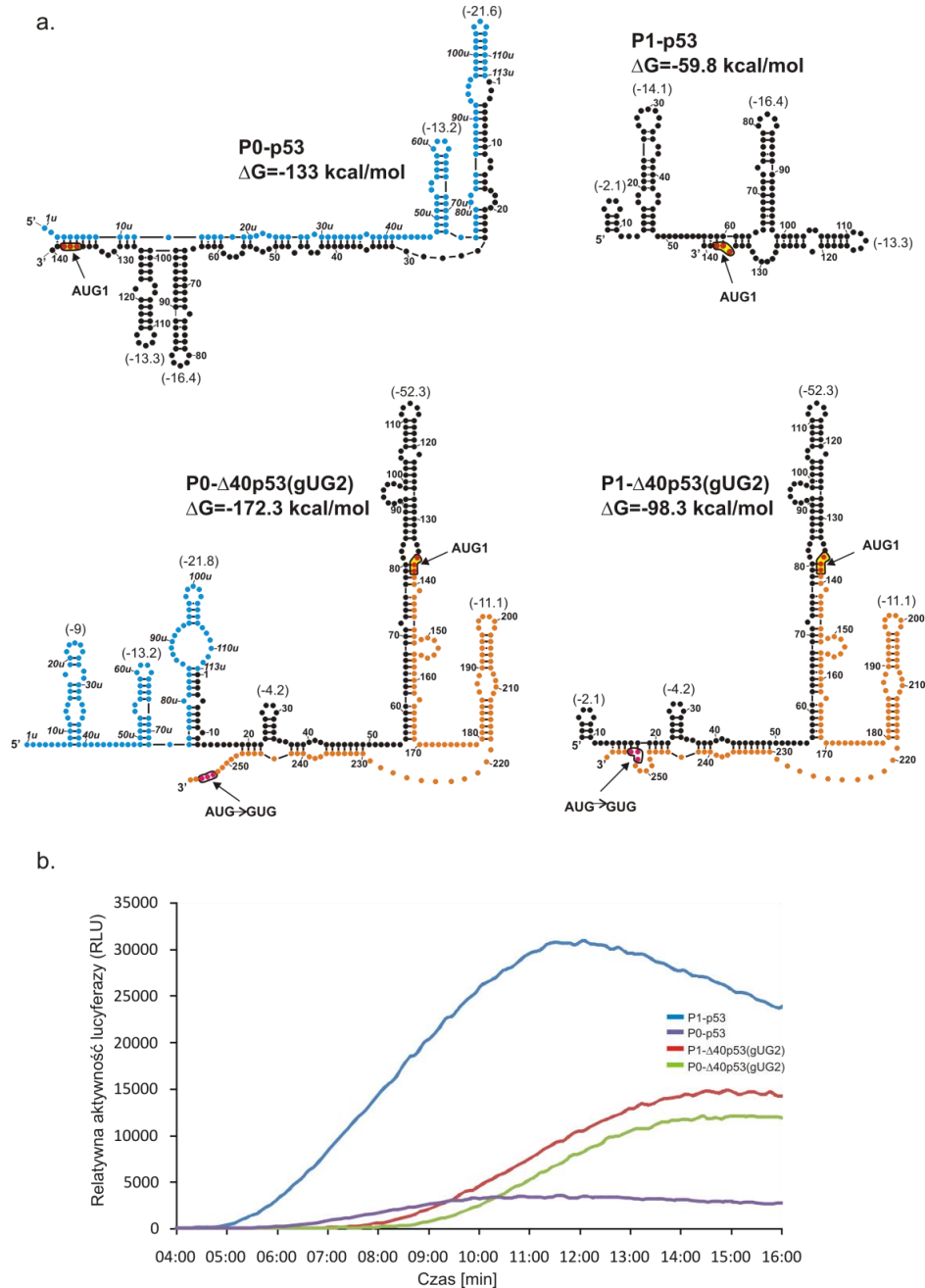
W pierwszej kolejności przeprowadziłam translację *in vitro* w RRL z jednoczesnym pomiarem aktywności lucyferazowej dla wariantów mRNA posiadających jeden kodon inicjacyjny AUG (Rys. 41). Były to mRNA: P1-p53 i P0-p53, u których gen reporterowy lucyferazy znajdował się bezpośrednio za kodonem AUG1, oraz P1- Δ 40p53(gUG2) i P0- Δ 40p53(gUG2) z nieaktywnym kodonem AUG2, gdzie gen reporterowy lucyferazy zlokalizowany był 120 nukleotydów za kodonem AUG1. W rezultacie, w przypadku pierwszej pary modelowych mRNA syntetyzowana jest pełnej długości lucyferaza,

natomiast w przypadku drugiej pary powstaje lucyferaza z dodatkowymi 40 aminokwasami. Schematyczny model struktury drugorzędowej regionów terminalnych 5' wariantów mRNA przedstawiony jest na rysunku 41a.

Na podstawie danych otrzymanych z pomiarów aktywności lucyferazowej, uzyskanych z co najmniej trzech niezależnych eksperymentów, dla poszczególnych modelowych wariantów mRNA został obliczony całkowity czas translacji (Rys. 41b, Tab. 3). Różna długość, sekwencja nukleotydów i/lub struktura regionów niekodujących 5' w konstrukcjach powoduje duże różnice w ilościach zsyntetyzowanych białek, które wyrażane są jako maksymalne aktywności luminescencji (Tab. 3). Wartości te, określone są względem konstruktu mRNA P1- Δ 40p53, dla którego maksymalna wartość luminescencji wyrażona jest jako 100%. Rysunek 41b przedstawia wykres zależności czasu od relatywnej aktywności lucyferazowej, dla poszczególnych modelowych wariantów mRNA. Są to przykładowe dane, otrzymane po przeprowadzeniu pomiarów dla każdego konstruktów, obrazujące przyrost luminescencji w czasie.

Analiza porównawcza czasów inicjacji translacji dla wariantów rozpoczynających się od promotora P0 i P1 wykazała, że czas ten dla transkryptu posiadającego dłuższy region niekodujący 5' jest dłuższy. Dla wariantu mRNA P0-p53 wynosi on 7:08 min, natomiast dla konstruktów P1-p53 wynosi 5:46 min. Wydłużony czas skanowania wariantu P0-p53 jest rezultatem występowania dodatkowej, 113-nukleotydowej, sekwencji w regionie 5'UTR w porównaniu do wariantu P1-p53. W konsekwencji, obliczona szybkość skanowania 113-nukleotydowej sekwencji mRNA przez rybosom wynosi 1,4 nt/s.

Czas inicjacji translacji wyznaczony dla kolejnej pary wariantów wynosił 8:31 min dla mRNA P0- Δ 40p53(gUG2) oraz 8:14 min dla P1- Δ 40p53(gUG2). Sekwencja o długości 113 nukleotydów, zlokalizowana pomiędzy promotorem P0 i P1, w przypadku mRNA P0- Δ 40p53(gUG2) jest skanowana z prędkością 6,6 nt/s. Wymaga podkreślenia, że zarówno w wariantach P0-p53 jak i P0- Δ 40p53(gUG2) sekwencja ta jest taka sama, lecz szybkość jej skanowania jest wyraźnie różna. Jest to konsekwencją odmiennego związania się struktury drugorzędowej w tym obrębie. Region ten w konstrukcji mRNA P0-p53 jest silnie ustrukturyzowany, natomiast w wariantach P0- Δ 40p53(gUG2) składa się z kilku spinek o niskiej energii stabilizacji (Rys. 41a).



Rysunek 41. Schematyczne przedstawienie regionu terminalnego 5' mRNA p53 w modelowych mRNA zawierających jeden kodon inicjacyjny wraz z kinetyką ich translacji *in vitro*. (a) Modele struktury drugorzędowej konstruktów: P0-p53, P1-p53, P0- $\Delta 40$ p53 (gUG2) i P1- $\Delta 40$ p53 (gUG2). Przewidywane wartości ΔG (kcal/mol) są przedstawione dla każdego wariantu, natomiast wartości ΔG wybranych motywów strukturalnych są pokazane w nawiasach. Kolor niebieski oznacza region pomiędzy promotorami P0 i P1; czarny – 5'UTR poniżej promotora P1; pomarańczowy - otwarta ramka odczytu (ORF) p53.(b) Względna aktywność lucyferazy (RLU) zmierzona podczas translacji każdego konstrukt mRNA przy użyciu luminometru, przez 1 s z 9-sekundowymi przerwami, w trakcie 16 minut. Wykresy ilustrują przybliżone wartości maksymalnej wydajności translacji dla każdego konstrukt. Pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.4.3.3.

Na podstawie otrzymanych danych eksperymentalnych, została obliczona także wartość maksymalnej aktywności lucyferazy. Określono, że dla wariantu P1-p53 wartość tego parametru jest 10-krotnie wyższa niż dla mRNA P0-p53. Oznacza to istotnie wyższą efektywność translacji konstruktów P1-p53, spowodowaną jego krótszą sekwencją nukleotydową oraz mniejszym stopniem ustrukturyzowania. Podobna zależność była zaobserwowana w przypadku wariantów P1- Δ 40p53(gUG2) i P0- Δ 40p53(gUG2), gdyż wydajność translacji wariantu rozpoczynającego się od promotora P1 była wyższa o około 10%.

Tabela 3. Porównanie całkowitego czasu translacji oraz maksymalnej aktywności luminescencji dla konstruktów mRNA z jednym kodonem AUG. Całkowity czas translacji został przedstawiony wraz z odchyleniem standardowym oraz określony w oparciu o trzy niezależne eksperymenty. Pełny opis obliczeń znajduje się w rozdziale 5.4.3.3. Maksymalną aktywność luminescencji uzyskaną dla każdego konstruktów znormalizowano w oparciu o wartości otrzymane dla wariantu P1- Δ 40p53, a standardowe odchylenia podano w tabeli.

konstrukt mRNA	całkowity czas translacji [min:s]	maksymalna aktywność luminescencji [%]
P0-p53	07:08 ± 00:16	33 ± 5
P1-p53	05:46 ± 00:02	300 ± 30
P0-Δ40p53(gUG2)	08:31 ± 00:10	60 ± 12
P1-Δ40p53(gUG2)	08:14 ± 00:09	69 ± 11
P1-Δ40p53	06:58 ± 00:14	100

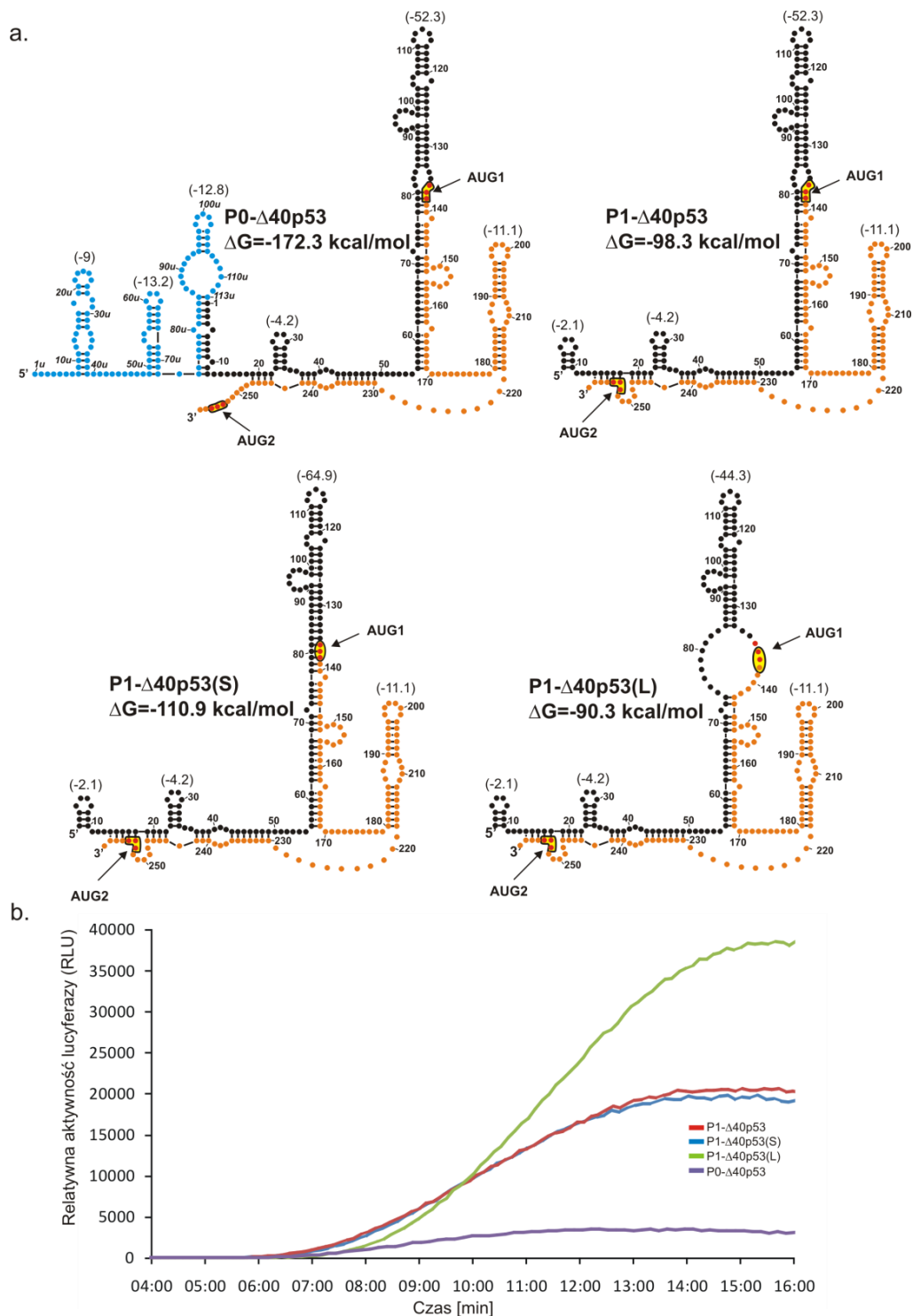
3.2.5. Rola struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w inicjacji translacji i czas skanowania tego regionu przez rybosom, dla wariantów mRNA z dwoma kodonami inicjacyjnymi – AUG1 i AUG2

W dalszej kolejności przeprowadziłam pomiar aktywności lucyferazowej w czasie translacji *in vitro* wariantów posiadających dwa kodony inicjacyjne: P0- Δ 40p53 i P1- Δ 40p53 oraz P1- Δ 40p53(S) i P1- Δ 40p53(L) (Rys. 42). Produkt białkowy syntetyzowany z wykorzystaniem poszczególnych wariantów mRNA jest mieszaniną dwóch białek: białka fuzyjnego lucyferazy wraz z 40 dodatkowymi aminokwasami p53, syntetyzowanego z kodonu AUG1 oraz białka lucyferazy syntetyzowanej z kodonu AUG2. Na podstawie wyników badań translacji *in vitro* w RRL, przedstawionych

na rysunkach 36 i 37, określiłam stosunek ilości produktów końcowych syntetyzowanych z kodonów AUG1 i AUG2 i wynosił on około 3:1. W związku z tym, białko fuzyjne syntetyzowane z kodonu AUG1 miało większy wpływ na parametry obliczone z pomiarów luminescencji niż białko syntetyzowane z kodonu AUG2.

Określenie całkowitego czasu translacji dla wariantów P0- Δ 40p53 i P1- Δ 40p53 ponownie umożliwiło wykazanie wpływu 113-nukleotydowego odcinka między-promotorowego P0-P1 na wydłużenie czasu skanowania. Czas skanowania wariantu o dłuższej sekwencji – P0- Δ 40p53 wynosił 7:35 min, natomiast P1- Δ 40p53 wynosił 6:58 min. W rezultacie obliczona szybkość skanowania regionu P0-P1 o długości 113 nt jest równa 3 nt/s. Efektywność translacji ustalona na podstawie maksymalnej aktywności lucyferazy dla wariantu P0- Δ 40p53 była 3 razy niższa niż dla konstrukt mRNA P1- Δ 40p53 (Tab. 4, Rys. 42).

W następnym zestawieniu porównałam ze sobą warianty mRNA o takiej samej długości, różniące się kontekstem strukturalnym w obrębie kodonu AUG1: P1- Δ 40p53, P1- Δ 40p53(S) oraz P1- Δ 40p53(L). Rysunek nr 42a przedstawia schemat struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' wariantów mRNA wraz ze zmianami w obrębie kodonu AUG1. Konstrukt mRNA P1- Δ 40p53(L) posiada kodon inicjacyjny w obrębie jednoniciowej pętli wewnętrznej, natomiast u P1- Δ 40p53(S) kodon ten zlokalizowany jest w dwuniciowym trzonie spinki. Całkowity czas translacji jak i efektywność translacji dla obydwu wariantów porównano z wartościami otrzymanymi dla wariantu mRNA typu dzikiego – P1- Δ 40p53, posiadającego kodon AUG1 w regionie częściowo sparowanym, gdzie A jest niesparowane, natomiast reszty U i G są sparowane. Co istotne, niewielkie zmiany wprowadzone w sekwencji regionu terminalnego 5' mRNA spowodowały znaczne różnice stabilności termodynamicznej spinki G56–C169 w poszczególnych wariantach: dla P1- Δ 40p53 wynosi -52.3 kcal/mol, dla P1- Δ 40p53(L) równa się -44.3 kcal/mol natomiast dla P1- Δ 40p53(S) wynosi -64.9 kcal/mol. Wartości te zostały wyliczone za pomocą programu *RNAstructure 5.6*.



Rysunek 42. Modele struktur drugorzędowych wariantów mRNA z dwoma kodonami AUG, wraz z analizą kinetyki ich translacji *in vitro*. (a) wartość ΔG (kcal/mol) została przedstawiona dla każdego z wariantów: P0- Δ 40p53, P1- Δ 40p53, P1- Δ 40p53(S) i P1- Δ 40p53(L), natomiast wartości ΔG wybranych motywów strukturalnych są pokazane w nawiasach. Kolorami oznaczono poszczególne części regionu terminalnego 5', w taki sam sposób jak na rysunku 41. (b) wykres przyrostu relatywnej aktywności lucyferazy w czasie dla poszczególnych wariantów mRNA. Pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.4.3.3.

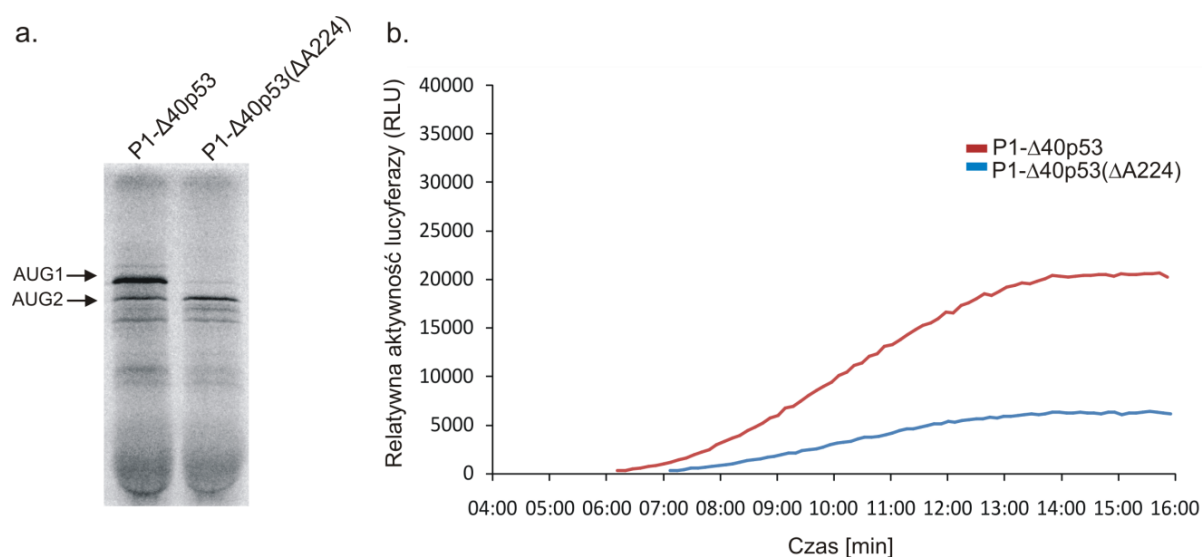
Tabela 4. Porównanie całkowitego czasu translacji oraz maksymalnej aktywności luminescencji dla konstruktów mRNA z dwoma kodonami AUG oraz dla wariantu P1-Δ40p53(ΔA224). Całkowity czas translacji został podany wraz z odchyleniem standardowym, określony został w oparciu o trzy niezależne eksperymenty. Pełny opis obliczeń znajduje się w rozdziale 5.4.3.3. Maksymalną aktywność luminescencji uzyskaną dla każdego konstruktu znormalizowano w oparciu o wartości otrzymane dla wariantu P1-Δ40p53, a standardowe odchylenia podano w tabeli.

konstrukt mRNA	całkowity czas translacji [min:s]	maksymalna aktywność luminescencji [%]
P0-Δ40p53	07:35 ± 00:15	33 ± 0.3
P1-Δ40p53	06:58 ± 00:14	100
P1-Δ40p53(L)	07:35 ± 00:08	169 ± 10
P1-Δ40p53(S)	08:00 ± 00:03	90 ± 4
P1-Δ40p53(ΔA224)	07:27 ± 00:06	28 ± 1,4

Analiza całkowitego czasu translacji wariantów mRNA P1-Δ40p53(S) i typu dzikiego P1-Δ40p53 ujawniła, że kontekst strukturalny kodonu inicjacyjnego ma istotny wpływ na inicjację translacji. Bowiem czas skanowania dla powyższych konstruktów wynosi odpowiednio: 8:00 min i 6:58 min (Tab. 4). Wydłużony czas skanowania w przypadku wariantu, którego kodon inicjacyjny zlokalizowany jest w regionie sparowanym może być interpretowany jako utrudnienie w wiązaniu się rybosomu. Natomiast znacznie bardziej korzystnym otoczeniem strukturalnym kodonu AUG, ułatwiającym wiązanie się rybosomu, była powiększona pętla wewnętrzna. Inicjacja translacji dla wariantu P1-Δ40p53(L), którego kodon inicjacyjny był zlokalizowany w takim motywie strukturalnym, wynosi 7:35 min (Tab. 4). Jednoniciowa struktura w obrębie kodonu AUG1 wpłynęła także na efektywność translacji. Bowiem była ona znacznie podwyższona, prawie 2 razy, w stosunku do wariantu typu dzikiego P1-Δ40p53 (Rys. 42, Tab. 4).

Dodatkowo przeprowadziłam analizę efektywności translacji oraz czasu skanowania dla wariantu P1-Δ40p53(ΔA224) (Rys. 43a i b). W tym przypadku czas inicjacji translacji jest dłuższy (7:27 min) niż dla konstruktu P1-Δ40p53 (6:58 min) (Tab. 4, Rys. 43b). Jest to spodziewany efekt, ponieważ delecja pojedynczego nukleotydu w konstrukcie P1-Δ40p53(ΔA224) przesuwająca ramkę odczytu, tak że z kodonu AUG1 nie powstaje lucyferaza. W konsekwencji enzym syntetyzowany jest jedynie z kodonu AUG2, przed którym znajduje się 5'UTR o długości 252 nt, co wydłuża czas skanowania regionu

niekodującego przez rybosom. Efektywność translacji zachodzącej z kodonu AUG2 w mRNA P1- Δ 40p53(Δ A224) jest porównywalna z wydajnością syntezy inicjowanej z kodonu AUG2 dla wariantu typu dzikiego P1- Δ 40p53 (Rys. 43a). Natomiast zahamowana została synteza zachodząca z kodonu AUG1 dla P1- Δ 40p53(Δ A224), co wpłynęło na obniżenie ogólnej efektywności translacji konstruktów, określonej na podstawie maksymalnej aktywności luminescencji (Tab. 4).

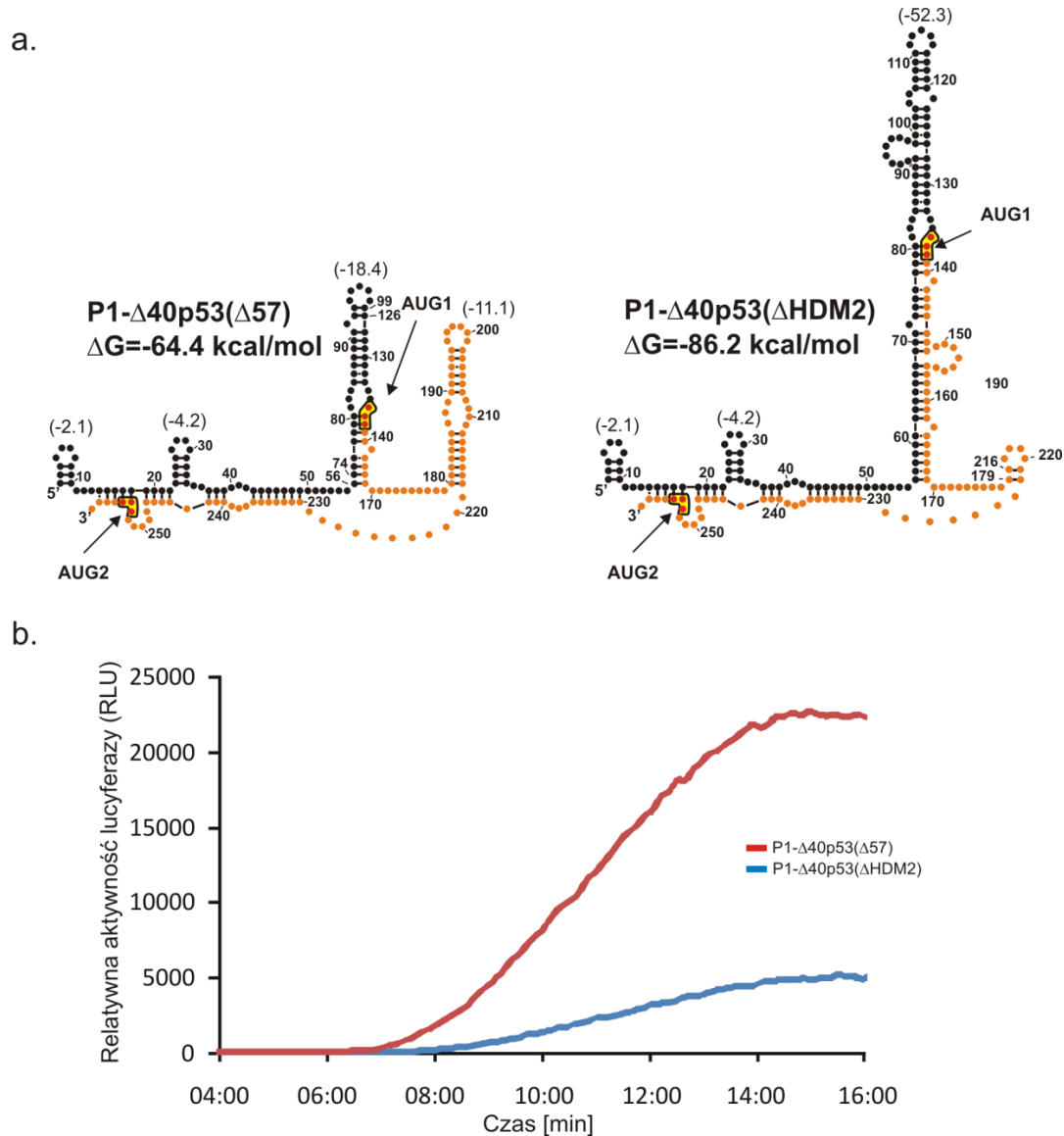


Rysunek 43. Badanie efektywności oraz kinetyki translacji *in vitro* dla wariantów mRNA P1- Δ 40p53(Δ A224) i P1- Δ 40p53. (a) analiza efektywności translacji *in vitro* przeprowadzona w obecności [35 S]-Met, na drodze rozdzielania elektroforetycznego w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego z 0,1% SDS, pełny opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3 produkty syntezy zachodzącej z kodonów AUG1 i AUG2 oznaczone są strzałkami. (b) wykres zależności relatywnej aktywności lucyferazy od czasu. Pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.4.3.3.

3.2.6. Rola struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w inicjacji translacji i czas skanowania tego regionu przez rybosom, dla wariantów mRNA pozbawionych ważnych elementów strukturalnych

W celu określenia wpływu wybranych motywów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 na inicjację translacji i proces skanowania tego regionu przez rybosom, zostały przygotowane warianty mRNA pozbawione istotnych elementów strukturalnych. W konstrukcie P1- Δ 40p53(Δ 57) skróceniu uległa spinka

do włosów G56–C169. W konsekwencji usunięcia trzonu i pętli apikalnej spinki, powstała krótsza spinka o wyższej energii, gdyż ΔG wzrosła z $-52,3$ kcal/mol do $-18,4$ kcal/mol. Natomiast w przypadku wariantu P1- $\Delta 40p53(\Delta HDM2)$ usunięty został motyw spinki U180–A218, którego ΔG wynosiła $-11,1$ kcal/mol (Rys. 44a).



Rysunek 44. Schematyczne przedstawienie regionu terminalnego 5' mRNA p53 modelowych wariantów pozbawionych elementów strukturalnych wraz z kinetyką ich translacji *in vitro*. (a) Modele struktury drugorzędowej konstruktorów: P1- $\Delta 40p53(\Delta 57)$ oraz P1- $\Delta 40p53(\Delta HDM2)$ wraz z ich wartościami ΔG (kcal/mol). Kolory oznaczone na schemacie wskazują na części regionu terminalnego: czarny – 5'UTR poniżej promotora P1; pomarańczowy – otwarta ramka odczytu (ORF) p53. (b) Względna aktywność lucyferazy (RLU) zmierzona podczas translacji każdego konstruktów mRNA. Wykres ilustruje przybliżone wartości maksymalnej wydajności translacji dla każdego konstruktów mRNA. Pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.4.3.3.

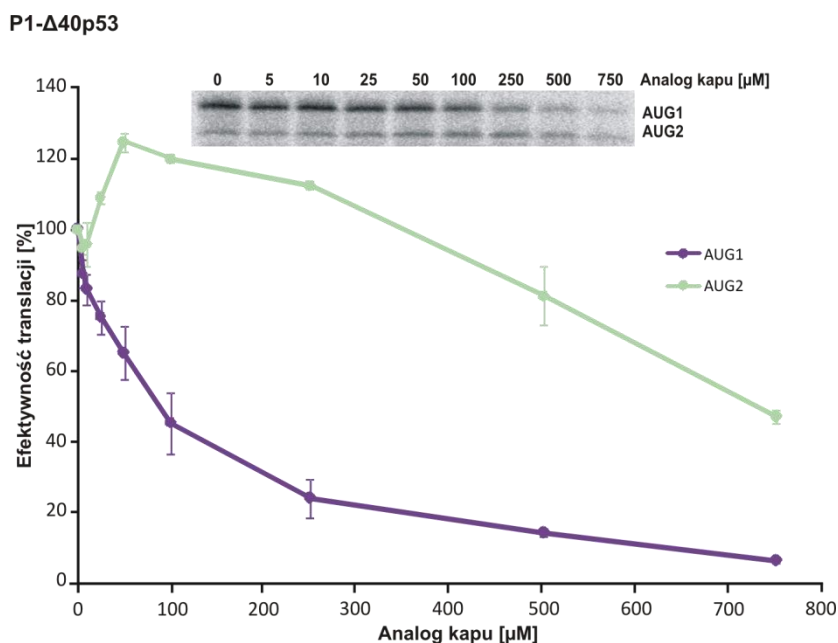
Efektywność translacji wariantu P1- Δ 40p53(Δ 57) jest około 2,4 razy wyższa od wydajności mRNA P1- Δ 40p53. Jednakże całkowity czas translacji dla tego wariantu okazał się być dłuższy niż dla mRNA typu dzikiego, wynosił bowiem 7:57 min (Tab. 5). Zważywszy na krótszą sekwencję P1- Δ 40p53(Δ 57) w stosunku do P1- Δ 40p53, jest to wynik nieoczekiwany. Całkowity czas translacji dla wariantu P1- Δ 40p53(Δ HDM2) także uległ wydłużeniu o prawie 2 minuty. Natomiast efektywność translacji wariantu stanowiła 60% wartości wyznaczonej dla regionu terminalnego 5' mRNA p53 typu dzikiego (Tab. 5, rys. 44b).

Tabela 5. Porównanie całkowitego czasu translacji oraz maksymalnej aktywności luminescencji dla konstruktów mRNA P1- Δ 40p53(Δ 57) i P1- Δ 40p53(Δ HDM2). Całkowity czas translacji został podany wraz z odchyleniem standardowym, a określony został w oparciu o trzy niezależne eksperymenty. Pełny opis obliczeń znajduje się w rozdziale 5.4.3.3. Maksymalną aktywność luminescencji uzyskaną dla każdego konstruktu znormalizowano w oparciu o wartości otrzymane dla wariantu P1- Δ 40p53, a odchylenia standardowe podano w tabeli.

konstrukt mRNA	całkowity czas translacji [min:s]	maksymalna aktywność luminescencji [%]
P1- Δ 40p53	06:58 ± 00:14	100
P1- Δ 40p53(Δ 57)	07:57 ± 00:04	237 ± 9
P1- Δ 40p53(Δ HDM2)	08:58 ± 00:04	58 ± 9

3.2.7. Wpływ zmian w strukturze drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na inicjację translacji według mechanizmu kap-zależnego

Wyniki badań opisanych przeze mnie we wcześniejszym rozdziale sugerowały, że translacja inicjowana z kodonu AUG1 zachodzi w sposób kap-zależny, natomiast z kodonu AUG2 inicjacja może przebiegać niezależnie od struktury kapu na końcu 5' mRNA. W przypadku zahamowania translacji kap-zależnej, synteza izoformy Δ 40p53 zachodzi na drodze procesu zależnego od IRES. Odbywa się to dzięki obecności specyficznych motywów strukturalnych znajdujących się w regionie terminalnym 5' mRNA p53. Wobec tego, celem wykonanego przeze mnie doświadczenia było określenie, który z głównych elementów strukturalnych, obecnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53, uczestniczy w IRES-zależnej inicjacji translacji.

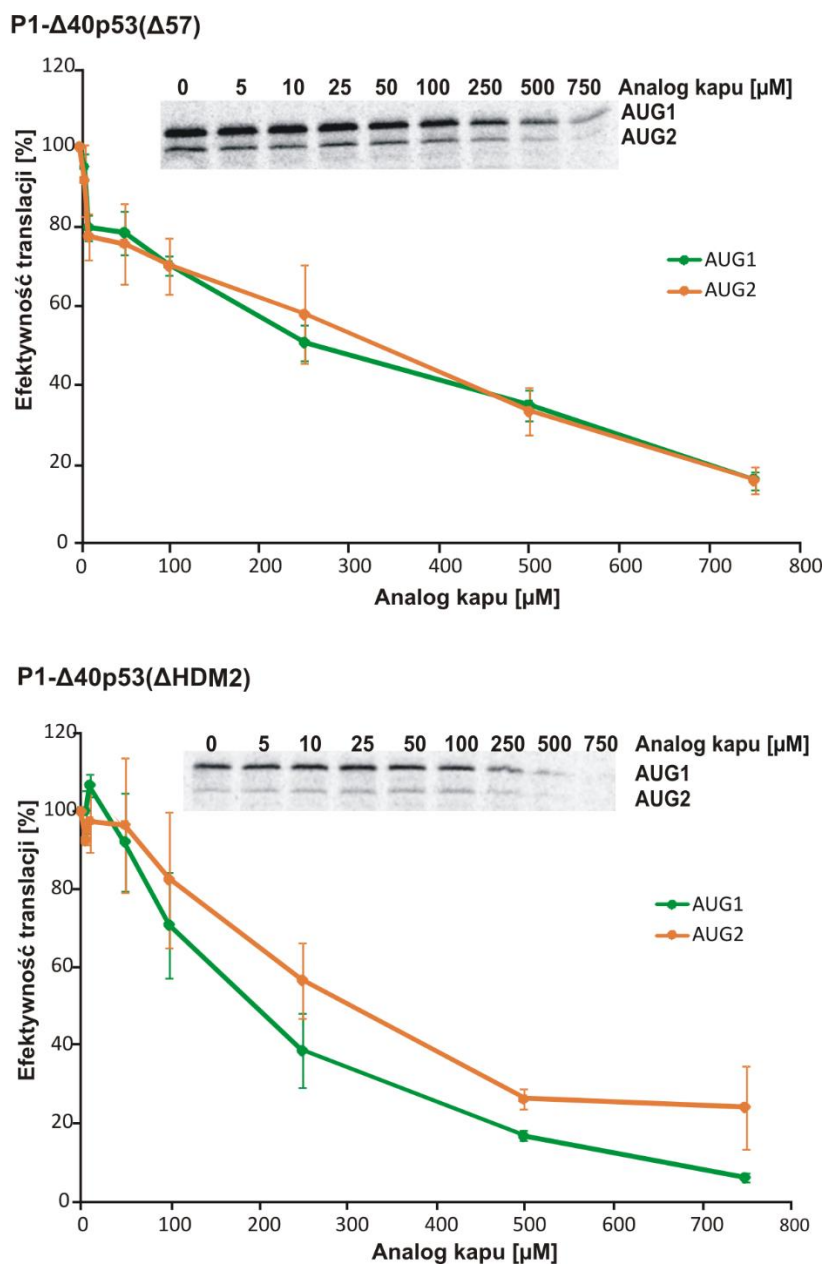


Rysunek 45. Analiza efektywności translacji mRNA P1-Δ40p53 w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu $m^7\text{GpppG}$. Autoradiogram przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji translacji *in vitro*, przeprowadzony w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z dodatkiem 0,1% SDS (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale. 5.3.3.). Wykres prezentuje średnią efektywność translacji wyliczoną wraz z odchyleniem standardowym, z trzech niezależnych eksperymentów. Synteza zachodząca z kodonu AUG1 oznaczona jest kolorem fioletowym, natomiast z kodonu AUG2 kolorem zielonym.

Przeprowadzona została translacja *in vitro* wariantu typu dzikiego P1-Δ40p53 (Rys. 45) oraz wariantów P1-Δ40p53(ΔHDM2) i P1-Δ40p53(Δ57) (Rys. 46). Konstrukty te, zostały wybrane ze względu na brak określonych elementów strukturalnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53, natomiast translacja wariantu typu dzikiego stanowiła reakcję kontrolną. Reakcja translacji *in vitro* została wykonana w RRL, w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu $m^7\text{GpppG}$ (szczegółowy opis procedury znajduje się w rozdziale 5.4.3.1.). Produkty białkowe po reakcji rozdzielane były elektroforetycznie w warunkach denaturujących, z dodatkiem 0,1% SDS. Wizualizacja otrzymanych po reakcji produktów białkowych była prowadzona na drodze autoradiografii, poprzez wykorzystanie obecności metioniny znakowanej izotopem siarki [^{35}S]-Met w powstałym produkcie białkowym.

W reakcji przeprowadzonej dla mRNA P1-Δ40p53, potwierdzona została IRES-zależna translacja zachodząca z kodonu AUG2, czego dowodem jest efektywna synteza białka nawet przy wzrastającym stężeniu analogu kapu. Jednocześnie,

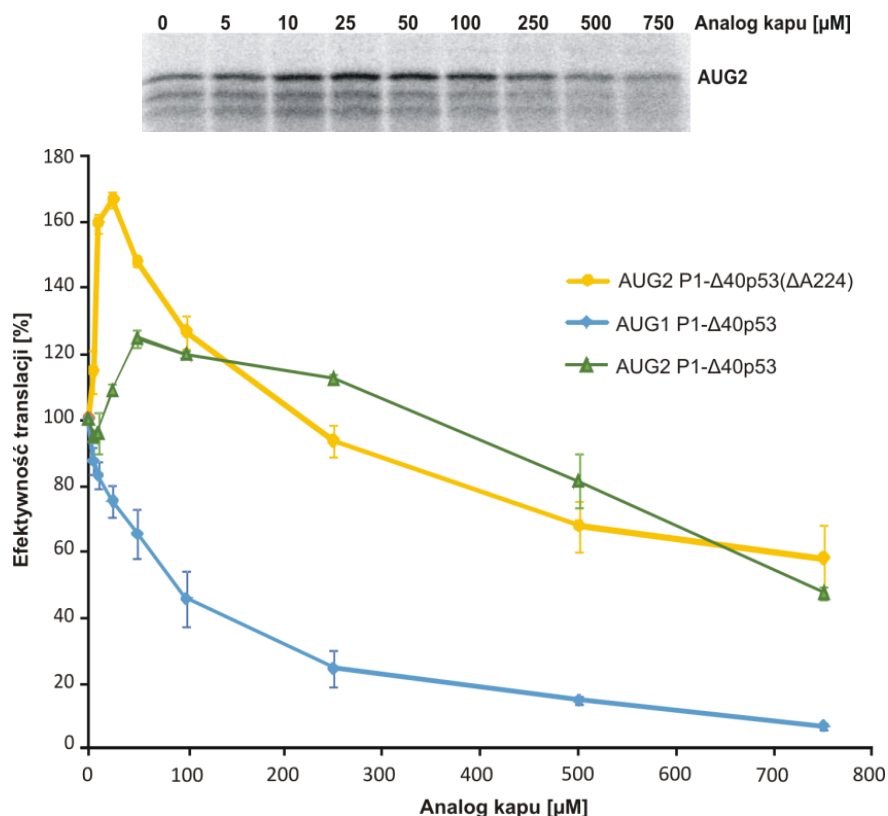
przy dużym stężeniu analogu kapu, nastąpiła inhibicja translacji przebiegającej z kodonu AUG1, co potwierdza jej kap-zależny charakter (Rys. 45).



Rysunek 46. Analiza wydajności translacji *in vitro* mRNA P1-Δ40p53(Δ57) i P1-Δ40p53(ΔHDM2) w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m⁷GpppG. Autoradiogramy przedstawiają rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji translacji *in vitro*, przeprowadzony w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z dodatkiem 0,1% SDS (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3.). Wykresy prezentują zależność efektywności translacji od stężenia analogu kapu, wartości są znormalizowane w oparciu o próbę kontrolną bez analogu kapu, określone na podstawie trzech niezależnych powtórzeń. Synteza zachodząca z kodonu AUG1 oznaczona jest kolorem zielonym, natomiast z kodonu AUG2 kolorem pomarańczowym.

Translacja *in vitro* w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu, przeprowadzona z mRNA P1- Δ 40p53(Δ 57) wykazała kap-zależny charakter procesu zachodzącego z kodonu AUG1, ponieważ efektywność translacji została obniżona nawet przy niskich stężeniach analogu (Rys. 46). Co ciekawe, niskie stężenie analogu kapu spowodowało także obniżenie efektywności translacji inicjowanej z kodonu AUG2. Jest to rezultat skrócenia spinki G56–C169, która może pełnić istotną funkcję w przebiegu translacji IRES-zależnej. Analogiczny rezultat został otrzymany w eksperymencie przeprowadzonym dla wariantu P1- Δ 40p53(Δ HDM2). W konsekwencji dodania analogu kapu efektywność translacji *in vitro* zachodzącej z kodonu zarówno AUG1 jak i AUG2 została obniżona (Rys. 46). Uzasadnieniem obserwowanej zmiany przebiegu translacji inicjowanej z kodonu AUG2 w porównaniu do wariantu typu dzikiego jest usunięcie spinki U180–A218 w konstrukcie P1- Δ 40p53(Δ HDM2). Eksperyment inhibicji translacji za pomocą analogu kapu dowodzi, iż obydwa elementy strukturalne typu spinki G56–C169 oraz U180–A218 są niezwykle istotne w przebiegu IRES-zależnego procesu inicjacji translacji.

W celu potwierdzenia, że inicjacja translacji z kodonu AUG2 zachodzi według mechanizmu zależnego od IRES, przeprowadziłam reakcję translacji *in vitro* w obecności analogu kapu z wariantem mRNA P1- Δ 40p53(Δ A224). W wyniku zmiany ramki odczytu spowodowanej usunięciem adenozyiny w pozycji 224, pełnej długości lucyferaza syntetyzowana jest jedynie z kodonu AUG2, natomiast z kodonu AUG1 powstaje krótsze białko. Eksperyment wykazał, że w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu synteza zachodząca z kodonu AUG2 nie jest inhibowana (Rys. 47). Dla wariantu P1- Δ 40p53(Δ A224) obserwowany jest silny wzrost efektywności translacji zachodzącej z kodonu AUG2, który przekracza 160% przy stężeniu analogu kapu wynoszącym 25 μ M. Przy wysokich stężeniach analogu kapu, obserwowane jest obniżenie efektywności translacji do około 60% wartości w nieobecności analogu. Co więcej, przebieg krzywej przy wysokich stężeniach analogu 250–750 μ M jest podobny do krzywej otrzymanej dla wariantu mRNA P1- Δ 40p53.



Rysunek 47. Analiza efektywności translacji mRNA P1- Δ 40p53(Δ A224) w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu. Autoradiogram przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji translacji *in vitro*, przeprowadzony w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z dodatkiem 0,1% SDS (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale. 5.3.3.). Wykres prezentuje średnią efektywność translacji zachodzącą z kodonu AUG2, wraz ze średnią efektywnością dla wariantu P1- Δ 40p53. Obliczenia wykonano na podstawie trzech niezależnych eksperymentów, wraz z odchyleniem standardowym.

3.2.8. Analiza formowania się inicjacyjnego kompleksu rybosomalnego 80S w obrębie kodonów start, w wybranych mRNA

Kluczowym etapem procesu inicjacji translacji jest rozpoznanie kodonu start AUG w czasie skanowania mRNA. W tym miejscu tworzony jest kompleks przejściowy 48S, składający się z 43S PIC oraz z czynników zaangażowanych w inicjację translacji. Gdy nastąpi parowanie zasad pomiędzy kodonem AUG a pętlą antykodonową Met-tRNA^{Met}_i, przyłącza się duża podjednostka rybosomu 60S, dzięki czemu powstaje aktywny rybosom 80S gotowy do przeprowadzenia kolejnego etapu translacji – elongacji.

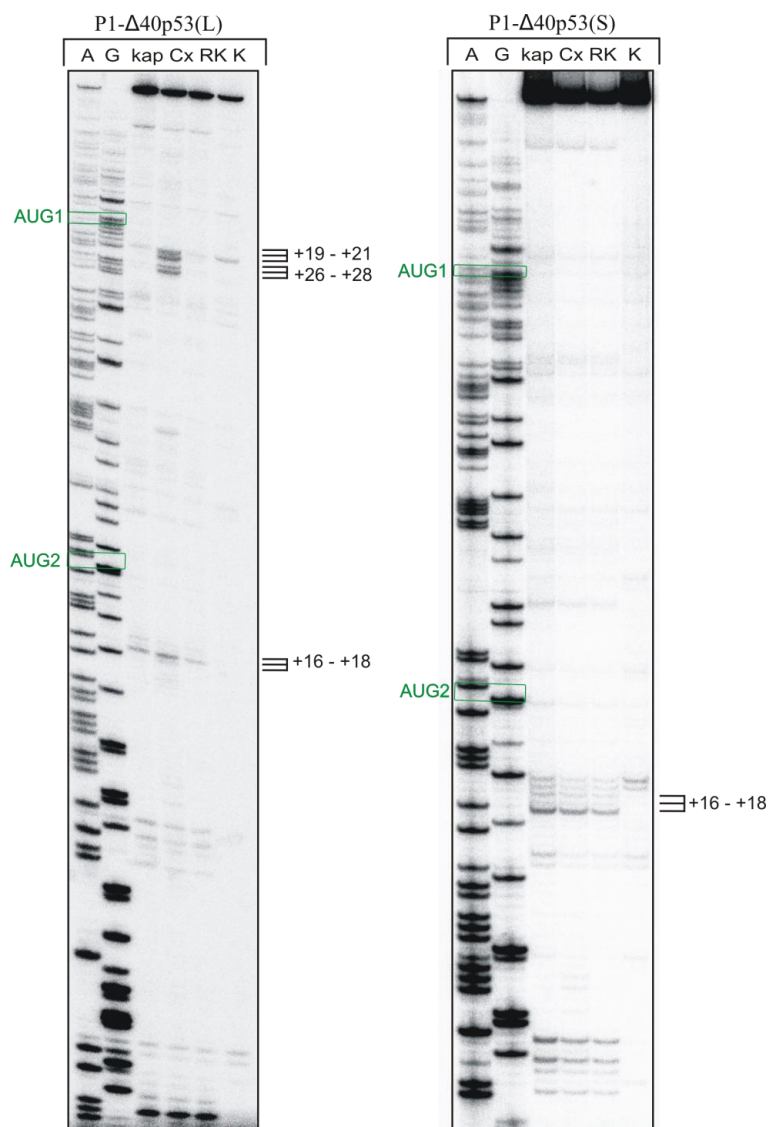
Analiza powstawania kompleksów rybosomalnych w obrębie kodonów AUG możliwa jest dzięki metodzie odcisku palca (ang. *toe-printing*) (Dmitriev et al., 2003).

Polega ona na inhibicji inicjacji translacji poprzez zastosowanie cykloheksymidu – inhibitora aktywności peptydylotransferazy, uniemożliwiającego elongację. Zastosowanie tego odczynnika powoduje blokowanie rybosomu w obrębie kodonu AUG. Podczas analizy położenia kompleksów rybosomalnych na mRNA za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji powstające kompleksy 48S i 80S powodują zatrzymanie reakcji wydłużania startera. Utworzone kompleksy rybosomalne, po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym, generują charakterystyczny wzór trzech prążków. Kompleksy rybosomalne 48S generują prążki w odległości +16 – +18 od kodonu AUG, natomiast w dalszej odległości widoczne są prążki odpowiadające kompleksom rybosomalnym 80S (Dmitriev et al., 2003).

Reakcja translacji *in vitro* przeprowadzona została w RRL z wykorzystaniem wybranych mRNA – P1-Δ40p53(S), P1-Δ40p53(L), P1-Δ40p53(ΔHDM2), oraz P1-Δ40p53(Δ57), w obecności cykloheksymidu. Cykloheksymid, o stężeniu końcowym 1 mg/ml, dodany został do mieszaniny reakcyjnej w RRL, która następnie inkubowana była 20 minut w 30°C (pełny opis przeprowadzonej reakcji przedstawiony jest w rozdziale 5.4.3.2.). W dalszej kolejności, wykonana została reakcja odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem startera DNA znakowanego radioaktywnym izotopem fosforu [³²P] (Tab. 7). Fragmenty cDNA były rozdzielane elektroforetycznie, w warunkach denaturujących w 8% żelu poliakryloamidowym z 7 M mocznikiem oraz w buforze 1x TBE. Identyfikacja powstałych kompleksów rybosomalnych odbyła się na drodze autoradiografii.

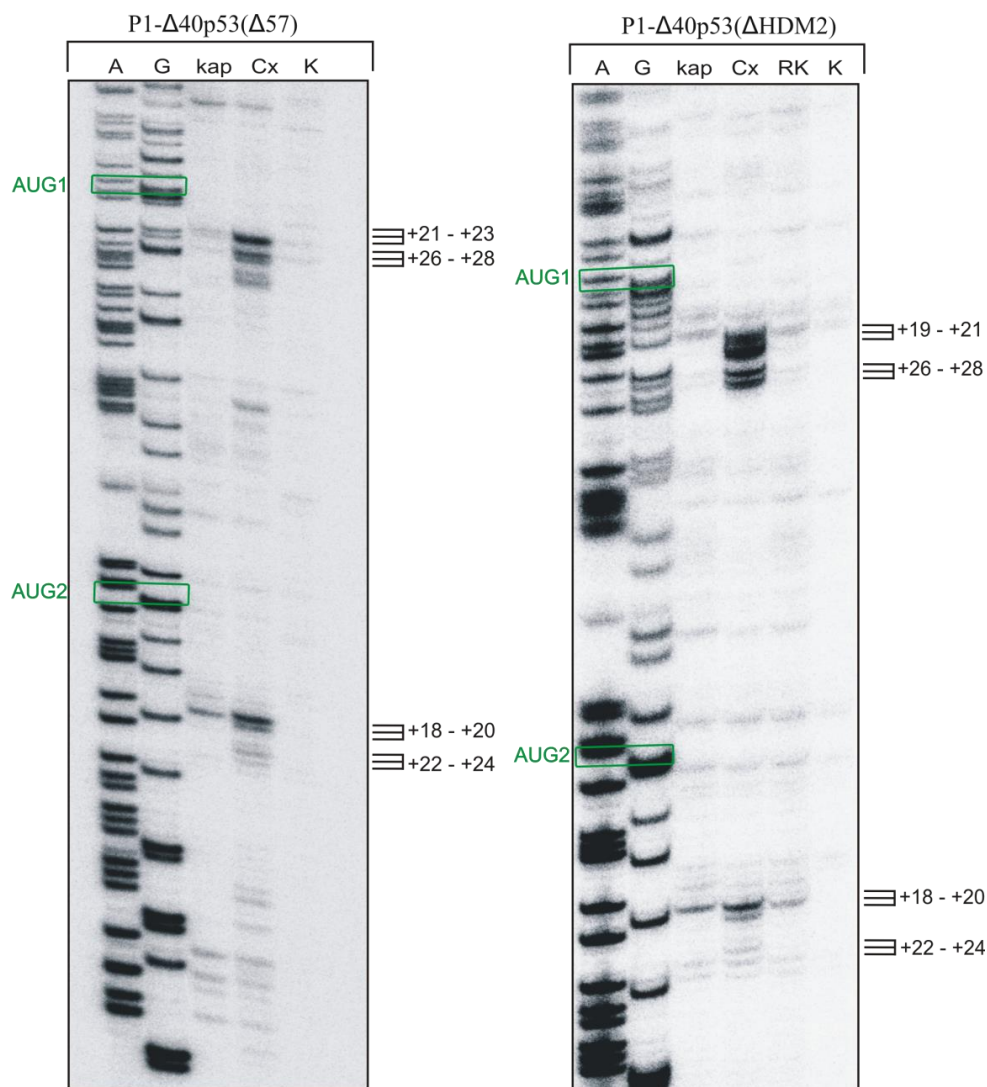
W pierwszej kolejności, reakcja ta została przeprowadzona dla konstruktów mRNA posiadających zmiany strukturalne w obrębie kodonu AUG1 – P1-Δ40p53(S) oraz P1-Δ40p53(L). W przypadku wariantu P1-Δ40p53(L), na otrzymanym autoradiogramie obserwowałam charakterystyczny układ prążków znajdujących się poniżej kodonu AUG1 (Rys. 48). Prążki te znajdowały się w pozycji od +19 do +21, oraz od +26 do +28 od kodonu AUG1 i odpowiadały kompleksowi rybosomalnemu 80S. Potwierdzeniem tego była ich obecność jedynie w reakcji po zastosowaniu cykloheksymidu. Co ważne, kompleksy rybosomalne nie były widoczne w reakcji przeprowadzonej z analogiem kapu, co wskazuje na przebieg kap-zależnej inicjacji translacji zachodzącej z kodonu AUG1. Po przeprowadzeniu tej samej reakcji z wariantem

mRNA P1- Δ 40p53(S), nie obserwowałam prążków na autoradiogramie poniżej kodonu AUG1 (Rys. 48). Z powodu dwuniciowej struktury drugorzędowej w obrębie kodonu AUG1 skanowanie mRNA P1- Δ 40p53(L) oraz proces rozpoznania kodonu inicjacyjnego jest utrudniony, co również było obserwowane we wcześniej opisanych w literaturze doświadczeniach (Gebauer & Hentze 2004).



Rysunek 48. Identyfikacja kompleksów rybosomalnych w obrębie kodonów AUG1 i AUG2 dla wariantów mRNA P1- Δ 40p53(L) i P1- Δ 40p53(S). Autoradiogramy przedstawiają rozdzielanie elektroforetyczne w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7 M mocznika, pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.3.1. Na autoradiogramach kolorem zielonym oznaczone są kodony inicjacyjne, miejsca utworzonych kompleksów 80S zaznaczone są liniami. A i G oznaczają linie sekwencyjne, kap – reakcja z analogiem kapu, Cx – reakcja z cykloheksymidem, RK – kontrola z H₂O, K – kontrola bez lizatu.

Dla obydwu badanych mRNA, kompleksy rybosomalne 80S były rozpoznane również poniżej kodonu AUG2, w pozycji +16 – +18. To samo ułożenie prążków pojawiło się nie tylko w reakcji przeprowadzonej z cykloheksymidem, lecz także z analogiem kapu. Brak inhibicji translacji przez analog kapu wskazuje na obecność elementu IRES odpowiedzialnego za kap-niezależną inicjację translacji z kodonu AUG2 (Rys. 48).



Rysunek 49. Identyfikacja kompleksów rybosomalnych utworzonych w obrębie kodonów AUG1 i AUG2 dla wariantów mRNA P1-Δ40p53(Δ57) i P1-Δ40p53(ΔHDM2). Autoradiogramy przedstawiają rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7 M mocznika, pełny opis procedury znajduje się w rozdziale 5.3.1. Kolorem zielonym na autoradiogramach oznaczone są kodony inicjacyjne, miejsca utworzonych kompleksów 80S zaznaczone są liniami. A i G oznaczają linie sekwencyjne, kap – reakcja z analogiem kapu, Cx – reakcja z cykloheksymidem, RK – kontrola z H₂O, K – kontrola bez lizatu.

Analiza powstających kompleksów rybosomalnych została także przeprowadzona dla wariantów posiadających istotne zmiany w obrębie motywów struktury drugorzędowej – P1- Δ 40p53(Δ HDM2) oraz P1- Δ 40p53(Δ 57) (Rys. 49). W obydwu przypadkach silny, wyróżniający się układ prążków widoczny był poniżej kodonu AUG1, w reakcji przeprowadzonej z cykloheksymidem, czego nie obserwowano w reakcjach kontrolnych. Co ciekawe, podobny wzór został otrzymany dla kodonu AUG2, w reakcji z cykloheksymidem, lecz nie z analogiem kapu. Brak prążków w reakcji z analogiem kapu sugeruje kap-zależną inicjację translacji zachodzącą z kodonu AUG2, w przypadku obydwu tych konstruktów mRNA (Rys. 49).

3.2.9. Dyskusja

Sądzi się, że inicjacja translacji stanowi etap limitujący podczas biosyntezy białka. Jednym z kluczowych czynników wpływających na szybkość skanowania regionu niekodującego 5' mRNA przez rybosom, a w konsekwencji także na efektywność translacji, jest struktura drugorzędowa tego regionu. W przedstawionych przeze mnie doświadczeniach skoncentrowałam się na bliższym poznaniu procesu identyfikacji kodonu AUG przez kompleks rybosomalny, który odbywa się na drodze skanowania regionu terminalnego 5' mRNA. Co więcej, zamierzałam określić, jaki jest wpływ struktury drugorzędowej tego regionu na szybkość jego skanowania oraz na efektywność procesu biosyntezy białka.

3.2.9.1. *Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA ma wpływ na inicjację oraz efektywność translacji*

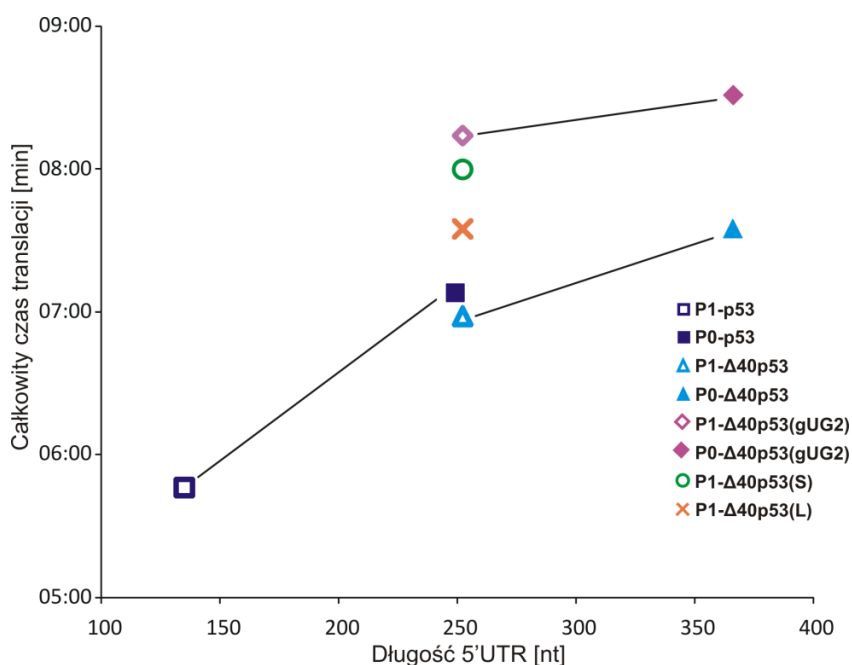
W celu bliższego zbadania zależności pomiędzy strukturą drugorzędową regionu niekodującego 5' mRNA a szybkością skanowania tego regionu przez rybosom, został zaprojektowany szereg wariantów mRNA (Rys. 35). Warianty te różniły się od siebie kilkoma parametrami. Pierwszym z nich była długość regionu terminalnego 5' wynikająca z obecności lub braku regionu między-promotorowego P0-P1 oraz występowania jednego lub dwóch kodonów inicjacyjnych AUG. Kolejnym, była struktura jedno- lub dwuniciowa

w obrębie kodonu start AUG1. W wyniku odmiennej długości oraz usunięcia ważnych elementów struktury: spinek G56–C169 oraz U180–A218, konstrukty te istotnie różniły się także strukturą drugorzędową. Wszystkie warianty modelowego mRNA w regionie kodującym posiadały gen reporterowy lucyferazy *Renilla*, co umożliwiło przeprowadzenie analiz efektywności i czasu inicjacji translacji. Przewidywana struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' wariantów mRNA została potwierdzona za pomocą metod biochemicznych (Rys. 31b, 32, 33, 34). Umożliwiło to korelację zmian w czasie skanowania mRNA przez rybosom z modyfikacjami wprowadzonymi w strukturze regionu terminalnego 5' mRNA.

Reakcje translacji *in vitro* zostały przeprowadzone w lizacie z retikulocytów króliczych (Rys. 36, 37, 38). Istotną zaletą systemu RRL jest uproszczenie jego składu i pozbawienie wielu białek komórkowych. Dzięki temu doskonale widoczny jest wpływ innych czynników na translację, w tym struktury drugorzędowej 5'UTR mRNA. Zważywszy na to, zastosowanie RRL stanowiło odpowiedni wybór do przeprowadzenia moich badań, których celem była ocena wpływu regionu terminalnego 5' mRNA na inicjację translacji, ze zminimalizowanym wpływem innych czynników.

Graficzne przedstawienie otrzymanych wyników analiz czasu skanowania mRNA przez rybosom przedstawione jest na rysunku 50. Wykres ten obrazuje zależność pomiędzy długością regionu niekodującego 5' wariantów mRNA a całkowitym czasem translacji. Warianty różniące się jedynie obecnością 113-nukleotydowego regionu między-promotorowego P0-P1 połączone są w pary, dzięki czemu zilustrowany jest wpływ wydłużenia sekwencji niekodującej na wydłużenie skanowania mRNA przez rybosom. Co niezwykle istotne, wykazałam, że nie tylko długość 5'UTR ma wpływ na inicjację translacji, ale także jego struktura drugorzędowa ma kluczowe znaczenie. Bowiem, ta sama 113-nukleotydowa sekwencja w różnych wariantach mRNA związała się w odmienną strukturę, co w rezultacie spowalniało lub przyspieszało szybkość skanowania (Tab. 3, 4, 5). W przypadku konstruktu mRNA P0-Δ40p53(gUG2) szybkość ta, obliczona poprzez porównanie do wariantu mRNA P1-Δ40p53(gUG2), wynosi 6,6 nt/s. Natomiast dla mRNA P0-p53, którego szybkość skanowania została porównana do wariantu P1-p53, wynosi 1,4 nt/s. Dla P0-Δ40p53 szybkość ta jest równa 3 nt/s i została określona poprzez porównanie do wariantu P1-Δ40p53 (Rys. 50). Obliczone szybkości skanowania są

porównywalne z wartościami otrzymanymi przez inne grupy badawcze (Berthelot et al., 2004; Vassilenko et al., 2011). Dla systemu translacyjnego Krebs-2 wynosi ona około 6 nt/s, dla translacji przeprowadzonej w lizacie z kielków pszenicy równa jest 8 nt/s, natomiast około 10 nt/s dla translacji w ekstrakcie drożdżowym (Berthelot et al., 2004; Vassilenko et al., 2011).



Rysunek 50. Wykres zależności całkowitego czasu translacji od długości 5'UTR wariantów mRNA. Symbole połączone liniami reprezentują konstrukty, które różnią się tylko regionem pomiędzy miejscami startu transkrypcji P0 i P1.

3.2.9.2. Stabilność termodynamiczna motywów strukturalnych znajdujących się w regionie niekodującym 5' mRNA ma wpływ na efektywność translacji

Wykazano, że u przedstawicieli Prokaryota, istnieje silna zależność pomiędzy stabilnością motywu strukturalnego spinki do włosów, w której znajduje się kodon inicjacyjny AUG, a efektywnością translacji (Asano 2014). Obniżenie wartości ΔG dla elementu spinki o około -1,4 kcal/mol spowodowało 10-krotną redukcję efektywności translacji białek płaszcza u bakteriofagów (Asano 2014). Co więcej, wykazano, że w tym przypadku większy wpływ miała struktura drugorzędowa niż skład nukleotydowy sekwencji. Dodatkowo w oparciu o obliczenia energii swobodnej, de Smith i van Duin zasugerowali, że wydajność translacji jest związana z frakcją nie zwiniętego regionu RNA

w miejscu wiązania się rybosomu (Smith & van Duin 1990). Obserwacje te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez mnie podczas translacji *in vitro* przeprowadzonej dla modelowych mRNA: P1- Δ 40p53, P1- Δ 40p53(S) i P1- Δ 40p53(L). W tych przypadkach stabilność motywu strukturalnego spinki z kodonem AUG1 wynosi odpowiednio: -52.3 kcal/mol, -64.9 kcal/mol i -44.3 kcal/mol, co koresponduje z wydajnością translacji dla poszczególnych wariantów (Rys. 41).

Stabilność termodynamiczna większości motywów strukturalnych zlokalizowanych w wariantach regionu terminalnego 5' mRNA p53 wynosi około -20 kcal/mol (Rys. 41, 42, 44). Wyjątek stanowi spinka G56–C169, której ΔG wynosi około -50 kcal/mol. Jednakże, ten element strukturalny nie jest regularną spinką, lecz posiada pętle i wybrzuszenia. Niewątpliwie, rozwinięcie takiej spinki jest dużo łatwiejsze niż rozwinięcie w pełni sparowanego elementu. Dlatego też, wpływ tego elementu na efektywność translacji jest mniejszy niż mogłoby to wynikać jedynie z jego stabilności termodynamicznej. Struktury typu spinki do włosów, których ΔG sięga nawet poniżej -50 kcal/mol, mogą uczestniczyć w wydajnej translacji pod warunkiem, że ilość par GC w ich obrębie jest relatywnie niska.

Zaobserwowano, że struktury drugorzędowe znajdujące się w regionach bliżej 5' końca mRNA mają znacznie silniejszy, inhibujący wpływ na efektywność translacji oraz czas skanowania przez rybosom, niż motywy strukturalne oddalone od końca 5' mRNA. Dotyczy to zwłaszcza motywów typu spinki do włosów, których ΔG wynosi poniżej -30 kcal/mol. Przykładem jest spinka zlokalizowana 5 nt od końca 5' regionu niekodującego mRNA, o stabilności -30 kcal/mol, istotnie obniżająca efektywność translacji. Natomiast spinka bogata w pary GC, z kodonem inicjacyjnym AUG, znajdująca się w środku 5'UTR nie obniżyła efektywności translacji w komórkach COS (Kozak 1987).

3.2.9.3. Kontekst strukturalny kodonu inicjacyjnego AUG ma duży wpływ na efektywność translacji oraz skanowanie mRNA przez rybosom

Efektywność translacji nie zależy tylko od energii stabilizacji, jaką posiadają struktury drugorzędowe regionu niekodującego 5'. Duży wpływ na wydajność translacji z pewnością ma lokalizacja kodonu AUG w strukturze mRNA. W moich badaniach

zależność pomiędzy obniżeniem efektywności translacji a umiejscowieniem kodonu inicjacyjnego w dwuniciowej strukturze RNA jest bardzo dobrze widoczna (Rys. 36, 42, Tab. 4).

Porównanie wartości całkowitego czasu translacji dla P1- Δ 40p53(S) i P1- Δ 40p53(L) z tym wyznaczonym dla P1- Δ 40p53 pokazuje, że oba warianty mRNA posiadające mutacje punktowe w regionach terminalnych 5' są skanowane z mniejszą szybkością (Rys. 42b, i tab. 4). Najdłuższą całkowitą wartością czasu translacji obliczono dla mRNA P1- Δ 40p53(S), w którym kodon inicjacyjny jest osadzony w strukturze dwuniciowej. To pokazuje, że spinka do włosów G56–C169 stanowi barierę dla rybosomalnego kompleksu skanującego 43S. W P1- Δ 40p53(L) rozplecenie spinki do włosów, zawierającej dużą pętlę wewnętrzną jest niewątpliwie łatwiejsze niż w przypadku dwuniciowego trzonu, w którym znajduje się kodon AUG1. Co więcej, efektywność translacji tego konstruktu jest wyższa, co można wyjaśnić krótszym czasem całkowitej translacji i/lub lepszej dostępności AUG1 do maszynerii translacyjnej (Rys. 36). Powyższe wyniki pokazują ponownie, że czas migracji rybosomu nie zawsze jest wprost proporcjonalny do długości 5'UTR i że kontekst strukturalny, w którym znajduje się kodon inicjacyjny, ma kluczowe znaczenie dla inicjacji translacji.

3.2.9.4. Region obejmujący elementy strukturalne typu spinki G56–C169 oraz U180–A218 jest niezbędny do translacji według mechanizmu zależnego od IRES

Wykazano, że region obejmujący dwa kodony inicjacyjne: AUG1 i AUG2 jest niezbędny do zainicjowania translacji według mechanizmu niezależnego od struktury kapu (Gorska et al., 2013a) (Rys. 45). Tezę tę potwierdzają wyniki badań inhibicji translacji w obecności analogu kapu m^7 GpppG, przeprowadzone dla wariantów mRNA P1- Δ 40p53(Δ 57) oraz P1- Δ 40p53(Δ HDM2) (Rys. 46). Konstrukty te, pozbawione są elementów strukturalnych uczestniczących w IRES-zależnej translacji, w wyniku czego dodany do reakcji inhibitor kap-zależnej translacji zahamował syntezę białek zachodzącą z kodonu AUG2.

Dodatkowym potwierdzeniem usunięcia elementów IRES z tych konstruktów było przeprowadzenie analizy tworzenia się kompleksów rybosomalnych 80S w obrębie kodonu

AUG2. W reakcji tej obserwowany był zanik kompleksów rybosomalnych, po dodaniu do reakcji inhibitora kap-zależnej translacji (Rys. 48 i 49). Wynik ten ilustruje znaczenie obu elementów strukturalnych, spinek G56–C169 i U180–A218, dla funkcjonowania 5'-końcowego regionu mRNA p53, jako elementu IRES. Okazało się, że „manipulacja strukturą drugorzędową” w obrębie tego regionu zmieniła mechanizm inicjacji translacji.

Co interesujące, wzrost wydajności translacji P1- Δ 40p53(Δ 57), zachodzącej z kodonu AUG2 (Rys. 37) potwierdza hipotezę, że spinka G56–C169 jest odpowiedzialna za blokowanie translacji zależnej od kapu w celu promowania aktywności IRES i syntezy białka z kodonu AUG2. Z drugiej strony, spadek wydajności translacji P1- Δ 40p53(Δ HDM2) z drugiego kodonu inicjacyjnego jest zgodny z sugestią, że spinka U180–A218 jest elementem strukturalnym, w którym umieszczona byłaby aktywność IRES (Rys. 37). Bardzo ważne jest dla mRNA z elementami IRES, aby dwa typy mechanizmu inicjacji translacji, kap-zależny i kap-niezależny, mogły działać jednocześnie (Candeias et al., 2006).

Przedstawione przeze mnie badania pokazują, że długość regionu niekodującego 5' mRNA p53, obecność stabilnych motywów struktury drugorzędowej w tym regionie, kontekst strukturalny kodonów inicjacyjnych i elementy IRES mają decydujący wpływ na wydajność translacji. Różnice strukturalne korelowały z różnymi szybkościami skanowania tego regionu i wydajnością syntezy białka reporterowego. Warianty regionu niekodującego 5' mRNA p53 wyraźnie ilustrują złożony charakter wpływu cech tego regionu na translację.

3.3. Badanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA Δ 133p53 oraz efektywności translacji zachodzącej z kodonów AUG3 i AUG4

Niedawno rozpoznane izoformy białka p53 – Δ 133p53 i Δ 160p53 uchodzą za niezwykle ważne białka, których funkcje znacznie różnią się od p53 typu dzikiego. Szereg publikacji podkreśla rolę izoformy Δ 133p53 w procesach nowotworzenia, w tym angiogenezie i metastazie, a także w innych procesach komórkowych, np. w procesie starzenia (Bourdon et al., 2005; Aoubala et al., 2011; Bernard et al., 2013; Ji et al., 2015;

Arsic et al., 2017, Zhang et al., 2017). W znacznie mniejszym stopniu została zbadana izoforma $\Delta 160p53$, krótsza o 159 aminokwasów od białka p53 (Marcel et al., 2010a). Pomimo, iż została odkryta znacznie później, jest to druga najbardziej ewolucyjnie zachowawcza izoforma p53 wśród gatunków, tuż po białku p53 pełnej długości. Wykazano, że izoforma ta występuje w kilku liniach komórkowych, m.in. raka kości – U2OS, raka piersi – T47D oraz białaczki szpikowej – K562 (Marcel et al., 2010a). Co ciekawe, zwiększoną ilość $\Delta 160p53$ zidentyfikowano w liniach komórkowych, w których występuje *TP53* w formie zmutowanej, np. raka jelita grubego HT-29 oraz raka skóry A431 (Candeias et al., 2016). Białko $\Delta 160p53$ kontroluje los komórek w sposób bardzo podobny do zmutowanego białka p53, gdy w *TP53* występuje mutacja R273H, zmieniająca argininę na histydynę. Podobnie jak w przypadku mutantu p53 R273H, zwiększona synteza $\Delta 160p53$ w komórkach powoduje wzmożoną proliferację komórek, natomiast brak $\Delta 160p53$ przyspiesza apoptozę. Dodatkowo, badania wykazały, iż brak $\Delta 160p53$ w komórkach, w których występuje zmutowane białko p53, powoduje apoptozę, natomiast występowanie obydwu białek znacznie zwiększa proliferację komórek. Podobna zależność była obserwowana także u innych mutantów *TP53*: R248Q oraz R175H, co wskazuje na współdziałanie zmutowanego białka p53 z izoformą $\Delta 160p53$ (Candeias et al., 2016).

Funkcja izoform $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$ jest coraz szerzej badana, jednak wciąż nie została określona struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$. Jak przedstawiono w poprzednich rozdziałach, regulacja translacji poszczególnych mRNA białka p53 okazała się być niezwykle ważna. Dlatego też, ze względu na brak danych na temat regulacji translacji izoform $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$, poznanie struktury drugorzędowej tego regionu mRNA wydaje się kluczowe. Zważywszy na szczególnie ważną rolę obydwu izoform w procesie nowotworzenia, istotne jest, aby dokładnie zbadać mechanizmy ich generowania, a także regulacji ich syntezy.

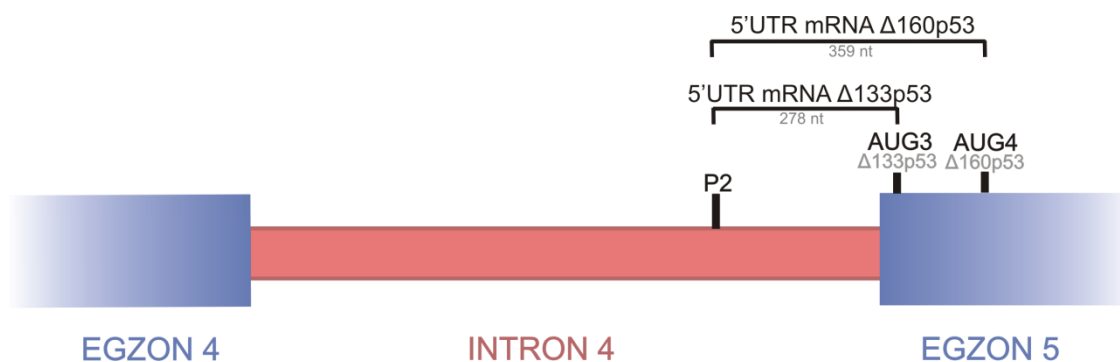
W związku powyższym podjęłam się zadania określenia struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$, z którego generowane są izoformy $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$. Celem przedstawionych w tym rozdziale badań było mapowanie struktury drugorzędowej oraz zaproponowanie modelu strukturalnego regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$. Przeprowadzone przeze mnie analizy umożliwią poznanie roli

zawartych w tym regionie elementów strukturalnych, które potencjalnie są istotne w procesie inicjacji translacji.

3.3.1. Przygotowanie konstrukt mRNA $\Delta 133p53$ zawierającego region terminalny 5'

Pierwszym etapem badań przedstawionych w tym rozdziale było przygotowanie wariantu mRNA $\Delta 133p53$. Początek sekwencji nukleotydowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ znajduje się w intronie 4 (P2 – miejsce początku transkryptu). Region terminalny 5' obejmuje 257 końcowych nukleotydów intronu 4 oraz część egzonu 5 pre-mRNA p53. W przypadku $\Delta 133p53$ jest to 21 nukleotydów egzonu 5, natomiast w przypadku $\Delta 160p53$ są to 102 nukleotydy (Rys. 51).

Konstrukt dsDNA $\Delta 133p53$ otrzymano na bazie wektora plazmidowego pOTB7 niosącego insert odpowiadający sekwencji mRNA p53 o pełnej długości. W pierwszej kolejności usunięta została sekwencja wektora odpowiadająca czterem pierwszym egzonom, za pomocą enzymów restrykcyjnych BsaAI i SalI. W następnym etapie na drodze ligacji wprowadzono do wektora insert o sekwencji odpowiadającej 257 nt intronu 4 wraz z sekwencją promotora dla polimerazy Sp6. W kolejnym etapie wektor dsDNA linearyzowany był przy pomocy enzymu restrykcyjnego XhoI i przeprowadzona została transkrypcja *in vitro* z wykorzystaniem polimerazy Sp6. Szczegółowy opis procedury przygotowania dsDNA $\Delta 133p53$ znajduje się w rozdziale 5.4.1.



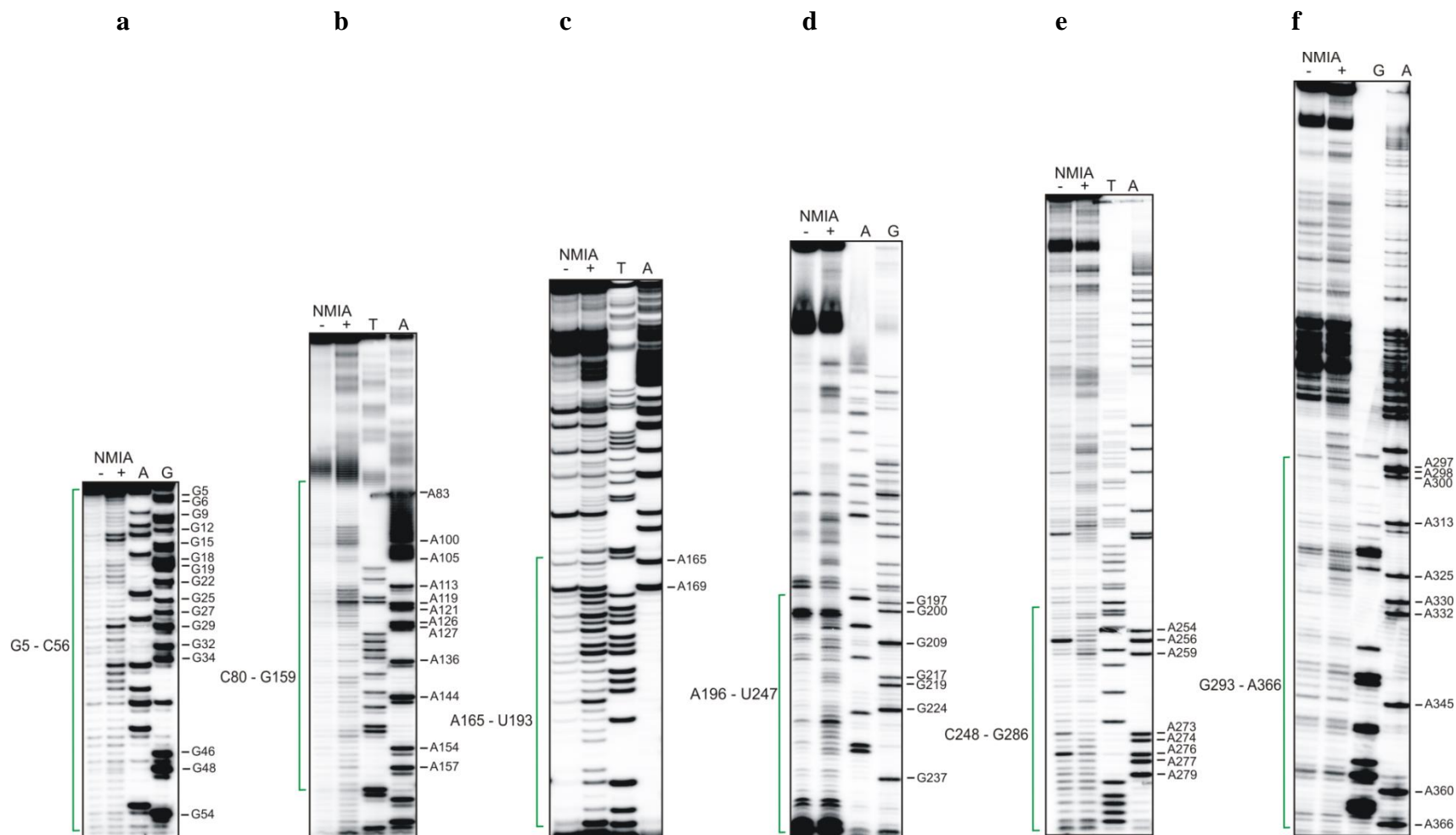
Rysunek 51. Schematyczne przedstawienie fragmentu pre-mRNA p53 wraz z regionem niekodującym 5' mRNA $\Delta 133p53$. P2 oznacza początek transkryptu mRNA $\Delta 133p53$, AUG3 i AUG4 oznaczają kodony inicjacji translacji izoform $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$.

3.3.2. Określenie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$

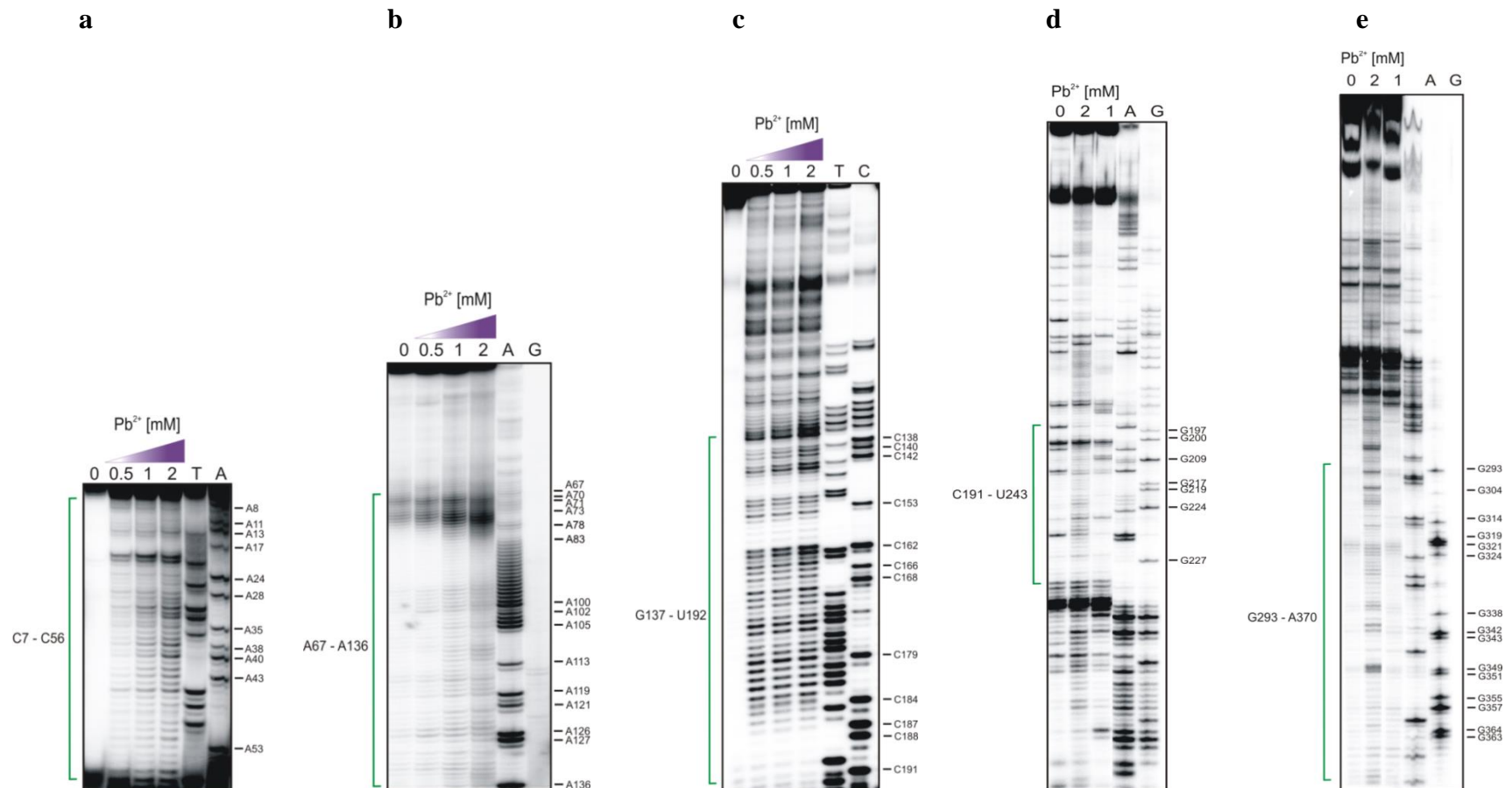
W celu określenia struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ zastosowane zostały metody: SHAPE z wykorzystaniem odczynnika modyfikującego NMIA oraz cięcia RNA indukowane w obecności jonów ołowiu (II) (metody te zostały opisane w rozdziale 5.4.8.). Miejsca modyfikacji chemicznej oraz cięcia identyfikowałam za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem 4 starterów DNA wyznakowanych na końcu 5' radioaktywnym izotopem fosforu [^{32}P], co umożliwiło detekcję produktów uzyskanych po reakcji. Otrzymane fragmenty cDNA rozdzielałam elektroforetycznie warunkach denaturujących, w 8% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7 M mocznika.

Rysunek 52 przedstawia autoradiogramy otrzymane po reakcji SHAPE a następnie odwrotnej transkrypcji, przy użyciu poszczególnych starterów. Przy zastosowaniu każdego ze starterów możliwa była identyfikacja około 40–80 nukleotydowej sekwencji. Na żelu znajdującym się na rysunku 52a widoczne są intensywne prążki w obrębie regionu zlokalizowanego w pozycjach A35–A38. Silne prążki obserwowane są także w pozycjach: A94–A100, A169–U179, U223–A232, U323–C329 (Rys. 52b, c, d i e).

W przypadku mapowania struktury drugorzędowej przeprowadzonej na drodze cięcia RNA indukowanego w obecności jonów ołowiu (II) szczególnie silne cięcia obserwowałam w obrębie reszt C20–C44, co jest odzwierciedlone na żelu poliakrylamidowym w postaci intensywnych prążków (Rys. 53a). Region ten cechuje się także wysoką reaktywnością wobec odczynnika NMIA. Silne prążki na autoradiogramie występowały także w pozycji A67–A78, regionie który nie był analizowany metodą SHAPE, z powodu utrudnionej dostępności (Rys. 53b). Podobnie, jak w przypadku przeprowadzenia reakcji SHAPE, cięcia w obecności jonów Pb^{2+} wystąpiły także w pozycjach A94–A100 (Rys. 53b). Obserwowałam również cięcia RNA w obrębie regionu C162–G183, występowały w nim też modyfikacje reszt za pomocą NMIA, co wskazuje na jednoniciowy charakter tego regionu (Rys. 53c). Intensywne prążki obserwowane były na autoradiogramie w regionie odpowiadającym sekwencji G217–A231, który podlegał także modyfikacji metodą SHAPE (Rys. 53d). Przy użyciu jonów Pb^{2+} określona została również struktura w obrębie nukleotydów U323–C329 (Rys. 53e).



Rysunek 52. Mapowanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ metodą SHAPE. Autoradiogramy a, b, c, d, e, f przedstawiają rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnymi starterami, w warunkach denaturujących w 8% żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 7 M mocznika. Zieloną linią zaznaczono regiony wykorzystane do analizy strukturalnej w oprogramowaniu *RNAstructure* 5.6. A, T, G oznaczają linie sekwencyjne, NMIA + oznacza reakcję z odczynnikiem modyfikującym, natomiast – oznacza reakcję kontrolną, do której nie dodano NMIA.

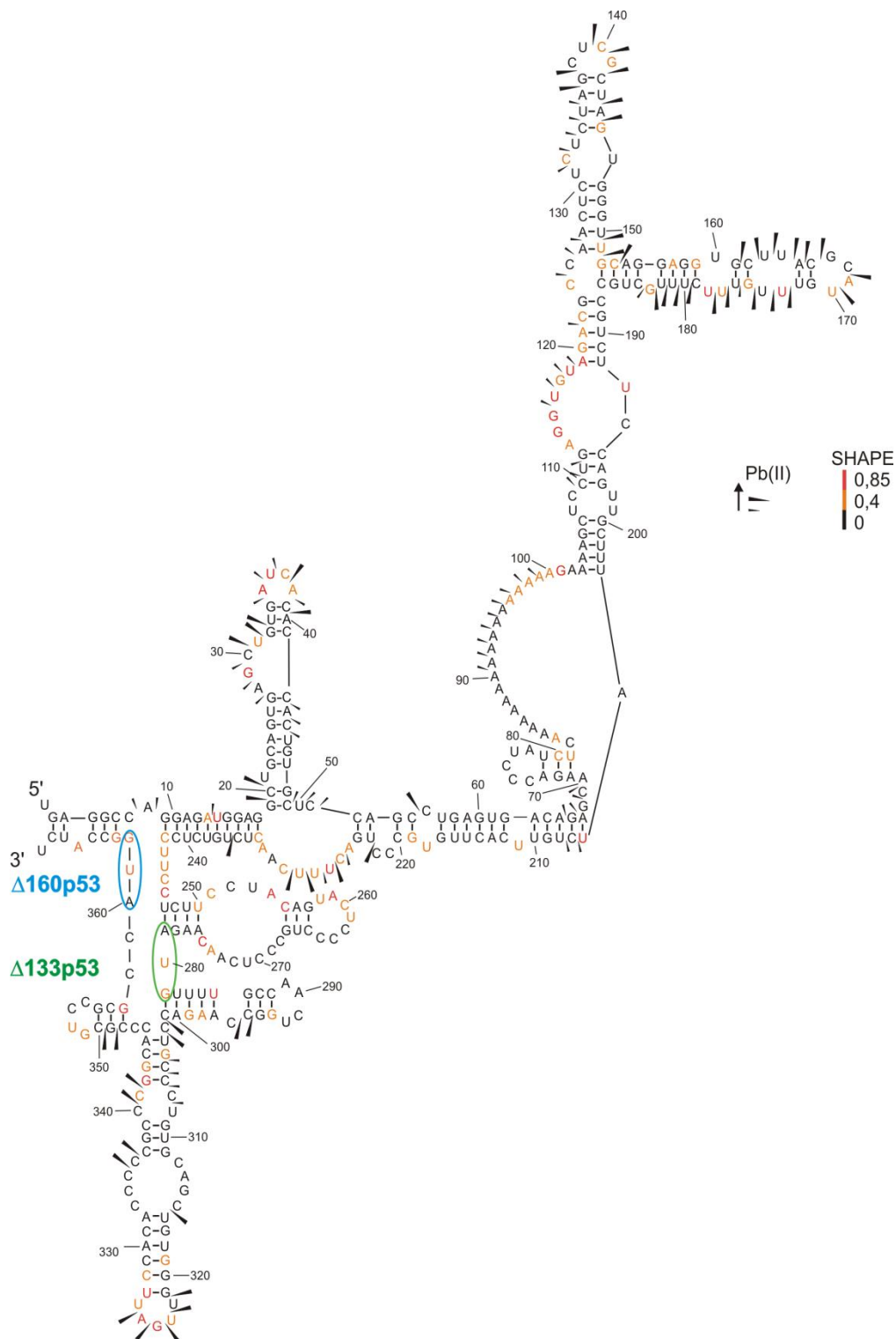


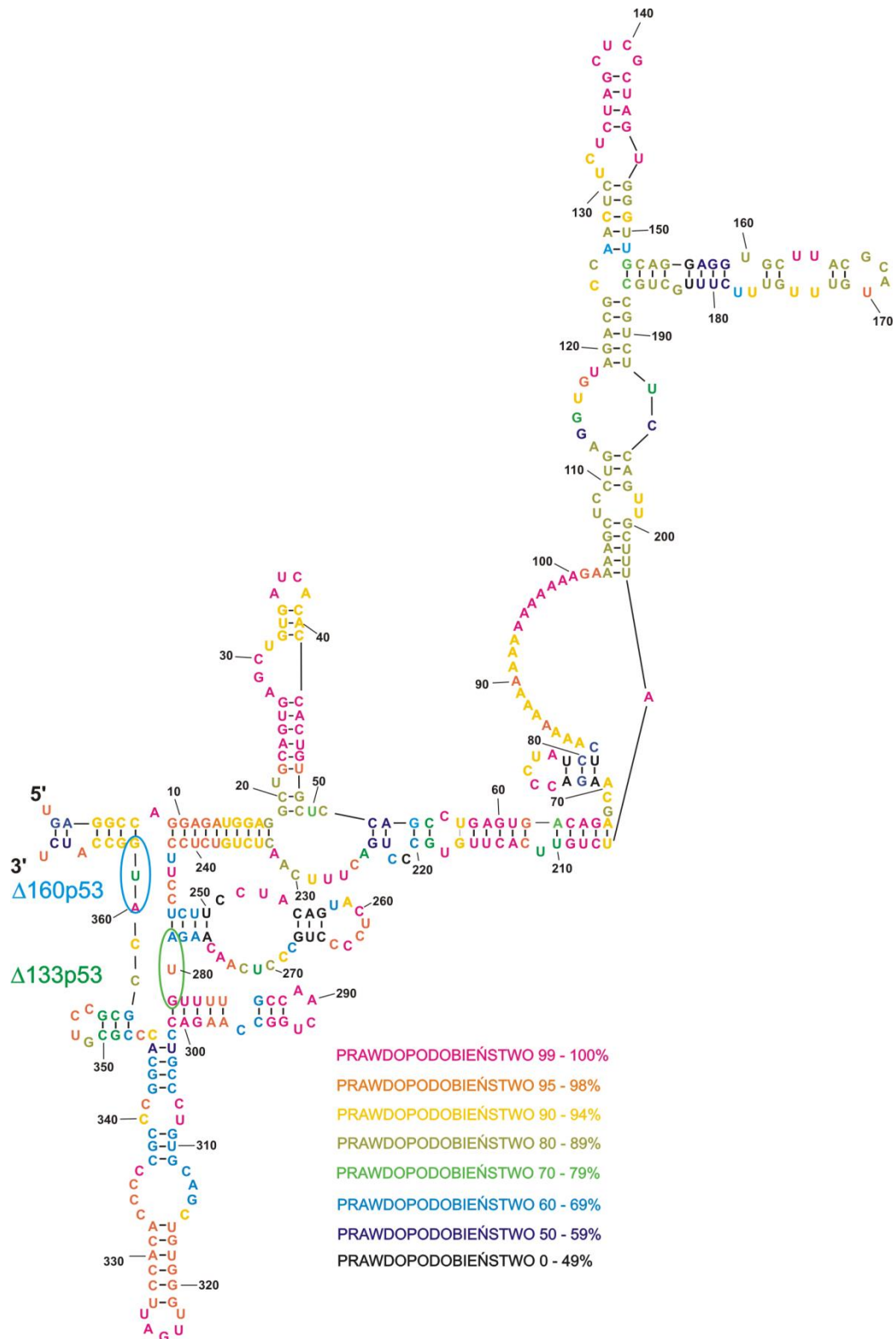
Rysunek 53. Mapowanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ metodą cięcia RNA indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} . Autoradiogramy a, b, c, d, e, przedstawiają rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnymi starterami, w warunkach denaturujących w 8% żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7 M mocznika. Zieloną linią zaznaczono regiony wykorzystane do analizy. A, T, G oznaczają linie sekwencyjne, 0,5, 1 i 2 oznaczają stężenie jonów Pb^{2+} , 0 stanowi reakcję kontrolną w której nie został dodany Pb^{2+} , po prawej stronie zaznaczono wybrane pozycje reszt nukleotydowych.

Wyniki uzyskane na drodze reakcji SHAPE zostały znormalizowane w oparciu o reakcję kontrolną, w której nie został zastosowany odczynnik NMIA. Następnie, otrzymane rezultaty wprowadzone były do oprogramowania *RNAstructure 5.6*. Wygenerowane zostały prawdopodobne struktury drugorzędowe analizowanego regionu, w zakresie 10% minimalnej energii swobodnej, spośród których wybrałam strukturę najbardziej zgodną z wynikami eksperymentalnymi. Cięcia indukowane jonami Pb^{2+} naniosłam na zaproponowany przeze mnie model struktury drugorzędowej, po określeniu ich względnej intensywności.

Rysunek 54 przedstawia zaproponowany model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$, o energii $\Delta G = -140$ kcal/mol. W strukturze tej występuje silne sparowanie regionu terminalnego 5' ze środkową częścią cząsteczki. Widoczny jest także region jednoniciowy A83–A100, składający się z 18 reszt adenozyiny. Ponadto, zaproponowana struktura charakteryzuje się występowaniem kilku elementów typu spinki o stosunkowo niskiej stabilności termodynamicznej od około -16 do -5 kcal/mol, znajdujących się w części końcowej 3' analizowanego regionu. Kodon AUG3 znajduje się w regionie częściowo sparowanym: A oraz G znajdują się w regionie dwuniciowym, natomiast U w jednoniciowym. Kodon AUG4 zlokalizowany jest w regionie jednoniciowym (Rys. 54).

Odcinki jednoniciowe manifestowane są przez silne prążki widoczne na autoradiogramach otrzymanych po reakcji SHAPE (Rys. 52). Intensywne prążki obecne na żelu w obrębie regionu zlokalizowanego w pozycjach A35–A38 (Rys. 52a) odpowiadają pętli apikalnej spinki G19–C49. Modyfikacje występują także w pozycjach A94–A100 (Rys. 52b) co odpowiada odcinkowi jednoniciowemu. Dodatkowo, silne prążki obserwowane są również w regionie A169–U179 (Rys. 52c), który tworzy mało stabilną strukturę spinki, posiadającą wiele niesparowanych nukleotydów. Występowanie odcinków jednoniciowych w zaproponowanej strukturze jest także potwierdzone przez modyfikacje nukleotydów w pozycjach U223–A232 i U323–C329 (Rys. 52d i f).





Rysunek 55. Model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ wraz z określonym prawdopodobieństwem występowania danego nukleotydu w podobnym motywie strukturalnym, zaproponowanym przez program *RNAstructure 5.6*.

Dla zaproponowanej struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ przeprowadziłam także analizę zdeterminowania strukturalnego tego regionu (Rys. 55). Z wykorzystaniem oprogramowania *RNAstructure 5.6* określiłam prawdopodobieństwo występowania danego nukleotydu w podobnym motywie strukturalnym, również w innych zwińnięciach, wygenerowanych przez program. Możliwe było wyróżnienie kilku motywów strukturalnych o wysokim stopniu zdeterminowania. Szczególnie dużą zachowawczością cechuje się rozwidlony element struktury drugorzędowej typu ramię-pętla, obejmujący pozycje nukleotydowe: A103–U204. Prawdopodobieństwo wystąpienia motywu strukturalnego w takim zwińnięciu wynosi 80 – 99%.

Wykorzystanie dwóch metod eksperymentalnych: SHAPE oraz cięcia RNA w obecności jonów Pb (II), w połączeniu z analizą komputerową, umożliwiło zaproponowanie pierwszego modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$.

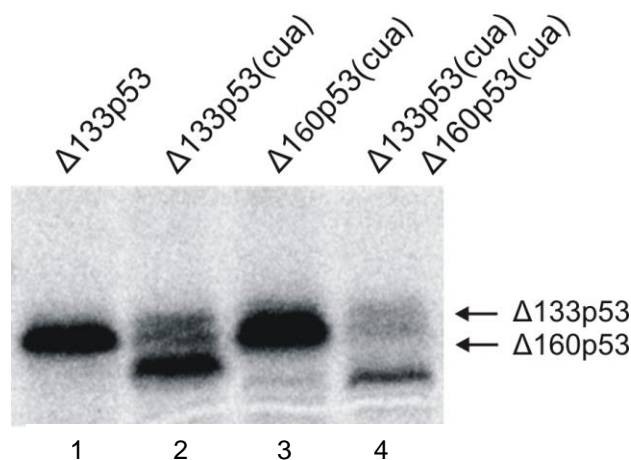
3.3.3. Badanie efektywności translacji izoform $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$

Kolejnym etapem badań było określenie efektywności syntezy zachodzącej z kodonów inicjacyjnych AUG3 i AUG4 dla izoform $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$ (Rys. 51). W tym celu przeprowadziłam translację *in vitro* lizacie z retikulocytów króliczych, w obecności metioniny znakowanej izotopem siarki [³⁵S]-Met, umożliwiającą detekcję produktów translacji. Matrycę do reakcji stanowił mRNA $\Delta 133p53$, który na końcu 5' zawierał strukturę kap (dokładny opis reakcji przedstawiony jest w rozdziale 5.4.3.1). Produkty białkowe otrzymane po translacji analizowałam elektroforetycznie w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego z dodatkiem 0,1% SDS (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.3.3.).

Na otrzymanym autoradiogramie obecny był tylko jeden produkt białkowy na wysokości około 34 kDa (Rys. 56, linia 1). Zważywszy na to, iż w mRNA występują dwa kodony inicjacyjne był to wynik nieoczekiwany.

W celu określenia, z którego z kodonów AUG zachodzi inicjacja translacji przeprowadziłam ich ukierunkowaną mutagenezę. Przygotowane zostały dwa warianty

mRNA. W pierwszym, $\Delta 133p53(cua)$, kodon AUG3 został zmieniony na kodon leucynowy CUA, tak, aby translacja zachodziła jedynie z kodonu AUG4 dla $\Delta 160p53$. Drugi wariant, $\Delta 160p53(cua)$, zawierał mutację kodonu AUG4 na CUA, tak aby synteza była inicjowana tylko z kodonu AUG3. W celu całkowitego zahamowania translacji przygotowany został wariant ze zmutowanymi obydwoma kodonami start. Zmiany w kodonach zostały wprowadzone na drodze ukierunkowanej mutagenazy, przy użyciu dsDNA $\Delta 133p53$ jako matrycy, poprzez wprowadzenie substytucji punktowych, za pomocą starterów DNA niosących mutacje (szczegółowa procedura przedstawiona jest w rozdziale 5.4.1., sekwencje starterów DNA zawarte są w tabeli 6). Następnie, przeprowadziłam transkrypcję *in vitro* z wykorzystaniem otrzymanych wariantów dsDNA niosących mutacje, w obecności analogu kapu ARCA. Translacja *in vitro* z otrzymanymi wariantami mRNA, a także z mRNA typu dzikiego – $\Delta 133p53$ została przeprowadzona w RRL, w obecności metioniny znakowanej izotopem siarki [^{35}S]-Met. Rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji translacji prowadzony był w warunkach denaturujących z dodatkiem 0,1% SDS.



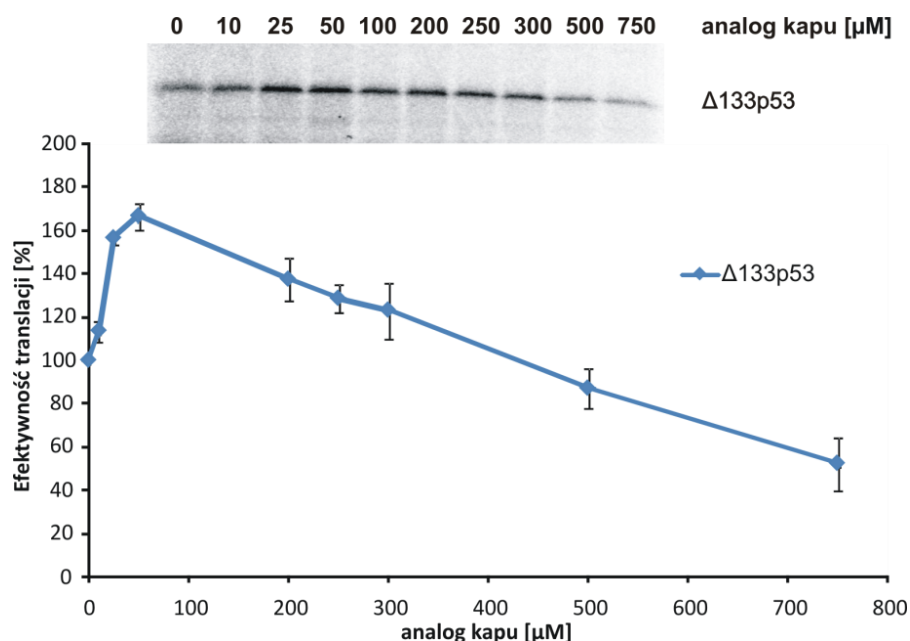
Rysunek 56. Analiza produktów białkowych otrzymanych po translacji *in vitro* modelowych mRNA w lizacie z retikulocytów króliczych. Autoradiogram przedstawia rozdzielanie elektroforetyczne produktów po reakcji translacji *in vitro*, przeprowadzony w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z dodatkiem 0,1% SDS (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale. 5.3.3.). Przedstawione zostały produkty białkowe powstające z mRNA $\Delta 133p53(cua)$ oraz $\Delta 160p53(cua)$. Jako kontrola wykorzystany został typ dziki mRNA, z dwoma kodonami AUG ($\Delta 133p53$) oraz mRNA ze zmutowanymi dwoma kodonami AUG – $\Delta 133p53(cua)$ $\Delta 160p53(cua)$. Strzałki oznaczają izoformy białkowe powstające na drodze translacji.

Analiza wyników po przeprowadzonej reakcji translacji *in vitro* z wykorzystaniem otrzymanych wariantów mRNA niosących mutacje wykazała zróżnicowany poziom syntezy białek (Rys. 56). W przypadku wariantu $\Delta 133p53(cua)$ obserwowany jest prążek znajdujący się poniżej 34 kDa (Rys. 56, linia 2), natomiast na wysokości 34 kDa, czyli na wysokości gdzie obserwowany był sygnał po translacji z mRNA typu dzikiego, jest słaby prążek. W przypadku wariantu $\Delta 160p53(cua)$ translacja zachodziła w taki sam sposób jak z konstruktem mRNA typu dzikiego (Rys. 56 linia 3), czyli obserwowany był silny prążek na wysokości 34 kDa. Zgodnie z oczekiwaniami, po przeprowadzeniu mutagenyzy obydwu kodonów start – $\Delta 133p53(cua)$ $\Delta 160p53(cua)$, synteza $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$ została zahamowana, natomiast pojawił się produkt poniżej, odpowiadający nie opisanemu kodonowi start, który może stanowić produkt niespecyficzny translacji (Rys. 56 linia 4). Wykazałam, że translacja w warunkach *in vitro* zachodzi głównie z kodonu AUG3, z którego syntetyzowana jest izoforma $\Delta 133p53$.

3.3.4. Analiza mechanizmu inicjacji translacji zachodzącej z kodonu AUG3

Kolejnym celem moich badań była analiza mechanizmu procesu inicjacji translacji zachodzącej z kodonu AUG3 dla izoformy $\Delta 133p53$. Wcześniejsze analizy, a także doniesienia literaturowe wykazały, że inicjacja translacji innego transkryptu mRNA p53 zachodząca z kodonu AUG2, może przebiegać w sposób kap-zależny, jak i IRES-zależny (Gorska et al., 2013a). Jak dotąd, sposób przebiegu inicjacji translacji z kodonu AUG3 nie został określony. W celu określenia, czy inicjacja translacji z kodonu AUG3 zachodzi w sposób zależny od struktury 5' kap, przeprowadziłam badanie przebiegu translacji *in vitro* w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m^7GpppG .

Badanie przeprowadziłam z wykorzystaniem mRNA $\Delta 133p53$ w RRL wraz z metioniną znakowaną izotopem siarki [^{35}S]-Met. Do próbek dodany został analog kapu w stężeniach od 5 do 750 μM . Próbę kontrolną stanowiła reakcja, do której nie dodano analogu kapu (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale 5.4.3.1.). Produkty po reakcji były rozdzielane elektroforetycznie w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakrylamidowego z dodatkiem 0,1% SDS, natomiast identyfikacja produktów translacji odbyła się na drodze autoradiografii.



Rysunek 57. Analiza efektywności translacji mRNA $\Delta 133p53$ zachodzącej z kodonu AUG3 w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m^7GpppG . Autoradiogram przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów po reakcji translacji *in vitro*, przeprowadzony w warunkach denaturujących, w 15% warstwie rozdzielającej żelu poliakryloamidowego z dodatkiem 0,1% SDS (szczegółowy opis metody znajduje się w rozdziale. 5.3.3.). Wykres prezentuje średnią efektywność translacji wyliczoną wraz z odchyleniem standardowym, z trzech niezależnych eksperymentów.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że efektywność translacji *in vitro* zachodzącej z kodonu AUG3 wzrasta wraz ze wzrostem stężenia analogu kapu w zakresie od 5 do 300 μM (Rys. 57). Natomiast przy wyższych stężeniach analogu intensywność prążka obecnego na autoradiogramie ulega zmniejszeniu.

Przebieg translacji *in vitro* zobrazowany jest na wykresie wygenerowanym w oparciu o dane uzyskane z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. Przy stężeniu analogu kapu 50 μM obserwowana jest maksymalna wydajność translacji, która przekracza 160% wartości początkowej. Najniższą wydajność translacji obserwowano przy stężeniu analogu 750 μM i wynosi ona około 50% (Rys. 57). Powyższe obserwacje sugerują kap-niezależny charakter inicjacji translacji *in vitro* zachodzącej z kodonu AUG3, przebiegającej prawdopodobnie z udziałem elementu IRES.

3.3.5. Dyskusja

Celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$. Model struktury tego regionu otrzymany został na podstawie badań mapowania strukturalnego metodą SHAPE oraz z wykorzystaniem metody cięcia RNA w obecności jonów Pb^{2+} . Poprzez wprowadzenie otrzymanych rezultatów do oprogramowania *RNAstructure 5.6* wygenerowany został model struktury drugorzędowej. Badania te są niezwykle istotne, ponieważ struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ nie została wcześniej określona.

W zaproponowanym modelu struktury drugorzędowej regionu niekodującego 5' mRNA $\Delta 133p53$ można wyróżnić kilka potencjalnie istotnych elementów strukturalnych (Rys. 54). Są to motywy: typu spinki obejmującej pozycje nukleotydowe G19–C49, odcinek jednoniciowy pomiędzy pozycjami A83 i A100, rozwidlony motyw struktury drugorzędowej typu ramię-pętla, obejmujący pozycje nukleotydowe od A103 do U204. Przeprowadzona analiza stopnia zdeterminowania strukturalnego wykazała, iż powyższe motywy cechują się wysoką zachowawczością (Rys. 55). Można zatem wnioskować, iż jest duże prawdopodobieństwo występowania powyższych motywów strukturalnych w takiej aranżacji w warunkach *in vitro*, co może przekładać się także na warunki komórkowe (Gorska et al., 2013a).

Dodatkowo, motywy strukturalne występujące w regionach jednoniciowych zaproponowanej struktury drugorzędowej mogą stanowić miejsca oddziaływania z białkami RBP (Wilkie et al., 2003; Ray et al., 2013). Białka te mogłyby wiązać się do mRNA oraz uczestniczyć w regulacji syntezy białek $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$. Jednym z ciekawszych motywów sekwencyjnych zlokalizowanych w regionie terminalnym 5' mRNA $\Delta 133p53$ jest odcinek bogaty w reszty pirymidynowe C oraz U. Reszty te, w pozycjach: C74–U77, C226–C230, oraz U243–C246, zlokalizowane są w niesparowanych regionach struktury drugorzędowej (Rys. 53). Mogą one być rozpoznawane przez białko PTB (ang. *polypyrimidine tract binding protein*) (Ray et al., 2013). Białko to uczestniczy w regulacji procesu obróbki posttranskrypcyjnej – wycinania intronów, jak również może stymulować translację

zależną od IRES (Brunel et al., 1996; Sawicka et al., 2008). Co niezwykle interesujące, odkrycia Grover i współpracowników wykazały, że białko PTB wiąże się do regionu terminalnego 5' mRNA p53, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Szczególnie duże powinowactwo PTB wykazuje względem sekwencji nukleotydowej poniżej kodonu AUG1 (Grover et al., 2008). To sugeruje, iż białko PTB może wiązać się też do regionu terminalnego 5' mRNA kolejnych izoform białka p53 – $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$.

W regionie terminalnym 5' mRNA $\Delta 133p53$ znajdują się także odcinki jednoniciowe bogate w reszty cytydyny (Rys. 53). Zlokalizowane są w pozycjach C262–C264, C268–C270 oraz C333–C336. Mogą one stanowić potencjalne miejsce wiązania białka PCBP (ang. *poly(C)-binding protein*). Białko to jest odpowiedzialne za stabilizację mRNA oraz regulację translacji (Choi et al., 2009). Dodatkowo w regionie niekodującym mRNA znajduje się też odcinek wielokrotnego powtórzenia reszty adenozyiny, w pozycjach A83–A100, co może być potencjalnym miejscem oddziaływania z białkiem PABP (ang. *poly(A)-binding protein*), uczestniczącym w procesie poliadenylacji mRNA (Kuhn & Wahle 2004). Pomimo, iż PABP wiąże się głównie do regionu terminalnego 3', wykazano, że może także wiązać się do elementów występujących w regionie 5'UTR (Wu & Bag 1998; Kulkarni et al., 2011). Przykładem jest wiązanie się PABP do 5'UTR mRNA insuliny (Kulkarni et al., 2011). Ponadto, PABP1 reguluje swoją własną syntezę poprzez wiązanie się do odcinka bogatego w reszty adenozyiny w 5'UTR mRNA (Wu & Bag 1998). To potwierdza, że białko PABP potencjalnie może oddziaływać z 5'UTR mRNA $\Delta 133p53$.

Analiza efektywności syntezy białek $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$ wykazała, że inicjacja translacji w warunkach *in vitro* zachodzi wyłącznie z kodonu AUG3 (Rys. 56). Przyczyną braku produktu białkowego syntetyzowanego z kodonu AUG4 mogą być ograniczenia związane z translacją *in vitro* przeprowadzaną w RRL. System ten ma uproszczony skład i pozbawiony jest wielu białek komórkowych. Możliwe, iż do syntezy izoformy $\Delta 160p53$ wymagane są dodatkowe czynniki białkowe ułatwiające zachodzenie tego procesu, nieobecne podczas syntezy w warunkach *in vitro*.

Co ciekawe, opublikowane niedawno wyniki doświadczeń przeprowadzonych w liniach komórkowych wykazały, iż translacja zachodzi zarówno z kodonu AUG3 jak i AUG4. Możliwa była identyfikacja obydwu białek za pomocą metody Western blot, choć

ich poziom jest bardzo niski (Marcel et al., 2013; Gadea et al., 2016). Jednakże, są to nieliczne badania, w których wykazano występowanie izoform na poziomie komórkowym. Głównym czynnikiem limitującym identyfikację endogennych izoform $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$ jest ich niski poziom w komórce, a także brak handlowo dostępnych przeciwciał wykorzystywanych w metodzie Western blot. Co więcej, detekcja izoform dostępnymi przeciwciałami także może być zaburzona przez modyfikacje potranslacyjne w miejscu epitopu rozpoznawanego przez przeciwciało. Przykładem jest obniżenie wiązania przeciwciała DO-1 w wyniku fosforylacji reszty serynowej w pozycji 20 białka p53, co w konsekwencji uniemożliwia identyfikację białka p53 pełnej długości z wykorzystaniem tego przeciwciała (Webley et al., 2000).

W kolejnym etapie zbadano przebieg inicjacji translacji *in vitro* izoformy $\Delta 133p53$, w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m^7GpppG (Rys. 57). Spadek efektywności translacji nastąpił dopiero przy stężeniu analogu $500 \mu M$. Biorąc pod uwagę to, że przy niższych stężeniach analogu obserwowana jest wzmożona synteza izoformy $\Delta 133p53$, sugeruje to inicjację translacji zależną od IRES. Podobną zależność pomiędzy stężeniem analogu kapu, a syntezą białka obserwowano dla izoformy $\Delta 40p53$ (Gorska et al., 2013a, Rys. 45). Przy niskim stężeniu analogu kapu translacja $\Delta 40p53$ była wzmożona, natomiast spadek nastąpił przy stężeniu powyżej $250 \mu M$. Zarówno przedstawione w niniejszej pracy wyniki jak i dane literaturowe sugerują IRES-zależny mechanizm inicjacji translacji izoformy $\Delta 40p53$ (Candeias et al., 2008; Gorska et al., 2013a).

Co więcej, obserwowano, że wzmożona synteza białka $\Delta 133p53$ jest silnie zależna od obecności warunków stresowych w komórce (Arsic et al., 2015; Ji et al., 2015). Jest to zgodne z danymi literaturowymi na temat elementów IRES, gdyż translacja IRES-zależna aktywowana jest w komórkach głównie w warunkach stresowych (Leppek et al., 2018).

Aktywność komórkowych elementów IRES może także zależeć od białek, które służą jako czynniki ITAF. Ostatnie badania wykazały, że czynniki białkowe mogą odgrywać ważną rolę w ekspresji *TP53*, działając jako ITAF (Grover et al., 2008; Swiatkowska et al., 2015). Przykładami takich białek są PTB, HDM2 oraz RPL26 (Candeias et al., 2008; Grover et al., 2008; Khan et al., 2013). Aktywują one syntezę białka

p53 pełnej długości poprzez oddziaływanie z elementem IRES, szczególnie w warunkach stresowych. Przedstawione przeze mnie wyniki mapowania strukturalnego regionu terminalnego 5' mRNA $\Delta 133p53$ umożliwiły wygenerowanie pierwszego modelu strukturalnego tego regionu. Model ten stanowi podstawę do dalszych badań nad poszukiwaniem czynników ITAF promujących IRES-zależną inicjację translacji izoform $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$.

4. Podsumowanie

Przedstawione przeze mnie wyniki badań wskazują na niezwykle ważną rolę regionów terminalnych 5' mRNA w procesie translacji. Przeprowadzone analizy efektywności syntezy białek p53 i $\Delta 40p53$, zarówno w warunkach *in vitro* jak i w liniach komórkowych, wykazały, że zaburzenie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 obniża efektywność syntezy tych białek, w szczególności w warunkach stresowych. Dodatkowo analizy wykazują, że ustrukturyzowanie tego regionu mRNA wpływa bardzo istotnie na wydajność inicjacji translacji. Zaburzenie struktury drugorzędowej w obrębie regionu niekodującego 5' mRNA może zmieniać sposób skanowania tego regionu przez rybosomalny kompleks inicjacyjny. Rearanżacje strukturalne wprowadzone w elementach typu spinki do włosów, obecnych w tym regionie, mają duży wpływ także na inicjację translacji zachodzącą z udziałem elementu IRES. Co więcej, można przypuszczać, że mogą również zmieniać powinowactwo wiążących się białek, w tym czynników ITAF. Przeprowadzone przeze mnie badania potwierdziły, że określenie struktury drugorzędowej regionu niekodującego 5' mRNA p53 jest niezbędne dla bliższego poznania mechanizmu inicjacji translacji i efektywności syntezy białka p53 i jego izoform, co w dalszym etapie pozwoli na bliższe poznanie ich funkcji w komórce.

Rola elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie translacji analizowana za pomocą oligonukleotydów antysensowych

Przeprowadzona została analiza efektywności syntezy białek p53 oraz $\Delta 40p53$ w liniach komórkowych MFC-7, HT-29 i HepG2 w warunkach stresu komórkowego. Wykorzystane zostały oligonukleotydy antysensowe przyłączające się do istotnych elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 takich jak: spinka U180–A218 oraz fragment jednoniciowy A219–U228. Zastosowanie oligomerów spowodowało znaczne zmiany strukturalne tego regionu mRNA, co zostało potwierdzone eksperymentalnie za pomocą badań mapowania strukturalnego RNA (Rys. 18 i 19). W konsekwencji hybrydyzacji oligonukleotydów i zaburzenia struktury drugorzędowej

regionu terminalnego 5' mRNA, efektywności syntezy p53 oraz $\Delta 40p53$ uległa istotnej zmianie, w szczególności w warunkach stresowych. Analizy Western blot wykazały, że zastosowanie oligonukleotydów antysensowych znacznie obniżyło efektywność translacji izoformy $\Delta 40p53$ w komórkach HT-29, w warunkach stresowych, co prawdopodobnie jest spowodowane zahamowaniem inicjacji translacji przebiegającej z udziałem elementu IRES (Rys. 22). Dodatkowo zastosowane oligomery wywołały obniżenie wydajności syntezy białka p53 w komórkach MCF-7, spowodowane przez zaburzenie struktury drugorzędowej w obrębie regionu U180–U228, co było obserwowane pod wpływem stresu komórkowego (Rys. 24). Co ciekawe, zastosowane oligomery w linii komórkowej HepG2 pod wpływem stresu spowodowały wzrost syntezy izoformy $\Delta 40p53$, co jest dowodem na rozplecane struktury drugorzędowej w obrębie spinki U180–A218 i ułatwienie przebiegu translacji według mechanizmu zależnego od elementu IRES (Rys. 26 i 27).

Badania z zastosowaniem oligonukleotydów antysensowych wykazały, że elementy strukturalne regionu terminalnego 5' mRNA p53: spinka U180–A218 oraz fragment jednoniciowy A219–U228 pełnią istotną rolę w procesie syntezy białka p53 oraz izoformy $\Delta 40p53$, zwłaszcza w warunkach translacji przebiegającej z udziałem elementu IRES. Obydwa motywy strukturalne mogą pełnić rolę elementów *cis*, umożliwiających przyłączenie się białek pełniących funkcję czynników ITAF i przebieg translacji według mechanizmu niezależnego od kapu na końcu 5' mRNA.

Wpływ wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 na proces skanowania mRNA przez rybosom i efektywność translacji

Celem kolejnych badań realizowanych w ramach mojej pracy doktorskiej było określenie zależności między szybkością skanowania mRNA przez kompleks rybosomalny a strukturą drugorzędową regionu terminalnego 5', długością tego regionu oraz kontekstem strukturalnym w obrębie kodonu inicjacyjnego AUG. Przeprowadzone zostały pomiary szybkości inicjacji translacji, a także efektywności translacji z wykorzystaniem systemu genu reporterowego lucyferazy *Renilla*. Analizom zostały poddane warianty sekwencyjne mRNA p53 posiadające istotne różnice w obrębie regionu

terminalnego 5' mRNA (Rys. 32, 33, 34, 35). Wyniki przeprowadzonych pomiarów czasu skanowania mRNA przez rybosomalny kompleks inicjacyjny potwierdziły, iż dla niektórych wariantów czas skanowania regionu terminalnego 5' mRNA jest proporcjonalny do długości tego regionu (Rys. 41). Co ważne, dobranie w pary wariantów różniących się jedynie obecnością 113-nukleotydowego regionu P0-P1, umożliwiło zilustrowanie wpływu wydłużenia regionu terminalnego 5' na opóźnienie skanowania mRNA przez kompleks rybosomalny (Rys. 50). Jednakże, co niezwykle istotne, wykazano także, że skanowanie regionu terminalnego 5' mRNA zależy również od struktury drugorzędowej w jego obrębie. Wykazałam bowiem, iż ta sama 113-nukleotydowa sekwencja, lecz zwijająca się w odmienną strukturę drugorzędową, może być skanowana z różną szybkością: 1,4 nt/s, 3 nt/s lub 6,6 nt/s (Rys. 41, 42, Tab. 3, 4). Co więcej, kolejne analizy ujawniły, że czas skanowania mRNA przez rybosom silnie zależy od kontekstu strukturalnego, w jakim znajduje się kodon inicjacyjny AUG. Czas skanowania dla konstruktów mRNA, w którym kodon AUG znajduje się w regionie jednoniciowym był istotnie krótszy i wynosił 7 min i 35 s, natomiast dla konstruktów z kodonem umiejscowionym w strukturze dwuniciowej wynosił on 8 min (Rys. 42, Tab. 4). Jednoniciowa struktura w obrębie kodonu inicjacyjnego AUG sprawia, że region jest bardziej dostępny dla rybosomu i także efektywność translacji ulega znacznemu zwiększeniu.

Dodatkowo przeprowadzone zostały analizy efektywności translacji *in vitro* przygotowanych wariantów. Zaobserwowano, iż efektywność translacji znacznie różni się pomiędzy poszczególnymi wariantami i silnie zależy od regionu terminalnego 5' mRNA (Rys. 36, 37 i 38). Dla wariantu o regionie najkrótszym efektywność translacji była około 10-krotnie wyższa niż dla wariantu z najdłuższym regionem niekodującym 5' (Rys. 37 i 38). Dla wariantu, którego kodon inicjacyjny AUG znajduje się w jednoniciowej strukturze efektywność była znacznie wyższa i wynosiła ponad 210% efektywności wyznaczonej dla wariantu wyjściowego, natomiast dla konstruktów z kodonem AUG w dwuniciowej strukturze wynosiła ona zaledwie 20% (Rys. 36).

Ponadto usunięcie istotnych elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53, spinek G56–C169 oraz U180–A218, istotnie wpłynęło nie tylko na efektywność translacji oraz czas skanowania, lecz także na przebieg inicjacji translacji.

Obydwie zmiany spowodowały zahamowanie IRES zależnej inicjacji translacji (Rys. 46). To oznacza, iż obydwa elementy strukturalne są niezbędne do prawidłowego przebiegu translacji według mechanizmu niezależnego od kapu.

Badania szybkości skanowania mRNA przez rybosom przeprowadzone z wykorzystaniem modelowych wariantów regionu terminalnego 5' mRNA potwierdziły jak ważną rolę w procesie inicjacji translacji pełni struktura drugorzędowa. Wszelkie zmiany strukturalne wprowadzone w tym regionie skutkowały znaczną różnicą czasu skanowania mRNA przez rybosomalny kompleks inicjacyjny (Rys. 50) oraz zmianami w efektywności translacji.

Badanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA Δ 133p53 oraz efektywności translacji zachodzącej z kodonów AUG3 i AUG4

W kolejnym etapie moich badań, określiłam strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA Δ 133p53. Przeprowadzone zostały analizy mapowania struktury drugorzędowej tego regionu z wykorzystaniem metody SHAPE oraz cięcia mRNA w obecności jonów ołowiu (II) (Rys. 52 i 53). Wyniki badań eksperymentalnych zostały wprowadzone do programu komputerowego *RNAstructure 5.6* i wygenerowany został prawdopodobny model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA Δ 133p53 (Rys. 54).

Przeprowadzona została także translacja mRNA Δ 133p53 w warunkach *in vitro* w lizacie z retikulocytów króliczych. Nieoczekiwanie po przeprowadzonej reakcji obserwowany był jeden produkt białkowy, pomimo występowania w mRNA dwóch kodonów inicjacyjnych – AUG3 oraz AUG4 (Rys. 56). W celu określenia, który kodon bierze udział w translacji, kodon AUG3 dla Δ 133p53 oraz AUG4 dla Δ 160p53 zostały kolejno poddane ukierunkowanej mutagenzie. Eksperyment pokazał, że wiodącym kodonem start, z którego zachodzi translacja w warunkach *in vitro* jest kodon inicjacyjny AUG3 dla izoformy Δ 133p53.

Wykonano również analizę przebiegu inicjacji translacji *in vitro* izoformy Δ 133p53 w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m⁷GpppG. Co interesujące, wyniki sugerują, iż synteza Δ 133p53 nie ulega silnej inhibicji po dodaniu analogu kapu (Rys. 57).

Spadek efektywności translacji następował dopiero w wysokich stężeniach analogu kapu, powyżej 500 μM . Sugeruje to, że w regionie terminalnym 5' mRNA $\Delta 133\text{p}53$ może znajdować się element IRES, dzięki któremu inicjacja translacji z kodonu AUG3 może zachodzić w sposób niezależny od struktury kapu na końcu 5' mRNA.

5. Materiały i metody

5.1. Aparatura

Zestaw do elektroforezy płytowej S2 – Life Technologies

Zestaw do elektroforezy płytowej S2001 – Life Technologies

Mały zestaw do elektroforezy płytowej

Zestaw do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra Cell – Bio-Rad

Zasilacz E833 – Consort

Zasilacz E863 – Consort

Termocykler UNO II – Biometra

Termocykler T-professional – Biometra

pH-metr Accumet BASIC – Fisher Scientific

Wirówka 5804R – Eppendorf

Wirówka 5415D – Eppendorf

Wirówka 5702 – Eppendorf

Wirówka próżniowa N 840.3 – Labort

Cieplarka do hodowli bakterii – Memmert

Spektrofotometr UV/VIS NanoDrop – Thermo Scientific

Licznik scyntylicyjny Microplate Counter 2450 – Perkin Elmer

Zestaw do wizualizacji żeli UVP2000

Skaner radioaktywności FLA-5100 – Fuji Film

Suszarka do żeli Gel Dryer 583 – Bio-Rad

Pompa próżniowa – Laboport

Komora laminarna aura mini – BioAir

Komora laminarna Steril-Bio BAN Compact – Angelantoni Lifescience

Inkubator do hodowli komórkowych – Memmert

Multilabel Reader VICTOR X4 – Perkin Elmer

Aparat do półsuchego transferu białek TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL – Bio-Rad

5.2. Odczynniki i materiały

Odczynniki pochodziły z firm Sigma Aldrich, Lab Empire, Invitrogen, Serva, Fluka lub Bio-Rad. Analogi kapu ARCA (ang. *anti-reverse cap analog*) oraz trimetylowany analog kapu m7G(5')ppp(5')G zakupiono w firmach New England Biolabs i Tebubio. Analog kapu ApppG otrzymano dzięki uprzejmości prof. dr hab. E. Darżynkiewicza z Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego. Odczynnik do detekcji kwasów nukleinowych w żelach agarozowych Simply Safe został zakupiony w firmie EURx. Substrat dla enzymu Lucyferazy *Renilla* – Coelenterazine pochodził z firmy Promega.

5.2.1. Związki promieniotwórcze

[γ ³²P] ATP (4000-5000 Ci/mmol) oraz L-[S³⁵] metionina (1000 Ci/mmol) – Hartmann Analytic

5.2.2. Enzymy

Enzymy restrykcyjne: XbaI, NotI, BamHI, SalI, BsaAI, Csp 45I, XhoI i DpnI, polimerazy DNA Taq i *Pfu*, kinaza polinukleotydomowa T4, inhibitor rybonukleaz RNasin – Thermo Scientific, rybonukleaza H– Promega, rybonukleaza A – Sigma Aldrich i Promega, polimeraza poli(A) – Epicentre Biotechnologies.

5.2.3. Zestawy odczynników

- Zestaw do transkrypcji *in vitro* Ampli Scribe™ T7, oraz SP6 High Yield Transcription Kit– Epicentre Biotechnologies
- Zestaw do transkrypcji *in vitro* TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit – Thermo Scientific
- Zestaw do transkrypcji *in vitro* MAXIscript SP6 Transcription Kit – Ambion
- Zestawy do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakterii – Qiagen oraz Bio Basic

- Zestaw do odwrotnej transkrypcji Super Script III i Super Script IV – Invitrogen
- Lizat z retikulocytów królika, trawiony mikrokokalną nukleazą – Promega
- Zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych i PCR – Gene MATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit – EURX
- Zestaw do oczyszczania RNA po transkrypcji *in vitro*– GeneJET RNA Purification Kit– Thermo Scientific
- Zestaw do oczyszczania RNA po transkrypcji *in vitro* RNA Clean-Up and Concentration Kit – Norgen BIOTEK CORP.
- Zestaw do mutagenезy Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit – Agilent
- Zestaw do pomiaru aktywności lucyferazy *Firefly* i *Renilla* Dual Luciferase Reporter Assay System – Promega
- Odczynnik do izolacji kwasów nukleinowych TRI Reagent – Molecular Research Centre, Inc.
- Odczynnik do transfekcji komórek Lipofectamine RNAi Max – Invitrogen
- Odczynnik do transfekcji komórek Lipofectamine 2000 – Invitrogen
- Zestaw do detekcji chemiluminescencji w metodzie Western blot – ECL Western Blotting Substrate – Pierce

5.2.4. Odczynniki do hodowli komórek ludzkich

- PBS 1x pH 7,4 bez jonów wapnia i magnezu – BioShop
- Medium do hodowli DMEM z wysoką zawartością glukozy – Sigma
- Medium do hodowli McCoy's – Sigma
- Medium do hodowli MEM – Sigma
- Medium do transfekcji OPTIMEM – Gibco
- Medium do hodowli RPMI 1640 – Sigma
- Witaminy MEM – Gibco
- Mieszanina antybiotyków Antibiotic/Antimycotic Solution 100x – Sigma
- Mieszanina aminokwasów endogennych Non-Essential Amino Acids – Gibco
- Trypsyna z EDTA 10x – PAA
- Bydlęca surowica płodowa Fetal Bovine Serum (FBS) – Sigma

– Medium do zamrażania komórek Recovery Cell Culture Freezing Medium – Gibco

5.2.5. Oligonukleotydy

Wszystkie startery DNA użyte w toku wykonywania pracy doktorskiej zostały zsyntetyzowane w firmie Genomed. Oligonukleotydy antysensowe 2'-*O*-metylowane zostały zakupione w firmie Future Synthesis. 2'-*O*-metylowany oligomer nr 7b został zsyntetyzowany w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN pod kierownictwem prof. dr hab. R. Kierzka. Oligonukleotyd nr 7 znakowany barwnikiem fluorescencyjnym FAM został zakupiony w firmie Future Synthesis.

5.2.6. Plazmidy

Plazmid pRL-CMV – Promega

Plazmid pOTB7 *TP53* – Transomic

5.2.7. Szczepy bakteryjne

E. coli DH5 α – Invitrogen

One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* – Invitrogen

5.2.8. Linie komórkowe

– Komórki raka piersi MCF-7 – pochodzące z The European Collection of Authenticated Cell Cultures, dostarczone dzięki uprzejmości prof. dr hab. J. W. Krzyżosiaka z Zakładu Biomedycyny Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

– Komórki raka jelita grubego HT-29 – pochodzące z The European Collection of Authenticated Cell Cultures, dostarczone dzięki uprzejmości dr M. Świątkowskiej z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi,

–Komórki raka wątroby HepG2 – zostały zakupione w The European Collection of Authenticated Cell Cultures

5.2.9. Przeciwciała

–I-rzędowe przeciwciało PAB1801przeciwno p53 – sc-98 Santa Cruz

–I-rzędowe przeciwciało A3 przeciwno dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego GAPDH Santa Cruz

–I-rzędowe przeciwciało DO-1 przeciwno p53 – sc-126 Santa Cruz

–I-rzędowe przeciwciało SMP14 przeciwno HDM2 – sc-965 Santa Cruz

–I-rzędowe przeciwciało TU-02 przeciwno α tubulinie – sc-8035 Santa Cruz

–I-rzędowe przeciwciało Anti-Renilla Luciferase antibody przeciwno lucyferazie *Renilla* – ab187338 Abcam

– II-rzędowe mysie przeciwciało IgG z kozy skoniugowane z peroksydazą chrzanową – Pierce

5.2.10. Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek

– Marker do oznaczania masy białek w żelach denaturujących z SDS – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder

– Marker do analizy wielkości fragmentów DNA w żelach agarozowych Gene Ruler DNA Ladder Mix – Thermo Scientific

5.2.11. Bufory, roztwory i pożywki

Bufor elektroforetyczny 1x TBE

100 mM Tris, 100 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,3

Bufor elektroforetyczny 1x TAE

40 mM Tris-kwas octowy, 1 mM EDTA, pH 8,0

Bufor do elektroforezy białek w warunkach denaturujących „10x Running buffer”

25 mM Tris-HCl pH 8,3, 190 mM glicyna, 0,1% SDS

Bufor do żelu poliakryloamidowego zagęszczającego do elektroforezy białek

125 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 6,8

Bufor do żelu poliakryloamidowego rozdzielającego do elektroforezy białek

375 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 8,8

Roztwór do dehydratacji żeli poliakryloamidowych do elektroforezy białek – roztwór „fixing”

50% metanol, 10% lodowaty kwas octowy

Roztwór do płukania żeli poliakryloamidowych do elektroforezy białek

7% metanol, 7% lodowaty kwas octowy, 1% glicerol

40% roztwór żelu poliakryloamidowego 29:1 (w/w)

38,66 g akrylamidu, 1,33 g bisakrylamidu, H₂O do 100 ml

30% roztwór żelu poliakryloamidowego do elektroforezy białek 37,5:1 (w/w)

150 g akrylamidu, 4 g bisakrylamidu, H₂O do 100 ml

Bufor „stop”

7 M mocznik, 20 mM EDTA, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol

1x bufor do transferu białek

47,9 mM Tris Base pH 9,2, 38,9 mM glicyna, 0,038% SDS, 20% metanol

10x TBS

200 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl

Bufor Laemmli

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy

Roztwór do denaturacji i obciążania próbek białkowych, SSB (ang. *SDS sample buffer*)

50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM DTT, 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy

Roztwory obciążające próbki zawierające RNA lub DNA

– Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących: 7 M mocznik, 20 mM EDTA, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol

– Elektroforeza DNA w żelu agarozowym: 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% glicerol, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol, 60 mM EDTA

– Elektroforeza RNA w żelu agarozowym– roztwór RSB (ang. *RNA sample buffer*): 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% glicerol, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy

Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

300 mM octan sodu pH 5,2, 0,1 mM EDTA

10x bufor „*Reconstitution*” do identyfikacji „odcisku palca” w RRL

200 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM octan magnezu, 10 mM DTT, 100 mM KCl

Pożywki do hodowli bakteryjnych

Pożywka stała LB

5 g peptonu, 2,5 g ekstraktu drożdżowego, 2,5 g NaCl, 7,5 g agaru, 1 ml 1 M NaOH, H₂O do 500 ml

Pożywka płynna LB

5 g peptonu, 2,5 g ekstraktu drożdżowego, 2,5 g NaCl, 1 ml 1 M NaOH, H₂O do 500 ml

Antybiotyki

Ampicylina 100 mg/ml H₂O

Stężenie końcowe antybiotyku w pożywce do hodowli bakteryjnej wynosiło 100 µg/ml pożywki.

Chloramfenikol 20 mg/ml H₂O

Stężenie końcowe antybiotyku w pożywce do hodowli bakteryjnej wynosiło 25 µg/ml pożywki.

5.3. Metody standardowe

5.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę wykorzystywano do analizy produktów cDNA otrzymanych w reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanymi starterami, a także do oczyszczania oligomerów DNA po syntezie chemicznej. Stosowano żel poliakryloamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akryloamidu do bisakryloamidu) z 7 M mocznikiem oraz bufor elektroforetyczny 1x TBE. Procentowość żelu wynosiła 8%. Próbkę obciążano roztworem 7 M mocznika z barwnikami elektroforetycznymi w stosunku 1:1. Każdą elektroforezę poprzedzała preelektroforeza prowadzona przy natężeniu prądu 10 mA, aż do ustalenia parametrów prądowych. Podczas rozdzielania elektroforetycznego stosowano natężenie prądu 20 mA (żel 20x20 cm) lub 40 mA (żel 30x40 cm). Do wizualizacji wyników wykorzystywano: autoradiografię po znakowaniu

radioizotopowym, wygaszanie światła UV po oczyszczeniu oligomerów DNA po syntezie chemicznej, ekrany odwzorowujące po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanym starterem DNA.

5.3.2. Elektroforeza cząsteczek DNA i RNA w żelu agarozowym

Elektroforezę DNA w żelu agarozowym stosowano do analizy fragmentów otrzymanych metodą PCR, a także do sprawdzania poszczególnych etapów konstrukcji wektorów, oraz efektywności ich trawienia enzymami restrykcyjnymi. W zależności od długości rozdzielanych fragmentów stosowano 1–2% (w/v) żel agarozowy z bromkiem etydyny (0,1 µg/ml), a jako bufor elektroforetyczny stosowano 1x TBE. Próbki DNA obciążano roztworem do obciążania próbek DNA, w stosunku 6:1. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej przy stałym natężeniu prądu 60 mA. DNA obserwowano w świetle UV.

Elektroforezę RNA w żelu agarozowym stosowano do analizy jakościowej modelowych mRNA, otrzymanych metodą transkrypcji *in vitro*. Stosowano 1% (w/v) żel agarozowy i bufor elektroforetyczny 1x TAE. Próbki obciążano roztworem RSB, w stosunku 10:1 z dodatkiem bromku etydyny (50 µg/ml). Jako czynnik denaturujący stosowano dejonizowany formamid, którego końcowe stężenie wynosiło 60%. Przed nałożeniem materiału do kieszonek w żelu, przeprowadzano denaturację próbek przez 5 minut w temperaturze 95°C, po czym przenoszono je na 10 minut do lodu. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4°C przy stałym natężeniu prądu 40 mA. RNA obserwowano w świetle UV.

5.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę stosowano do rozdzielania produktów po translacji *in vitro* oraz lizatu białkowego z komórek MCF-7, HT-29 i HepG2 transfekowanych oligonukleotydami antysensowymi. Żel białkowy składał się z dwóch warstw różniących się procentowością i wartością pH. Stosowano 5% żel zagęszczający pH 6,8 i 15% żel rozdzielający pH 8,8, przy czym obydwa zawierały 0,1% SDS jako czynnik denaturujący. Przed elektroforezą,

próbki obciążano 25 μ l roztworu SSB i denaturowano 3 minuty w 95°C. Próbkę zwirowano, pobierano 5 μ l i nakładano bezpośrednio do kieszonek w żelu. Natężenie prądu podczas migracji białek w warstwie żelu zagęszczającego wynosiło 15 mA, a w warstwie żelu rozdzielającego 30 mA.

Żele zawierające produkty białkowe otrzymane w reakcji translacji *in vitro*, zawierające wbudowaną L-[S³⁵] metioninę, umieszczano na 30 minut w roztworze „fixing” z jednoczesnym delikatnym mieszaniem. Następnie, żel przenoszono do roztworu zawierającego 7% metanol, 7% lodowaty kwas octowy, 1% glicerol i inkubowano 5 minut. Tak przygotowane żele przenoszono na bibułę Whatman 3 MM i suszono 45 minut w temperaturze 65°C. Wyniki elektroforezy wizualizowano z wykorzystaniem ekranów odwzorowujących (Fuji Film).

5.3.4. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

Po elektroforezie prążki odpowiadające oligomerom DNA wizualizowano w świetle UV. Wycięte pasma żelu inkubowano w buforze do elucji przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z okresowym wytrząsaniem, wynoszącym 850 rpm.

5.3.5. Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu

Oligomery DNA, fragmenty DNA, cDNA oraz RNA strącano w obecności 300 mM octanu sodu pH 5,2 dodając 3 objętości 96% etanolu. Próbkę strącano przez 10 minut w suchym lodzie lub w temperaturze -20°C przez noc. Cząsteczki RNA wytrącano w obecności glikogenu, którego końcowe stężenie wynosiło 20 μ g/ml. Po strącaniu, próbki wirowano przez 25 minut przy 14000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant usuwano, a osad suszono i rozpuszczano w sterylnej wodzie.

Stężenie kwasu nukleinowego w próbce oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali $\lambda = 260$ nm, z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop. Stosowano następujące przeliczniki: ssRNA: $1A_{260}/\text{ml} = 33\mu\text{g}/\text{ml}$, ssDNA: $1A_{260}/\text{ml} = 33\mu\text{g}/\text{ml}$, dsDNA: $1A_{260}/\text{ml} = 50\mu\text{g}/\text{ml}$.

5.3.6. Ekstrakcja fenolem

Procedurę wykorzystywano do oczyszczania produktów reakcji PCR, wektorów DNA po reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi, a także do izolacji RNA z RRL po reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji tzw. metodą „odcisku palca”. Próbkę zawierającą DNA lub RNA wytrząsano 2 minuty z jedną objętością fenolu (nasyconego buforem TE, pH 8,0 dla DNA i pH 4,5 dla RNA) w temperaturze pokojowej i wirowano 1 minutę przy 10000 rpm w celu oddzielenia faz. Następnie, aby usunąć resztki fenolu, do zebranej fazy wodnej dodawano jedną objętość mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy w stosunku 24:1 (v/v) i wytrząsano 1 minutę w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 1 minutę przy 10000 rpm, zbierano fazę wodną i wytrącano osad.

5.3.7. Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ^{32}P

Mieszanina reakcyjna zawierała 10–20 pmoli RNA z wolną grupą hydroksylową na końcu 5' lub 100 pmoli oligomeru DNA, 2 μl [γ - ^{32}P] ATP o aktywności 4000-5000 Ci/mmol, bufor reakcyjny (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0,1 mM spermidyna) oraz 10 U T4 kinazy polinukleotydowej. Przed reakcją przeprowadzano denaturację RNA przez 2 minuty w temperaturze 100°C, a następnie próbkę schładzano przez 10 minut w lodzie. Po dodaniu enzymu reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C. Znakowane oligomery DNA (Tab. 7) oczyszczano w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, wizualizowano przez autoradiografię, wycinano z żelu, eluowano, strącano, wirowano i suszono. Natomiast znakowane cząsteczki RNA oczyszczano z wykorzystaniem zestawu RNeasy Min Elute Cleanup Kit firmy Qiagen lub Clean-Up and Concentration Kit firmy Norgen. Poziom radioaktywności wyznakowanych cząsteczek mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego.

5.3.8. Izolacja RNA za pomocą odczynnika TriReagent

Odczynnik TriReagent stosowano do izolacji całkowitego RNA z komórek MCF-7 po transfekcji oligonukleotydami antysensowymi. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano

wodę do objętości 50 μ l oraz 300 μ l odczynnika TriReagent, natomiast komórki rosnące w monowarstwie zalewano bezpośrednio 300 μ l odczynnika TriReagent i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 60 μ l chloroformu, wytrząsano przez 15 sekund i ponownie inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy 12000 x g. Następnie do zebranej fazy wodnej dodawano 150 μ l izopropanolu i 0,5 μ l glikogenu i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu 10000 x g, w 4°C przez 10 minut z fazy wodnej wytrącano osad, który przemywano 50 μ l 75% etanolu i odwirowywano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 7500 x g. Wyszuszony osad rozpuszczano w wodzie.

5.3.9. Hodowla ludzkich komórek nowotworowych

Ludzkie komórki raka piersi MCF-7 hodowano w medium DMEM z wysoką zawartością glukozy 4,5 g/L, komórki raka jelita grubego HT-29 hodowane były w medium McCoy's, natomiast komórki raka wątroby HepG2 hodowane były w medium MEM. Do mediów dodawano mieszaninę aminokwasów endogennych, mieszaninę antybiotyków i antymykotyków zawierającą 100 U/ml penicyliny G, 0,1 mg/ml siarczanu streptomycyny i 0,25 mg/ml amfoterycyny B oraz bydlęcą surowicę płodową FBS, której końcowe stężenie wynosiło 10%. Do medium DMEM dodawano glutaminę do końcowego stężenia 2 mM. Natomiast medium RPMI uzupełniano o mieszaninę witamin. Hodowlę prowadzono w 37°C w 5% CO₂. Komórki pasażowano 2-3 razy w tygodniu w stosunku 1:2 lub 1:4. Hodowlę prowadzono maksymalnie do 20 pasażu.

5.4. Metody stosowane w badaniach własnych

5.4.1. Przygotowanie modelowych konstruktów dsDNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 człowieka

5.4.1.1. Otrzymywanie insertów dsDNA

Tabela 6. Lista starterów wykorzystanych do syntezy dsDNA.

Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa 5' – 3'	Nazwa cząsteczki syntetyzowanej
F(Δ 57)	GGCTAGAGCCACCGUCCAGGGAGCAGGTAGCTGCT GGGCTCCGGGGACACTTTGCGCTTCCACGAC	P1- Δ 40p53(Δ 57)
R(Δ 57)	CTCAGAGGGGCTCCTCCATGGCAGTGACCGGGAAG CGTGTCACCGTCGTGGAAAG	P1- Δ 40p53(Δ 57)
F(Δ 57)2	CTTCCACGACGGTGACACGCTTCCCGGTCCTGACC ATGGAGGAGCCCCTCTGAG	P1- Δ 40p53(Δ 57)
R(Δ 57)2	CATTGCTTGGGACGGCAAGGGGGACAGAACGTTGTTTTTCAGGA AGTAGTTTCCATAGGTCTGAAAATGTTTCTGACTCAGAGGGGGC	P1- Δ 40p53(Δ 57)
F(L)	GGCTGGGAGCGTGCTTAAGCCGACGGTGACACGCTT	P1- Δ 40p53(L)
R(L)	AAGCGTGTACCGTCGGCTTAAGCACGCTCCCAGCC	P1- Δ 40p53(L)
F(S)	CGTGCTTCCATGGCGGTGACACGCTTC	P1- Δ 40p53(S)
R(S)	AAGCGTGTACCGCCATGGAAAGCAG	P1- Δ 40p53(S)
F(gUG2)	TGCCGTCCCAAGCAGTGGATTTCGAAAGTT	P1- Δ 40p53(gUG2), P0- Δ 40p53(gUG2)
R(gUG2)	AACTTTTCGAATCCACTGCTTGGGACGGCAA	P1- Δ 40p53(gUG2), P0- Δ 40p53(gUG2)
F224A	CTTCCTGAAAACACGTTCTGTCC	P1- Δ 40p53(Δ A224)
R224A	GGACAGAACGTGTTTTTCAGGAAG	P1- Δ 40p53(Δ A224)
F Δ 133p53 (cua)	CCTGCCCTCAACAAGCTATTTTGCCAACTGGCC	Δ 133p53(cua)
R Δ 133p53 (cua)	GGCCAGTTGGCAAAATAGCTTGTGAGGGCAGG	Δ 133p53(cua)
F Δ 160p53 (cua)	GCGTCCGCGCCCTAGCCATCTACAAGCAG	Δ 160p53(cua)
R Δ 160p53 (cua)	CTGCTTGTAGATGGCTAGGGCGCGGACGC	Δ 160p53(cua)

Modelowe konstrukty dsDNA: P0-p53, P0-p53, P0- Δ 40p53, P1- Δ 40p53, p53-554 oraz Hp53-554 zostały otrzymane w Zakładzie Biochemii RNA przez dr Agnieszkę Górską.

Matrycę dsDNA dla konstruktu P1- Δ 40p53(Δ 57) otrzymano następująco: do syntezy cząsteczki zastosowano dwa oligomery DNA, posiadające komplementarne do

siebie sekwencje: F($\Delta 57$) oraz R($\Delta 57$) (Tab.6). Przeprowadzono reakcję PCR, która zawierała: 200 μ M starterów F i R, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Tween 20, 0,2 mM każdego dNTP, 1,5 mM MgCl_2 i 30 U/ml polimerazy Taq. Reakcję rozpoczęto od 2 min denaturacji w 95°C a następnie prowadzono przez 8 cykli: 30 s w 95°C, 30 s w 72°C i 1 min w 72°C, po czym następowało końcowe wydłużanie w przez 5 min w 72° C. Produkt reakcji oczyszczono przy użyciu zestawu Gene MATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (Eurx), a otrzymany DNA wykorzystany został jako matryca do następnej reakcji PCR, z użyciem starterów: F($\Delta 57$)₂ oraz R($\Delta 57$)₂ (Tab 6.). Stężenie matrycy w reakcji wynosiło 3 nM, stężenie starterów równe było 0,25 mM, stężenia pozostałych składników reakcyjnych były takie same jak opisano powyżej. Warunki PCR również były takie same jak opisano powyżej. Po oczyszczeniu insertu dsDNA przystąpiono do reakcji ligacji z wektorem plazmidowym pRL-CMV (Promega) stosując ligazę DNA T4 (Thermo Scientific), zgodnie z protokołem producenta.

W celu otrzymania wariantu dsDNA dla konstruktu P1- $\Delta 40$ p53(Δ HDM2) zamówiono insert dsDNA Δ HDM2 zawierający sekwencję promotorową dla polimerazy T7:

5'AAGTCTAGAGCCACCGTCCAGGGAGCAGGTAGCTGCTGGGCTCCGGGGACAC
TTTGCGTTCGGGCTGGGAGCGTGCTTTCCACGACGGTGACACGCTTCCCTGGAT
TGGCAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAGTCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGATC
CTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTGAAAACAACGTTCTGTCCCCCTTGCCGTCCC
AAGCAATGGATTTCGAATAG 3'.

Przeprowadzono enzymatyczne cięcie wektora plazmidowego pRL-CMV, niosącego insert P1- $\Delta 40$ p53, enzymami restrykcyjnymi XbaI i Csp 45I. Następnie insert dsDNA Δ HDM2 ligowany był z wektorem pRL-CMV.

Cząsteczkę dsDNA $\Delta 133$ p53 otrzymano poprzez zamówienie insertu dsDNA, stanowiącego region niekodujący 5'mRNA $\Delta 133$ p53 wraz z sekwencją promotorową dla polimerazy Sp6:

5'TGGTACGTCGACCATAACGATTTAGGTGACACTATAGTGAGGCCAGGAGATGG
AGGCTGCAGTGAGCTGTGATCACACCAGTGTGCTCCAGCCTGAGTGACAGAGC
AAGACCCTATCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGCTCCTGAGGTGTAGA
CGCCAACCTCTCTCTAGCTCGCTAGTGGGTTGCAGGAGGTGCTTACGCATGTTTG

TTTCTTTGCTGCCGTCTTCCAGTTGCTTTATCTGTTCACCTTGTGCCCTGACTTTCA
ACTCTGTCTCCTTCCTCTTCCTACAGTATATG 3'

Wariant otrzymano poprzez enzymatyczne cięcie wektora plazmidowego pOTB7, niosącego insert mRNA p53, enzymami Sall i BsaAI, z którego wycięto sekwencję odpowiadającą czterem pierwszym egzonom. Następnie insert $\Delta 133p53$ ligowano z przygotowanym wektorem.

5.4.1.2. Ukierunkowana mutageneza

Wykorzystane w niniejszej pracy konstrukty dsDNA: P1- $\Delta 40p53(S)$, P1- $\Delta 40p53(L)$, P0- $\Delta 40p53(gUG2)$, P1- $\Delta 40p53(gUG2)$, P1- $\Delta 40p53(\Delta A224)$, $\Delta 133p53(cua)$ oraz $\Delta 160p53(cua)$ otrzymano z wykorzystaniem techniki ukierunkowanej mutagenezy poprzez przeprowadzenie PCR z odpowiednio dobranymi starterami niosącymi mutacje, oznaczonymi na początku nazw literą F (ang. *primer forward*) i R (ang. *primer reverse*). Sekwencje starterów użytych w reakcji zostały przedstawione w tabeli 6. Konstrukty w formie dsDNA stanowiły matryce w reakcji transkrypcji *in vitro* w celu uzyskania modelowych mRNA. Matrycę do reakcji PCR dla wariantów dsDNA: P1- $\Delta 40p53(S)$, P1- $\Delta 40p53(L)$, P1- $\Delta 40p53(gUG2)$, P1- $\Delta 40p53(\Delta A224)$, stanowił konstrukt dsDNA P1- $\Delta 40p53$. Dla dsDNA P0- $\Delta 40p53(gUG2)$ matrycą był P0- $\Delta 40p53$, natomiast dla $\Delta 133p53(cua)$ oraz $\Delta 160p53(cua)$ matrycowym dsDNA był konstrukt $\Delta 133p53$.

Reakcja PCR zawierała: 0,5 ng matrycy dsDNA, 75 μM startera F i R, 0,2 mM każdego dNTP, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgSO_4$, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA i 1,5 U polimerazy *Pfu*. Reakcje ze starterem F i starterem R przeprowadzono oddzielnie, lecz w tych samych warunkach: 95°C – 2 minuty i 10 cykli: 95°C–50 s, 60°C–50 s, 68°C–16 minut, po czym następowało końcowe wydłużanie w 68°C przez 7 minut. Następnie połączono dwie reakcje, dodano 1,5 U polimerazy Pfu i reakcję PCR przeprowadzono w takich samych warunkach jak powyżej, przez 20 cykli. Następnie produkty po reakcji były oczyszczone na kolumnkach EURx.

5.4.1.3. Trawienie insertów dsDNA oraz wektora plazmidowego enzymami restrykcyjnymi

Trawienie enzymami restrykcyjnymi stosowano do przygotowywania cząsteczek dsDNA w celu klonowania do plazmidów pRL-CMV oraz pOTB7, jak również do linearyzacji plazmidów przed transkrypcją *in vitro*. Stosowano różne enzymy restrykcyjne, dobrane w zależności od cząsteczki dsDNA i pożądanego miejsca cięcia. Mieszanina reakcyjna zawierała od 1 do 2 µg dsDNA, handlowo dostępny bufor o składzie dostosowanym do każdego enzymu, 20 U enzymu restrykcyjnego. Reakcję prowadzono przez 40 minut – 6 godzin w temperaturze 37°C, po czym usuwano enzym za pomocą ekstrakcji fenolem. DNA strącano etanolem, próbki wirowano i osad rozpuszczano w sterylnej wodzie. W celu usunięcia niezmutowanej matrycy do mieszaniny reakcyjnej dodano 10 U DpnI i inkubowano w 37°C przez 1 godzinę.

5.4.1.4. Ligacja insertów dsDNA z plazmidem

Cząsteczki dsDNA odpowiadające wariantom regionu terminalnego 5' mRNA p53 człowieka stanowiły inserty, które po trawieniu enzymami restrykcyjnymi mieszano z trawionym odpowiednio plazmidem w stosunku molowym 3:1. Dodawano handlowo dostępny bufor dla T4 DNA ligazy oraz 5 U T4 DNA ligazy. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 22°C. Mieszaninę reakcyjną bez oczyszczania transformowano komórki *E.coli*.

5.4.1.5. Transformacja komórek *E.coli*

Plazmidowy DNA wprowadzano do komórek kompetentnych *E. coli* DH5α metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie przez 30 minut. Następnie, dodawano 5 µl mieszaniny ligacyjnej i inkubowano 30 minut w lodzie. Zawiesinę bakteryjną umieszczano na 30 sekund w temperaturze 42°C, po czym przenoszono na 2 minuty do lodu, dodawano 250 µl pożywki LB i komórki hodowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (200 rpm). Komórki bakteryjne (50 µl) rozprowadzano na powierzchni szalek z pożywką LB i ampicyliną. Hodowlę prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Bakterie pochodzące z pojedynczej kolonii

zawieszano w 8 ml pożywki LB z ampicyliną i inkubowano przez 8 godzin w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przy 240 rpm. Izolację plazmidu prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników firmy Qiagen lub Bio Basic. Otrzymane plazmidy sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie lub w firmie Genomed.

5.4.2. Transkrypcja *in vitro*

Wszystkie analizowane cząsteczki mRNA otrzymano przy użyciu zestawów do transkrypcji: AmpliScribe™ T7, and SP6 High Yield Transcription Kit zgodnie z wytycznymi producenta. Jako matryce stosowano cząsteczki dsDNA otrzymane w reakcji PCR lub plazmidy uprzednio poddane linearyzacji. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,5–1 µg matrycowego dsDNA, bufor transkrypcyjny, 7,5 mM mieszaninę NTP, 20 mM DTT oraz 2 µl polimerazy RNA. Reakcję prowadzono przez 2–4 godziny w temperaturze 37°C. Następnie, dodawano 1 U DNazy I i inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Transkrypty oczyszczano z wykorzystaniem zestawu Clean-Up and Concentration Kit firmy Norgen lub GeneJET RNA Purification Kit– Thermo Scientific. Otrzymane transkrypty rozdzielano w żelu agarozowym w obecności buforu 1x TAE w celu analizy jakościowej.

W reakcjach mających na celu otrzymanie mRNA z wbudowanym na końcu 5' analogiem kapu ARCA i ApppG, dodawano analog do końcowego stężenia 3 mM obniżając jednocześnie stężenie GTP do 0,75 mM.

5.4.3. Doświadczenia wykonywane w lizacie z króliczych retikulocytów (RRL)

5.4.3.1. Translacja *in vitro*

Wszystkie reakcje translacji *in vitro* prowadzono w RRL według zaleceń producenta (Promega). Produkty reakcji analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Przed reakcją, mRNA inkubowano 3 minuty w temperaturze 65°C i przenoszono na lód. Mieszanina reakcyjna zawierała 2,5 pmola modelowego konstruktu mRNA, 17,5 µl RRL, 20 µM mieszaninę aminokwasów (bez metioniny), 1 µl L-[S³⁵] metioniny (1000 Ci/mmol), 40 U inhibitora rybonukleaz i wodę do końcowej objętości 25 µl. Reakcję prowadzono 90 minut w temperaturze 30°C, po czym przenoszono do lodu. W celu degradacji mRNA, do 5 µl mieszaniny reakcyjnej dodawano rybonukleazę A do końcowego stężenia 0,2 mg/ml i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 25°C. Następnie, dodawano 20 µl roztworu SSB. Produkty reakcji analizowano elektroforetycznie w 15% żelu poliakryloamidowym. Bezpośrednio przed elektroforezą, próby denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 80°C. Wizualizacja produktów odbywała się na drodze autoradiografii, z wykorzystaniem analizatora obrazu FLA 5100W.

W przypadku reakcji translacji *in vitro* z wolnym analogiem kapu końcowe stężenie m7G(5')ppp(5')G w reakcji wynosiło 5–750 µM. Przed dodaniem mRNA mieszaninę reakcyjną inkubowano w obecności analogu kapu i równomolowych ilości octanu magnezu przez 15 minut w temperaturze 30°C.

5.4.3.2. Analiza kompleksów rybosomalnych 48S i 80S w RRL, tzw. metodą „odcisk palca”

Tworzenie kompleksów rybosomalnych 48S i 80S na mRNA P1-Δ40p53(S), P1-Δ40p53(L), P1-Δ40p53(ΔHDM2) oraz P1-Δ40p53(Δ57) analizowano przeprowadzając reakcję inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL tzw. metodą „odcisku palca”. W celu otrzymania „odcisku palca” dla kodonów AUG1 oraz AUG2 wykorzystano starter DNA Rluc330 (Tab. 7) hybrydujący do sekwencji kodującej lucyferazę *Renilla* oraz procedurę opisaną przez Dmitriev i wsp. (Dmitriev et al., 2003). Mieszanina reakcyjna zawierała 7, 14 µl RRL, 10 U inhibitora rybonukleaz oraz 13 mM octan magnezu. W reakcji kontrolnej lizat zastąpiono równą objętością wody. Aby zatrzymać kompleksy rybosomalne 48S i 80S, RRL traktowano cykloheksimidem o końcowym stężeniu 1mg/ml lub równą objętość wody dla reakcji kontrolnej.

Wszystkie próby inkubowano przez 5 minut w temperaturze 30°C. Następnie do mieszaniny dodawany był 1 pmol mRNA zawierający kap na końcu 5'. Po 20 minutowej inkubacji w temperaturze 30°C, do każdej reakcji dodawano około 5 µl startera DNA znakowanego izotopem ³²P na końcu 5' i 8 µl mieszaniny do odwrotnej transkrypcji RT-MIX zawierającej 0,6 µl 320 mM MgOAc₂, 1 µl 10 mM dNTP, 1 µl 10x buforu *Reconstitution*, 4,9 µl wody i 5 U odwrotnej transkryptazy Super Script III. Reakcja odwrotnej transkrypcji przebiegała przez 10 minut w temperaturze 30°C.

Otrzymane cDNA oczyszczano poprzez ekstrakcję fenolem i mieszaniną chloroformu z alkoholem izoamylowym oraz strącano za pomocą etanolu. Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących. Przed nałożeniem na żel próbki denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 95°C w 7 M moczniku z barwnikami elektroforetycznymi.

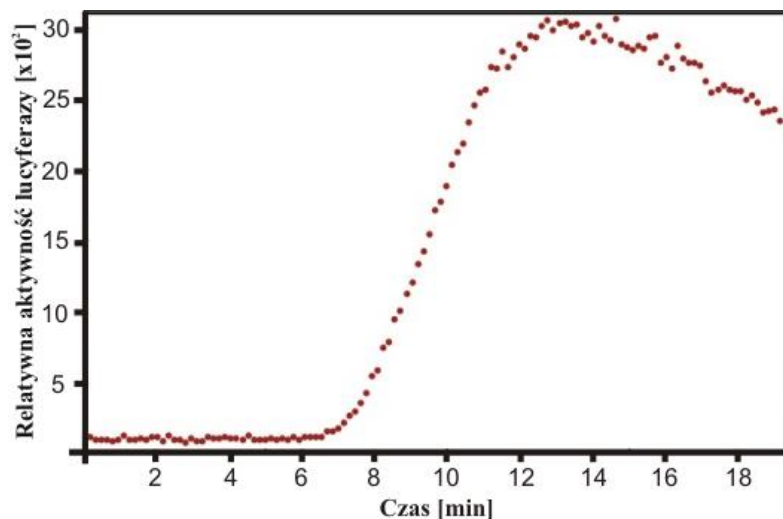
5.4.3.3. Pomiar aktywności lucyferazy z wykorzystaniem systemu genu reporterowego lucyferazy *Renilla*

Translacja w czasie rzeczywistym została przeprowadzona w mieszaninie zawierającej 17,5 µl RRL (Promega), 20 µM mieszaniny aminokwasów bez metioniny, 20 µM mieszaniny aminokwasów bez leucyny, 10 U inhibitor rybonukleaz RNasin (Thermo Scientific) i 25 µM koelenterazyny (Promega) w końcowej objętości 25 µl. Do roztworu dodano 1,25 pmol mRNA zawierającego 5' kap, uprzednio poddanego denaturacji przez 5 minut w 65°C. Próbki umieszczono w spektrofotometrze Victor 4 (Perkin Elmer), który utrzymywał temperaturę 30°C. Intensywność luminescencji mierzono co 8 sekund przez 1 s i 140 takich pomiarów zostało wykonanych.

Wyznaczenie całkowitego czasu translacji wykonano z pomocą dr Łukasza Popeny stosując program komputerowy *Mathematica 8.0* (Wolfram Research, Inc., Champaign, IL, USA) metodą analizy maksimum drugiej pochodnej w sposób zbliżony do metody opisanej przez Vassilenko i współpracowników (Vassilenko et al., 2011). W celu zmniejszenia efektu wzmocnienia sygnału szumu zarejestrowane w eksperymencie kinetyczne profile sygnału luminescencyjnego zostały w pierwszej kolejności dopasowane

funkcją wielomianową, a następnie obliczono dla niej pierwszą i drugą pochodną w celu wyznaczenia jej maksimum odpowiadającemu całkowitemu czasowi translacji.

Przykładowe dane otrzymane w trakcie pomiarów aktywności luminescencji lucyferazy w czasie rzeczywistym, uzyskane przy użyciu metody translacji *in vitro* w RRL z wykorzystaniem genu reporterowego lucyferazy *Renilla* dla konstruktu P0- Δ 40p53 pokazano na rysunku 58.



Rysunek 58. Dane aktywności luminescencyjnej uzyskane przy użyciu metody translacji *in vitro* w RRL z wykorzystaniem genu reporterowego lucyferazy *Renilla* w funkcji czasu reakcji. Intensywność sygnału odzwierciedla wydajność translacji z konstruktu P0- Δ 40p53. Nagły wzrost intensywności sygnału luminescencji pomiędzy 6-tą a 8-mą minutą czasu reakcji odpowiada pojawieniu się aktywności lucyferazy, wskutek zakończenia syntezy białka, która ma miejsce po wszystkich etapach syntezy, tj. inicjacji, elongacji i terminacji. Czas ten definiowany jest mianem średniego czasu translacji.

W przypadku danych uzyskiwanych bezpośrednio w pomiarach można obserwować szum, który może być spowodowany zarówno czynnikami aparaturowymi jak i czynnikami związanymi z przebiegiem samego eksperymentu. Konwencjonalne techniki numerycznego obliczania drugiej pochodnej powodują znaczne wzmocnienie wszelkich szumów i zniekształceń obecnych w danych pomiarowych, co powoduje, że wyniki są często nieczytelne. Zastosowanie technik redukcji szumów na danych przed różniczkowaniem lub po nim może z kolei prowadzić do niezadowalających wyników, a zatem w przypadku danych obciążonych błędem ich wcześniejsze przybliżenie funkcją analityczną wydaje się znacznie bardziej efektywne. Dla przykładu podanego na rysunku

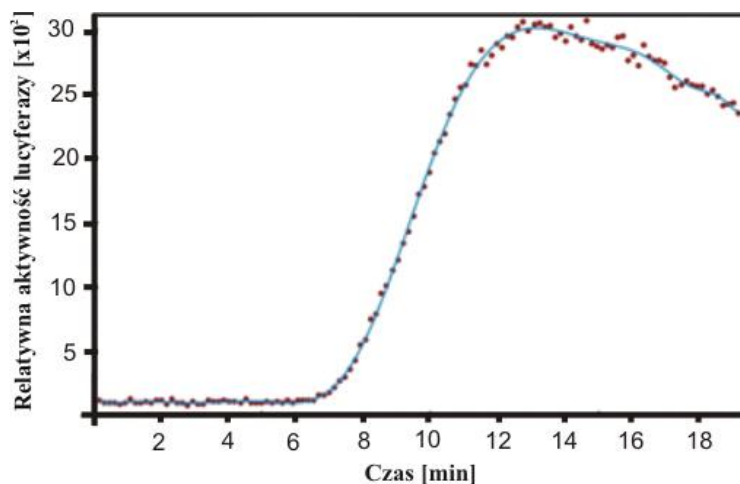
58 stosunek sygnału do szumu jest akceptowalny. Jednak intensywność sygnału luminescencji nie jest tak duża w przypadku wszystkich zarejestrowanych danych co skutkuje w takich sytuacjach znacznie wyższym poziomem szumów.

Procesy fizyczne i chemiczne reprezentowane przez zbiory danych eksperymentalnych mogą być wyrażane lub przybliżone za pomocą funkcji matematycznej. Jeśli istnieje teoretyczny model danego zjawiska to do reprezentowania danych pomiarowych można użyć odpowiedniej funkcji matematycznej. W sytuacji braku zależności wyrażonej wzorem można próbować zastosować przybliżenie numeryczne w postaci założeń funkcji trygonometrycznych, logarytmicznych, wykładniczych lub wielomianowych, tak aby osiągnąć najbardziej maksymalne przybliżenie. Spośród wielu funkcji, testowanych w omawianym zagadnieniu przed właściwą analizą, najlepiej przybliżała dane eksperymentalne funkcja wielomianowa. Wielomiany są jedną z ważniejszych a jednocześnie należą do najprostszych klas funkcji analitycznych, będących najodpowiedniejszym wyborem w wielu zastosowaniach.

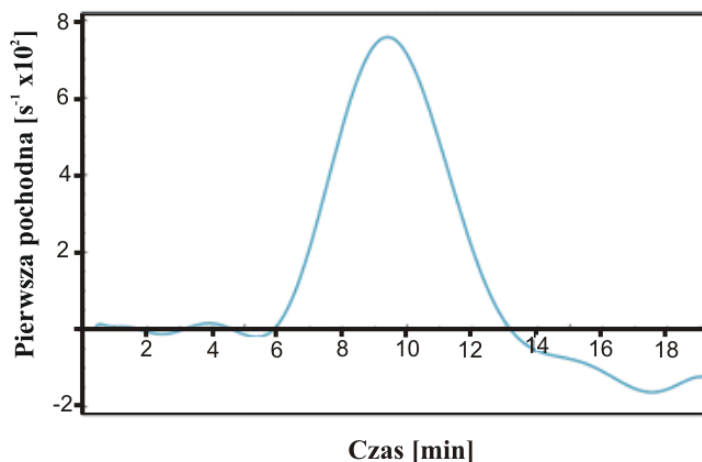
Równanie opisujące ogólną postać funkcji wielomianowej można przedstawić w sposób następujący:

$$f(x) = a_0x^0 + a_1x^1 + a_2x^2 + \dots + a_nx^n = \sum_{i=0}^n a_i x^i \quad (1)$$

gdzie $a_0, a_1, a_2, \dots, a_n$ są współczynnikami wielomianu, a współczynnik n zwany jest stopniem wielomianu. W pierwszym etapie analizy eksperymentalnych profili kinetycznych sygnału luminescencyjnego do ich aproksymacji użyto funkcji $L(t)$ w postaci funkcji wielomianowej $f(x)$ (1), ze stopniem wielomianu $n = 17$ (Rys. 59). Stopień n funkcji wielomianowej został tak dobrany, aby uzyskać najlepszą zbieżność z danymi eksperymentalnymi, zaś czynnikiem decydującym o jakości dopasowania był współczynnik determinacji R^2 .



Rysunek 59. Aproksymacja danych eksperymentalnych (czerwone punkty) sygnału luminescencyjnego zmierzonego dla konstruktu P0-Δ40p53 funkcją wielomianową $L(t)$ (niebieska linia).

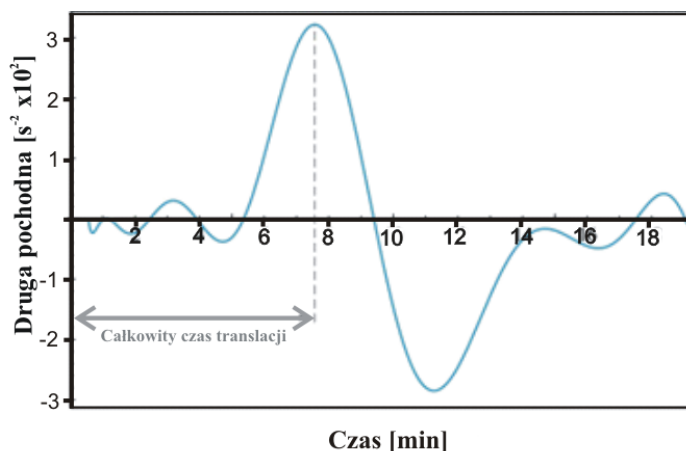


Rysunek 60. Pierwsza pochodna $L'(t)$ funkcji wielomianowej $L(t)$ przedstawionej na rysunku 59.

W kolejnych dwóch etapach funkcja wielomianowa $L(t)$ wcześniej aproksymowana do krzywej luminescencji była różniczkowana, a jej pierwsza pochodna $L'(t)$ została przedstawiona na rysunku 60, natomiast druga pochodna $L''(t)$ - na rysunku 61

Pozycja odciętej dla której wartość drugiej pochodnej przyjmuje wartość maksymalną, określa średni czas całkowitej translacji lub średni czas syntezy lucyferazy pełnej długości w danej rundzie translacji. W przedstawionym przykładzie (Rys. 58–61) średni czas pełnej translacji dla translacji konstruktu P0-Δ40p53 wynosił 7 min 36 s. Poprawność dopasowania, R^2 w tym przykładzie wynosiła 0,999664. Aby zweryfikować powtarzalność danych (uzyskanych jak wyżej), zebrano trzy niezależne

zbiory danych dla każdego konstruktu. Po tych pomiarach określono również standardowe odchylenia danych.



Rysunek 61. Druga pochodna $L''(t)$ funkcji wielomianowej $L(t)$ z rysunku 59. Pozycja odciętej dla której wartość drugiej pochodnej funkcji $L(t)$ osiąga maksimum odpowiada średniemu całkowitemu czasowi translacji.

5.4.4. Odwrotna transkrypcja z radioaktywnie znakowanym starterem DNA

Miejsca cięcia w RNA indukowane jonami Pb^{2+} oraz modyfikacje RNA po reakcji SHAPE analizowano w reakcji odwrotnej transkrypcji. Do 2 pmoli RNA dodawano 2 pmole startera DNA znakowanego radioizotopowo ^{32}P na końcu 5' oraz wodę do końcowej objętości 12 μ l. RNA denaturowano przez 5 minut w temperaturze $65^{\circ}C$ i przenoszono na 10 minut do lodu. Do RNA dodawano 8 μ l mieszaniny zawierającej 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 6 mM DTT, 0,5 mM każdego z dNTP oraz 50 U odwrotnej transkryptazy Super Script III lub Super Script IV (Invitrogen). Reakcje prowadzono przez 60 minut w temperaturze $55^{\circ}C$, a następnie przez 15 minut w temperaturze $70^{\circ}C$. Po zakończeniu reakcji, w celu degradacji RNA, dodawano 1 μ l 4M NaOH i inkubowano 5 minut w temperaturze $95^{\circ}C$. Reakcje zobojętniano przez dodanie 25 μ l 160 mM Tris-HCl. Otrzymane cDNA strącano, wirowano, suszono i rozpuszczano w 20 μ l wody. Produkty reakcji analizowano w 8% żelu w warunkach denaturujących. Przed nałożeniem na żel, próbki denaturowano przez 2 minuty w temperaturze $95^{\circ}C$ w 7 M moczniku z barwnikami elektroforetycznymi. W celu

otrzymania produktów reakcji sekwencjonowania, dNTP zastępowano mieszaniną ddNTP:dNTP w stosunku 4:1 (końcowe stężenia w reakcji: 0,2 mM ddNTP, 0,05 mM dNTP).

5.4.5. Transfekcja komórek MCF-7, HT-29 i HepG2 oligonukleotydami antysensowymi

Komórki między pasażami 4 i 20 zastosowano do transfekcji. Transfekcję przeprowadzono, gdy konfluencja komórek osiągnęła 50-80%. Antysensowne oligomery 2'-OMe o końcowym stężeniu 1 μ M transfekowano do komórek przy użyciu odczynnika Lipofectamine RNAiMax zgodnie z protokołem transfekcji producenta (Invitrogen). Transfekowane komórki przemyto PBS i podano świeżą pożywkę 4 godziny po zainicjowaniu transfekcji. Stres oksydacyjny generowano przez dodanie nadtlenu wodoru do końcowego stężenia 100 μ M lub 200 μ M. Etopozyd, świeżo rozpuszczony w DMSO, zastosowano w końcowym stężeniu 50 μ M. Komórki zostały poddane działaniu czynników stresowych przez 6 godzin, a następnie je zebrano.

5.4.6. Analiza białek metodą Western blot

W celu otrzymania lizatu białkowego, komórki MCF-7, HT-29 i HepG2 po transfekcji oligonukleotydami antysensowymi, poddawano lizie w 30 μ l buforu *Laemmli* poprzez inkubację w temperaturze 95°C przez 5 minut z wytrząsaniem. Następnie przeprowadzono elektroforezę otrzymanych białek w poliakryloamidowym żelu białkowym w warunkach denaturujących. Przed przystąpieniem do transferu białek, żel płukano w buforze do transferu, a membranę PVDF płukano przez 10 sekund w metanolu, następnie przemywano ją wodą i płukano przez 5 minut w buforze do transferu. Transfer białek z żelu na membranę prowadzono przez 1 godzinę przy napięciu prądu 70 mA w aparacie Trans-blot SD Semi-Dry Transfer cell. Po transferze, membranę blokowano za pomocą buforu zawierającego 5% mleko, 0,1% Tween i 1x TBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie, membranę płukano 3 razy w buforze 1x TBS przez 10 min. W celu identyfikacji białka p53, membranę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z I-rzędowym przeciwciałem rozcieńczonym

w stosunku 1:600 w 0,1 % Tween i 1x TBS. Po inkubacji, membranę płukano 3 razy buforem zawierającym 0,1% Tween i 1x TBS przez 15 minut. Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym IgG przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Przeciwciało rozcieńczano w stosunku 1:10000 w roztworze zawierającym 5% mleko, 0,1% Tween i 1xTBS. Po inkubacji membranę płukano 3 razy w buforze 0,1% Tween i 1x TBS. Tak przygotowaną membranę poddawano detekcji za pomocą reakcji chemiluminescencji z odczynnikiem Pierce ECL Western Blotting, w celu wykonania autoradiografii. W celu identyfikacji białka dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego GAPDH stosowano I-rzędowe przeciwciało GAPDH A3 (Santa Cruz), które rozcieńczano w stosunku 1:100 w roztworze zawierającym 5% mleko, 0,1% Tween i 1xTBS.

5.4.7. Półilościowa analiza poziomu mRNA metodą RT-PCR

Po transfekcji komórek MCF-7, HT-29 i HepG2 oligonukleotydami antysensowymi, izolowano całkowity RNA za pomocą odczynnika TriReagent. W celu otrzymania cDNA, 300 ng wyizolowanego całkowitego RNA połączono ze 100 ng startera oligo(dT) i inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie 5 minut w lodzie. Następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji w mieszaninie, która zawierała: 0,5 mM dNTP, 5 mM DTT, 1x bufor reakcyjny, 2 U/μl inhibitora RNazy oraz 100 U odwrotnej transkryptazy Super Script III. Mieszaninę reakcyjną inkubowano najpierw przez 1 godzinę w temperaturze 50°C, następnie w temperaturze 70°C przez 15 minut, po czym schładzano ją w lodzie. W celu usunięcia matrycowego RNA, dodawano 250 U/ml RNazy H i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut. Enzym inaktywowano poprzez inkubację w temperaturze 70°C przez 10 minut. Otrzymany cDNA stanowił matrycę w reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla p53: Fkrot 5'-CTAGAGCCACCGTCCAGGGGAGC-3' i R295 5'-GTCTTGGCCAGTTGGCAAACATC-3' i β-aktyny: Factin 5'-AGAGCAAGAGAGGCATCCTG-3' i Ractin 5'-CGACGTAGCACAGCTTCTCC-3'. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 1,2 μl cDNA, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 200 μM mieszaniny dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM starterów oraz 30 U/ml DNA polimerazy Taq. Reakcja przebiegała w następujących warunkach: preinkubacja w temperaturze 95°C przez 5 minut,

30 cykli obejmujących 95°C–30 sekund, 60°C (dla β -aktyny) i 62°C (dla p53)–30 sekund, 72°C–30 sekund, a następnie końcowe wydłużanie produktu 72°C–5 minut. 5 μ l każdej próbki DNA obciążano roztworem do obciążania próbek DNA i rozdzielano w 1% żelu agarozowym.

5.4.8. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA

5.4.8.1. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem techniki SHAPE

Przed reakcją modyfikacji, 5 – 20 pmoli mRNA zawieszono w 20 μ l buforu zawierającego: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 100 μ M EDTA denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 90°C, po czym schładzano do temperatury 4°C w tempie 0,1°C/sekundę. Następnie, dodawano 5x bufor o składzie 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 130 mM KCl, 100 μ M EDTA oraz wodę do końcowej objętości 146 μ l i inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Mieszaninę dzielono na dwie równe części. Do jednej dodawano 7,3 μ l 55 mM NMIA rozpuszczonego w bezwodnym DMSO, a do drugiej 7,3 μ l bezwodnego DMSO (reakcja kontrolna). Końcowe stężenie NMIA w reakcji wynosiło 5,5 mM. Reakcje modyfikacji prowadzono przez 50 minut w temperaturze 37°C po czym mRNA strącano, wirowano, suszono i rozpuszczano w 10 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 z 0,1 mM EDTA. W kolejnym etapie, wykonywano reakcje odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy Super Script III i radioaktywnie znakowanego startera DNA (Tab. 7). Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

5.4.8.2. Cięcia RNA indukowane w obecności jonów Pb²⁺

Przed reakcją cięcia, 20 – 70 pmoli mRNA denaturowano w buforze zawierającym 40 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂ w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie przez 10 minut w temperaturze 37°C. W przypadku reakcji przeprowadzonej w obecności oligonukleotydów antysensowych, mieszanina reakcyjna była inkubowana kolejne 5 minut w 37°C, z dodatkiem poszczególnego oligomeru o stężeniu końcowym

1 μ M. Następnie, mieszaninę rozdzielano na 3 lub 4 próbki i do każdej dodawano świeżo przygotowany roztwór octanu ołowiu, do uzyskania końcowych stężeń 0,5 mM, 1 mM i 2 mM. Reakcje prowadzono 3 minuty w temperaturze 37°C i zatrzymywano przez dodanie buforu „stop” w stosunku 1:1 oraz próbki przenoszono do suchego lodu. W kolejnym etapie, wykonywano reakcje odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy Super Script III i radioaktywnie znakowanym starterem DNA (Tab. 7). Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Tabela 7. Lista starterów wykorzystanych w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa 5' – 3'	Nazwa cząsteczki analizowanej
RUTR160p53	CCATCGCTATCTGAGCAGCG	Δ 133p53
R133p53UTR2_2	ACAGGGCAGGTCTTGGC	Δ 133p53
R133p53UTR3	GTGAACAGATAAAGCAACTGG	Δ 133p53
R133p53UTR6	TTTGAGATAGGGTCTTGCTCTGTAC	Δ 133p53
R330	TAATAAATGAATCAAGAACATTC	P1- Δ 40p53(Δ 57), P1- Δ 40p53(Δ HDM2), P1- Δ 40p53(S), P1- Δ 40p53(L), P1- Δ 40p53
R554AUGb	TCATCTGGACCTGGGTCTTCAG	p53-554
Rdlug	TCCATTGCTTGGGACGGCAAGG-	p53-554

6. Literatura

- Anensen, N. *et al.* Correlation analysis of p53 protein isoforms with NPM1/FLT3 mutations and therapy response in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **31**, 1533-1545 (2012).
- Aoubala, M. *et al.* p53 directly transactivates Delta133p53alpha, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ* **18**, 248-258 (2011).
- Arai, N. *et al.* Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol* **6**, 3232-3239 (1986).
- Arsic, N. *et al.* The p53 isoform Delta133p53beta promotes cancer stem cell potential. *Stem Cell Reports* **4**, 531-540 (2015).
- Arsic, N. *et al.* The p53 isoform delta133p53ss regulates cancer cell apoptosis in a RhoB-dependent manner. *PLoS One* **12**, e0172125 (2017).
- Asano, K. Why is start codon selection so precise in eukaryotes? *Translation (Austin)* **2**, e28387 (2014).
- Ashcroft, M., Kubbutat, M.H. & Vousden, K.H. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **19**, 1751-1758 (1999).
- Avery-Kiejda, K.A., Morten, B., Wong-Brown, M.W., Mathe, A. & Scott, R.J. The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. *Carcinogenesis* **35**, 586-596 (2014).
- Beckerman, R. & Prives, C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000935 (2010).
- Bellini, I. *et al.* DeltaN133p53 expression levels in relation to haplotypes of the TP53 internal promoter region. *Hum Mutat* **31**, 456-465 (2010).
- Bernard, H. *et al.* The p53 isoform, Delta133p53alpha, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene* **32**, 2150-2160 (2013).
- Berthelot, K., Muldoon, M., Rajkowitsch, L., Hughes, J. & McCarthy, J.E. Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Mol Microbiol* **51**, 987-1001 (2004).
- Blaszczyk, L. & Ciesiolka, J. Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry* **50**, 7080-7092 (2011).
- Blaszczyk, L., Dutkiewicz, M. & Ciesiolka, J. [Translation of eukaryotic mRNA in a cap-independent mode]. *Postepy biochemii* **53**, 400-412 (2007).

-
- Boldrup, L., Bourdon, J.C., Coates, P.J., Sjostrom, B. & Nylander, K. Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* **43**, 617-623 (2007).
- Bourdon, J.C. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* **97**, 277-282 (2007).
- Bourdon, J.C. *et al.* p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* **19**, 2122-2137 (2005).
- Bourougaa, K. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces G2 cell-cycle arrest via mRNA translation of the p53 isoform p53/47. *Mol Cell* **38**, 78-88 (2010).
- Brooks, C.L. & Gu, W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 164-171 (2003).
- Brunel, F., Zakin, M.M., Buc, H. & Buckle, M. The polypyrimidine tract binding (PTB) protein interacts with single-stranded DNA in a sequence-specific manner. *Nucleic Acids Res* **24**, 1608-1615 (1996).
- Budde, A. & Grummt, I. p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene* **18**, 1119-1124 (1999).
- Burns, D.M. & Richter, J.D. CPEB regulation of human cellular senescence, energy metabolism, and p53 mRNA translation. *Genes Dev* **22**, 3449-3460 (2008).
- Campbell, H. *et al.* 133p53 isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signalling. *Nat Commun* **9**, 254 (2018).
- Campbell, H.G. *et al.* Does Delta133p53 isoform trigger inflammation and autoimmunity? *Cell Cycle* **11**, 446-450 (2012).
- Camus, S. *et al.* The p53 isoforms are differentially modified by Mdm2. *Cell Cycle* **11**, 1646-1655 (2012).
- Candeias, M.M., Hagiwara, M. & Matsuda, M. Cancer-specific mutations in p53 induce the translation of Delta160p53 promoting tumorigenesis. *EMBO Rep* **17**, 1542-1551 (2016).
- Candeias, M.M. *et al.* P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol* **10**, 1098-1105 (2008).
- Candeias, M.M. *et al.* Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene* **25**, 6936-6947 (2006).
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**, 563-572 (2002).

- Chambers, S.K. & Martinez, J.D. The significance of p53 isoform expression in serous ovarian cancer. *Future oncology (London, England)* **8**, 683-686 (2012).
- Chang, J., Kim, D.H., Lee, S.W., Choi, K.Y. & Sung, Y.C. Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. *J Biol Chem* **270**, 25014-25019 (1995).
- Chen, J. & Kastan, M.B. 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev* **24**, 2146-2156 (2010).
- Chen, J. & Peng, J. p53 Isoform Delta113p53 in zebrafish. *Zebrafish* **6**, 389-395 (2009).
- Choi, H.S. *et al.* Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 431-436 (2009).
- Ciesiolka, J., Lorenz, S. & Erdmann, V.A. Structural analysis of three prokaryotic 5S rRNA species and selected 5S rRNA--ribosomal-protein complexes by means of Pb(II)-induced hydrolysis. *Eur J Biochem* **204**, 575-581 (1992).
- Ciesiolka, J., Michalowski, D., Wrzesinski, J., Krajewski, J. & Krzyzosiak, W.J. Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J Mol Biol* **275**, 211-220 (1998).
- Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**, 313-319 (2011).
- Courtois, S. *et al.* DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* **21**, 6722-6728 (2002).
- de Smit, M.H. & van Duin, J. Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7668-7672 (1990).
- Dmitriev, S.E., Pisarev, A.V., Rubtsova, M.P., Dunaevsky, Y.E. & Shatsky, I.N. Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting. *FEBS Lett* **533**, 99-104 (2003).
- Donehower, L.A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-221 (1992).
- el-Deiry, W.S. *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825 (1993).
- Ewen, M.E., Oliver, C.J., Sluss, H.K., Miller, S.J. & Peeper, D.S. p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes Dev* **9**, 204-217 (1995).

-
- Farzannia, A., Roghanian, R., Zarkesh-Esfahani, S.H., Nazari, M. & Emamzadeh, R. FcUni-RLuc: an engineered Renilla luciferase with Fc binding ability and light emission activity. *Analyst* **140**, 1438-1441 (2015).
- Feng, Z. *et al.* The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* **67**, 3043-3053 (2007).
- Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* **36**, 3943-3956 (2017).
- Flaman, J.M. *et al.* The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* **12**, 813-818 (1996).
- Fortin, A. *et al.* APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* **155**, 207-216 (2001).
- Fragou, A. *et al.* Increased Delta133p53 mRNA in lung carcinoma corresponds with reduction of p21 expression. *Mol Med Rep* **15**, 1455-1460 (2017).
- Freed-Pastor, W.A. & Prives, C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* **26**, 1268-1286 (2012).
- Fujita, K. *et al.* p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* **11**, 1135-1142 (2009).
- Gadea, G. *et al.* TP53 drives invasion through expression of its Delta133p53beta variant. *Elife* **5** (2016).
- Galy, B., Creancier, L., Prado-Lourenco, L., Prats, A.C. & Prats, H. p53 directs conformational change and translation initiation blockade of human fibroblast growth factor 2 mRNA. *Oncogene* **20**, 4613-4620 (2001).
- Gazda, H.T. *et al.* Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Hum Mutat* **33**, 1037-1044 (2012).
- Gebauer, F. & Hentze, M.W. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 827-835 (2004).
- Ghosh, A., Stewart, D. & Matlashewski, G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* **24**, 7987-7997 (2004).
- Gong, L. *et al.* p53 isoform Delta133p53 promotes efficiency of induced pluripotent stem cells and ensures genomic integrity during reprogramming. *Sci Rep* **6**, 37281 (2016).

-
- Gornicki, P. *et al.* Use of lead(II) to probe the structure of large RNA's. Conformation of the 3' terminal domain of E. coli 16S rRNA and its involvement in building the tRNA binding sites. *J Biomol Struct Dyn* **6**, 971-984 (1989).
- 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* **10**, 1726-1740 (2013).
- Gorska, A., Swiatkowska, 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* **8**, e78863 (2013).
- Grover, R., Candeias, M.M., Fahraeus, R. & Das, S. p53 and little brother p53/47: linking IRES activities with protein functions. *Oncogene* **28**, 2766-2772 (2009).
- Grover, R., Sharathchandra, A., Ponnuswamy, A., Khan, D. & Das, S. Effect of mutations on the p53 IRES RNA structure: implications for de-regulation of the synthesis of p53 isoforms. *RNA Biol* **8**, 132-142 (2011).
- Hafsi, H., Santos-Silva, D., Courtois-Cox, S. & Hainaut, P. Effects of Delta40p53, an isoform of p53 lacking the N-terminus, on transactivation capacity of the tumor suppressor protein p53. *BMC Cancer* **13**, 134 (2013).
- Hershey, J.W., Sonenberg, N. & Mathews, M.B. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4** (2012).
- Hinnebusch, A.G., Ivanov, I.P. & Sonenberg, N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science* **352**, 1413-1416 (2016).
- Hoeben, A. *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* **56**, 549-580 (2004).
- Hofstetter, G. *et al.* The N-terminally truncated p53 isoform Delta40p53 influences prognosis in mucinous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **22**, 372-379 (2012).
- Hofstetter, G. *et al.* Delta133p53 is an independent prognostic marker in p53 mutant advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer* **105**, 1593-1599 (2011).
- Hoh, J. *et al.* The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8467-8472 (2002).
- Horikawa, I. *et al.* Autophagic degradation of the inhibitory p53 isoform Delta133p53alpha as a regulatory mechanism for p53-mediated senescence. *Nat Commun* **5**, 4706 (2014).

-
- Horikawa, I. & Harris, C.C. Delta133p53: A p53 isoform enriched in human pluripotent stem cells. *Cell Cycle* **16**, 1631-1632 (2017).
- Horikawa, I. *et al.* Delta133p53 represses p53-inducible senescence genes and enhances the generation of human induced pluripotent stem cells. *Cell Death Differ* **24**, 1017-1028 (2017).
- Jackson, R.J., Hellen, C.U. & Pestova, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-127 (2010).
- Janicke, R.U., Graupner, V., Budach, W. & Essmann, F. The do's and don'ts of p53 isoforms. *Biol Chem* **390**, 951-963 (2009).
- Ji, H., Fraser, C.S., Yu, Y., Leary, J. & Doudna, J.A. Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16990-16995 (2004).
- Ji, W. *et al.* Expression of p53beta and Delta133p53 isoforms in different gastric tissues. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 10468-10474 (2015).
- Joruiz, S.M. & Bourdon, J.C. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6** (2016).
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**, 6304-6311 (1991).
- Kastan, M.B. *et al.* A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597 (1992).
- Kastenhuber, E.R. & Lowe, S.W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062-1078 (2017).
- Khan, D., Chattopadhyay, S. & Das, S. Influence of metabolic stress on translation of p53 isoforms. *Mol Cell Oncol* **3**, e1039689 (2016).
- Khan, D. *et al.* Reversible induction of translational isoforms of p53 in glucose deprivation. *Cell Death Differ* **22**, 1203-1218 (2015).
- Khan, D., Sharathchandra, A., Ponnuswamy, A., Grover, R. & Das, S. Effect of a natural mutation in the 5' untranslated region on the translational control of p53 mRNA. *Oncogene* **32**, 4148-4159 (2013).
- Khosravi, R. *et al.* Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14973-14977 (1999).

-
- Khoury, M.P. & Bourdon, J.C. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000927 (2010).
- Khoury, M.P. *et al.* Detecting and quantifying p53 isoforms at mRNA level in cell lines and tissues. *Methods Mol Biol* **962**, 1-14 (2013).
- Kim, S. & An, S.S. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3993 (2016).
- Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* **196**, 947-950 (1987).
- Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F. & Vousden, K.H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 393-405 (2015).
- Kuhn, U. & Wahle, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1678**, 67-84 (2004).
- Kulkarni, S.D. *et al.* Glucose-stimulated translation regulation of insulin by the 5' UTR-binding proteins. *J Biol Chem* **286**, 14146-14156 (2011).
- Kussie, P.H. *et al.* Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**, 948-953 (1996).
- Lane, D. & Levine, A. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000893 (2010).
- Lane, D.P. *et al.* Mdm2 and p53 are highly conserved from placozoans to man. *Cell Cycle* **9**, 540-547 (2010).
- Lane, D.P. & Crawford, L.V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263 (1979).
- Laptenko, O. & Prives, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* **13**, 951-961 (2006).
- Leppek, K., Das, R. & Barna, M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 158-174 (2018).
- Leroy, B. *et al.* The TP53 website: an integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res* **41**, D962-969 (2013).
- Levine, A.J. & Oren, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* **9**, 749-758 (2009).

-
- Li, F.P. & Fraumeni, J.F., Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* **71**, 747-752 (1969).
- Linzer, D.I. & Levine, A.J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52 (1979).
- Liu, K. *et al.* The Delta133p53 Isoform Reduces Wtp53-induced Stimulation of DNA Pol gamma Activity in the Presence and Absence of D4T. *Aging Dis* **8**, 228-239 (2017).
- Loayza-Puch, F. *et al.* p53 induces transcriptional and translational programs to suppress cell proliferation and growth. *Genome Biol* **14**, R32 (2013).
- Lopez, I. *et al.* p53-mediated suppression of BiP triggers BIK-induced apoptosis during prolonged endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **24**, 1717-1729 (2017).
- Mahmoudi, S. *et al.* Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell* **33**, 462-471 (2009).
- Maier, B. *et al.* Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* **18**, 306-319 (2004).
- Maiuri, M.C. *et al.* Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell Cycle* **8**, 1571-1576 (2009).
- Marcel, V., Catez, F. & Diaz, J.J. p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene* **34**, 5513-5523 (2015).
- Marcel, V., Fernandes, K., Terrier, O., Lane, D.P. & Bourdon, J.C. Modulation of p53beta and p53gamma expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell Death Differ* **21**, 1377-1387 (2014).
- Marcel, V. *et al.* p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell* **24**, 318-330 (2013).
- Marcel, V. & Hainaut, P. p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell Mol Life Sci* **66**, 391-406 (2009).
- Marcel, V. *et al.* Detecting p53 isoforms at protein level. *Methods Mol Biol* **962**, 15-29 (2013).
- Marcel, V. *et al.* Delta160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Delta133p53 transcript. *FEBS Lett* **584**, 4463-4468 (2010).
- Marcel, V. *et al.* G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis* **32**, 271-278 (2011).

-
- Marcel, V. *et al.* p53 regulates the transcription of its Delta133p53 isoform through specific response elements contained within the TP53 P2 internal promoter. *Oncogene* **29**, 2691-2700 (2010).
- Matlashewski, G., Pim, D., Banks, L. & Crawford, L. Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res* **1**, 77-85 (1987).
- Menendez, D., Inga, A., Jordan, J.J. & Resnick, M.A. Changing the p53 master regulatory network: ELEMENTary, my dear Mr Watson. *Oncogene* **26**, 2191-2201 (2007).
- Michael, D. & Oren, M. The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* **13**, 49-58 (2003).
- Milicevic, Z. *et al.* Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells. *ScientificWorldJournal* **2014**, 618698 (2014).
- Miyashita, T. & Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299 (1995).
- Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741 (2011).
- Moll, U.M. & Petrenko, O. The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 1001-1008 (2003).
- Momand, J., Wu, H.H. & Dasgupta, G. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* **242**, 15-29 (2000).
- Moore, H.C. *et al.* The RNA helicase p68 modulates expression and function of the Delta133 isoform(s) of p53, and is inversely associated with Delta133p53 expression in breast cancer. *Oncogene* **29**, 6475-6484 (2010).
- Mosner, J. *et al.* Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *Embo j* **14**, 4442-4449 (1995).
- Muller, P.A. & Vousden, K.H. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* **25**, 304-317 (2014).
- Nakano, K. & Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683-694 (2001).
- Navarro, F. & Lieberman, J. miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PLoS One* **10**, e0132767 (2015).
- Nutthasirikul, N. *et al.* Targeting the 133p53 isoform can restore chemosensitivity in 5-fluorouracil-resistant cholangiocarcinoma cells. *Int J Oncol* **47**, 2153-2164 (2015).

- Nutthasirikul, N., Limpaboon, T., Leelayuwat, C., Patrakitkomjorn, S. & Jearanaikoon, P. Ratio disruption of the 133p53 and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* **42**, 1181-1188 (2013).
- Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M.B. & Oren, M. Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell* **32**, 180-189 (2008).
- Ohki, R., Kawase, T., Ohta, T., Ichikawa, H. & Taya, Y. Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci* **98**, 189-200 (2007).
- Olivares-Illana, V. & Fahraeus, R. p53 isoforms gain functions. *Oncogene* **29**, 5113-5119 (2010).
- Olivier, M., Hussain, S.P., Caron de Fromentel, C., Hainaut, P. & Harris, C.C. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*, 247-270 (2004).
- Olivier, M. *et al.* Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* **16**, 1-12 (2009).
- Pavletich, N.P., Chambers, K.A. & Pabo, C.O. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* **7**, 2556-2564 (1993).
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320-325 (1988).
- Pflaum, J., Schlosser, S. & Muller, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol* **4**, 285 (2014).
- Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U. & Pestova, T.V. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* **135**, 1237-1250 (2008).
- Powell, D.J. *et al.* Stress-dependent changes in the properties of p53 complexes by the alternative translation product p53/47. *Cell Cycle* **7**, 950-959 (2008).
- Poyurovsky, M.V. *et al.* The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 982-989 (2010).
- Ray, D. *et al.* A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* **499**, 172-177 (2013).
- Ray, P.S., Grover, R. & Das, S. Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep* **7**, 404-410 (2006).

-
- Rodrigues, N.R. *et al.* p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7555-7559 (1990).
- Rovinski, B. *et al.* Deletion of 5'-coding sequences of the cellular p53 gene in mouse erythroleukemia: a novel mechanism of oncogene regulation. *Mol Cell Biol* **7**, 847-853 (1987).
- Rustandi, R.R., Baldisseri, D.M. & Weber, D.J. Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(beta). *Nature structural biology* **7**, 570-574 (2000).
- Saifudeen, Z., Marks, J., Du, H. & El-Dahr, S.S. Spatial repression of PCNA by p53 during kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F727-733 (2002).
- Sakaguchi, K. *et al.* DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**, 2831-2841 (1998).
- Sawicka, K., Bushell, M., Spriggs, K.A. & Willis, A.E. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* **36**, 641-647 (2008).
- Schroder, M. & Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789 (2005).
- Sharathchandra, A., Katoch, A. & Das, S. IRES mediated translational regulation of p53 isoforms. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**, 131-139 (2014).
- Slatter, T.L. *et al.* Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a Delta133p53-like isoform. *Blood* **117**, 5166-5177 (2011).
- Solomon, H. *et al.* Post-translational regulation of p53 function through 20S proteasome-mediated cleavage. *Cell Death Differ* **24**, 2187-2198 (2017).
- Sonenberg, N. & Hinnebusch, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745 (2009).
- Sosinska, P., Mikula-Pietrasik, J. & Ksiazek, K. [Molecular bases of cellular senescence: Hayflick phenomenon 50 years later]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* **70**, 231-242 (2016).
- Spriggs, K.A., Stoneley, M., Bushell, M. & Willis, A.E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell* **100**, 27-38 (2008).
- Stommel, J.M. *et al.* A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo j* **18**, 1660-1672 (1999).

-
- Storer, N.Y. & Zon, L.I. Zebrafish models of p53 functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001123 (2010).
- Strudwick, S., Carastro, L.M., Stagg, T. & Lazarus, P. Differential transcription-coupled translational inhibition of human p53 expression: a potentially important mechanism of regulating p53 expression in normal versus tumor tissue. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 463-474 (2003).
- Surget, S., Khoury, M.P. & Bourdon, J.C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther* **7**, 57-68 (2013).
- Swiatkowska, A., Zydowicz, P., Sroka, J. & Ciesiolka, J. The role of the 5' terminal region of p53 mRNA in the p53 gene expression. *Acta Biochim Pol* **63**, 645-651 (2016).
- Sykes, S.M. *et al.* Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* **24**, 841-851 (2006).
- Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G. & Kastan, M.B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **123**, 49-63 (2005).
- Takahashi, R., Markovic, S.N. & Scrable, H.J. Dominant effects of Delta40p53 on p53 function and melanoma cell fate. *J Invest Dermatol* **134**, 791-800 (2014).
- Tan, T. & Chu, G. p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* **22**, 3247-3254 (2002).
- Tanaka, H. *et al.* A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42-49 (2000).
- Tatsumi, H., Fukuda, S., Kikuchi, M. & Koyama, Y. Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides. *Anal Biochem* **243**, 176-180 (1996).
- Terrier, O. *et al.* Influenza A viruses control expression of proviral human p53 isoforms p53beta and Delta133p53alpha. *J Virol* **86**, 8452-8460 (2012).
- Thompson, T. *et al.* Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 53015-53022 (2004).
- Tokino, T. & Nakamura, Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **33**, 1-6 (2000).
- Tuck, S.P. & Crawford, L. Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol* **9**, 2163-2172 (1989).

-
- Turnquist, C. *et al.* p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration. *Cell Death Differ* **23**, 1515-1528 (2016).
- Ungewitter, E. & Scrable, H. Delta40p53 controls the switch from pluripotency to differentiation by regulating IGF signaling in ESCs. *Genes Dev* **24**, 2408-2419 (2010).
- Vassilenko, K.S., Alekhina, O.M., Dmitriev, S.E., Shatsky, I.N. & Spirin, A.S. Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Res* **39**, 5555-5567 (2011).
- Vilborg, A., Wilhelm, M.T. & Wiman, K.G. Regulation of tumor suppressor p53 at the RNA level. *J Mol Med (Berl)* **88**, 645-652 (2010).
- Webley, K. *et al.* Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* **20**, 2803-2808 (2000).
- Wei, J. *et al.* Pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* alters the expression profile of p53 protein isoforms and p53 response to cellular stresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2543-2550 (2012).
- Wilker, E.W. *et al.* 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature* **446**, 329-332 (2007).
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S. & Gray, N.K. Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 182-188 (2003).
- Wu, J. & Bag, J. Negative control of the poly(A)-binding protein mRNA translation is mediated by the adenine-rich region of its 5'-untranslated region. *J Biol Chem* **273**, 34535-34542 (1998).
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. & Levine, A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-1132 (1993).
- Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* **10**, 678-684 (2012).
- Yang, D.Q., Halaby, M.J. & Zhang, Y. The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene* **25**, 4613-4619 (2006).
- Yang, Y., Li, C.C. & Weissman, A.M. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* **23**, 2096-2106 (2004).

-
- Yin, Y., Stephen, C.W., Luciani, M.G. & Fahraeus, R. p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* **4**, 462-467 (2002).
- Yonish-Rouach, E. *et al.* Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**, 345-347 (1991).
- Zhang, H.M. *et al.* Role of Delta133p53 isoform in NF-kappaB inhibitor PDTC-mediated growth inhibition of MKN45 gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* **23**, 2716-2722 (2017).
- 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* **8**, 1533 (2018).