

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

**Analiza struktury regionu niekodującego 5'
mRNA genu *p53* oraz jego funkcji w procesie
inicjacji translacji**

Leszek Błaszczyk

Praca doktorska wykonana w Pracowni Biochemii RNA
pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Ciesiołki

Poznań 2012

Dziękuję mojemu promotorowi prof. dr hab. Jerzemu Ciesiołce za
opiekę naukową i cenne wskazówki,

mgr inż. Agnieszce Górskiej
dr Katarzynie Purzyckiej
za owocne dyskusje naukowe

oraz

koleżankom i kolegom z Pracowni za miłą atmosferę.

Dziękuję mojej *fiśce* za motywację i wiarę we mnie oraz moim
rodzicom.

”...if it is a Miracle, any sort of evidence will answer, but if it is a Fact, proof is necessary.”

Mark Twain

Dla moich bliskich

W trakcie realizacji pracy doktorskiej brałem udział w następujących projektach badawczych:

1. Projekt MNiSW/NCN/NCBR Nr NN301 272037. Temat: Rola regionu niekodującego 5' mRNA genu *p53* w regulacji jego ekspresji na poziomie translacji. Kierownik tematu: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka.
2. Grant badawczy w ramach zadania służącego rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2011, (finansowanie MNiSzW). Temat: Analiza struktury regionu niekodującego 5' mRNA genu *p53* oraz jego funkcji w procesie inicjacji translacji. Kierownik projektu: Leszek Błaszczyk.

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

Leszek Błaszczyk, Mariola Dutkiewicz, Jerzy Ciesiołka „*Proces translacji zachodzący niezależnie od obecności kapu na końcu 5' eukariotycznych mRNA*”. Postępy Biochemii 53 (4) 2007 str. 400–412.

Leszek Błaszczyk, Jerzy Ciesiołka “*Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA*”. Biochemistry 50 (33) 2011 str. 7080–7092.

Leszek Błaszczyk, Jerzy Ciesiołka „*Interaction of polypyrimidine tract binding protein 1 with the 5'-terminal region of p53 mRNA*”. Publikacja w przygotowaniu.

Agnieszka Górka, Leszek Błaszczyk, Jerzy Ciesiołka. *Sequence variants of the 5' untranslated region of p53 mRNA and their impact on efficiency of translation initiation*. Publikacja w przygotowaniu.

Leszek Błaszczyk, Monika Matelska, Jerzy Ciesiołka “*Characterization of secondary structure folding and sequence conservation of the 5' untranslated region of p53 mRNA*”. XIII Annual Meeting of the RNA Society, 28 VIII–3 IX, 2008, Berlin, Niemcy.

Leszek Błaszczyk, Agnieszka Górka, Jerzy Ciesiołka “*Secondary structure and the role in translation initiation of the 5' untranslated region of p53 mRNA*”. Frontiers in Structural Biology of RNAs and RNPs, 16–18 VIII, 2010, Poznań.

Leszek Błaszczyk, Agnieszka Górka, Jerzy Ciesiołka “*Structural probing of the 5' untranslated region of p53 mRNA and its possible role in translation initiation*”. The modern RNA world, 13–16 IX, 2010, Murnau, Niemcy.

Leszek Błaszczyk, Jerzy Ciesiołka “*Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA*”. II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, 5–9 XI, 2011, Kraków.

Agnieszka Górka, Leszek Błaszczyk, Jerzy Ciesiołka “*The role of different variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA in translation*”. II Ogólnopolski Kongres Biochemii i Biologii Komórki, 5–9 XI, 2011, Kraków.

Leszek Błaszczyk, Jerzy Ciesiołka “*Interaction of polypyrimidine tract binding protein 1 with the 5'-terminal region of p53 mRNA*”. 1st Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 11–14, 2012, Poznań.

Spis treści

Spis stosowanych skrótów	12
Abstract	14
Streszczenie	16
1. Wprowadzenie i cel pracy	18
2. Wstęp	20
2.1. Białko p53 – strażnik genomu	20
2.2. Budowa białka p53	21
2.2.1. Domena transaktywacyjna	22
2.2.2. Domena oddziaływania z DNA	22
2.2.3. Domena tetrameryzacji	22
2.2.4. Domena regulatorowa	23
2.3. Modyfikacje potranslacyjne białka p53	23
2.3.1. Fosforylacja	23
2.3.2. Acetylacja	24
2.3.3. Ubikwitynacja	24
2.4. Geny <i>p63</i> i <i>p73</i>	25
2.5. Izoformy białka p53	25
2.5.1. Izoforma Δ Np53	26
2.5.2. Izoformy Δ 133p53 i Δ 160p53	27
2.5.3. Izoformy p53 skrócone z końca karboksylowego	28
2.6. Mutacje i polimorfizmy w genie <i>p53</i>	28
2.6.1. Mutacje w genie <i>p53</i>	28
2.6.2. Polimorfizm genu <i>p53</i>	30
2.7. Gen <i>p53</i> – promotory transkrypcyjne oraz alternatywne składanie jego pre-mRNA	31
2.7.1. Promotory transkrypcyjne genu <i>p53</i>	31
2.7.2. Alternatywne składanie pre-mRNA p53	32
2.8. Wpływ alternatywnego składania pre-mRNA p53 oraz wewnętrznej inicjacji translacji na syntezę białka p53 i izoformy Δ Np53.	33
2.8.1. Rola alternatywnego składania intronu 2 w ekspresji izoformy Δ Np53	33

2.8.2.	Struktura kwadrupleksu w intronie 3 i jej wpływ składanie intronu 2	35
2.8.3.	Wewnętrzna inicjacja translacji białka p53 i izoformy Δ Np53	36
2.9.	Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA p53	41
2.10.	Czynniki wpływające na regulację ekspresji mRNA p53.	43
2.10.1.	Białka oddziałujące z regionem terminalnym 5' mRNA p53	43
2.10.1.1.	PTB1	43
2.10.1.2.	Hdm2	45
2.10.1.3.	hnRNP C1/C2	46
2.10.1.4.	RPL26 i nukleolina	47
2.10.1.5.	p53	47
2.10.1.6.	Pdcd4	48
2.11.	Oddziaływania typu RNA–RNA i ich rola w regulacji ekspresji mRNA p53	49
2.11.1.	Antysensowny transkrypt Wrap53	49
2.11.2.	Oddziaływanie 5'UTR–ORF	50
2.11.3.	Oddziaływanie pomiędzy regionami niekodującymi 5' i 3' mRNA p53	50
2.12.	Rola regionu niekodującego 3' w regulacji ekspresji białka p53	52
2.12.1.	Struktura oraz elementy regulatorowe obecne w regionie niekodującym 3' mRNA p53	52
2.12.2.	Udział białek oddziałujących z regionem niekodującym 3' mRNA p53 w regulacji ekspresji białka p53	54
2.12.3.	Udział cząsteczek mikroRNA w ekspresji białka p53	57
3.	Wyniki i Dyskusja	58
3.1.	Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się w miejscu inicjacji transkrypcji P1	58
3.1.1.	Struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53	59
3.1.2.	Struktura drugorzędowa RNA H56-169	65
3.1.3.	Struktura drugorzędowa RNA P1-p53	67
3.1.4.	Badanie zachowawczości struktury regionu terminalnego 5' w dłuższych fragmentach mRNA p53	71
3.1.4.1.	Struktura drugorzędowa RNA P1-554	71
3.1.4.2.	Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' w pełnej długości mRNA p53	79
3.1.5.	Badanie stabilności termodynamicznej elementów struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53	86
3.1.6.	Analiza zmienności genetycznej regionu terminalnego 5' genu <i>p53</i>	88

3.1.7.	Zmiany polimorficzne pojedynczego nukleotydu w regionie terminalnym 5' genu <i>p53</i> i ich potencjalny wpływ na strukturę drugorzędową RNA – analiza <i>in silico</i> .	88
3.1.7.1.	Analiza zmienności sekwencji regionu terminalnego 5' genu <i>p53</i> za pomocą techniki SSCP	90
	Analiza SSCP DNA p53E1	91
	Analiza SSCP DNA p53E2	92
3.1.7.2.	Porównanie sekwencji regionu terminalnego 5' mRNA p53 u różnych organizmów	94
3.1.8.	Dyskusja uzyskanych wyników	98
3.1.8.1.	Spinka G56–C169, główny motyw strukturalny regionu terminalnego 5' mRNA p53	98
3.1.8.2.	Struktura spinki U180–A218 oraz pozostałych elementów regionu terminalnego 5' mRNA p53	107
3.2.	Rola regionu terminalnego 5' mRNA p53 w inicjacji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53111	
3.2.1.	Analiza efektywności translacji <i>in vitro</i> modelowych konstruktów mRNA p53 . . .	112
3.2.2.	Dyskusja uzyskanych wyników	116
3.2.2.1.	Inicjacja translacji białka p53 jest głównie zależna od obecności kapu . .	117
3.2.2.2.	Translacja izoformy Δ Np53 wykazuje cechy inicjacji wewnętrznej z użyciem elementu IRES	119
3.2.2.3.	Inne, potencjalne mechanizmy inicjacji translacji izoformy Δ Np53	120
3.3.	Oddziaływanie białka wiążącego się z traktami polipirymidynowymi (PTB1) z regionem terminalnym 5' mRNA p53	122
3.3.1.	Potencjalne miejsca wiązania białka PTB1 w regionie terminalnym 5' mRNA p53	122
3.3.2.	Mapowanie struktury RNA P1- Δ Np53 w kompleksie z białkiem PTB1	122
3.3.3.	Badanie struktury drugorzędowej RNA P1-554 w kompleksie z białkiem PTB1 . .	125
3.3.4.	Analiza tworzenia kompleksów między białkiem PTB1 a fragmentami mRNA p53 za pomocą techniki <i>filter binding assay</i>	128
3.3.5.	Wpływ obecności białka PTB1 na translację białka p53 i izoformy Δ Np53 <i>in vitro</i>	134
3.3.6.	Dyskusja uzyskanych wyników	136
3.4.	Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się od promotora transkrypcyjnego P0 oraz posiadających zachowaną sekwencję intronu 2	143
3.4.1.	Struktura drugorzędowa RNA P0-p53	145
3.4.2.	Struktura drugorzędowa regionu międzypromotorowego w dłuższych fragmentach mRNA – RNA P0- Δ Np53 oraz RNA P0-554	148
3.4.3.	Udział regionu międzypromotorowego w translacji białka p53 i izoformy Δ Np53 .	154
3.4.4.	Wpływ obecności intronu 2 na strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53	155

3.4.5.	Dyskusja uzyskanych wyników	160
3.4.5.1.	Struktura regionu międzypromotorowego mRNA p53	160
3.4.5.2.	Wpływ sekwencji intronu 2 na strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53	162
3.4.5.3.	Rola regionu międzypromotorowego w regulacji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53	162
4.	Podsumowanie	167
5.	Materiały i Metody	169
5.1.	Aparatura	169
5.2.	Odczynniki i materiały	169
5.2.1.	Związki promieniotwórcze	170
5.2.2.	Enzymy	170
5.2.3.	Zestawy odczynników	170
5.2.4.	Oligonukleotydy	170
5.2.5.	Plazmidy	170
5.2.6.	Szczepy bakteryjne	171
5.2.7.	Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek	171
5.2.8.	Bufory, roztwory i pożywki	171
5.3.	Metody standardowe	174
5.3.1.	Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	174
5.3.2.	Elektroforeza RNA w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących	175
5.3.3.	Elektroforeza cząsteczek DNA i RNA w żelu agarozowym	175
5.3.4.	Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	176
5.3.5.	Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego	176
5.3.6.	Wytrącanie kwasów nukleinowych	176
5.3.7.	Oznaczanie stężenia białka	177
5.3.8.	Ekstrakcja fenolem	177
5.3.9.	Odzyskiwanie RNA z kompleksów rybonukleoproteinowych za pomocą odczynnika Tri Reagent	177
5.3.10.	Hydrolyzaty formamidowy	178
5.3.11.	Ograniczone trawienie RNA rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących	178
5.4.	Metody stosowane w badaniach własnych	178
5.4.1.	Otrzymanie matrycowych DNA	178
5.4.2.	Trawienie restrykcyjne cząsteczek DNA	179

5.4.3.	Klonowanie insertu DNA do plazmidu	180
5.4.4.	Transformacja komórek <i>E. coli</i>	180
5.4.5.	Ukierunkowana mutageneza	180
5.4.6.	Transkrypcja <i>in vitro</i>	181
5.4.7.	Znakowanie kwasów nukleinowych	181
5.4.7.1.	Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ^{32}P	181
5.4.7.2.	Znakowanie RNA na końcu 3' za pomocą $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ pCp i T4 RNA ligazy .	182
5.4.8.	Mapowanie struktury drugorzędowej RNA	182
5.4.8.1.	Cięcie RNA indukowane jonami Pb^{2+}	182
5.4.8.2.	Mapowanie struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem techniki SHAPE	183
5.4.8.3.	Modyfikacja chemiczna RNA za pomocą siarcznanu dimetylu (DMS) . . .	183
5.4.8.4.	Enzymatyczne mapowanie struktury drugorzędowej RNA	184
5.4.8.5.	Mapowanie struktury drugorzędowej RNA w kompleksie z białkiem PTB1	184
5.4.8.6.	Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA <i>in silico</i>	184
5.4.9.	Otrzymywanie rekombinantowego białka PTB1	185
5.4.9.1.	Transformacja komórek bakteryjnych wektorem pET28A	185
5.4.9.2.	Nadekspresja białka PTB1	185
5.4.9.3.	Liza komórek bakteryjnych	185
5.4.9.4.	Oczyszczanie rekombinantowego białka PTB1	185
5.4.9.5.	Oczyszczanie na złożu Ni-NTA	186
5.4.9.6.	Oczyszczanie z wykorzystaniem techniki FPLC	186
5.4.10.	Analiza kompleksów białko PTB1–RNA za pomocą techniki opóźnionej migracji kompleksów w żelu poliakryloamidowym	187
5.4.11.	Zatrzymywanie kompleksów rybonukleoproteinowych na filtrach	187
5.4.12.	Translacja <i>in vitro</i>	188
5.4.13.	Polimorfizm pojedynczej nici DNA (SSCP)	189
Literatura	190

Spis stosowanych skrótów

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

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

A – adenozyzna

BSA – surowiczca albumina wołowa (ang. *bovine serum albumine*)

C — cytydyna

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

Cp — 3'-monofosforan cytydyny

c.p.m. — zliczenia rozpadów promieniotwórczych na minutę

DMS — siarczan dimetylu

DNA — kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP — trifosforan dowolnego deoksyrybonukleotydu

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

G — guanozyzna

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

ITAF — czynnik białkowy oddziałujący z IRES *in trans* (ang. *IRES trans-acting factor*)

Kd — stała dysocjacji

kDa — kilodaltony

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

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

nt — nukleotyd

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

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

PTB1 — białko wiążące z traktami polipirymidynowymi (ang. *polypyrimidine tract binding protein*)

r.p.m. – obroty na minutę (ang. *rotations per minute*)

RNA — kwas rybonukleinowy

RRM — motyw rozpoznający RNA (ang. *RNA recognition motif*)

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

SNP — polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)

SSCP — polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów (ang. *single strand conformational polymorphism*)

T — tymidyna

U — urydyna

uORF — mała otwarta ramka odczytu leżąca powyżej głównego kodonu inicjacyjnego (ang. *upstream open reading frame*)

Abstract

Tumor suppressor p53, the guardian of the genome, has been extensively studied for more than 30 years. It is one of the major transcription factors involved in cell cycle control, DNA repair and induction of apoptosis. p53 expression is regulated on several levels and one of them is translation initiation. The presence of multiple transcription initiation sites, alternative splicing events and alternative translation initiation codons causes that the 5'-terminal region of p53 mRNA plays a crucial role in translation initiation of p53 protein and its N-terminally truncated isoform, Δ Np53. Internal translation initiation of p53 and its isoform has been also suggested which is possible through a putative IRES element present in the 5' untranslated region. Finally, several protein factors have been identified which interact with the 5'-terminal region of p53 mRNA. However, their exact role in translation regulation is largely unknown.

In this thesis secondary structure of the several variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA has been determined. It turns out that a part of the coding sequence is involved in the folding of the 5' untranslated region of p53 mRNA. The most characteristic structural element that is formed in this region is a large hairpin motif. In the central part of this structure the initiation codon for the p53 protein is embedded. Structural environment of the p53 protein initiation codon seems to be thermodynamically less stable than other parts of the hairpin which can play an important role in recognition between p53 mRNA and the translational machinery. The secondary structure of the 5'-terminal region is preserved not only in longer fragments of p53 mRNA but also in the full length molecule. Moreover, SSCP analysis of this region revealed high degree of sequence conservation. It suggests an important role of this region in translation initiation. Secondary structure of two extended variants of 5'-terminal region of p53 mRNA being a consequence of the transcription initiation from the upstream promoter, as well as retention of intron 2, has been also determined. It turns out that the region between two transcriptional promoters folds independently in relation to the downstream sequence and forms several small, relatively unstable hairpin motifs. Retention of the intron 2 sequence in p53 mRNA causes disappearance of important structural motifs and creation of interaction leading to formation of new structures. However, the large hairpin motif with the p53 initiation codon is still present.

Alternative mechanisms of p53 mRNA translation initiation have been investigated. The results show that translation initiation of the p53 protein is mostly cap-dependent since the process is stimulated by a cap structure but strongly inhibited by a stable hairpin motif introduced at the 5' end of model mRNA. The translation initiation of the Δ Np53 isoform shows largely

a cap-independent character. The 5' cap structure actually decreases its synthesis. Moreover, blocking cap-dependent translation by a stable hairpin does not change the level of Δ Np53 isoform translation, suggesting the presence of an IRES element.

Formation of ribonucleoprotein complexes that are formed between polypyrimidine tract binding protein 1 (PTB1) and the 5'-terminal region of p53 mRNA is also characterized. Probing of RNA structure in the complex with this protein allowed to identify possible regions of PTB1 interactions. PTB1 binds to the long polypyrimidine tracts located mainly in the stretch of coding sequence which is important for proper folding of the 5'-terminal region of p53 mRNA. PTB1 binding also leads to the formation of higher-order complexes containing presumably multiple copies of the protein. Quantitative analysis of RNA–protein complexes formation by filter binding assay revealed that PTB1 has the greatest affinity for variants of the 5'-terminal region containing part of the coding sequence. This indicates that proper structure of the 5'-terminal region of p53 mRNA is required for PTB1 binding. The influence of PTB1 protein on p53 and Δ Np53 synthesis was determined in *in vitro* translation. It turns out that PTB1 inhibits synthesis of both proteins. Moreover, the level of translation inhibition is correlated with the affinity of PTB1 to different fragments of p53 mRNA.

Streszczenie

Białko p53 jest jednym najważniejszych czynników transkrypcyjnych w komórce. Zaangażowane jest w wiele procesów, takich jak kontrola cyklu komórkowego, naprawa DNA oraz indukcja apoptozy. Ekspresja białka p53 regulowana jest na wielu poziomach, a jednym z nich jest inicjacja translacji. Aktywność kilku promotorów transkrypcyjnych w genie *p53*, alternatywne składanie pre-mRNA oraz obecność alternatywnych kodonów inicjacyjnych powoduje, że region terminalny 5' mRNA p53 odgrywa istotną rolę w ekspresji białka p53. W regionie tym zidentyfikowano element typu IRES, dzięki któremu możliwa jest niezależna od obecności kapu inicjacja translacji białka p53, a także jego izofory $\Delta Np53$, skróconej z końca aminowego o 39 reszt aminokwasowych. Ponadto, zidentyfikowano szereg czynników białkowych, oddziałujących z regionem terminalnym 5' mRNA p53, które regulują jego ekspresję. Jednakże ich dokładna rola nie została jak dotąd poznana.

W niniejszej pracy doktorskiej zbadano strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że w prawidłowym związaniu struktury tego regionu kluczową rolę odgrywa oddziaływanie, do jakiego dochodzi między regionem niekodującym 5' a sekwencją kodującą. Dzięki temu, tworzy się charakterystyczna struktura typu spinki. W jej obrębie zlokalizowanych jest szereg motywów strukturalnych, takich jak jednonukleotydowe wybrzuszenia i wielonukleotydowe wypętlania. Ponadto, w centralnej części spinki znajduje się kodon inicjacyjny białka p53. Analiza struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53 wykazała, że otoczenie kodonu inicjacyjnego białka p53 jest mniej stabilnym elementem niż inne części struktury, co może mieć istotne znaczenie w oddziaływaniu mRNA z maszyną translacyjną. Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' zostaje zachowana w dłuższych fragmentach mRNA p53, a także w cząsteczce o pełnej długości. Ponadto, przeprowadzona analiza zmienności sekwencji tego regionu metodą SCCP wskazała na jej wysoką zachowawczość. Wyniki te świadczą o istotnej roli regionu terminalnego 5' mRNA p53 w procesie inicjacji translacji białka p53. W toku prowadzonych badań określono także strukturę wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53, wynikających z aktywności alternatywnego promotora transkrypcyjnego, a także zachowania sekwencji intronu 2. Okazało się, że region między promotorami transkrypcyjnymi związa się niezależnie od reszty cząsteczki i nie ma wpływu na aranżację struktury motywów leżących w sekwencji poniżej. Z kolei, zachowanie intronu 2 w transkrypcji prowadzi do rozpadu niektórych ważnych motywów strukturalnych w regionie terminalnym 5' oraz powstania nowych, wynikających z oddziaływania między regionem niekodującym 5' a sekwencją intronu 2. Jednakże struktura typu spinki, zawierająca kodon inicjacyjny białka p53, zostaje zachowana niezależnie od

obecności intronu 2.

Podjęto również próbę wyjaśnienia alternatywnych mechanizmów inicjacji translacji białka p53 i jego izoformy $\Delta Np53$. Badania wykazały, że translacja białka p53 jest w dużej mierze zależna od kapu, ponieważ jego obecność silnie stymulowała translację. Ponadto, po wprowadzeniu stabilnej struktury typu spinki na końcu 5' modelowego mRNA, w celu inhibicji translacji zależnej od kapu, poziom białka p53 drastycznie spadł. Z kolei, inicjacja translacji izoformy $\Delta Np53$ jest głównie niezależna od kapu. Przemawia za tym spadek poziomu syntezy tego białka w obecności kapu na końcu 5' mRNA. Dodatkowo, stabilna struktura typu spinki nie miała wpływu na poziom syntezy tej izoformy. Otrzymane wyniki sugerują, że za syntezę $\Delta Np53$ może być odpowiedzialny element IRES.

Scharakteryzowano również oddziaływanie między białkiem wiążącym się z traktami polipiryimidynowymi (PTB1) a regionem terminalnym 5' mRNA p53. Analiza struktury drugorzędowej RNA w kompleksie z białkiem wykazała, że PTB1 wiąże się głównie w części kodującej mRNA, istotnej dla prawidłowego zwinienia się regionu terminalnego 5'. Wiązanie białka PTB1 jest kooperatywne i prowadzi do powstania kompleksów wyższego rzędu, zawierających prawdopodobnie wiele kopii białka. Badania mające na celu wyznaczenie stałej dysocjacji wiązania białka PTB1 do RNA wskazały, że ma ono zróżnicowane powinowactwo do wariantów sekwencyjnych regionu terminalnego 5'. Największe powinowactwo zaobserwowano względem wydłużonego wariantu mRNA p53 co oznacza, że prawidłowe otoczenie strukturalne miejsca wiązania białka PTB1 tworzy się dopiero we fragmentach mRNA p53 zawierających istotną część sekwencji kodującej. Przeanalizowano również wpływ białka PTB1 na efektywność translacji białka p53 i izoformy $\Delta Np53$. Wzrastająca ilość białka PTB1 w reakcji translacji *in vitro* prowadziła do inhibicji syntezy obydwu białek. Dodatkowo zaobserwowano, że efekt inhibicji był zależny od stopnia powinowactwa białka do regionu terminalnego 5' mRNA p53.

1. Wprowadzenie i cel pracy

Ekspresja genów u organizmów eukariotycznych jest skomplikowanym, wieloetapowym procesem, który rozpoczyna się od remodelowania chromatyny, a następnie poprzez transkrypcję i dojrzewanie pre-mRNA kończy się syntezą białek. Każdy z tych etapów ulega ciągłej regulacji przez setki czynników (białek i RNA) oddziałujących bezpośrednio lub pośrednio z sekwencjami DNA lub RNA. W szczególności, regulacja na poziomie inicjacji translacji umożliwia komórce bardzo szybką odpowiedź na bodźce fizjologiczne i stresowe. Etap ten jest kontrolowany nie tylko poprzez regulację dostępności czynników translacyjnych i podjednostek rybosomalnych, zaangażowanych w tworzenie kompleksu inicjacyjnego i dojrzałego rybosomu, ale też na poziomie cząsteczek mRNA, zwłaszcza z zaangażowaniem ich regionów terminalnych 5' [1]. Regiony te posiadają szereg cech wpływających w bardzo istotny sposób na inicjację syntezy białek. Są to: struktura kapu obecna na końcu 5', możliwość współwystępowania alternatywnych regionów niekodujących wskutek aktywności kilku promotorów transkrypcyjnych oraz alternatywnego składania pre-mRNA, kontekst sekwencji wokół kodonu inicjacyjnego, małe otwarte ramki odczytu leżące powyżej głównego kodonu inicjacyjnego [2-4]. Regiony terminalne 5' cząsteczek mRNA wpływają na kontrolę inicjacji translacji także dzięki tworzeniu się w ich obrębie drugo- i trzeciorzędowych struktur RNA. Powstają dzięki temu miejsca oddziaływania licznych ligandów takich jak białka, cząsteczki mikroRNA i antysensowne RNA. Wyżej wymienione elementy wpływają istotnie na to, w jaki sposób osiągnięta zostanie pozycja kodonu AUG przez kompleks inicjacyjny. Białka mogą bowiem powstawać nie tylko w sposób zależny od kapu, a następnie migracji kompleksu inicjacyjnego wzdłuż regionu niekodującego 5', lecz także w wyniku przynajmniej kilku alternatywnych mechanizmów, takich jak inicjacja wewnętrzna z wykorzystaniem elementu IRES (ang. *internal ribosome entry site*), reinicjacja translacji czy tzw. skaning przeciekowy (ang. *leaky scanning*) [3]. Wybór alternatywnego mechanizmu inicjacji translacji zależy w dużej mierze od zdolności tworzenia struktur drugo- i trzeciorzędowych w regionie terminalnym 5' mRNA. Ich lokalizacja w stosunku do końca 5' cząsteczki i kodonu AUG oraz organizacja struktury przestrzennej, odgrywają często ważną rolę w wyborze danego mechanizmu syntezy [3]. Pomimo postulowanej istotnej roli struktury RNA regionów niekodujących w procesie translacji jest ona niemal nieznaną, ponieważ w przeważającej liczbie przypadków są one badane przede wszystkim w aspekcie funkcjonalnym.

Celem mojej pracy doktorskiej była kompleksowa analiza struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53, a także roli tego regionu w procesie inicjacji translacji. Zdecydowałem się właśnie na ten obiekt badawczy, ponieważ przez ponad 30 lat badań nad genem i białkiem p53,

które jest jednym z najważniejszych w komórce, dopiero niedawno zainteresowano się bardziej mechanizmami regulującymi ekspresję cząsteczki mRNA p53. Zaowocowało to wieloma odkryciami m.in. kilkunastu białek wiążących się do tego mRNA, regulujących efektywność translacji, a ponadto postulowanej wewnętrznej inicjacji translacji białka p53 oraz jego izoformy Δ Np53, dzięki obecności elementu IRES. Pomimo tego, nie scharakteryzowano struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53.

Cel, który sobie postawiłem zamierzałem osiągnąć w kilku etapach:

1. Poznanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53.
2. Analiza zmienności genetycznej regionu terminalnego 5' genu *p53* w kontekście potencjalnego wpływu polimorfizmów na strukturę drugorzędową RNA.
3. Translacja *in vitro* wybranych wariantów mRNA p53 w modelowym układzie lizatu z retikulocytów królika, w celu scharakteryzowania alternatywnych mechanizmów inicjacji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53.
4. Analiza struktury wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 powstających w wyniku alternatywnego wyboru miejsca inicjacji transkrypcji oraz alternatywnego składania pre-mRNA (zachowanie intronu 2).
5. Zbadanie wpływu białka PTB1, wiążącego się z traktami bogatymi w reszty pirymidynowe, na strukturę i funkcję regionu terminalnego 5' mRNA p53.

2. Wstęp

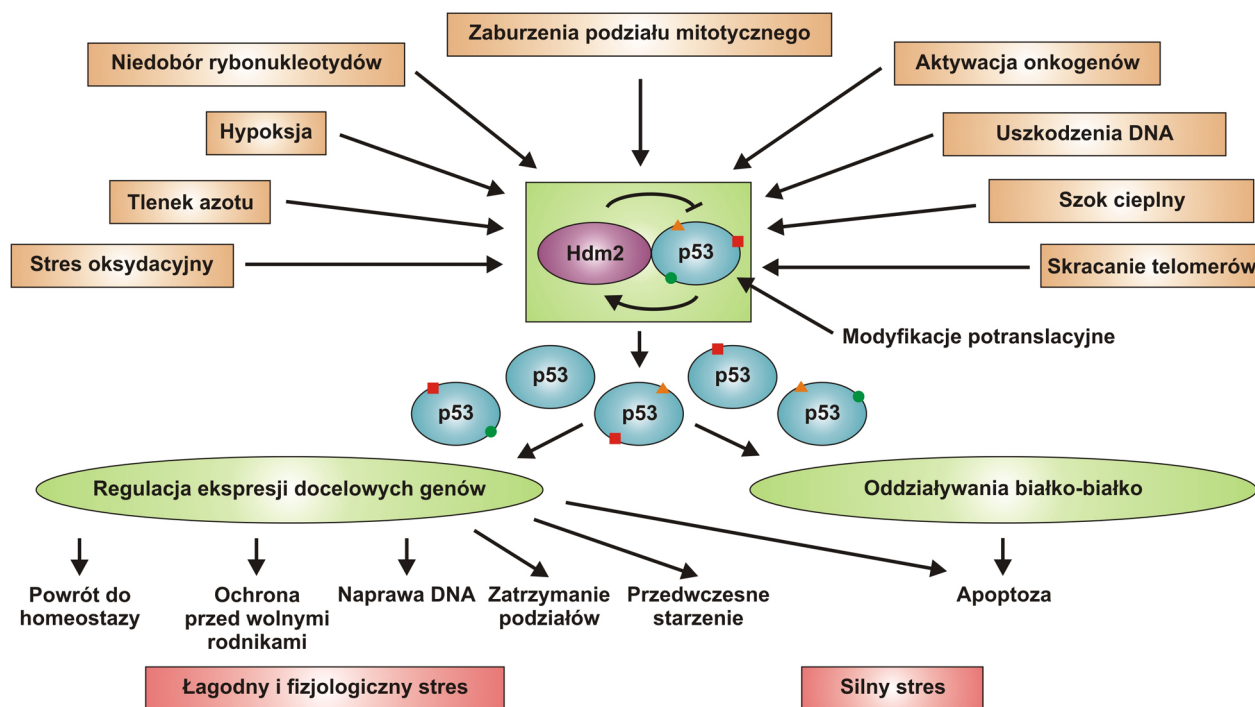
2.1. Białko p53 – strażnik genomu

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym o właściwościach supresora nowotworzenia, który pełni wiele bardzo istotnych funkcji, decydujących często o losach komórki. Jest kluczowym czynnikiem podczas takich procesów jak cykl komórkowy, naprawa DNA czy apoptoza. Z tego względu nazywany jest często „strażnikiem genomu”, ponieważ jego aktywność zapewnia stabilność materiału genetycznego i chroni go przed mutacjami, które mogą prowadzić do nowotworzenia.

W warunkach fizjologicznych, białko p53 utrzymywane jest na bardzo niskim poziomie, wskutek ubikwitynacji i degradacji w proteasomie. Sprawia to, że okres półtrwania białka p53 w komórce wynosi zaledwie 5–20 minut [5]. Większość p53 syntetyzowana *de novo* kierowana jest bezpośrednio do degradacji w proteasomie typu 20S. Pozostała pula ulega degradacji regulowanej przez przyłączanie podjednostek ubikwityny, a następnie skierowanie do degradosomu typu 26S [6]. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za degradację p53 jest białko Hdm2 (ang. *human double minute 2*). Zawiera ono domenę typu RING (ang. *really interesting new gene*), za pomocą której Hdm2 wiąże się do p53 w obrębie końca aminowego [5]. Wiązanie Hdm2 do p53 wywołuje przynajmniej trzy efekty. Uniemożliwia oddziaływanie białka p53 z czynnikami maszynierii transkrypcyjnej, co hamuje indukcję ekspresji genów, stymuluje translokację p53 do cytoplazmy, a wskutek przyłączenia reszt ubikwityny inicjuje proces degradacji [5, 6].

Szerokie spektrum czynników stresowych może prowadzić do aktywacji białka p53. Są to między innymi czynniki uszkodzające DNA (promieniowanie γ lub UV, wolne rodniki, inhibitory topoizomeraz), mutageny indukujące tworzenie adduktów DNA (aflatoksyny, czynniki alkilujące), czynniki blokujące elongację transkrypcji, a także uszkodzenia wrzeciona podziałowego, obniżenie poziomu rybonukleotydów, szok cieplny, hypoksja i wiele innych (Rys. 1) [7]. Aktywacja p53 zachodzi głównie w wyniku modyfikacji potranslacyjnych, gdyż białko to zawiera wiele miejsc, które mogą ulegać między innymi fosforylacji lub acetylacji. Typ oraz rozkład modyfikacji wpływa na to jaka droga odpowiedzi na czynnik stresowy zostanie wybrana. Przykładowo, w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, p53 ulega fosforylacji w regionie oddziaływania z białkiem Hdm2, co powoduje jego uwolnienie z kompleksu z Hdm2 i aktywację [7]. Następnie, p53 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie uruchamia szereg zdarzeń w komórce, głównie wskutek indukcji transkrypcji określonych genów (Rys. 1). Są to między innymi geny czynników zaangażowanych w

regulację cyklu komórkowego, apoptozę czy też naprawę DNA. To, jaki rodzaj odpowiedzi wywoła białko p53 zależy od rodzaju czynnika stresowego oraz od jego siły. Może to być m.in. indukcja apoptozy, przedwczesne starzenie lub zatrzymanie podziału komórki. Dwa pierwsze mechanizmy prowadzą do śmierci komórki. Natomiast zatrzymanie podziału komórkowego daje możliwość uruchomienia procesów naprawczych, a więc szansę na przetrwanie [7].



Rysunek 1. Uproszczony schemat obrazujący rolę białka p53 w komórce.

2.2. Budowa białka p53

Białko p53 ma masę cząsteczkową 43,7 kDa i zbudowane jest z 393 reszt aminokwasowych [5, 8]. Nazwa p53 wzięła się z tego, że ze względu na duży udział reszt prolinowych białko to podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących migruje jak białko o masie cząsteczkowej 53 kDa. p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, zbudowanym z kilku funkcjonalnych domen: N-końcowej domeny transaktywacyjnej, domeny oddziałującej z DNA, domeny tetrameryzacji oraz domeny regulatorowej (Rys. 2) [5, 8]. W białku p53 znajduje się pięć regionów cechujących się wysoką zachowawczością sekwencji aminokwasowej u wielu organizmów. Pierwszy z nich zlokalizowany jest w domenie transaktywacyjnej (reszty 13–26), a pozostałe w domenie oddziałującej z DNA (Rys. 2) [5].



Rysunek 2. Budowa białka p53. Regiony wykazujące wysoką zachowawczość sekwencji aminokwasowej zaznaczono kolorem szarym.

2.2.1. Domena transaktywacyjna

N-końcowa domena transaktywacyjna, NTD (ang. *amino-terminal transactivation domain*) obejmuje reszty aminokwasowe 1–97. Jest nieustrukturalizowana i składa się z dwóch poddomen: TAD1 (reszty 1–40) i TAD2 (reszty 43–73) oraz regionu bogatego w reszty prolinowe [5, 8] (Rys. 2). W jej granicach zlokalizowana jest również sekwencja odpowiedzialna za eksport białka z jądra do cytoplazmy, NES (ang. *nuclear export sequence*). Z domeną NTD oddziałują liczne białka wchodzące w skład maszyny transkrypcyjnej, które regulują zdolność p53 do aktywacji ekspresji genów [5]. W normalnych warunkach, z domeną NTD oddziałuje także główny regulator poziomu p53 w komórce, jakim jest białko Hdm2. Wiążąc się do reszt 15–29 poddomeny TAD1 indukuje ubikwitynację, która wprowadza p53 na szlak degradacji [5, 9]. W odpowiedzi na warunki stresowe niektóre reszty aminokwasowe domeny transaktywacyjnej ulegają fosforylacji, co uniemożliwia wiązanie Hdm2, prowadząc do stabilizacji p53 i jednoczesnej translokacji do jądra komórkowego [5, 9].

2.2.2. Domena oddziaływania z DNA

Domena oddziaływania z DNA, DBD (ang. *DNA binding domain*) (reszty 102–292) jest centralną i największą częścią białka (Rys. 2). Dzięki niej p53 ma zdolność wiązania się do sekwencji regulatorowych obecnych w docelowych genach [5, 8]. O kluczowej roli jaką pełni ta domena świadczy to, że prawie 80% wszystkich mutacji w genie *p53* znaleziono w jej obrębie [10, 11]. Z reguły, mutacje w DBD osłabiają bądź uniemożliwiają wiązanie p53 do DNA, w wyniku czego dochodzi do zaburzenia kontroli procesów komórkowych pozostających pod kontrolą tego białka. Domena DBD jest również miejscem oddziaływania z licznymi białkami, które regulują aktywność p53 [12].

2.2.3. Domena tetrameryzacji

Domena tetrameryzacji, TD (ang. *tetramerisation domain*) (reszty 325–356) odpowiedzialna jest za tworzenie aktywnej formy p53, homotetrameru. Jest ona niezwykle ważna, ponieważ w takiej formie p53 ma wysokie powinowactwo do DNA oraz szeregu białek [5, 8]. W sekwencji domeny TD znajdują się liczne miejsca modyfikacji potranslacyjnych, które wpływają na

zdolność do oligomeryzacji, a także sekwencja lokalizacji jądrowej, NLS (ang. *nuclear localization sequence*) [5, 8].

2.2.4. Domena regulatorowa

Obejmuje reszty 363–393 (Rys. 2). Domena ta ma istotne znaczenie w aktywności transkrypcyjnej białka p53 poprzez zwiększanie powinowactwa do specyficznych sekwencji DNA. Zaangażowana jest również w zdolność p53 do migracji wzdłuż nici DNA, w celu poszukiwania sekwencji promotorowych [12]. Duża zawartość reszt serynowych i lizynowych sprawia, że domena regulatorowa jest miejscem licznych modyfikacji potranslacyjnych. Jest to głównie fosforylacja, regulująca zdolność p53 do oddziaływania z innymi białkami oraz zależna od Hdm2 ubikwitynacja [5, 8].

2.3. Modyfikacje potranslacyjne białka p53

Podwyższony poziom białka p53 może być bardzo niebezpieczny dla komórki ze względu na możliwość niekontrolowanej indukcji apoptozy lub zatrzymania cyklu komórkowego. Z tego względu, z jednej strony aktywność p53 w warunkach fizjologicznych musi być ściśle kontrolowana, a z drugiej niezbędna jest obecność mechanizmów umożliwiających szybką akumulację p53 w odpowiedzi na czynniki stresowe. Jednym z głównych mechanizmów regulujących aktywność p53 są modyfikacje potranslacyjne. p53 może ulegać przynajmniej 10 różnym modyfikacjom, z czego najlepiej poznane zostały fosforylacja, acetylacja i ubikwitynacja (Rys. 3) [5, 10, 13]. Zważywszy na to, że p53 zaangażowane jest w wiele różnych procesów zarówno w jądrze komórkowym jak i cytoplazmie, mamy tak naprawdę do czynienia z sytuacją, w której w komórce istnieje jednocześnie wiele form białka p53, różniących się rozkładem modyfikacji potranslacyjnych [14]. Analiza wpływu modyfikacji na funkcje białka p53 jest zatem bardzo trudna, tym bardziej, że wiele reszt aminokwasowych może ulegać różnym modyfikacjom w zależności od tego, w jaki proces zaangażowane jest p53.

2.3.1. Fosforylacja

W sekwencji białka p53 znajdują się 23 potencjalne miejsca, które mogą ulegać fosforylacji [10]. Zlokalizowane są głównie w aminowej i karboksylowej części p53 (Rys. 3). Fosforylacja uruchamiana jest zazwyczaj w odpowiedzi na różnego rodzaju czynniki stresowe (uszkodzenia DNA czy też aktywacja onkogenów) [5, 15]. Wywołuje to zwiększenie komórkowego poziomu

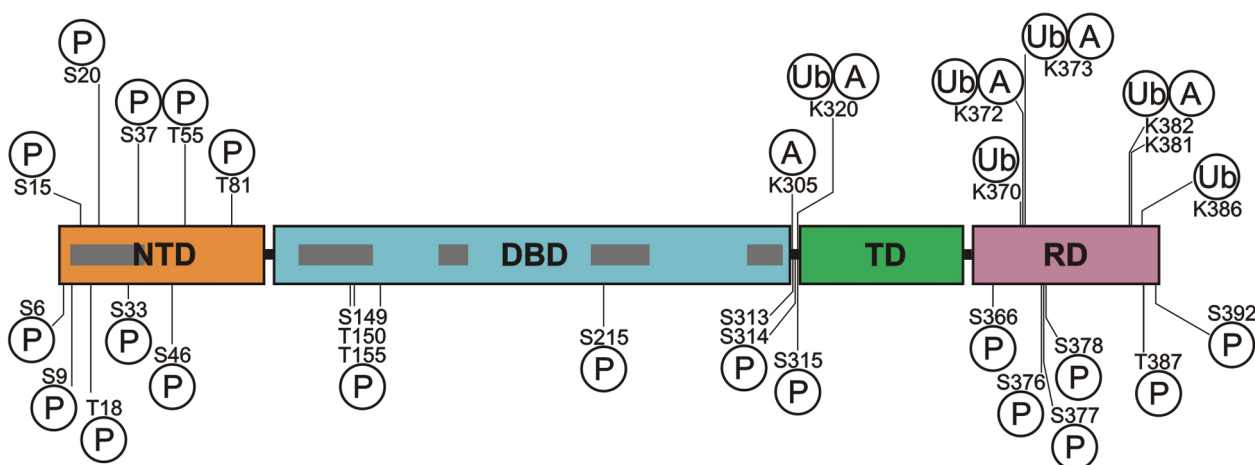
p53 wskutek zmniejszenia tempa degradacji i dodatkowo silniejsze powinowactwo do sekwencji docelowych w DNA [5, 14].

2.3.2. Acetylacja

p53 było pierwszym zidentyfikowanym białkiem niehistonowym, które może ulegać acetylacji [14]. Wszystkie reszty aminokwasowe ulegające acetylacji zlokalizowane są w domenie tetrameryzacji i regulatorowej (Rys. 3). Podobnie jak fosforylacja, acetylacja uruchamiana jest głównie w wyniku działania czynników stresowych i powoduje aktywację białka p53. Acetylowane p53 ma znacznie większą zdolność do oddziaływania z białkami maszynierii transkrypcyjnej, przez co zwiększa się jego potencjał do indukcji ekspresji określonych genów [5, 14].

2.3.3. Ubikwitynacja

Ubikwitynacja jest jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie niskiego poziomu p53 w komórce w warunkach fizjologicznych. Najważniejszym czynnikiem zaangażowanym w ten proces jest białko Hdm2, które wykazuje aktywność ligazy ubikwitynowej [5, 15]. Białko Hdm2 dzięki obecności domeny typu RING wiąże się do poddomeny TAD1 w p53 (aminokwasy 15–29), po czym przyłącza jednostki ubikwityny do reszt lizynowych znajdujących się w jego części karboksylowej (Rys. 3) [5, 15]. Ilość przyłączonych jednostek ubikwityny decyduje o losach p53. Poliubikwitynacja kieruje p53 do degradacji w degradosomie [5]. Z kolei monoubikwitynacja osłabia lub uniemożliwia oddziaływanie p53 z białkami maszynierii transkrypcyjnej [5, 15]. Monoubikwitynacja zmienia także lokalizację p53 z jądrowej na cytoplazmatyczną, wskutek czego białko to nie może funkcjonować jako czynnik transkrypcyjny [5, 15]. Podczas warunków



Rysunek 3. Modyfikacje potranslacyjne białka p53. P – fosforylacja, A – acetylacja, Ub – ubikwitynacja, S, T, K – reszty seryny, treoniny i lizyny [10].

stresowych p53 ulega modyfikacjom potranslacyjnym, co zaburza oddziaływanie z Hdm2, poziom p53 oraz jego stabilność wzrastają i białko ulega translokacji do jądra komórkowego [5]. Interesujące jest, że p53 stymuluje transkrypcję genu *Hdm2*. Dzięki temu podwyższenie poziomu białka p53 w komórce prowadzi do zależnej od Hdm2 degradacji p53. Pozwala to przywrócić niski poziom p53 w komórce po tym, jak czynnik stresowy przestanie działać [5, 15].

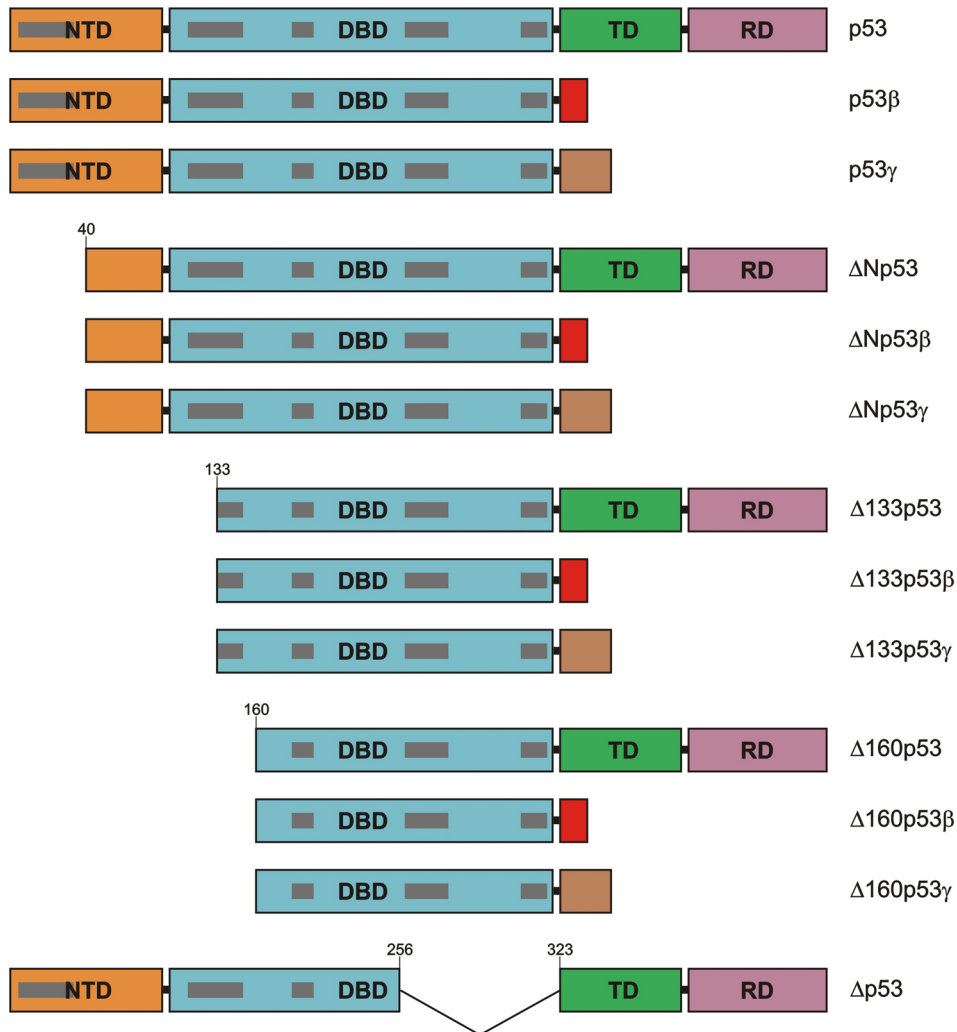
2.4. Geny *p63* i *p73*

Tak zwaną „rodzinę p53” oprócz genu *p53* tworzą jeszcze dwa inne geny: *p63* i *p73*. Wszystkie tworzą grupę czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w odpowiedź komórki na czynniki stresowe. Tak jak w przypadku białka p53, również p63 i p73 mają charakterystyczną dla czynników transkrypcyjnych budowę: N-kończącą domenę transaktywacyjną, domenę oddziaływania z DNA i karboksylową domenę oligomeryzacji. Wykazują też wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej do p53, szczególnie w obrębie domeny oddziaływania z DNA [16]. Wysoka zachowawczość sekwencji w tym regionie umożliwia p63 i p73 indukcję transkrypcji niektórych genów pozostających pod kontrolą białka p53. Geny *p63* i *p73* wykazują podobieństwo do genu *p53* również pod względem obecności kilku promotorów transkrypcyjnych, alternatywnych form mRNA, a nawet (w przypadku *p73*) możliwości syntezy białka w sposób niezależny od kapu [16, 17]. Powyższe cechy wspólne oraz to, że w genomach bezkręgowców można znaleźć tylko pojedynczy gen kodujący białko z rodziny p53 pozwalają przypuszczać, że *p53*, *p63* i *p73* obecne w genomach wyższych organizmów wyewoluowały z jednego genu [16]. Chociaż p63 i p73 wykazują podobieństwo do p53 w wielu aspektach, to posiadają także szereg unikalnych funkcji. p63 odgrywa istotną rolę w rozwoju komórek nabłonkowych, podczas gdy p73 jest niezbędny dla rozwoju układu nerwowego [18].

2.5. Izoformy białka p53

Początkowo sądzono, że gen *p53* ma prostszą budowę niż geny *p63* i *p73*, z których może powstawać wiele izoform białkowych. Jednakże systematyczne badania wykazały, że z ludzkiego genu *p53* obok białka o pełnej długości, może powstawać aż 11 różnych izoform w wyniku obecności kilku promotorów transkrypcyjnych, alternatywnego składania pre-mRNA oraz alternatywnych form inicjacji translacji (Rys. 4) [9, 12, 16, 19]. Izoformy p53 mogą być zbudowane z różnych domen, co umożliwia im pełnienie funkcji częściowo niezależnie od białka p53 o pełnej długości. Można wyróżnić trzy typy izoform p53: skrócone z końca aminowego, skrócone z końca karboksylowego oraz skrócone z obydwu końców (Rys. 4). Do pierwszej grupy należą: $\Delta Np53$, $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$. Do drugiej można zaliczyć $p53\beta$ i $p53\gamma$. Trzecią grupę reprezentują

$\Delta Np53\beta$, $\Delta Np53\gamma$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$, $\Delta 160p53\beta$ i $\Delta 160p53\gamma$. Osobny przykład stanowi izoforma $\Delta p53$, która posiada delecję dystalnej części domeny oddziaływania z DNA.

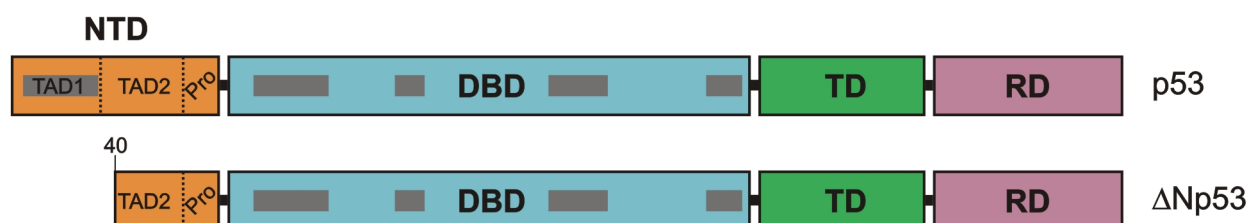


Rysunek 4. Izoformy białka p53.

2.5.1. Izoforma $\Delta Np53$

Izoforma $\Delta Np53$ (nazywana również $\Delta 40p53$ lub p47) zbudowana jest z 354 reszt aminokwasowych i ma masę cząsteczkową 39,3 kDa. Od białka o pełnej długości różni się tym, że nie posiada początkowych 39 reszt aminokwasowych, a zatem pozbawiona jest pierwszej poddomeny transaktywacyjnej TAD1 (Rys. 5). Jej synteza rozpoczyna się od wewnętrznego kodonu AUG zlokalizowanego w egzonie 4 mRNA p53 i może zachodzić w wyniku alternatywnego składania intronu 2 lub z wykorzystaniem mechanizmu wewnętrznej inicjacji translacji [20-22]. Badania wskazują, że w warunkach fizjologicznych $\Delta Np53$ zlokalizowane jest w jądrze komórkowym, a w odpowiedzi na czynniki stresowe ulega eksportowi do cytoplazmy [20]. Jest to zatem istotna różnica w porównaniu do pełnej długości białka p53, które w warunkach stresowych ulega akumulacji i relokalizacji z cytoplazmy do jądra komórkowego. Kolejną zasadniczą różnicą jest

okres półtrwania izoformy $\Delta Np53$ wynoszący około 9 godzin. Spowodowane jest to brakiem poddomeny TAD1 dzięki czemu jest ona odporna na zależną od Hdm2 ubiquitynację i degradację. Chociaż $\Delta Np53$ może wiązać się do tych samych sekwencji w DNA co p53, prawdopodobnie samodzielnie nie jest w stanie indukować transkrypcji [20, 23]. Może jednak regulować ekspresję genów pozostających pod kontrolą p53 oraz innych genów, związanych głównie z procesem apoptozy, wskutek oddziaływania z dodatkowymi białkami maszynarii transkrypcyjnej [24].



Rysunek 5. Białko p53 i izoforma $\Delta Np53$.

Początkowo odkryto, że obecność niewielkich ilości izoformy $\Delta Np53$ w komórce może hamować zdolność białka p53 do aktywacji transkrypcji określonych genów [23]. Ponadto, wzajemny stosunek obydwu białek różnił się w zależności od etapu cyklu komórkowego, co tłumaczono tym, że $\Delta Np53$ może funkcjonować jako przejściowy, negatywny regulator aktywności p53 [21, 23]. Udział izoformy $\Delta Np53$ w negatywnej kontroli aktywności białka p53 polega na tworzeniu z nim homodimerów i homotetramerów. Co więcej, kompleksy p53– $\Delta Np53$ tworzą się znacznie łatwiej niż kompleksy p53–p53 [20]. Niektóre obserwacje sugerują, że może mieć to istotne znaczenie w kontroli aktywności białka p53. Po pierwsze, ze względu na brak poddomeny TAD1 w $\Delta Np53$, kompleksy p53– $\Delta Np53$ mogą być bardziej odporne na zależną od Hdm2 degradację. Potwierdza to obserwacja, że w komórkach, w których indukowano wysoki poziom izoformy $\Delta Np53$, białko o pełnej długości występowało na podwyższonym poziomie [25]. Po drugie, kompleksy p53– $\Delta Np53$ mogą wykazywać mniejszą zdolność do indukcji transkrypcji genów ze względu na to, że izoforma $\Delta Np53$ nie posiada części domeny transaktywacyjnej, z którą oddziałują istotne czynniki transkrypcyjne takie jak TFIID i TFIIH (ang. *transcription factor IID, IIH*) [26, 27]. Po trzecie wykazano, że kompleksy p53– $\Delta Np53$ mogą posiadać odmienny wzór modyfikacji potranslacyjnych niż kompleksy p53–p53 [28]. Może to wpływać zarówno na aktywność transkrypcyjną takich kompleksów jak i na zdolność oddziaływania z innymi białkami.

2.5.2. Izoformy $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$

Izoformy $\Delta 133p53$ i $\Delta 160p53$ są skutkiem aktywności promotora transkrypcyjnego Pint4, zlokalizowanego w obrębie intronu 4 genu *p53* (Rys. 4) [29]. Powstaje z niego mRNA, z którego mogą być syntetyzowane obie izoformy wskutek inicjacji translacji z kodonu AUG w pozycji 133 lub 160 [30]. Rezultatem jest brak domeny transaktywacyjnej w obydwu izoformach oraz

dotatkowo części domeny wiążącej DNA w $\Delta 160p53$ (Rys. 4). Zachodzi tu zatem sytuacja podobna jak w przypadku mRNA *p53* pełnej długości, gdy z jednego mRNA mogą powstawać dwa białka (*p53* i $\Delta Np53$), w wyniku obecności dwóch kodonów inicjacyjnych. Jak dotąd brak doniesień, czy synteza izoformy $\Delta 160p53$ (podobnie jak izoformy $\Delta Np53$) może zachodzić niezależnie od kapu.

2.5.3. Izofomy *p53* skrócone z końca karboksylowego

Izofomy *p53 β* i *p53 γ* powstają wskutek alternatywnego składania pre-mRNA *p53* w obrębie intronu 9 [29]. W przypadku białka *p53* o pełnej długości dochodzi do wycięcia intronu 9, natomiast jego częściowe zachowanie w dwóch różnych konfiguracjach wprowadza przedwczesny kodon terminacyjny (Rys. 4). Obie izofomy różnią się od białka *p53* o pełnej długości brakiem domeny tetrameryzacji oraz regulatorowej. Domeny te zostały zastąpione krótkim, kodowanym przez sekwencję intronu 9, 10-aminokwasowym regionem w *p53 β* i 15-aminokwasowym w *p53 γ* (Rys. 4). Połączenie opisanych powyżej alternatywnych zdarzeń na poziomie inicjacji transkrypcji, składania pre-mRNA oraz inicjacji translacji, prowadzi do powstania izoform *p53* skróconych z obydwu końców jednocześnie. Są to: $\Delta Np53\beta$, $\Delta Np53\gamma$, $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$, $\Delta 160p53\beta$ i $\Delta 160p53\gamma$ (Rys. 4) [31].

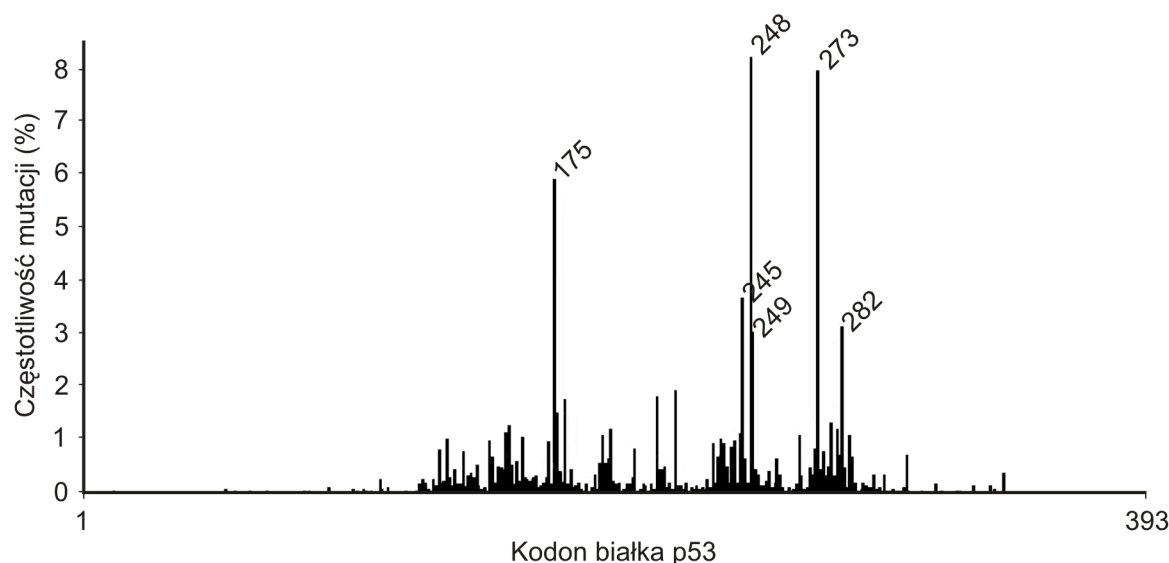
2.6. Mutacje i polimorfizmy w genie *p53*

Mutacje w genie *p53* są jedną z najczęściej spotykanych przyczyn dysfunkcji białka *p53*, które w bardzo wielu przypadkach prowadzą do procesu nowotworzenia. Gen *p53* wykazuje także dużą ilość polimorfizmów sekwencji, które niekiedy mogą predysponować do zwiększonej podatności na rozwój nowotworu. Wszystkie mutacje oraz polimorfizmy odkryte do tej pory w genie *p53* zgromadzone zostały w bazie danych IARC (ang. *international agency for reserch on cancer*, www.iarc.fr), która jest niezwykle cennym źródłem informacji w tym temacie.

2.6.1. Mutacje w genie *p53*

Mutacje w genie *p53* zostały opisane niemal we wszystkich rodzajach nowotworów. W zależności od rodzaju nowotworu i typu tkanki częstotliwość mutacji w genie *p53* waha się od 5 do 75% [7, 32, 33]. Spośród wszystkich mutacji 75% stanowią mutacje punktowe prowadzące do zmiany kodowanego aminokwasu, tzw. mutacje niesynonimiczne (ang. *missense mutations*), które w 88% zlokalizowane są w domenie oddziaływania z DNA (Rys. 6). W domenie tej mutacje niesynonimiczne zostały opisane niemal dla każdego kodonu, przy czym istnieje duża dysproporcja

w częstotliwości mutacji w zależności od pozycji. Przykładowo, 30% mutacji obserwowanych w domenie DBD występuje w obrębie pięciu kodonów: 175, 245, 248, 273 oraz 282 [7, 32].



Rysunek 6. Częstotliwość mutacji w genie *p53* w zależności od pozycji kodonu (www.iarc.fr).

Egzony 2 oraz 11, które kodują końce aminowy i karboksylowy białka *p53*, rzadko ulegają mutacjom (mniej niż 2%). Jest to ciekawa obserwacja, ponieważ regiony te zawierają ważne domeny regulatorowe oraz liczne miejsca modyfikacji potranslacyjnych [7, 32]. Co więcej, mutacje w tych regionach mogą wpływać nie tylko na funkcje białka *p53* ale też na mRNA *p53*. Świadczy o tym bardzo interesująca (i jedyna do tej pory) obserwacja, opisująca osłabienie oddziaływania białka Hdm2 z mRNA *p53* w wyniku mutacji synonimicznej w kodonie 22, która nie zmienia kodowanego aminokwasu lecz sekwencję mRNA (zmiana CUA w CUG). Osłabione powinowactwo Hdm2 do mRNA *p53* wynika prawdopodobnie z zaburzonej struktury drugorzędowej tego regionu [34]. Należy pamiętać, że badania zmienności genu *p53* dotyczą jednak głównie regionu kodującego domenę oddziaływania z DNA. Możliwe więc, że odnośnie regionów kodujących terminalne części białka *p53* istnieje pewne niedoszacowanie w ilości mutacji oraz polimorfizmów.

Obecność mutacji zmieniających kodowany aminokwas jest charakterystyczna dla genu *p53*, gdyż dla wielu innych białek funkcjonujących jako supresory nowotworzenia obserwuje się najczęściej mutacje wprowadzające kodon terminacyjny lub zmieniające ramkę odczytu. Prowadzi to zazwyczaj do powstania niefunkcjonalnej formy białka [35]. Mutacje niesynonimiczne powodują powstawanie zmutowanych wersji *p53*, które bardzo często cechują się nowymi właściwościami. Jednym z głównych skutków mutacji w genie *p53* jest osłabienie lub utrata zdolności białka *p53* do specyficznego oddziaływania z DNA oraz aktywności transkrypcyjnej, co obserwuje się dla mutantów wykazujących utratę funkcji (ang. *loss of function*) [7, 33]. W innym przypadku zmutowana forma białka ma negatywny wpływ na białko typu „dzikiego”. Biorąc pod uwagę to, że aktywną formą *p53* jest homotetramer, dochodzi do utworzenia heterotetramerów i częściowej lub

całkowitej inhibicji funkcji p53 nawet wtedy, gdy w komórce obecne jest nadal białko powstające z niezmutowanego allelu genu [7, 33]. W wyniku mutacji w genie *p53* mutanty mogą nabywać także nowych funkcji, których nie posiada białko typu „dzikiego” (ang. *gain of function*) [7, 33]. Jednym z najczęstszych efektów jest znaczny wzrost okresu półtrwania zmutowanych wersji p53, w wyniku czego ulega ono akumulacji w jądrze komórkowym. Inny efekt dotyczy możliwości aktywacji transkrypcji innych genów oraz oddziaływania z białkami, które w normalnych warunkach nie są rozpoznawane przez p53, np. p63 i p73 [7, 36].

2.6.2. Polimorfizm genu *p53*

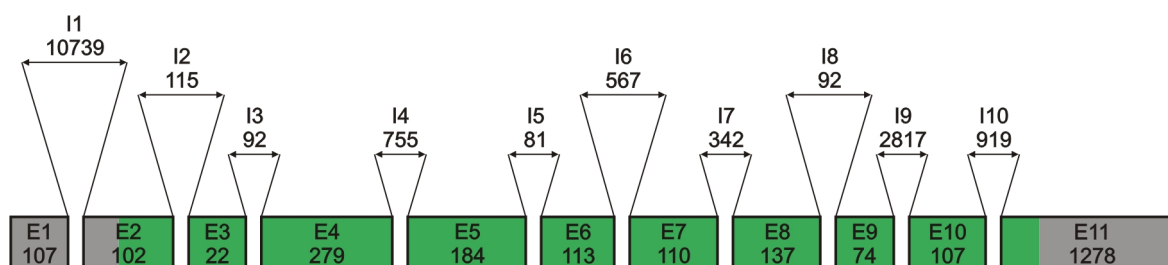
Jak dotąd zidentyfikowano 85 polimorfizmów sekwencji w genie *p53*, z czego większość to tzw. polimorfizmy pojedynczego nukleotydu, SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) [33]. 80% z nich występuje w sekwencjach intronów [33]. 19 polimorfizmów występuje w sekwencji egzonów, z czego 8 wprowadza zmianę typu synonimicznego. Takie polimorfizmy nie zmieniają sekwencji aminokwasowej białka, jednakże teoretycznie mogłyby wpływać na strukturę RNA, częstotliwość wykorzystania kodonów (ang. *codon usage*) czy tworzyć nowe miejsca składania pre-mRNA. Przykładowo, polimorfizmy w pozycji 21 (zmiana GAC w GAT), 34 (zmiana CCC w CCA) oraz 36 (zmiana CCG w CCA) leżą w regionie mRNA p53 istotnym dla oddziaływania z białkiem Hdm2. Takie zmiany w sekwencji mogłyby wpływać na subtelne różnice w strukturze tego regionu i tym samym na oddziaływanie z białkiem Hdm2. Pozostałe 11 polimorfizmów wprowadza zmiany niesynonimiczne, zmieniające sekwencję aminokwasową. Dla dwóch z nich istnieją dane, że ich obecność może predysponować do rozwoju choroby nowotworowej. Pierwszy, to rzadki polimorfizm w kodonie 47, który zmienia kodowany aminokwas z proliny na serynę, co osłabia fosforylację p53, zmniejszając tym samym jego aktywność [37]. Z tego względu sugeruje się, że prowadzi to do obniżonej stymulacji genów proapoptotycznych. Drugi, znacznie częstszy SNP w kodonie 72 wprowadza zmianę proliny na lizynę [38]. Choć opublikowano szereg prac, które powiązały jego występowanie ze zwiększoną zachorowalnością na nowotwór, to najnowsze badania nie potwierdzają jednak takiej korelacji [32, 33].

Oprócz polimorfizmów typu SNP w genie *p53* obserwuje się także zmienność dotyczącą dłuższych sekwencji. Wśród nich najlepiej scharakteryzowany jest polimorfizm dotyczący duplikacji 16 nukleotydowej sekwencji w intronie 3, którą powiązano ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niektórych nowotworów [39]. Są także doniesienia, że polimorfizm ten powiązany jest ze zmniejszonym poziomem mRNA p53, co sugeruje prawdopodobny udział tego regionu w regulacji dojrzewania pre-mRNA, być może wskutek wpływu na strukturę kwadrupleksu obecną w intronie 3 [40, 41].

2.7. Gen *p53* – promotory transkrypcyjne oraz alternatywne składanie jego pre-mRNA

2.7.1. Promotory transkrypcyjne genu *p53*

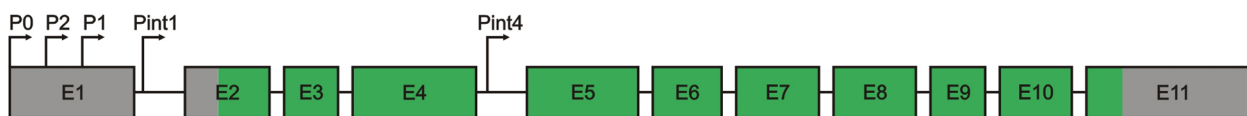
Gen *p53* występuje w pojedynczej kopii w ludzkim genomie. Obejmuje około 20 kbp i zlokalizowany jest na chromosomie 17. Zbudowany jest z 11 egzonów oraz 10 intronów (Rys. 7). Region niekodujący 5' utworzony jest przez egzon 1 oraz 28 nt egzonu 2, a jego długość w zależności od wyboru miejsca inicjacji transkrypcji wynosi od 140 do 250 nt. Region niekodujący 3' znajduje się w egzonie 11 i ma około 1200 nt.



Rysunek 7. Budowa genu *p53*. Część kodująca oznaczona jest kolorem zielonym. E1–E10, egzony, I1–I10, introny. Podane liczby oznaczają długości egzonów i intronów.

Do tej pory odkryto przynajmniej 5 regionów promotorowych w genie *p53* (Rys. 8). Trzy miejsca zidentyfikowano w regionie terminalnym 5' genu natomiast pozostałe 2 znajdują się w obrębie sekwencji intronowych. Gen *p53* zawiera liczne sekwencje regulatorowe, do których wiąże się ponad 15 różnych czynników transkrypcyjnych. Mają one głównie negatywny wpływ na jego ekspresję, co jest jednym z powodów tak niskiego poziomu *p53* w komórce w warunkach fizjologicznych [6, 42]. Najdalej położonym w kierunku 5' miejscem inicjacji transkrypcji jest promotor P0 (Rys. 8) [43]. Transkrypty rozpoczynające się w tym regionie posiadają region 5'UTR długości około 250 nt. Głównym miejscem inicjacji transkrypcji jest jednak najprawdopodobniej region określany jako promotor P1 [44]. Leży on około 110 nukleotydów poniżej miejsca P0 i powstają z niego transkrypty, których 5'UTR ma około 140 nt (Rys. 8). Promotor ten jest nietypowy, gdyż nie zawiera tzw. „kasety TATA”, a miejsc inicjacji transkrypcji jest kilka [43, 44]. Między promotorami P0 i P1 znajduje się kolejne miejsce inicjacji transkrypcji określane jako P2, które jest aktywne tylko w niektórych typach komórek (Rys. 8). Z tego promotora transkrypcyjnego mogą powstawać mRNA zawierające region 5'UTR długości około 200 nt [44, 45]. W sekwencji intronu 1, którego długość wynosi ponad 10000 nt znajduje się promotor Pint1, z którego powstaje transkrypt o nieznanym celu, kodowany całkowicie przez sekwencję tego intronu (Rys. 8) [46]. Z tego względu sądzi się, że locus genu *p53* może zawierać więcej niż jeden gen. W 2005 roku odkryto jeszcze jedno miejsce promotorowe, Pint4, zlokalizowane

w połowie intronu 4 (Rys. 8). mRNA powstający z tego miejsca zawiera część intronu 4 oraz następujące po nim sekwencje egzonów 5–11 [29].



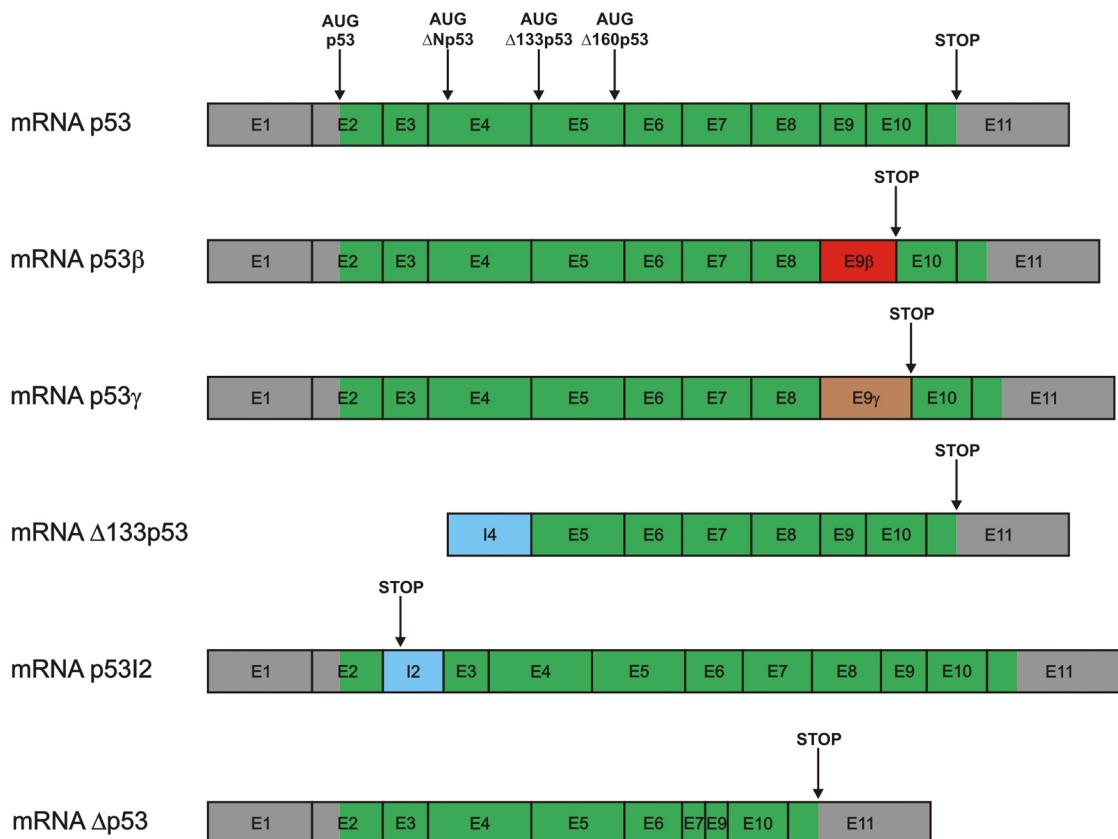
Rysunek 8. Lokalizacja promotorów transkrypcyjnych w genie *p53*.

Zważywszy na rolę jaką białko *p53* pełni w komórce, jego poziom musi być kontrolowany na wielu etapach ekspresji oraz na różne sposoby, zarówno w warunkach normalnych jak i podczas działania czynników stresowych. Już w 1985 roku zauważono, że sekwencja między promotorami P0–P1 ma negatywny wpływ na ekspresję białka *p53* [47]. Translacja genu reporterowego pod kontrolą tej sekwencji spadała do poziomu tła, co autorzy tłumaczyli istnieniem stabilnej struktury drugorzędowej w tym regionie. Wykazano również, że aktywność promotorów transkrypcyjnych genu *p53* jest specyficzna tkankowo oraz uzależniona od tego, czy mamy do czynienia ze zdrową czy chorą tkanką. Grupa Lazarusa jako jedyna przeprowadziła szereg badań sprawdzających, z którego miejsca promotorowego genu *p53* zachodzi transkrypcja, w zależności od typu i stanu komórek [45]. W wielu typach linii komórkowych, zarówno zdrowych jak i rakowych, zidentyfikowano tylko transkrypty *p53* rozpoczynające się w miejscu P1 [45]. Identyfikacja otrzymano badając tkanki pochodzące od osób chorych na różne rodzaje nowotworu [45]. Jednakże badając miejsca inicjacji transkrypcji w zdrowych tkankach stwierdzono, że częściej występują transkrypty rozpoczynające się w miejscu P0, a także to, że w jednym typie tkanki aktywnych może być kilka różnych promotorów. Autorzy zauważyli także bardzo silny spadek ekspresji genu reporterowego, gdy znajdowała się przed nim sekwencja odpowiadająca regionowi między promotorami P0–P1. Potwierdziło to wcześniejsze doniesienia o istnieniu negatywnego elementu w tym regionie [47].

2.7.2. Alternatywne składanie pre-mRNA *p53*

Składanie pre-mRNA jest jednym z etapów dojrzewania pierwotnych transkryptów, w którym dochodzi do wycięcia intronów z jednoczesnym łączeniem sekwencji egzonów [48, 49]. Alternatywne składanie pre-mRNA umożliwia powstawanie z jednego genu wielu cząsteczek mRNA, kodujących białka różniące się zarówno sekwencją jak i funkcją [48, 49]. Alternatywne składanie pre-mRNA odkryto również w przypadku genu *p53*. Do tej pory zidentyfikowano przynajmniej kilkadziesiąt alternatywnych form mRNA *p53*, jednakże tylko dla 11 udało się zidentyfikować białka, które z nich powstają (Rys. 9) [31, 42, 50]. Zróżnicowanie mRNA *p53* w obrębie regionu terminalnego 5' dotyczy zachowania intronu 2, co prowadzi do powstania mRNA *p53I2* (Rys. 9). Z takiej cząsteczki powstawać może jedynie izoforma Δ Np53, gdyż w

sekwencji intronu 2 znajduje się kodon terminacyjny zgodny z ramką odczytu dla białka p53 o pełniej długości [20]. W wyniku inicjacji transkrypcji z promotora Pint4 powstaje z kolei mRNA $\Delta 133p53$ (Rys. 9). Inny alternatywny wariant mRNA p53 zawiera delecję 198 nt między egzonem 7 a 9 (Rys. 9). Powstająca z niego izoforma $\Delta p53$ nie zawiera zatem części domeny wiążącej się z DNA [31, 42]. W regionie terminalnym 3' mRNA p53 alternatywne składanie intronu 9 prowadzi do powstania dwóch cząsteczek mRNA określanых jako β i γ które kodują izoformy p53 β i p53 γ różniące się sekwencją na końcu karboksylowym (Rys. 9) [31, 42].



Rysunek 9. Warianty mRNA p53 wynikające z alternatywnego składania. Szczegółowy opis w tekście.

2.8. Wpływ alternatywnego składania pre-mRNA p53 oraz wewnętrznej inicjacji translacji na syntezę białka p53 i izoformy $\Delta Np53$.

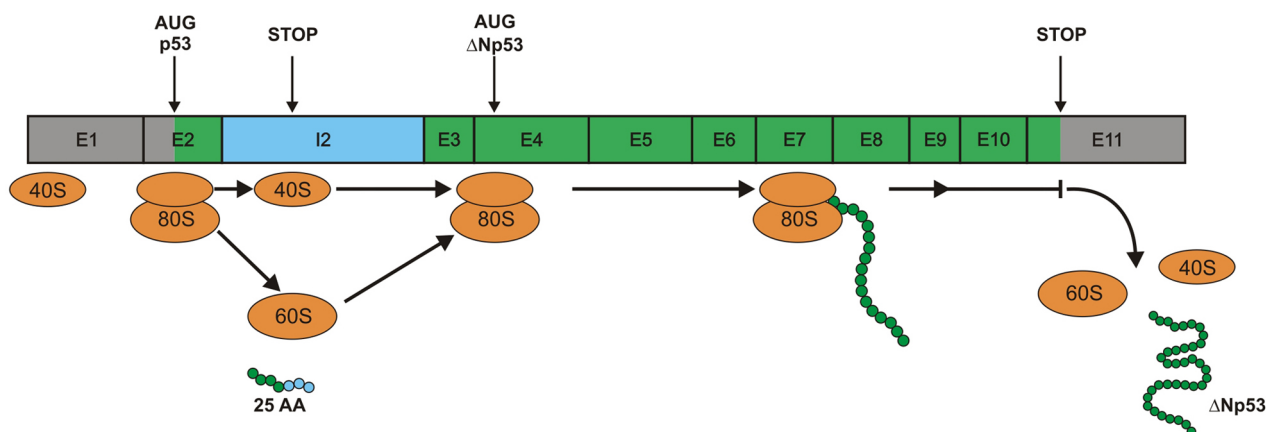
2.8.1. Rola alternatywnego składania intronu 2 w ekspresji izoformy $\Delta Np53$

Pierwsze dowody na istnienie mRNA p53 zawierającego intron 2 (mRNA p53I2) pochodzą z badań nad biblioteką fragmentów cDNA otrzymaną z ludzkich fibroblastów [51]. Wśród otrzymanych cDNA zidentyfikowano fragment mRNA p53 zawierający część sekwencji intronu 2. Kilkanaście lat później dodatkowe doświadczenia pozwoliły na identyfikację mRNA zawierającego pełną sekwencję intronu 2. Transkrypt ten zidentyfikowano w kilku liniach komórkowych zarówno

pochodzenia rakowego jak i w komórkach zdrowych [20, 52]. Badania poziomu mRNA p53I2 z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym wykazały jednak, że jego poziom w komórce jest przynajmniej kilkusetkrotnie mniejszy niż mRNA p53. Niemniej wydaje się, że ulega on translacji, gdyż potwierdzono jego asocjację z polirybosomami, a więc miejscem intensywnej syntezy białek [20]. W opozycji do tych wyników stoją rezultaty grupy Fahraeusa, która nie była w stanie zidentyfikować transkryptu p53I2 [53]. Fakt, że w swoich badaniach wykorzystywali inne linie komórkowe sugeruje, że ekspresja mRNA p53I2 może być specyficzna tkankowo.

Z mRNA p53I2 teoretycznie może powstawać tylko izoforma $\Delta Np53$. Wynika to z obecności kodonu terminacyjnego w intronie 2, zgodnego z ramką odczytu dla białka p53. Jeśli rybosom rozpocząłby translację od kodonu AUG dla białka o pełnej długości to po syntezie 25 reszt aminokwasowych doszłoby do terminacji syntezy (Rys. 10). W celu sprawdzenia czy mRNA p53I2 jest funkcjonalny i może z niego powstawać izoforma $\Delta Np53$ dokonano transfekcji wektora DNA zawierającego sekwencję mRNA p53I2 do komórek, w których nie zachodzi ekspresja endogennego mRNA p53. Komórki transfekowane tym wektorem produkowały nie tylko izoformę $\Delta Np53$ ale również pełnej długości białko p53, co zważywszy na obecność kodonu terminacyjnego w intronie 2 było dość interesujące [20]. Okazało się, że z wektora DNA syntetyzowany może być zarówno transkrypt z intronem 2 jak i taki, który jest go pozbawiony, co tłumaczy powstawanie obydwu białek [20]. Ten fakt rodzi jednak pytanie czy mogła zaistnieć sytuacja, w której obydwa białka powstały tylko z mRNA niezawierającego intronu 2, podczas gdy mRNA p53I2 jest niefunkcjonalny? Niestety, autorzy nie podjęli próby zweryfikowania tych wątpliwości. Nie jest znany również sposób, w jaki syntetyzowana miałaby być izoforma $\Delta Np53$ z mRNA p53I2. Teoretycznie, mógłby to być mechanizm wewnętrznej inicjacji translacji z wykorzystaniem elementu IRES zidentyfikowanego w mRNA p53, który umożliwia tworzenie dojrzałego rybosomu w bezpośrednim sąsiedztwie kodonu inicjacyjnego [21, 22]. Jednakże nie wiadomo, czy i w jaki sposób obecność intronu 2 wpływa na potencjalną strukturę tego elementu. Nie można wykluczyć także mechanizmu reinicjacji translacji. Mechanizm ten dotyczy cząsteczek mRNA, które mają małe otwarte ramki odczytu leżące powyżej głównego kodonu inicjacyjnego. Uważa się, że gdy rybosom osiąga kodon terminacyjny dla otwartej ramki odczytu dochodzi do oddysocjowania dużej podjednostki. Mała podjednostka pozostaje związana z mRNA i kontynuuje migrację, w trakcie której kompletuje niezbędne do inicjacji czynniki (przede wszystkim inicjatorowy tRNA^{Met}) [3]. W sytuacji mRNA p53I2, po napotkaniu kodonu terminacyjnego w intronie 2, duża podjednostka rybosomalna oddysocjowałaby od transkryptu, a mała migrowałaby dalej do momentu napotkania kodonu AUG dla izoformy $\Delta Np53$, gdzie dochodziłoby na nowo do utworzenia dojrzałego rybosomu (Rys. 10). mRNA p53 zawierający sekwencję intronu 2 zidentyfikowano również w embrionach danio przegowanego, w których dochodzi do ekspresji izoformy $\Delta Np53$. Transkrypt ten także zawiera kodon terminacyjny w intronie 2 zgodny z ramką odczytu dla pełnej długości białka [54]. Sugeruje to, że jeśli mRNA p53I2 jest funkcjonalny, to mechanizm powstawania izoformy

Δ Np53 z takiego transkryptu może być zachowawczy ewolucyjnie.



Rysunek 10. Mechanizm syntezy izoformy Δ Np53 z mRNA p53I2. Zaznaczono kodony inicjacyjne dla białka p53 oraz izoformy Δ Np53, a także kodon terminacyjny w obrębie intronu 2.

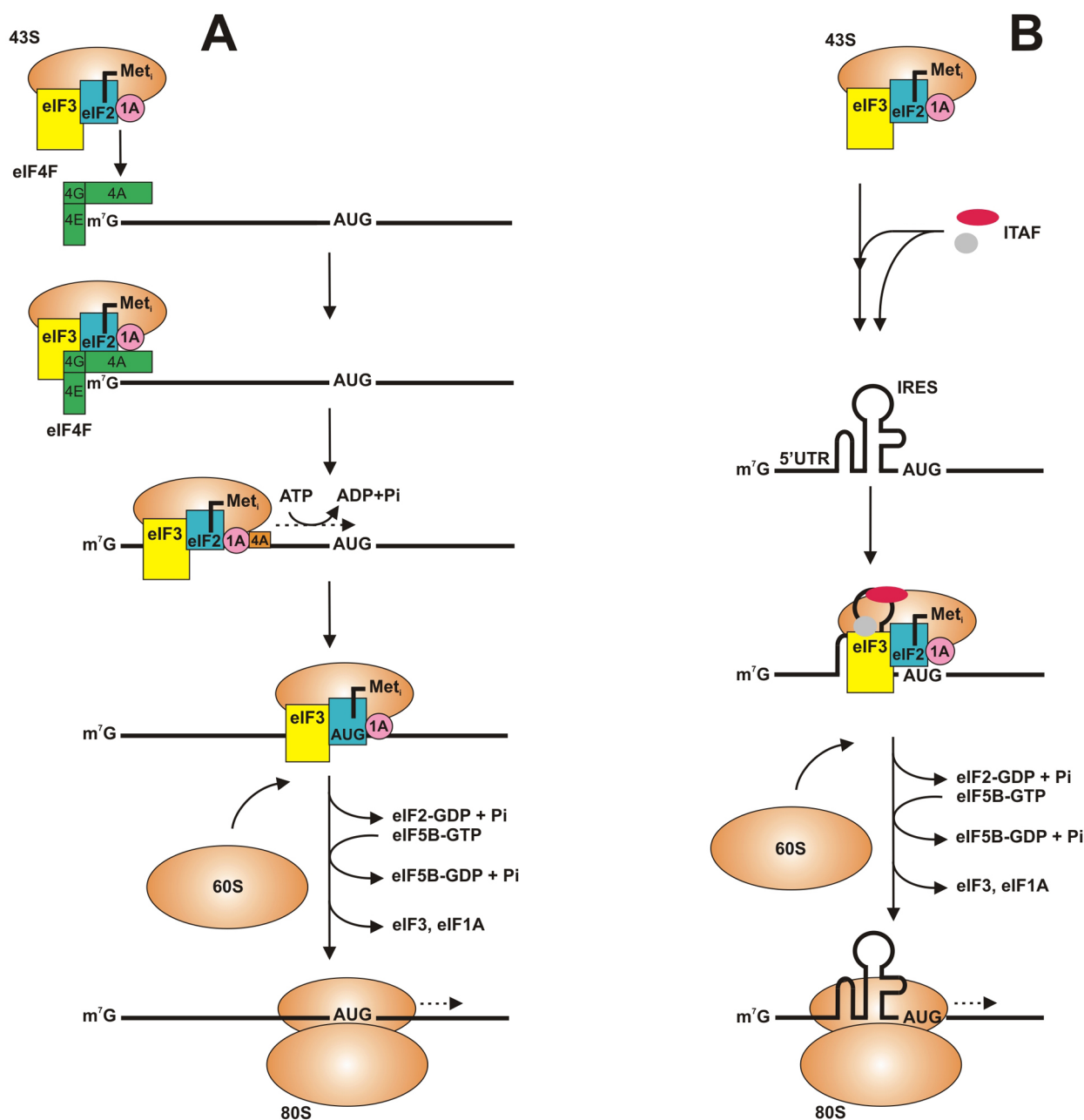
2.8.2. Struktura kwadrupleksu w intronie 3 i jej wpływ składanie intronu 2

Powstawanie mRNA p53I2, zawierającego zachowany intron 2 może być regulowane na poziomie alternatywnego składania pre-mRNA, dzięki obecności struktury kwadrupleksu w intronie 3 [41]. Struktury tego typu tworzą regiony bogate w reszty guanozynowe, które zależnie od kationów jednowartościowych (głównie potasowych) przyjmują strukturę tetrapleksu [55]. W strukturze kwadrupleksu dochodzi do niestandardowych oddziaływań wodorowych typu Hoogsteen oraz oddziaływań warstwowych między resztami guanozynowymi. W wyniku takiej aranżacji, dodatkowo stabilizowanej jonami jednowartościowymi, struktury tego typu wykazują dużą stabilność termodynamiczną [55]. Kwadrupleksy mogą pełnić różnorodne funkcje w zależności od ich lokalizacji w RNA. W niekodujących RNA odgrywają zwykle rolę strukturalną. Jeśli występują w regionach niekodujących 5' mogą wpływać na regulację translacji. Z kolei ich obecność w sekwencjach intronowych często wpływa na regulację alternatywnego składania pre-mRNA [55]. Niedawno odkryto, że fragment sekwencji intronu 3 pre-mRNA p53 ma zdolność przyjmowania struktury tetrapleksu, która reguluje alternatywne składanie intronu 2 [41]. Jest to dość interesujący przykład, ponieważ mamy do czynienia z sytuacją, gdy kwadrupleks obecny w jednym intronie (intron 3) reguluje wycinanie innego (intron 2). Jest to prawdopodobnie spowodowane niewielką długością sekwencji egzonowych i intronowych w tym regionie genu p53 (Rys. 7). Obecność kwadrupleksu w intronie 3 stymuluje wycinanie intronu 2, gdyż badanie składania wariantów RNA zawierających mutacje w regionie formowania się tej struktury wykazało, że dochodziło do znacznego wzrostu poziomu transkryptu z zachowanym intronem 2 [41]. Dokładnie nie wiadomo, jak zależna od obecności kwadrupleksu regulacja składania intronu 2 wpływa na poziom białka p53 (syntetyzowanego z mRNA bez intronu 2) oraz izoformy Δ Np53 (syntetyzowanej z mRNA z intronem lub bez). Ze względu na fakt obecności kodonu

terminacyjnego w intronie 2, zaburzenie alternatywnego składania intronu 2 wskutek mutacji powinno wpłynąć na zmianę stosunku p53 do $\Delta Np53$. Jednakże, autorzy zaobserwowali tylko subtelne zmiany w poziomie obydwu białek [41]. Tłumaczą to tym, że chociaż nie zaobserwowano istotnych różnic, być może już niewielkie zmiany w poziomie translacji pozwalają na dokładną regulację procesów, w które zaangażowane są białko p53 i izoforma $\Delta Np53$. Ciekawe, że region występowania kwadrupleksu, pokrywa się z częstym polimorfizmem polegającym na 16-nukleotyduowej duplikacji fragmentu intronu 3 [56]. Może to mieć istotne znaczenie dla formowania się tego typu struktury oraz jej funkcji w pre-mRNA p53.

2.8.3. Wewnętrzna inicjacja translacji białka p53 i izoformy $\Delta Np53$

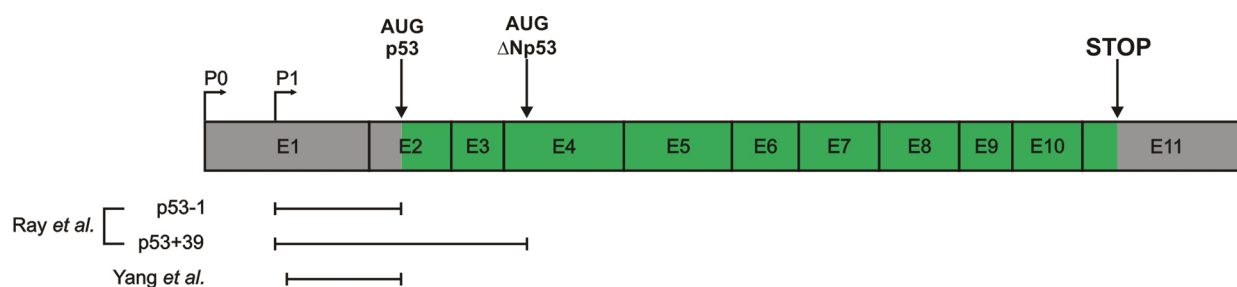
Obecnie, znane są dwa główne mechanizmy inicjacji translacji: zależny oraz niezależny od kapu [57-60]. Kluczowym etapem w translacji zależnej od kapu jest rozpoznanie 7-metyloguanozyny zlokalizowanej na końcu 5' mRNA, przez czynnik inicjacyjny eIF4E (ang. *eukaryotic initiation factor 4E*) [59]. Umożliwia to przyłączenie małej podjednostki rybosomalnej, a następnie migrację wzdłuż regionu niekodującego 5' do momentu napotkania kodonu inicjacyjnego (Rys. 11). Oddziaływanie eIF4E ze strukturą kapu jest ściśle regulowane przez dostępność składników odżywczych oraz kaskady sygnałne indukowane przez czynniki wzrostu [59]. Jednym z głównych czynników regulujących aktywność eIF4E jest białko 4E-BP1 (ang. *eIF4E binding protein 1*). W hypofosforylowanej postaci 4E-BP1 wiąże się do eIF4E i blokuje jego zdolność do oddziaływania z kapem [61, 62]. Czynniki wzrostu stymulują fosforylację 4E-BP1, co prowadzi do uwolnienia eIF4E z kompleksu i tym samym do translacji zależnej od kapu. Podczas różnych warunków stresowych np.: szoku cieplnego lub hypoksji, czynnik 4E-BP1 ulega defosforylacji, wskutek czego ulega trwałemu związaniu z eIF4E. Powoduje to zahamowanie lub silne obniżenie translacji zależnej od kapu [61, 62]. Wówczas, translacja niezależna od kapu umożliwia syntezę białek na poziomie niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania komórki. Jest ona możliwa dzięki istnieniu elementów IRES zlokalizowanych w regionach niekodujących 5' oraz częściach kodujących cząsteczek mRNA (Rys. 11) [62, 63]. Przy użyciu niektórych czynników inicjacyjnych, specyficznych czynników ITAF (ang. *ires trans-acting factors*) oraz niezależnie od eIF4E, elementy IRES zdolne są do wiązania małej podjednostki rybosomalnej i tworzenia dojrzałego rybosomu w bezpośrednim sąsiedztwie kodonu inicjacyjnego, z wyłączeniem mechanizmu skanowania (Rys. 11) [62, 63]. Ten typ translacji został po raz pierwszy odkryty i scharakteryzowany u wirusów, a później u szeregu komórkowych mRNA. Sądzi się, że od 5 do 10% wszystkich komórkowych mRNA może ulegać translacji w sposób niezależny od kapu, z wykorzystaniem elementów IRES [62, 63].



Rysunek 11. Schematyczne przedstawienie procesu inicjacji translacji. A – Inicjacja translacji zależna od struktury kapu, gdy po uformowaniu kompleksu inicjacyjnego następuje skanowanie regionu niekodującego 5' mRNA do momentu napotkania kodonu AUG. B – Inicjacja translacji zależna od struktury IRES, polegająca na wiązaniu się podjednostki rybosomalnej 40S do regionu niekodującego 5' w pobliżu kodonu inicjacyjnego z udziałem niektórych kanonicznych czynników inicjacyjnych oraz specyficznych czynników ITAF [57].

Region niekodujący 5' mRNA p53 poniżej promotora P1 jest bogaty w reszty G i C, co sugeruje, że w jego obrębie mogą tworzyć się stabilne struktury drugorzędowe RNA, choć do niedawna sugestie tego typu pojawiały się tylko w odniesieniu do regionu między promotorami P0 i P1 [45, 47]. Co więcej, dużą zawartością reszt G i C cechuje się także pierwsze 120 nt sekwencji kodującej, poprzedzającej kodon inicjacyjny dla izoformy $\Delta Np53$, co daje podstawy by sądzić, że stabilne struktury mogą istnieć również w tym fragmencie mRNA p53.

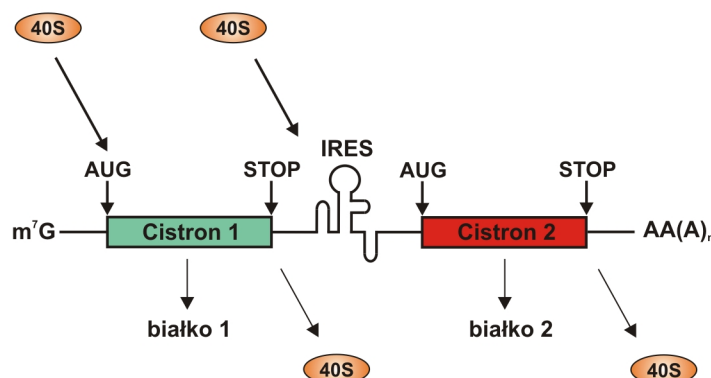
Pierwsze wzmianki o tym, że izoforma Δ Np53 może być syntetyzowana niezależnie od kapu pochodzą z 1987 roku gdy doniesiono, że kodon AUG w pozycji 40, od którego rozpoczyna się translacja tej izoformy, leży w obrębie sekwencji Kozak [64]. Ekspresja Δ Np53 ograniczona jest prawdopodobnie tylko do niektórych gatunków zwierząt, gdyż obecność kodonu inicjacyjnego dla tej izoformy stwierdzono w mRNA człowieka, szczura, myszy czy kury, lecz nie krowy, rezusa, konia, świni oraz żaby szponiastej [23]. W 2006 roku ukazały się równolegle dwie prace donoszące o odkryciu elementów IRES w mRNA p53, odpowiadających za niezależną od kapu syntezę izoformy Δ Np53, a także pełnej długości białka p53 [21, 22]. Grupa Zhanga badała jedynie aktywność translacyjną izolowanego regionu niekodującego 5', podczas gdy grupa Dasa dodatkowo region niekodujący 5' wydłużony o 120 nt sekwencji kodującej (Rys. 12).



Rysunek 12. Fragmenty RNA użyte przez grupę Zhanga i Dasa w badaniach nad obecnością elementu typu IRES w mRNA p53.

W celu wykrycia aktywności translacyjnej elementu IRES odpowiadającego za syntezę białka p53, sekwencję izolowanego regionu 5'UTR umieszczono w wektorze bicistronowym między genami reporterowymi [22]. Wektor bicistronowy zawiera dwa regiony kodujące różne geny reporterowe (najczęściej lucyferazę z *Photinus pyralis* i *Renilla reniformis*) oddzielone fragmentem dowolnej sekwencji (Rys. 13) [65]. Gdy wektor ten ulega transkrypcji w komórce tylko pierwszy region kodujący poprzedzony jest strukturą kapu, co pozwala na zależną od kapu inicjację jego translacji. Drugi region kodujący w bicistronowym mRNA może ulegać translacji w sposób niezależny od kapu jeśli poprzedzająca go sekwencja zawiera element IRES (Rys. 13). Jako kontrolę stosuje się wektor bicistronowy zawierający przypadkową sekwencję między regionami kodującymi geny reporterowe. Badany przez grupę Zhanga fragment mRNA p53 stanowił prawie cały region 5'UTR (131 nt ze 145 nt) kończący się kodonem inicjacyjnym dla białka p53. Aktywność RNA jako potencjalnego elementu IRES obliczono jako stosunek aktywności enzymatycznej obydwu lucyferaz. Region 5'UTR mRNA p53 wykazywał około 200-krotnie większą stymulację ekspresji drugiego genu reporterowego w porównaniu z kontrolą, co wyraźnie sugerowało możliwość niezależnej od kapu inicjacji translacji [22]. Dodatkowo, w celu sprawdzenia, jaka część regionu 5'UTR odpowiedzialna jest za aktywność IRES przeprowadzono analizę delecyjną, która wykazała, że pierwsze 70 nt 5'UTR odpowiada za 98% zaobserwowanej aktywności translacyjnej [22]. Aktywność elementu IRES w 5'UTR mRNA p53 uzależniona była również od obecności czynnika stresowego. Traktowanie komórek etopozydem, który uszkodza DNA, stymulowało aktywność tego elementu,

co sugeruje, że jego funkcjonowanie może być regulowane w zależności od stanu komórki oraz może odpowiadać za wzrost syntezy p53 obserwowany podczas działania czynników stresowych [22].



Rysunek 13. Cząsteczka bicystronowego mRNA, wykorzystywana w badaniach aktywności translacyjnej elementów IRES. Pierwszy gen reporterowy ulega translacji w procesie zależnym od obecności kapu, podczas gdy drugi ulega translacji tylko wtedy, gdy sekwencja znajdująca się pomiędzy obydwoma genami reporterowymi może funkcjonować jako element IRES [65].

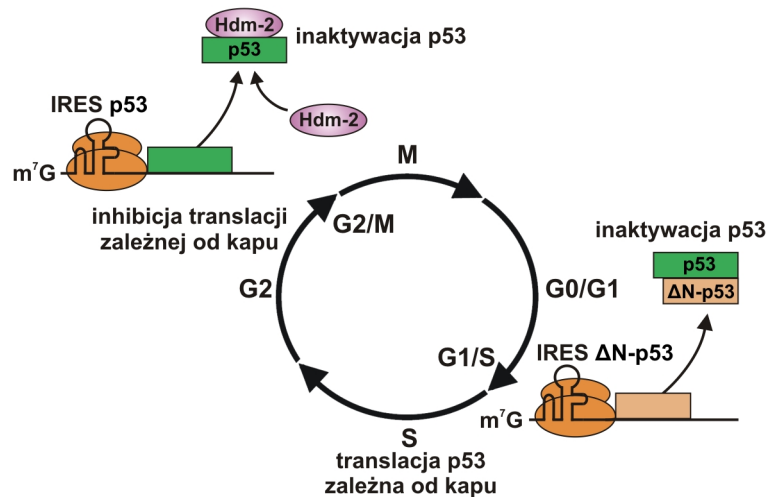
Grupa Dasa do analizy aktywności translacyjnej regionu niekodującego 5' mRNA p53 użyła dwóch cząsteczek RNA. Pierwszą był pełnej długości region 5'UTR rozpoczynający się w miejscu inicjacji transkrypcji P1, a kończący się kodonem inicjacyjnym dla białka p53 (RNA p53-1). Druga cząsteczka (RNA p53+39) była dodatkowo przedłużona o pierwsze 120 nt sekwencji kodującej i kończyła się kodonem inicjacyjnym dla izoformy $\Delta Np53$ (Rys. 12). Również w tym wypadku użyto wektorów bicystronowych do badania aktywności translacyjnej. Po wprowadzeniu konstruktów do komórek, ekspresja drugiego genu reporterowego dla obydwu badanych cząsteczek RNA była wyższa niż dla mRNA kontrolnego, przy czym RNA p53+39 stymulował translację na wyższym poziomie niż RNA p53-1 [21]. Sugerowało to, że także RNA p53+39 ma zdolność indukcji syntezy białka w sposób niezależny od kapu. Zauważono również zmienną aktywność translacyjną badanych cząsteczek RNA w zależności od typu linii komórkowej, co pozwala przypuszczać, że istnieją dodatkowe czynniki białkowe zaangażowane w regulację niezależnej od kapu syntezy p53 i $\Delta Np53$.

Obydwie grupy badawcze wykonały szereg doświadczeń kontrolnych w celu potwierdzenia prawdziwości otrzymanych wyników. Dowiedziono, że badane fragmenty RNA nie zawierają krytycznych promotorów transkrypcyjnych oraz krytycznych miejsc składania, które po wprowadzeniu wektora w formie DNA lub RNA do komórki generować mogłyby monocystronowe RNA, ulegające zależnej od kapu inicjacji translacji [21, 22]. W celu wyeliminowania możliwości migracji rybosomów do drugiego genu reporterowego i inicjacji jego translacji zależnie od kapu, wprowadzono stabilną strukturę typu spinki przed sekwencją RNA p53-1 oraz p53+39. Konstrukty zawierające taką modyfikację nie wykazywały obniżonej ekspresji drugiego genu reporterowego, co wskazywało na wewnętrzną inicjację translacji zarówno białka p53 jak i izoformy $\Delta Np53$ [21].

Ponadto, wykonano doświadczenie, w którym zastosowano syntetyczny analog kapu jako inhibitor translacji zależnej od kapu. Analog taki silnie wiąże się z czynnikiem inicjacyjnym eIF4E, w wyniku czego dochodzi do jego inaktywacji. Nie może on wówczas oddziaływać ze strukturą kapu w mRNA, co powoduje zahamowanie translacji zależnej od tej struktury. W warunkach inhibicji translacji zależnej od kapu, ekspresja genu reporterowego pod kontrolą RNA p53-1 oraz p53+39 nie uległa zmianie, co po raz kolejny przemawia za obecnością elementu IRES w tym regionie mRNA p53 [21].

Jedną z kluczowych funkcji jaką białko p53 pełni w komórce jest ochrona przed uszkodzeniami DNA. Jest on swego rodzaju „czujnikiem”, który w odpowiedzi na czynniki uszkadzające uruchamia szereg mechanizmów prowadzących do zatrzymania cyklu komórkowego tuż przed fazą syntezy DNA [6]. Taka sytuacja daje komórce czas na to, aby zadziałały mechanizmy naprawcze, dzięki czemu komórka wkracza w fazę replikacji DNA z poprawnym materiałem genetycznym. p53 bierze także udział w kontroli cyklu komórkowego na etapie przejścia z fazy G2 do mitozy, gdzie w razie uszkodzeń DNA również aktywuje zatrzymanie podziału komórki [66]. W kontroli cyklu komórkowego może brać udział również izoforma $\Delta Np53$. Istotną rolę w tym procesie odgrywa zróżnicowana aktywność translacyjna elementów IRES obecnych w mRNA p53. Wykazano bowiem, że element IRES regulujący syntezę izoformy $\Delta Np53$ jest najbardziej aktywny translacyjnie podczas przejścia z fazy G1 do S, podczas gdy IRES regulujący syntezę pełnej długości p53 w trakcie przejścia z fazy G2 do mitozy [21]. Na podstawie tej obserwacji stworzono model opisujący jak zróżnicowana aktywność elementów IRES w mRNA p53 oraz wzajemny stosunek p53 i $\Delta Np53$ wpływają na kontrolę cyklu komórkowego w warunkach fizjologicznych (Rys. 14). W czasie przejścia G1/S, zwiększona aktywność elementu IRES dla izoformy $\Delta Np53$ powoduje wzrost poziomu tego białka. $\Delta Np53$ ma zdolność tworzenia kompleksów z p53, co między innymi prowadzi do jego inaktywacji [20]. Zatem, powstanie kompleksów p53- $\Delta Np53$ uniemożliwia zatrzymanie cyklu komórkowego, dzięki czemu komórka może przejść do fazy syntezy DNA. Z kolei, podczas przejścia z fazy G2 do mitozy obserwuje się globalną inhibicję translacji zależnej od kapu, co jest jednym z etapów przygotowania komórki do podziału [67]. Zależna od IRES translacja pełnej długości p53 pozwalałaby w takich warunkach na zachowanie minimalnego poziomu tego białka, zapewniając utrzymanie kontroli przejścia do fazy mitozy. Z drugiej strony, niewielkie ilości p53 powstające wskutek zależnej od IRES inicjacji translacji mogłyby być bardzo szybko kierowane na drogę degradacji wskutek aktywności białka Hdm2. W zależnej od elementów IRES kontroli ekspresji p53 i $\Delta Np53$ nie można oczywiście wykluczyć udziału zidentyfikowanych dotychczas wielu czynników białkowych (Rozdział 2.10) [68]. Jednakże, wiedza na temat ich udziału wciąż jest fragmentaryczna i zawiera wiele luk, których wypełnienie wymaga dalszych badań.

Porównując wyniki otrzymane przez grupę Zhanga oraz Dasa można zauważyć dużą dysproporcję w aktywności translacyjnej izolowanego regionu niekodującego 5' mRNA p53 w



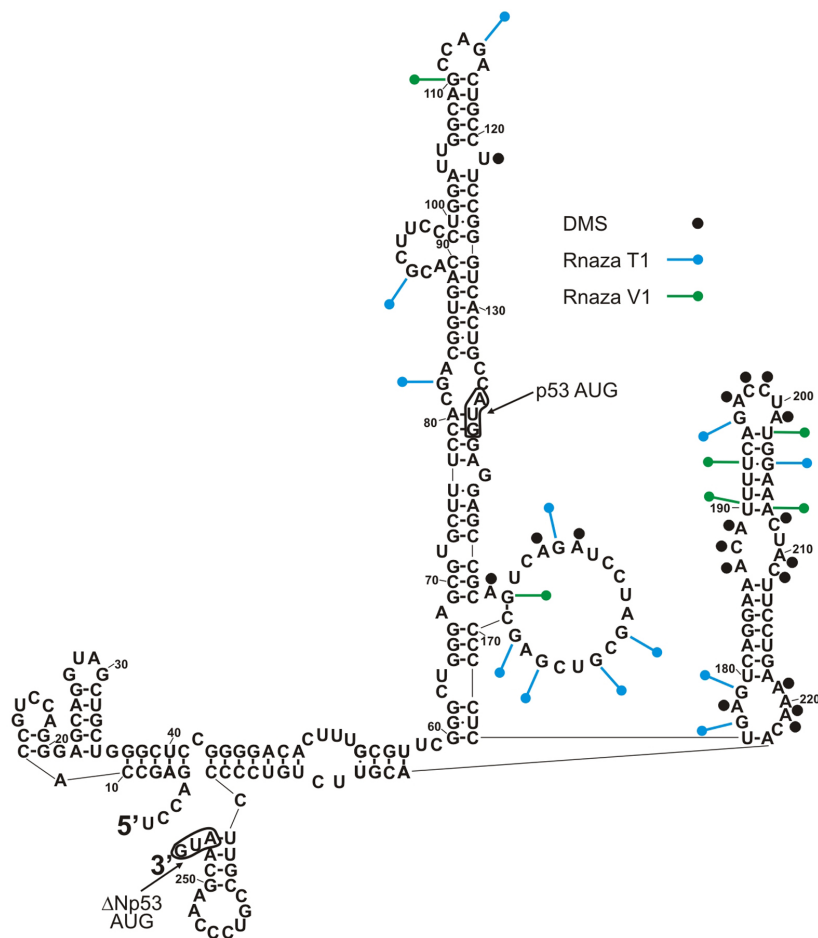
Rysunek 14. Proponowany mechanizm regulacji translacji mRNA p53 z wykorzystaniem elementów IRES obecnych w jego regionie niekodującym 5'. Aktywność IRES dla izoformy białka $\Delta Np53$ jest najwyższa podczas przejścia z fazy G1 do fazy S. Wysoki poziom tej izoformy hamuje aktywność p53 o pełnej długości, dzięki czemu komórka może przejść do fazy syntezy DNA. Z kolei, podczas przejścia z fazy G2 do fazy mitozy czynnik Hdm2 inaktywuje białko p53 pełnej długości, powstające również na drodze translacji zależnej od elementu IRES, co umożliwia indukcję podziału komórkowego zależną od tego czynnika białkowego [57].

zależności od użytej linii komórkowej. Jest to spowodowane prawdopodobnie tym, że element IRES znajdujący się w 5'UTR mRNA p53 może wymagać obecności dodatkowych czynników białkowych, których poziom może różnić się w zależności od typu komórki. Trzeba również zaznaczyć, że badany przez grupę Dasa RNA p53+39 zawiera w sobie sekwencję RNA p53-1 (Rys. 12). Zatem, istnieje możliwość, że w mRNA p53 istnieje tak naprawdę jeden element IRES, którego motywy strukturalne i/lub funkcjonalne zlokalizowane są częściowo w 5'UTR i regionie kodującym [21]. W takim wypadku właściwa organizacja struktury tego elementu możliwa byłaby prawdopodobnie tylko w fragmencie RNA, zawierającym nie tylko 5'UTR, ale również fragment sekwencji kodującej, przynajmniej do kodonu inicjacyjnego dla izoformy $\Delta Np53$.

2.9. Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA p53

W 2011 roku ukazała się publikacja, w której dokonano próby doświadczalnego określenia struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 [69]. Autorzy określili strukturę 251 nt fragmentu mRNA p53, który obejmował 5'UTR oraz 120 nukleotydów sekwencji kodującej pomiędzy kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i izoformy $\Delta Np53$ (RNA p53+39 IRES). Wykorzystano do tego celu modyfikację chemiczną RNA za pomocą siarczanu dimetylu, DMS (ang. *dimethyl sulfate*), oraz metodę cięć indukowanych za pomocą RNazy T1 oraz V1. DMS metyluje reszty A, C i G, znajdujące się w regionach jednoniciowych. RNaza T1 indukuje cięcia po resztach guanozynowych, znajdujących się w regionach jednoniciowych, podczas gdy RNaza V1 wykazuje specyficzność do cięcia RNA w regionach dwuniciowych [70]. Dane uzyskane z

doświadczeń mapowania wprowadzono do programu *Mfold* jako więzy strukturalne, w wyniku czego otrzymano model struktury drugorzędowej badanego RNA [71]. W strukturze badanego fragmentu mRNA p53 można wyróżnić dwa główne motywy strukturalne typu spinki. Pierwsza z nich zawiera zlokalizowany mniej więcej w połowie długości kodon inicjacyjny dla białka p53 (Rys. 15). Druga spinka jest mniejsza i wcześniej została zidentyfikowana jako ta, z którą oddziałują białka Hdm2 oraz hnRNP C1/C2 [34, 72]. Autorzy przeprowadzili również analizę wpływu mutacji na strukturę badanego regionu mRNA p53. Wszystkie zmiany sekwencji które wprowadzono, zlokalizowane były w obrębie struktury typu spinki, do której wiąże się Hdm2 i hnRNP C1/C2. Analizę struktury wariantów posiadających mutacje przeprowadzono z wykorzystaniem RNazy T1 i V1. Zaobserwowano, że do zmiany w rozkładzie intensywności cięć doszło w dwóch regionach. Pierwszym z nich była spinka, w obrębie której zlokalizowane były mutacje, a drugim 18-nukleotydowy region jednoniciowy znajdujący się powyżej w sekwencji (Rys. 15). Niestety, nie wiadomo czy zaobserwowane zmiany spowodowane były rzeczywistym wpływem mutacji, ponieważ warianty RNA nie reprezentowały całej badanej cząsteczki, a jedynie fragment między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i izoformy Δ Np53 (reszty 135–251), co mogło indukować fałszywie pozytywne rezultaty [69].



Rysunek 15. Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA zaproponowana przez grupę Dasa [69].

2.10. Czynniki wpływające na regulację ekspresji mRNA p53.

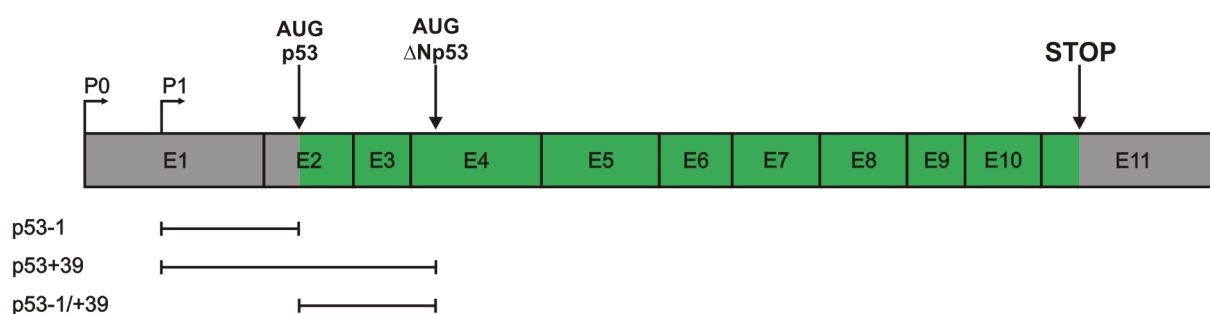
W regulacji translacji bardzo istotną rolę odgrywają czynniki białkowe, które oddziałują z cząsteczkami mRNA. W przypadku regionów niekodujących 5' mogą to być białka wchodzące w skład kompleksu preinicjacyjnego jak np. eIF4E, rozpoznający strukturę kapu. Inne, to czynniki ITAF, które biorą udział w niezależnej od kapu inicjacji translacji oddziałując z elementami IRES. Sądzi się, że jedną z ról jaką pełnią jest tworzenie „pomostu” między strukturą elementu IRES a kanonicznymi czynnikami inicjacyjnymi. Sugeruje się również, że po związaniu do mRNA niektóre z nich wykazują zdolność do remodelowania struktury RNA, przez co możliwe jest wiązanie innych elementów maszyneryi translacyjnej jak np. rybosomów [73]. Kontrola translacji może zachodzić także dzięki elementom regulatorowym w regionach niekodujących 3', które wpływają na stabilność mRNA, a także są miejscem wiązania różnych białek i cząsteczek mikroRNA. Jednym z etapów, na którym ekspresja mRNA p53 jest regulowana, jest inicjacja translacji. Chociaż nasza wiedza w tym temacie jest nadal fragmentaryczna, to dotychczas zidentyfikowano wiele czynników wpływających na regulację syntezy białka p53 i jego izoformy Δ Np53. Są to białka oddziałujące z regionami niekodującymi 5', 3' oraz częścią kodującą i cząsteczki mikroRNA. Istotną rolę pełnią także oddziaływania dalekiego zasięgu typu RNA–RNA w obrębie mRNA p53.

2.10.1. Białka oddziałujące z regionem terminalnym 5' mRNA p53

2.10.1.1. PTB1

Białko wiążące się z traktami bogatymi w reszty pirymidynowe, PTB1 (ang. *polypyrimidine tract binding protein 1*) ma masę cząsteczkową 57 kDa i zawiera 4 motywy białkowe typu RRM (ang. *RNA recognition motif*), za pomocą których oddziałuje z cząsteczkami RNA [74]. Dzięki obecności sekwencji lokalizacji jądrowej oraz sekwencji eksportu do cytoplazmy białko PTB1 może występować w różnych przedziałach komórkowych. W jądrze komórkowym zaangażowane jest w składanie pre-mRNA, działając głównie jako represor tego procesu. Jego wiązanie do długich odcinków polipirymidynowych w pre-mRNA uniemożliwia wiązanie czynników splicingowych, czego rezultatem jest najczęściej pominięcie egzonu (ang. *exon skipping*) i powstanie alternatywnej formy mRNA [74]. Ponadto, bierze ono udział w regulacji poliadenylacji, transporcie oraz stabilizacji mRNA [74, 75]. Na terenie cytoplazmy białko PTB1 uwikłane jest głównie w regulację procesu inicjacji translacji niezależnej od kapu. Początkowo odkryto, że białko PTB1 wiąże się do elementów IRES obecnych w wirusowych cząsteczkach RNA, co najczęściej stymuluje translację [74, 76, 77]. W tym przypadku, PTB1 działa jako czynnik ITAF, który najprawdopodobniej stabilizuje lub zmienia strukturę RNA, ułatwiając tworzenie kompleksu inicjacyjnego w bezpośrednim sąsiedztwie kodonu AUG. Białko PTB1 wiąże się również do komórkowych mRNA zawierających elementy typu IRES. Jednakże, jego rola w tym aspekcie jest słabo poznana [74, 77]. Jednym z nich jest mRNA p53, w którego regionie terminalnym

5' zidentyfikowano element typu IRES [21, 22, 78]. Wykazano, że PTB1 wiąże się do regionu niekodującego 5' mRNA p53 zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [78]. W celu określenia miejsca wiązania białka posłużono się trzema fragmentami mRNA p53. Pierwszy z nich, stanowił region 5'UTR wraz z fragmentem sekwencji kodującej pomiędzy kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i Δ Np53 (p53+39 IRES), fragment drugi, izolowany region 5'UTR (p53-1 IRES), a fragment trzeci, część kodującą sekwencji zawartą pomiędzy kodonami inicjacyjnymi (p53-1/+39) (Rys. 16). Białko PTB1 wykazywało zróżnicowane powinowactwo do tych fragmentów mRNA [78]. Najsilniej wiązało się do RNA p53+39 IRES oraz p53-1/+39, co sugeruje, że główne miejsce wiązania PTB1 znajduje się poniżej kodonu inicjacyjnego dla białka p53 [78]. PTB1 wiązało się również do RNA p53-1 IRES, choć znacznie słabiej. Świadczyć to może o obecności dodatkowego miejsca znajdującego się w obrębie sekwencji regionu 5'UTR. Taki wynik jest zgodny z wcześniejszymi danymi literaturowymi z których wynika, że białko PTB1 może wiązać się do cząsteczek RNA w różnych miejscach [79].



Rysunek 16. Fragmenty mRNA p53 użyte w badaniu oddziaływania z białkiem PTB1.

Wpływ białka PTB1 na aktywność translacyjną regionu 5'UTR mRNA p53 sprawdzono *in vivo*, wykorzystując do tego celu wektory bicistronowe zawierające badane fragmenty mRNA p53, umieszczone pomiędzy genami reporterowymi. Wyciszenie ekspresji endogennego PTB1 za pomocą oligomerów typu siRNA (ang. *small interfering RNAs*) spowodowało znaczne obniżenie aktywności translacyjnej RNA p53-1 IRES oraz p53+39 IRES. Może to świadczyć o stymulującym wpływie tego białka na syntezę p53 [78]. Sprawdzono również, jaki efekt ma wyciszenie ekspresji PTB1 na syntezę endogennego białka p53 i izoforny Δ Np53. Niespodziewanie, nie miało to żadnego wpływu na poziom obydwu białek, co było niezgodne z wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem wektorów bicistronowych. Ze względu na to, że podczas stresu genotoksycznego indukowanego doksorubicyną obserwuje się stymulację ekspresji p53 i Δ Np53 autorzy sprawdzili, czy w takich warunkach, przy jednoczesnym wyciszeniu ekspresji PTB1, poziom powstających z endogennego mRNA p53 białek ulegnie zmianie. W obecności doksorubicyny i zablokowanej ekspresji PTB1 poziom p53 i Δ Np53 uległ obniżeniu [78]. Dane te sugerują, że białko PTB1 jest pozytywnym regulatorem poziomu obydwu białek, ale tylko podczas warunków stresowych.

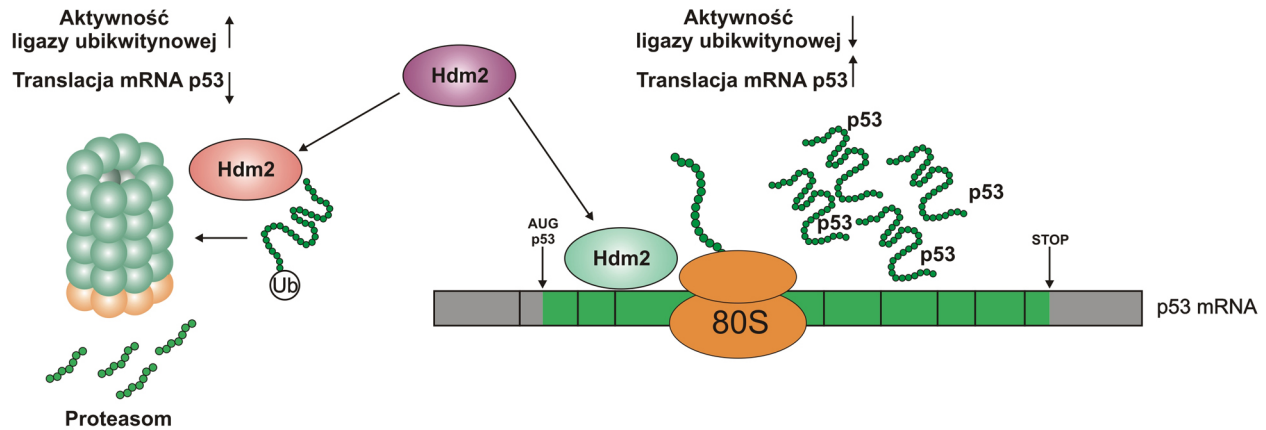
Ze względu na zróżnicowane powinowactwo PTB1 do badanych wariantów mRNA p53 zaproponowano model, w którym aktywność elementów IRES odpowiedzialnych za syntezę p53 i Δ Np53 zależy od komórkowego poziomu białka PTB1 [78]. W warunkach normalnych PTB1 zlokalizowane jest głównie w jądrze komórkowym, jednakże niewielkie ilości tego białka obecne w cytoplazmie są wystarczające do indukcji translacji Δ Np53 wskutek silnego oddziaływania z elementem IRES odpowiedzialnym za syntezę tej izoformy. W czasie stresu powodującego uszkodzenia DNA, PTB1 migruje z jądra do cytoplazmy. Zwiększona ilość białka w cytoplazmie umożliwia jego oddziaływanie z elementem IRES odpowiedzialnym za syntezę białka p53 o pełnej długości (z którym oddziałuje słabiej) i stymulację jego syntezy. Białko p53 ulega następnie translokacji do jądra komórkowego gdzie indukuje transkrypcję genów zaangażowanych w naprawę DNA lub indukcję apoptozy.

2.10.1.2. Hdm2

Białko Hdm2 jest jednym z głównych regulatorów poziomu p53 w komórce. W 2008 roku grupa Fahraeusa opublikowała pracę dotyczącą oddziaływania białka Hdm2 z mRNA p53. Wykazano, że Hdm2 wiąże się do mRNA p53 w części kodującej, w obrębie sekwencji tworzącej przypuszczalnie strukturę typu spinki (reszty 180–218) i w rezultacie stymuluje translację p53 [34]. W celu dokładniejszego poznania roli tego oddziaływania autorzy użyli wariantu mRNA p53 zawierającego mutację synonimiczną w przewidywanym regionie wiązania białka Hdm2, która występuje u chorych na białaczkę limfatyczną. Polegała ona na zmianie kodonu 22 z CUA na CUG [80]. Zaobserwowano, że białko Hdm2 wiązało się znacznie słabiej do transkryptu zawierającego mutację niż do mRNA p53 typu „dzikiego”. Co więcej, obecność białka Hdm2 nie miała żadnego wpływu na translację p53 i Δ Np53 ze zmutowanej wersji mRNA p53. Na podstawie tych wyników autorzy zasugerowali, że zmiana pojedynczego nukleotydu p53 prowadzi do zmiany struktury trzeciorzędowej miejsca wiązania białka Hdm2. Rezultatem tego jest zmniejszone powinowactwo do mRNA p53 i brak stymulacji translacji [34].

Autorzy wykazali, że regionem, za pomocą którego Hdm2 wiąże się do białka i mRNA p53 jest domena typu RING, co prowadzi do ciekawej regulacji poziomu białka p53. W warunkach fizjologicznych Hdm2 oddziałuje za pomocą domeny typu RING z białkiem p53, co wywołuje jego relokalizację do cytoplazmy, ubikwitynację i degradację w degradosomie (Rys. 17). W wyniku stresu genotoksycznego, uszkadzającego DNA, Hdm2 ulega fosforylacji w pozycji reszty seryny 395. Modyfikacja ta prowadzi prawdopodobnie do allosterycznej zmiany konformacyjnej domeny RING, co zwiększa jej powinowactwo do mRNA p53 [34, 81]. Wiązanie Hdm2 do mRNA p53 zaburza funkcjonowanie tego białka jako ligazy ubikwitynowej, a zatem efektywność degradacji p53 jest obniżona. W połączeniu ze stymulacją translacji, poziom p53 wzrasta, co umożliwia komórce szybką reakcję na zaistniałe warunki (Rys. 17). Z przeprowadzonych doświadczeń wynika pośrednio, że po uwolnieniu mRNA p53 z polisomów dochodzi do rozpadu kompleksów Hdm2–mRNA p53, co ponownie umożliwia oddziaływanie Hdm2 z białkiem p53. Konsekwencją

tego jest obniżenie poziomu p53 wskutek ubiquitytacji [34]. Fakt, że p53 stymuluje transkrypcję genu *Hdm2* jeszcze bardziej komplikuje ten złożony układ regulacji. Niestety, wszystkie warianty mRNA p53 jakie stosowali autorzy pozbawione były zarówno regionu 5' jak i 3'UTR. Stąd ich wpływ na oddziaływanie z Hdm2 jak pozostaje nieznan.



Rysunek 17. Model ilustrujący oddziaływanie białka Hdm2 z mRNA p53. Szczegółowy opis w tekście [34].

2.10.1.3. hnRNP C1/C2

Białko hnRNP C1/C2 (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2*) występuje w postaci dwóch izoform tworzących w komórce heterotetramer. Zaangażowane jest w składanie pre-mRNA, stabilizację mRNA oraz jako czynnik ITAF uczestniczy w regulacji inicjacji translacji komórkowych mRNA posiadających element IRES [82]. W 2008 roku opisano oddziaływanie białka hnRNP C1/C2 z mRNA p53. Zidentyfikowano miejsce wiązania hnRNP C1/C2, które leży w obrębie pierwszych 101 reszt nukleotydowych poniżej kodonu inicjacyjnego dla białka p53. Przewidywania struktury drugorzędowej RNA w miejscu wiązania sugerują, że hnRNP C1/C2 może oddziaływać ze strukturą typu spinki, do której wiąże się również białko Hdm2 [34]. Co więcej, analiza zdolności wiązania hnRNP C1/C2 do wariantów mRNA p53 posiadających mutacje w tym regionie dowiodła, że zmiana zaledwie jednego nukleotydu w przypuszczalnym miejscu kontaktu niemal całkowicie uniemożliwiła wiązanie hnRNP C1/C2, podobnie jak w przypadku białka Hdm2 [34, 72]. Dodatkowo, wariant mRNA p53 z wprowadzoną mutacją posiadał o połowę mniejszą aktywność translacyjną niż wariant typu „dzikiego” co sugeruje, że hnRNP C1/C2 jest najprawdopodobniej pozytywnym regulatorem translacji p53. Przeprowadzona analiza funkcjonalna wykazała także, że hnRNP C1/C2 wiąże się do mRNA p53 w warunkach fizjologicznych. Jednak w warunkach stresowych, powodujących uszkodzenia DNA oraz zahamowanie transkrypcji, wiązanie jest silniejsze, głównie we frakcji cytoplazmatycznej [72]. Na tej podstawie zaproponowano, że oddziaływanie hnRNP C1/C2 z mRNA p53 stymuluje translację białka p53, które ulega następnie translokacji do jądra komórkowego, gdzie indukuje transkrypcję genów. Taki mechanizm mogą potwierdzać wyniki, które wskazują, że częściowe

wyciszenie ekspresji hnRNP C1/C2 spowodowało obniżenie ekspresji nie tylko p53 ale także izoformy $\Delta Np53$ [69].

2.10.1.4. RPL26 i nukleolina

Badania przeprowadzone przez grupę Kastana wykazały, że białko rybosomalne RPL26 (ang. *ribosomal protein L26*) wiąże się do 5'UTR mRNA p53 po ekspozycji komórek na promieniowanie jonizujące [83]. Stosując fragmenty mRNA p53 zawierające różnej długości region niekodujący 5' zidentyfikowano miejsce wiązania tego białka, które przypada w pierwszych 22 resztach nukleotydowych powyżej kodonu inicjacyjnego dla białka p53. Dodatkowo, zasugerowano istnienie motywu strukturalnego w regionie 5'UTR o negatywnym wpływie na translację, gdyż stopniowe wydłużanie tego regionu powodowało obniżanie syntezy p53, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami [45, 47]. Białko RPL26 jest pozytywnym regulatorem ekspresji p53, gdyż jego oddziaływanie z regionem 5'UTR stymuluje translację tego białka. Podwyższona synteza p53 spowodowana jest zwiększoną asocjacją mRNA p53 z polisomami. Ponadto zaproponowano, że białko RPL26 umożliwia „obejście” stabilnej struktury drugorzędowej znajdującej się w regionie 5'UTR, co również pozytywnie wpływa na translację p53 [83]. W tych samych badaniach zidentyfikowano kolejny czynnik oddziałujący z regionem 5'UTR mRNA p53, którym jest nukleolina, białko jądrowe zaangażowane w syntezę i dojrzewanie rybosomów [83]. Chociaż nie poświęcono temu zagadnieniu wiele uwagi, to zaobserwowano, że nukleolina wywołuje przeciwny do białka RPL26 efekt. Mianowicie, podczas tych samych warunków stresowych nukleolina oddziałując z regionem 5'UTR mRNA p53 hamowała translację p53. Autorzy tłumaczą to możliwością stabilizacji struktury drugorzędowej obecnej w regionie 5'UTR mRNA p53 przez nukleolinę, co wpływałoby na obniżenie translacji. Sugerują również, że RPL26 oraz nukleolina mogą współzawodniczyć o to samo miejsce wiązania, a to czy dojdzie do stymulacji czy inhibicji translacji p53 zależy od stosunku ilości obydwu białek w komórce [83]. W 2010 roku zaproponowano, że białko RPL26 stymuluje translację p53 wskutek wiązania do regionu dwuniciowego jaki tworzy się w wyniku oddziaływania dalekiego zasięgu między regionem 5' i 3'UTR mRNA p53 (Rozdział 2.11.3) [84].

2.10.1.5. p53

Białko p53 jako czynnik transkrypcyjny ma zdolność specyficznego oddziaływania z sekwencjami promotorowymi w DNA. Interesujące jest jednak to, że wykazuje również powinowactwo do cząsteczek RNA. Istnieją liczne doniesienia dotyczące oddziaływania białka p53 z komórkowymi mRNA, które ma negatywny wpływ na ich translacji [85, 86]. W 1995 roku zaobserwowano wiązanie się mysiego białka p53 do regionu 5'UTR własnego mRNA [87]. Białko p53 wykazywało powinowactwo tylko do tych fragmentów mRNA, które zawierały region niekodujący 5'. Co więcej, wzrastające stężenie p53 w reakcji translacji *in vitro* prowadziło do obniżenia poziomu syntezy białka powstającego *de novo* z mRNA p53. Sugerowało to, że p53 wiążąc się do regionu

niekodującego 5' ma zdolność do inhibicji własnej syntezy i zaproponowano hipotetyczny model tłumaczący rolę tego oddziaływania w komórce. W normalnych warunkach poziom białka p53 w komórce jest bardzo niski. Odpowiedzialne za to miałyby być między innymi wiązanie białka p53 do własnego mRNA. Autorzy sugerują, że inhibicja translacji następowalaby wskutek stabilizacji struktury drugorzędowej RNA obecnej w regionie 5'UTR. Podczas uszkodzenia DNA białko p53 ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie stymuluje transkrypcję genów zaangażowanych w naprawę DNA. Translokacja do jądra powodowałaby obniżenie cytoplazmatycznego poziomu p53 i tym samym oddysocjowanie od regionu 5'UTR. Indukowałoby to translację p53, co jeszcze bardziej zwiększałoby pulę tego białka w komórce podczas warunków stresowych [87]. Chociaż powyższe wyniki dotyczą organizmu mysiego, to w przypadku komórek ludzkich również stwierdzono możliwość oddziaływania białka p53 z regionem 5'UTR własnego mRNA [83]. Nie przeprowadzono jednak dodatkowych doświadczeń, które scharakteryzowałyby tę interakcję.

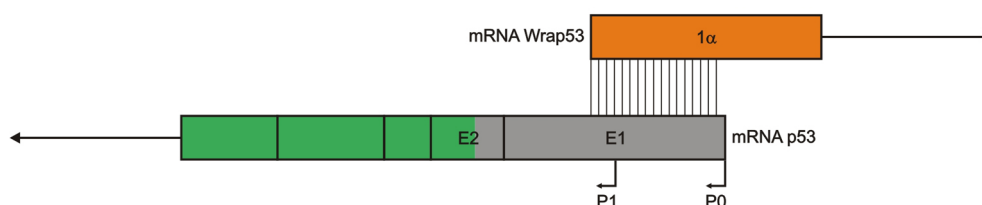
2.10.1.6. Pdc4

Pdc4 (ang. *programmed cell death protein 4*) jest czynnikiem zaangażowanym w kontrolę ekspresji wielu genów na etapie transkrypcji i translacji. Na poziomie transkrypcji, ma zdolność oddziaływania z czynnikami transkrypcyjnymi takimi jak c-Jun czy p53, prowadząc do ich inaktywacji, a tym samym inhibicji ekspresji genów, które są przez nie kontrolowane [88]. Na poziomie translacji, oddziałuje i hamuje aktywność czynnika inicjacyjnego eIF4A, którego aktywność helikazy RNA jest niezbędna do rozplatania struktur drugorzędowych obecnych w regionach niekodujących 5' szeregu mRNA [88]. Niedawno doniesiono, że Pdc4 wykazuje zdolność do hamowania translacji p53 w warunkach fizjologicznych [89]. Zaobserwowano bowiem, że wyciszenie ekspresji Pdc4 w komórkach prowadziło do wzrostu poziomu białka p53. Ponadto, doświadczenia z wykorzystaniem immunoprecypitacji kompleksów RNA-białko pozwoliły stwierdzić, że Pdc4 ma zdolność bezpośredniego oddziaływania z mRNA p53. Aby ustalić, która część mRNA p53 odpowiedzialna jest za kontakt z białkiem Pdc4, wykorzystano fragmenty RNA różniące się obecnością regionów niekodujących. Do wiązania Pdc4 oraz inhibicji translacji niezbędna była obecność regionu niekodującego 5' [89]. Systematyczne skracanie regionu niekodującego 5' osłabiało oddziaływanie z Pdc4, prawdopodobnie wskutek zaburzenia struktury drugorzędowej, jaka tworzy się w tym regionie mRNA p53. Dalsze doświadczenia pozwoliły określić, że Pdc4 hamuje tylko zależną od kapu translację p53, w wyniku oddziaływania i negatywnego wpływu na aktywność czynnika eIF4A [89].

2.11. Oddziaływania typu RNA–RNA i ich rola w regulacji ekspresji mRNA p53

2.11.1. Antysensowny transkrypt Wrap53

Ciekawym przykładem regulacji ekspresji p53 jest obecność antysensownego RNA Wrap53 (ang. *WD40 encoding RNA antisense to p53*). Jest to naturalnie występujący transkrypt, który oddziałuje z regionem niekodującym 5' mRNA p53 *in trans*, kontrolując jego translację [90]. Gen *Wrap53* zlokalizowany jest na chromosomie 17 i pokrywa się z genem *p53* w orientacji głowa–głowa. RNA Wrap53 może istnieć w trzech formach różniących się egzonem 1 (α , β lub γ), przy czym to właśnie egzon 1 α wykazuje komplementarność do egzonu 1 mRNA p53. Region całkowitej komplementarności pomiędzy obydwojema transkryptami obejmuje od 44 do 157 nt, w zależności od tego czy transkrypcja mRNA p53 rozpoczyna się od promotora P1 czy P0 (Rys. 18). W komórce RNA Wrap53 występuje na stukrotnie niższym poziomie niż mRNA p53, jednakże pomimo tak dużej dysproporcji jego obecność jest bardzo istotna dla ekspresji białka p53 [90].



Rysunek 18. Oddziaływanie antysensownego transkryptu *Wrap53* z mRNA *p53*. Pionowymi kreskami zaznaczono regiony komplementarne w obydwu cząsteczkach.

Działanie antysensownych cząsteczek RNA, których zwykle jest znacznie mniej niż ich docelowych mRNA tłumaczy się na dwa sposoby. W pierwszym przypadku, oddziaływanie z mRNA miałyby być krótkotrwałe, wystarczające do zmiany ekspresji docelowego transkryptu. Następnie, antysensowny RNA byłby uwalniany z kompleksu i mógłby wiązać się do kolejnej cząsteczki mRNA [91]. Drugi model zakłada, że z dupleksu antysensowny–sensowny RNA powstają endogenne siRNA, które następnie indukują degradację docelowych cząsteczek mRNA [91].

Wyciszenie ekspresji RNA *Wrap53* powoduje znaczny spadek ekspresji zarówno mRNA jak i białka p53 [90]. Sugeruje to, że bierze on udział w pozytywnej regulacji ekspresji p53, a potencjalne oddziaływanie *Wrap53*–mRNA p53 może być wymagane do utrzymania podstawowego poziomu p53 w komórce w warunkach fizjologicznych. Nie wiadomo dokładnie, w jaki sposób działa RNA *Wrap53* ale możliwe, że jego interakcja z mRNA p53 maskuje sekwencje regulatorowe obecne w regionie niekodującym 5' i chroni mRNA p53 przed degradacją [90]. Potwierdzają to badania, w których zaobserwowano, że transkrypty mRNA p53 pozbawione regionu 5'UTR są znacznie bardziej odporne na degradację [92]. RNA *Wrap53* pełni też ważną rolę w kontroli poziomu białka

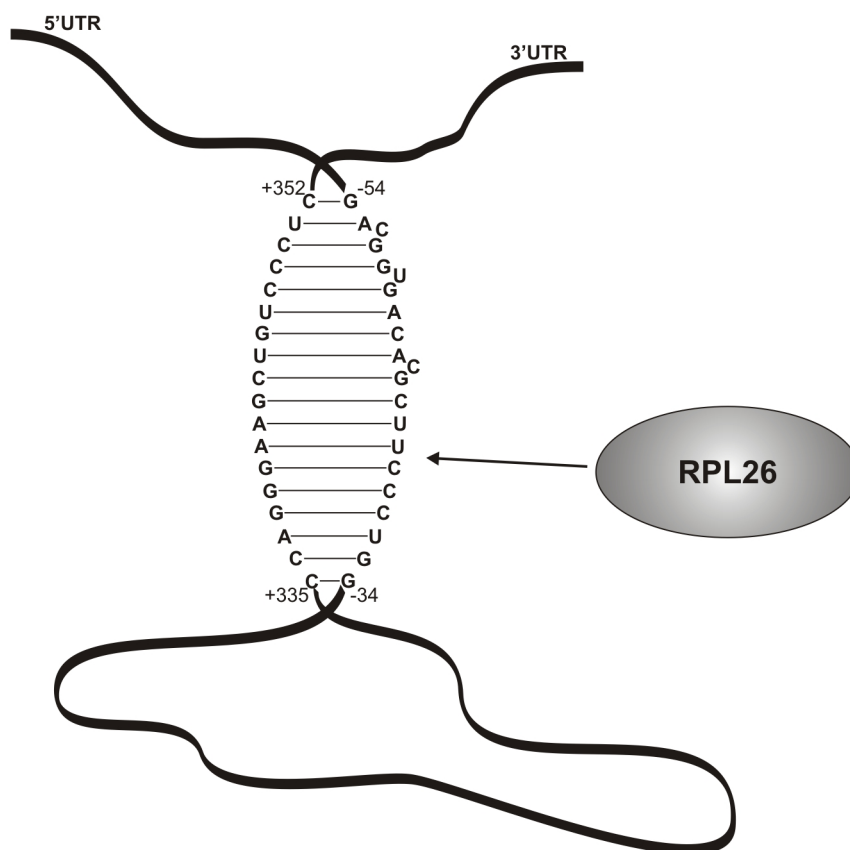
p53 podczas uszkodzenia DNA, gdyż wyciszenie jego ekspresji lub zablokowanie oddziaływania Wrap53–mRNA p53 przez oligonukleotydy RNA typu antysens uniemożliwia indukcję translacji p53, a co za tym idzie transkrypcji genów zaangażowanych w odpowiedź na takie warunki stresowe [90].

2.11.2. Oddziaływanie 5'UTR–ORF

Pierwsze doniesienia o możliwym oddziaływaniu dalekiego zasięgu w obrębie mRNA p53 pochodzą z badań nad aktywnością tej cząsteczki w komórkach drożdży [93]. Zaobserwowano, że u drożdży obecność regionu niekodującego 5' oraz pierwszych 154 reszt nukleotydowych regionu niekodującego 3' prawie całkowicie blokowała translację białka p53. Dalsze doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że za efekt ten odpowiedzialny był region 5'UTR, ponieważ jego obecność w transkrypcie była wystarczająca do osiągnięcia efektu obserwowanego w sytuacji, gdy mRNA zawierał obydwie regiony niekodujące [93]. Na tej podstawie zaproponowano istnienie struktury drugorzędowej w dystalnej części regionu kodującego mRNA p53, która wpływałaby na regulację translacji białka p53. Region 5'UTR oddziaływałby ze strukturą drugorzędową w części kodującej, prowadząc do powstania struktury typu pseudowęzła lub stabilizujących oddziaływań współosiowych między dwoma strukturami typu spinki [93]. W takim wypadku aktywność helikazy RNA rybosomu byłaby niewystarczająca do rozplecenia takiej struktury, co prowadziłoby do przedwczesnej terminacji translacji. Istnienie takiego oddziaływania częściowo może potwierdzać to, że z transkryptu zawierającego region 5'UTR i część kodującą powstaje w bardzo niewielkich ilościach tylko skrócony z końca karboksylowego wariant p53 [93].

2.11.3. Oddziaływanie pomiędzy regionami niekodującymi 5' i 3' mRNA p53

Bardziej przekonujących przesłanek na obecność oddziaływania dalekiego zasięgu w mRNA p53 dostarczyły badania, na podstawie których zaproponowano tworzenie regionu dwuniciowego pomiędzy regionem niekodującym 5' i 3' w mRNA p53 [84]. Wcześniej zauważono już, że obecność regionu niekodującego 5' wymagana jest do wiązania białka RPL26 i stymulacji translacji p53 w warunkach stresowych [83]. Stymulacja translacji p53 przez białko RPL26 wzrasta jednak jeszcze bardziej, gdy mRNA zawiera dodatkowo region 3'UTR [84]. Wykorzystując przewidywania struktury drugorzędowej RNA, wykazano możliwość istnienia regionu dwuniciowego, który tworzy się między resztami -34 do -54 regionu 5'UTR (numeracja od kodonu AUG p53 w kierunku końca 5') a +335 do +352 regionu 3'UTR (numeracja od kodonu terminacyjnego w kierunku końca 3') (Rys. 19) [84].



Rysunek 19. Model potencjalnego oddziaływania dalekiego zasięgu między regionami niekodującymi 5' i 3' mRNA p53 [84].

W celu sprawdzenia, czy takie oddziaływanie ma miejsce, zmapowano strukturę drugorzędową mRNA p53 z wykorzystaniem cięć indukowanych RNazą A, T1 oraz V1. W mRNA p53 pozbawionym regionu 3'UTR rybonukleaza A indukowała pojedyncze, silne cięcia w okolicy reszty urydynowej w pozycji -36, sugerując jej ulokowanie w regionie jednoniciowym. Na poparcie tej obserwacji wprowadzono mutację zmieniającą U(-36) na A(-36), co powodowało zanik cięcia. Ponadto, do cięcia RNazą A nie dochodziło, gdy w mRNA p53 obecny był region 3'UTR. W tym wypadku, autorzy tłumaczyli to powstaniem regionu dwuniciowego z zaangażowaniem obydwu regionów niekodujących. Podobne rezultaty otrzymano z wykorzystaniem RNazy T1. W przypadku mRNA pozbawionego regionu 3'UTR obserwowano pojedyncze cięcia w okolicy reszty guanozynowej w pozycji -34 lub -35, a w mRNA zawierającym 3'UTR następował zanik cięcia. Wyniki otrzymane z użyciem RNazy V1 również wydają się potwierdzać hipotezę autorów, ponieważ cięcia miały miejsce tylko wtedy, gdy mRNA p53 zawierał obydwa regiony niekodujące, a więc w sytuacji utworzenia potencjalnego regionu dwuniciowego [84]. Nie jest jednak jasne, dlaczego używając rybonukleazy A i T1 autorzy zaobserwowali tylko pojedyncze cięcia w obrębie regionu niekodującego 5'. Późniejsze wyniki analizy struktury drugorzędowej tego regionu wykazały bowiem liczne miejsca w tej części mRNA p53 dostępne dla tych enzymów [69].

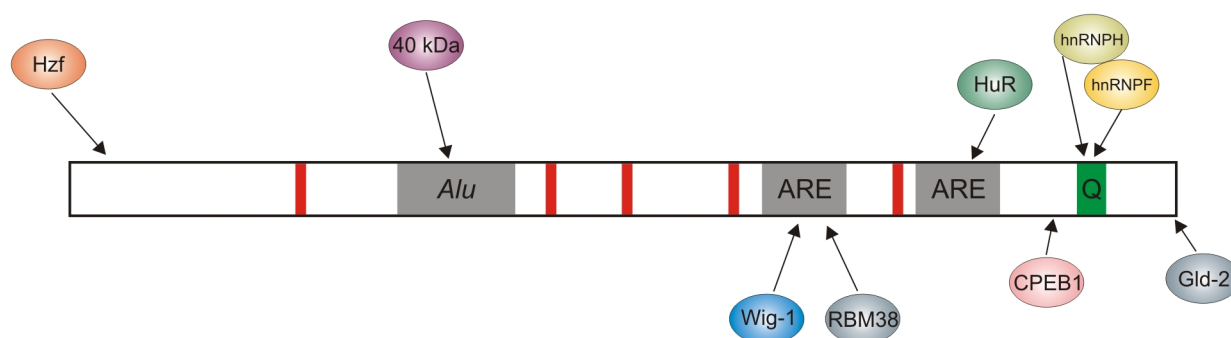
Sprawdzono również wpływ tworzenia domniemanego regionu dwuniciowego na wiązanie białka RPL26. Najpierw, wykorzystano do tego celu opóźnioną migrację kompleksów białko-RNA w żelu poliakryloamidowym, która wykazała, że RPL26 wiąże się do mRNA p53 tylko wtedy, gdy obecne są obydwa regiony niekodujące lub tylko 5'UTR. Następne testy przeprowadzono *in vivo*. Do komórek wprowadzono różne warianty mRNA p53, a tworzenie kompleksów z białkiem RPL26 monitorowano z wykorzystaniem immunoprecypitacji z przeciwciałami [84]. Obecność mutacji w regionach potencjalnego parowania regionów niekodujących powodowała silne obniżenie wiązania białka RPL26 [84]. Sugerowało to, że również *in vivo* takie oddziaływanie może mieć miejsce. W czasie warunków stresowych poziom białka p53 w komórce ulega zwiększeniu, między innymi wskutek stymulacji translacji przez wiązanie RPL26 [83]. Zważywszy na to, sprawdzono jak zablokowanie potencjalnego oddziaływania między regionami niekodującymi mRNA p53 wpłynie na indukcję translacji białka p53, w odpowiedzi na potraktowanie komórek promieniowaniem jonizującym. W tym celu, do komórek wprowadzono krótkie, jednoniciowe oligonukleotydy DNA, komplementarne do odpowiednich sekwencji w 3' lub 5'UTR. Ich zadaniem było utworzenie regionu dwuniciowego z sekwencjami docelowymi, blokując tym samym wiązanie białka RPL26. W warunkach stresowych wywołanych promieniowaniem jonizującym, zablokowanie potencjalnego oddziaływania między 5' i 3'UTR uniemożliwiło stymulację translacji i akumulację białka p53 nawet w sytuacji, gdy w komórkach indukowano nadprodukcję białka RPL26 [84]. Zatem, wydaje się, że tworzenie oddziaływania dalekiego zasięgu w mRNA p53 może mieć duże znaczenie dla wiązania białka RPL26 oraz indukcji translacji p53 w warunkach stresowych. Ustalono również, które reszty nukleotydowe w regionie 5'UTR mają najistotniejsze znaczenie dla formowania się potencjalnego regionu dwuniciowego oraz wiązania białka RPL26. Są to trzy reszty UGG (pozycje -34 do -36), których mutacja powodowała silne obniżenie zależnej od RPL26 stymulacji translacji p53 w warunkach stresowych [84].

2.12. Rola regionu niekodującego 3' w regulacji ekspresji białka p53

2.12.1. Struktura oraz elementy regulatorowe obecne w regionie niekodującym 3' mRNA p53

Region niekodujący 3' mRNA p53 ma długość 1176 reszt nukleotydowych i zlokalizowany jest całkowicie w egzonie 11. W regionie tym znajduje się szereg elementów regulatorowych odgrywających istotną rolę w kontroli ekspresji białka p53 (Rys. 20). Jednym z nich jest element typu Alu (ang. *alu-like element*) o długości około 470 reszt nukleotydowych (Rys. 20). Elementy Alu należą do najczęściej występujących sekwencji powtarzających się w genomie. Ich średnia długość wynosi około 300 reszt nukleotydowych. Wywodzą się z 7SL RNA, który wchodzi w skład kompleksu SRP (ang. *signal recognition particle*) biorącego udział w translokacji

nowo syntetyzowanych białek do retikulum endoplazmatycznego [94, 95]. Innymi sekwencjami regulatorowymi obecnymi w regionie 3'UTR mRNA p53 są bogate w reszty AU, dwa elementy typu ARE (ang. *AU-rich elements*) (Rys. 20). Elementy ARE, obecne w regionach 3'UTR wielu cząsteczek mRNA zaangażowane są w potranskrypcyjną regulację ekspresji genów. Ich obecność stymuluje degradację mRNA wskutek promowania deadenylacji lub obniżenia poziomu translacji [96]. Elementy ARE można znaleźć głównie w cząsteczkach mRNA genów, których ekspresja wymaga bardzo dokładnej kontroli, a więc genów kodujących białka zaangażowane przykładowo w regulację cyklu komórkowego (c-myc, c-fos, p53). Mogą być zbudowane z powtórzeń AUUUA w różnych układach lub zawierać tylko reszty urydynowe [96]. W przypadku mRNA p53, jeden element bogaty jest w reszty urydynowe, a drugi w reszty AU. W regionie 3'UTR mRNA p53 zidentyfikowano również sekwencje odpowiedzialne za poliadenylację cytoplazmatyczną, a także miejsca oddziaływania z cząsteczkami mikroRNA (Rys. 20).



Rysunek 20. Schematyczne przedstawienie regionu niekodującego 3' mRNA p53. Zaznaczono sekwencje regulatorowe oraz białka wiążące się do tego regionu. Kolor szary – elementy Alu i ARE, czerwone kreski – miejsca oddziaływania cząsteczek mikroRNA, Q – struktura kwadrupleksu.

Analiza *in silico* wykazała, że element Alu może przyjmować stabilną strukturę drugorzędową i tworzyć izolowany od reszty mRNA p53 motyw strukturalny [97]. Dodatkowo, gdy w przewidywaniu uwzględniono ogon poli(A), dochodzi do jego oddziaływania z dystalnym fragmentem elementu Alu, który zawiera ciąg około 50 reszt urydynowych, co dodatkowo stabilizuje strukturę [97]. Badania funkcjonalne przeprowadzone *in vitro* i *in vivo* nad wpływem elementu Alu na translację wykazały, że jego obecność obniża poziom syntezy białka p53 [97, 98]. Dokładniejsze określenie granic elementu represorowego nastąpiło w 1999 roku, gdy wykorzystano szereg konstruktów zawierających różne fragmenty regionu 3'UTR mRNA p53 [99]. Wykazano wówczas, że element represorowy ma długość około 66 nt, jest bogaty w reszty urydynowe i znajduje się w dystalnej części elementu Alu [99]. Ustalono również, że z regionem tym oddziałuje niezidentyfikowane dotąd białko o masie cząsteczkowej 40 kDa [99]. Co ciekawe, w warunkach stresowych, wywołanych promieniowaniem γ , zaobserwowano zniesienie wpływu elementu represorowego na translację białka p53 [98]. Sugeruje się, że efekt ten może być spowodowany dysocjacją białka 40 kDa [99]. Nie wyklucza się również możliwości oddziaływania regionu bogatego w reszty urydynowe z ogonem poli(A). Mogłoby to tworzyć miejsce wiązania czynnika lub czynników regulatorowych lub wręcz

przeciwnie, blokować miejsce takiej interakcji, wpływając tym samym na translację białka p53 [99].

2.12.2. Udział białek oddziałujących z regionem niekodującym 3' mRNA p53 w regulacji ekspresji białka p53

Zidentyfikowano szereg białek oddziałujących z regionem 3'UTR mRNA p53. Pierwszym z nich było białko HuR (ang. *Hu antigen R*), należące do rodziny białek ELAV (ang. *embryonic lethal abnormal vision*), które wiążąc się do regionów bogatych w reszty AU wpływają na stabilizację i ekspresję cząsteczek mRNA [100]. Białko HuR oddziałuje z regionem 3'UTR mRNA p53 w warunkach fizjologicznych, jednak silniejszą asocjację obserwuje się podczas warunków stresowych indukowanych promieniowaniem UV-C [101]. Wiązanie białka HuR do mRNA p53 zwiększa poziom translacji białka p53, jednakże mechanizm tej aktywacji nie jest do końca poznany. Obecność kompleksów HuR–mRNA p53 we frakcji polisomów pozwala przypuszczać, że białko to wpływa na relokalizację mRNA p53 do miejsc intensywnej translacji [101]. Jak dotąd, nie udało się precyzyjnie zlokalizować miejsca wiązania białka HuR do długiego na prawie 1200 nt regionu 3'UTR mRNA p53. Jednakże, tuż przy dystalnym końcu tego regionu znajduje się element ARE bogaty w reszty AU, który potencjalnie mógłby być miejscem takiego oddziaływania (Rys. 20). Częściowo sugerują to doświadczenia przeprowadzone na modelu komórek mysich, gdzie przy podwyższonym poziomie białka HuR w komórce, mRNA p53 zawierający delecję regionu bogatego w reszty AU wykazywał obniżoną translację [102].

Podobną rolę w regulacji translacji p53 pełni białko Hzf (ang. *hematopoietic zinc finger protein*), które oddziałując z regionem 3'UTR mRNA p53 pozytywnie reguluje translację p53 [103]. Białko to wymagane jest do prawidłowego przebiegu translacji oraz lokalizacji komórkowej specyficznych transkryptów [104]. Co ciekawe, białka Hzf oraz HuR mają zdolność jednoczesnego oddziaływania z regionem 3'UTR mRNA p53 pełniąc odrębne funkcje w regulacji jego translacji. Białko Hzf stymuluje eksport mRNA p53 z jądra komórkowego do cytoplazmy, natomiast białko HuR indukuje syntezę p53, prawdopodobnie wskutek relokalizacji do polisomów [101, 103]. Podjęto próbę identyfikacji regionu w 3'UTR mRNA p53, do którego wiąże się białko Hzf. Wykorzystanie różnych wariantów sekwencyjnych oraz techniki opóźnionej migracji kompleksów białko–RNA pozwoliło ustalić, że główne miejsce wiązania Hzf leży w obrębie pierwszych 60 reszt nukleotydowych regionu 3'UTR [103].

Kolejnym białkiem oddziałującym z regionem 3'UTR mRNA p53 jest Wig-1 (ang. *WT p53 induced gene 1 protein*). Wig-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który odgrywa także istotną rolę w stabilizacji cząsteczek mRNA w komórce [105]. Indukcja transkrypcji genu *Wig-1* regulowana jest przez białko p53, co tworzy pozytywne sprzężenie zwrotne. Wig-1 wywiera pozytywny wpływ na ekspresję p53. Doświadczenia z wykorzystaniem immunoprecypitacji kompleksów białko–RNA

wykazały, że Wig-1 wiąże się do regionu bogatego w reszty urydynowe zarówno w warunkach normalnych jak i podczas uszkodzenia DNA indukowanego kamptotecyną [106]. Po związaniu, Wig-1 blokuje proces deadenyacji, która jest jednym z pierwszych sygnałów do degradacji cząsteczek mRNA. Wskutek tego mRNA p53 ulega stabilizacji, co jest szczególnie ważne podczas warunków stresowych, kiedy wydajna synteza p53 pozwala na szybką odpowiedź komórki [106].

Region w 3'UTR mRNA p53 bogaty w reszty urydynowe jest miejscem wiązania nie tylko białka Wig-1, ale także RBM38 (ang. *RNA binding motif protein 38*). Należy ono do tej samej rodziny białek co HuR, regulujących ekspresję genów poprzez oddziaływanie z regionami bogatymi w reszty AU [100]. Wiązanie RBM38 do regionu 3'UTR mRNA p53 wywołuje jednak odmienny efekt, a mianowicie hamuje translację białka p53 [107]. Analiza migracji kompleksów białko-RNA w żelu poliakryloamidowym wykazała, że region bogaty w reszty urydynowe jest niezbędny do utworzenia kompleksów z RBM38. Co więcej, białko to ma również zdolność tworzenia kompleksów z regionem niekodującym 5'. Jednakże, dotychczas nie podjęto próby scharakteryzowania tego oddziaływania [107]. Białko RBM38 hamuje translację mRNA p53 w ciekawy sposób. Otóż, po związaniu do mRNA p53 oddziałuje bezpośrednio z czynnikiem inicjacyjnym eIF4E, uniemożliwiając mu wiązanie do struktury kapu [107]. Rozpoznanie struktury kapu przez eIF4E jest jednym z kluczowych etapów inicjacji translacji. Uniemożliwienie takiego oddziaływania silnie obniża (choć nie blokuje całkowicie) translację p53 [107]. Być może, pozostała aktywność translacyjna związana jest z niezależnym od kapu mechanizmem inicjacji translacji p53 [21, 22]. Ze względu na rozpoznawanie przez białko RBM38 zarówno regionu niekodującego 5' jak i 3' powstaje pytanie, po związaniu do którego z nich następuje inhibicja translacji? Odpowiedzi na to pytanie może być kilka. Hipoteza cyrkularyzacji mRNA podczas translacji zakłada, że wskutek oddziaływania czynników inicjacyjnych, białek wiążących się do regionu 3'UTR oraz ogonu poli(A), dochodzi do pośredniego kontaktu regionów niekodujących 5' i 3' cząsteczek mRNA [59]. Mogłoby to tłumaczyć jak białko RBM38 po związaniu do 3'UTR reguluje translację p53. Innym wytłumaczeniem może być to, że RBM38 mając zdolność wiązania się także do 5'UTR mRNA p53 znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie końca 5', a więc i struktury kapu, dzięki czemu może oddziaływać z czynnikiem eIF4E. Jeszcze jednym wyjaśnieniem może być zaobserwowana niedawno potencjalna możliwość tworzenia oddziaływania dalekiego zasięgu między regionami niekodującymi 5' i 3' mRNA p53 [84]. Taka sytuacja również zbliżałaby obydwie regiony, przez co RBM38 wiążąc się do 3'UTR mógłby oddziaływać z eIF4E i hamować translację. Jednakże to, czy RBM38 hamuje translację p53 wskutek oddziaływania z 5' czy 3'UTR pozostaje do zbadania.

Dojrzewanie końca 3' cząsteczek pre-mRNA jest procesem polegającym na ich przecięciu w określonym miejscu i dodaniu ogona poli(A). Jest to proces niezbędny do prawidłowego funkcjonowania cząsteczek mRNA, stabilności, translokacji do cytoplazmy oraz translacji [108]. Podczas uszkodzenia DNA, jednym z mechanizmów obronnych komórki jest zablokowanie

dojrzewania końca 3', w wyniku czego dochodzi do obniżenia poziomu cząsteczek mRNA i blokady translacji [109]. Ekspresja białek zaangażowanych w odpowiedź na działanie czynników stresowych musi być jednak kontrolowana w sposób, który pozwala na ich wydajną syntezę, aby komórka miała szansę na przetrwanie. W przypadku p53 jest to możliwe m.in. dzięki obecności struktury kwadrupleksu w regionie 3'UTR jego mRNA, zlokalizowanego między 108 a 142 nukleotydem poniżej sygnału poliadenylacji [110]. Do struktury kwadrupleksu wiążą się dwa białka: hnRNP H (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H*) oraz hnRNP F (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F*). Ich oddziaływanie z tą strukturą jest bardzo istotne podczas uszkodzeń DNA, gdyż pomimo warunków stresowych możliwe jest prawidłowe dojrzewanie końca 3' mRNA p53. Nie wiadomo dokładnie jak przebiega ta regulacja. Sądzi się, że obydwa białka wiążąc się do struktury kwadrupleksu oddziałują z czynnikami biorącymi udział w dojrzewaniu końca 3' takimi jak CstF (ang. *cleavage stimulatory factor*) czy polimeraza poliA. W ten sposób uniemożliwiają inaktywację tych białek, co ma miejsce podczas warunków stresowych spowodowanych uszkodzeniami DNA [110].

Proces poliadenylacji mRNA nie jest ograniczony tylko do jądra komórkowego. Może zachodzić również w cytoplazmie dzięki obecności specyficznych czynników wiążących się do cząsteczek mRNA oraz przynajmniej kilku cytoplazmatycznych polimeraz poli(A) [111]. Poliadenylacja cytoplazmatyczna związana jest z wieloma mechanizmami, takimi jak, rozwój na wczesnym etapie embrionalnym czy gametogeneza [111]. Tuż powyżej sygnału poliadenylacji w regionie 3'UTR mRNA p53 zlokalizowane są dwa elementy poliadenylacji cytoplazmatycznej, CPE (ang. *cytoplasmic polyadenylation element*), które odgrywają rolę w regulacji translacji mRNA p53. W procesie tym biorą udział dwa białka, CPEB1 (ang. *cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1*) oraz GLD-2. CPEB1 jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za poliadenylację cytoplazmatyczną, ponieważ ma zdolność oddziaływania z elementami CPE, natomiast GLD-2 stanowi podjednostkę katalityczną cytoplazmatycznej polimerazy poli(A) [111]. Dotychczas nie ustalono, czy białko CPEB1 bezpośrednio wiąże się do regionu 3'UTR mRNA p53. Jednakże, w jego obecności dochodzi do silnego obniżenia ekspresji genu reporterowego, zawierającego przyłączony 3'UTR mRNA p53 [112]. Działanie CPEB1 wydaje się być specyficzne komórkowo, gdyż w innym typie linii komórkowej jego obecność stymuluje translację p53 [113]. Nie wykluczone, że za efekt ten odpowiedzialne jest białko GLD-2, w którego obecności zaobserwowano zniesienie negatywnego wpływu CPEB1 na translację p53. Białko GLD-2 jest bowiem zdolne do poliadenylacji regionu niekodującego 3' mRNA p53, w wyniku czego dochodzi do zwiększenia stabilności oraz aktywności translacyjnej tego transkryptu [112].

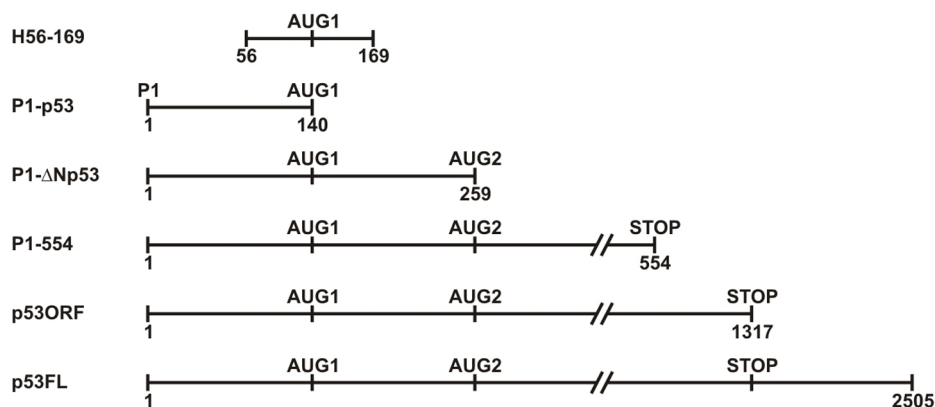
2.12.3. Udział cząsteczek mikroRNA w ekspresji białka p53

MikroRNA są małymi niekodującymi cząsteczkami RNA długości od 20 do 25 nukleotydów, zaangażowanymi w głównie negatywną regulację ekspresji genów [114]. Powstają w dwóch etapach. W pierwszym, pierwotne transkrypty mikroRNA ulegają przekształceniu przez enzym Drosha do cząsteczek prekursorowych, które mają postać struktury typu spinki. W drugim etapie, enzym Dicer docina prekursor, tworząc dojrzały dupleks mikroRNA [114]. Jedna z nici mikroRNA ulega następnie inkorporacji do kompleksu RISC (ang. *RNA induced silencing complex*) i trafia do docelowego transkryptu. Cząsteczki mikroRNA najczęściej wiążą się do regionów niekodujących 3' mRNA z zachowaniem niepełnej komplementarności. Prowadzi to do hamowania translacji lub obniżenia stabilności docelowych transkryptów [114]. Odgrywają również istotną rolę w procesie nowotworzenia, ponieważ zaburzoną ekspresję szeregu z nich obserwuje się w wielu typach nowotworów [115]. Dotychczas zidentyfikowano pięć cząsteczek mikroRNA, które bezpośrednio regulują ekspresję białka p53. Są to mir-125a, mir-125b, mir-504, mir-25 oraz miR-30d [116-119]. Wszystkie oddziałują w obrębie regionu 3'UTR mRNA p53, co w rezultacie prowadzi do obniżenia ekspresji białka. Okazuje się, że jest to bardzo ważny mechanizm kontroli poziomu p53 w komórce, ponieważ wyciszenie ekspresji któregokolwiek z nich prowadzi do akumulacji białka p53, a w konsekwencji do niekontrolowanej apoptozy, pomimo braku czynników stresowych [116-119]. Z drugiej strony, podwyższenie poziomu większości z wymienionych cząsteczek mikroRNA prowadziło do obniżonej odpowiedzi na warunki stresowe, wskutek niedostatecznej ilości białka p53 w komórce [116-119]. Chociaż do tej pory odkryto tylko kilka cząsteczek mikroRNA regulujących ekspresję p53 to możliwe, że inaktywacja ekspresji tego białka w obecności podwyższonego poziomu specyficznych mikroRNA może być jednym z pierwszych etapów prowadzących do rozwoju przynajmniej niektórych rodzajów nowotworów [117].

3. Wyniki i Dyskusja

3.1. Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się w miejscu inicjacji transkrypcji P1

Pierwszy etap moich badań polegał na analizie struktury drugorzędowej kilku fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się w miejscu inicjacji transkrypcji P1 (Rys. 21). RNA P1- Δ Np53 składał się z 259 reszt nukleotydowych i zawierał pełnej długości region niekodujący 5' oraz część otwartej ramki odczytu między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i izoformy Δ Np53. Drugą cząsteczką był RNA P1-p53, odpowiadający izolowanemu regionowi 5'UTR mRNA p53 o długości 140 reszt nukleotydowych, zakończony kodonem inicjacyjnym dla białka p53. RNA P1-554 reprezentował pierwsze 554 reszty nukleotydowe mRNA p53, RNA p53ORF zawierał 5'UTR i całą część kodującą (łącznie 1317 reszt nukleotydowych), natomiast RNA p53FL przedłużony był dodatkowo o region niekodujący 3' (łącznie 2505 reszt nukleotydowych). Najkrótszym fragmentem był RNA H56-169 zawierający 114 reszt nukleotydowych odpowiadających regionowi G56–C169 mRNA p53. Wszystkie cząsteczki namnożyłem na matrycy cDNA z wątroby ludzkiej, a następnie z wykorzystaniem techniki PCR wprowadziłem do nich sekwencje promotora transkrypcyjnego dla polimerazy RNA z faga T7. Zgodność sekwencji wszystkich cząsteczek została potwierdzona za pomocą sekwencjonowania. RNA otrzymane metodą transkrypcji *in vitro* odzyskiwane były z żelu poliakryloamidowego z 7 M mocznikiem lub z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu do oczyszczania RNA. Badane RNA w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących migrowały w postaci pojedynczych pasm.



Rysunek 21. Cząsteczki RNA użyte w badaniach struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53. P1 – region promotorowy P1 genu p53.

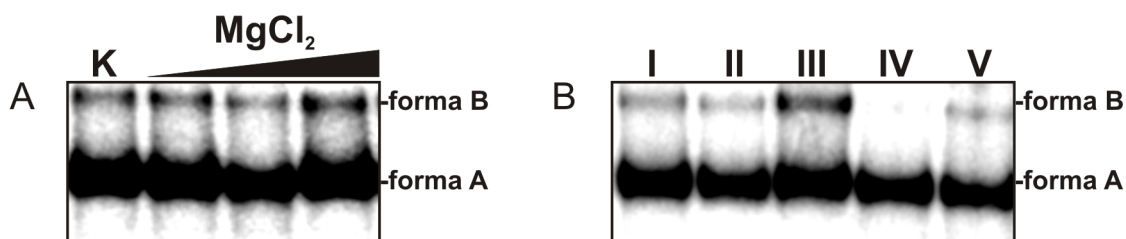
W swoich doświadczeniach, jako sondy do badania struktury drugorzędowej RNA stosowałem głównie metodę cięć indukowanych jonami ołowiu oraz technikę SHAPE (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*). Metoda cięć indukowanych jonami ołowiu stosowana jest w naszym laboratorium od szeregu lat. Umożliwia identyfikację reszt nukleotydowych w regionach jednoniciowych oraz o zaburzonej strukturze helikalnej [70]. Chociaż zasadniczo metoda ta nie wykazuje specyficzności co do rodzaju zasady azotowej, to zwykle obserwuje się słabsze cięcia po resztach purynowych, w szczególności guanozynowych [120]. Technika SHAPE polega na wykorzystaniu bezwodnika NMIA (ang. *N-methylisatoic anhydride*), który acyluje grupy 2'-hydroksylowe reszt ryboz położonych w regionach jednoniciowych RNA [121]. Powstałe addukty identyfikuje się za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji, wskutek terminacji wydłużania startera DNA o jedną pozycję przed resztą, która uległa modyfikacji. Technika SHAPE wykazuje niewielką specyficzność wobec rodzaju zasady azotowej, jednakże przeprowadzone ostatnio dokładne badania wykazały, że NMIA ma około 1,5-krotnie większą reaktywność w stosunku do reszt purynowych niż pirymidynowych [122]. Obydwie metody wydają się zatem bardzo dobrze uzupełniać. Stosując technikę SHAPE oraz w części doświadczeń mapowania struktury z wykorzystaniem jonów ołowiu, jako metody detekcji używałem reakcji odwrotnej transkrypcji, co w przypadku niektórych reszt nukleotydowych uniemożliwiało wyznaczenie ich reaktywności. Dotyczyło to regionów zaangażowanych w hybrydyzację startera DNA do reakcji odwrotnej transkrypcji oraz reszt, w obrębie których enzym dokonywał niespecyficznej terminacji wydłużania startera, co manifestowało się silnymi prążkami na autoradiogramach zarówno w liniach reakcyjnych jak i kontrolnych.

W celu udokładnienia wyników otrzymanych z użyciem powyższych metod, stosowałem niekiedy modyfikację chemiczną za pomocą siarczanu dimetylu oraz mapowanie enzymatyczne z wykorzystaniem rybonukleaz: A, T1 i V1. RNazy A i T1 hydrolizują RNA w regionach jednoniciowych (rybonukleaza A po resztach urydynowych i cytydynowych, rybonukleaza T1 po resztach guanozynowych), podczas gdy RNaza V1 wykazuje specyficzność względem regionów dwuniciowych i niekiedy jednoniciowych zaangażowanych w oddziaływania warstwowe [70].

3.1.1. Struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53

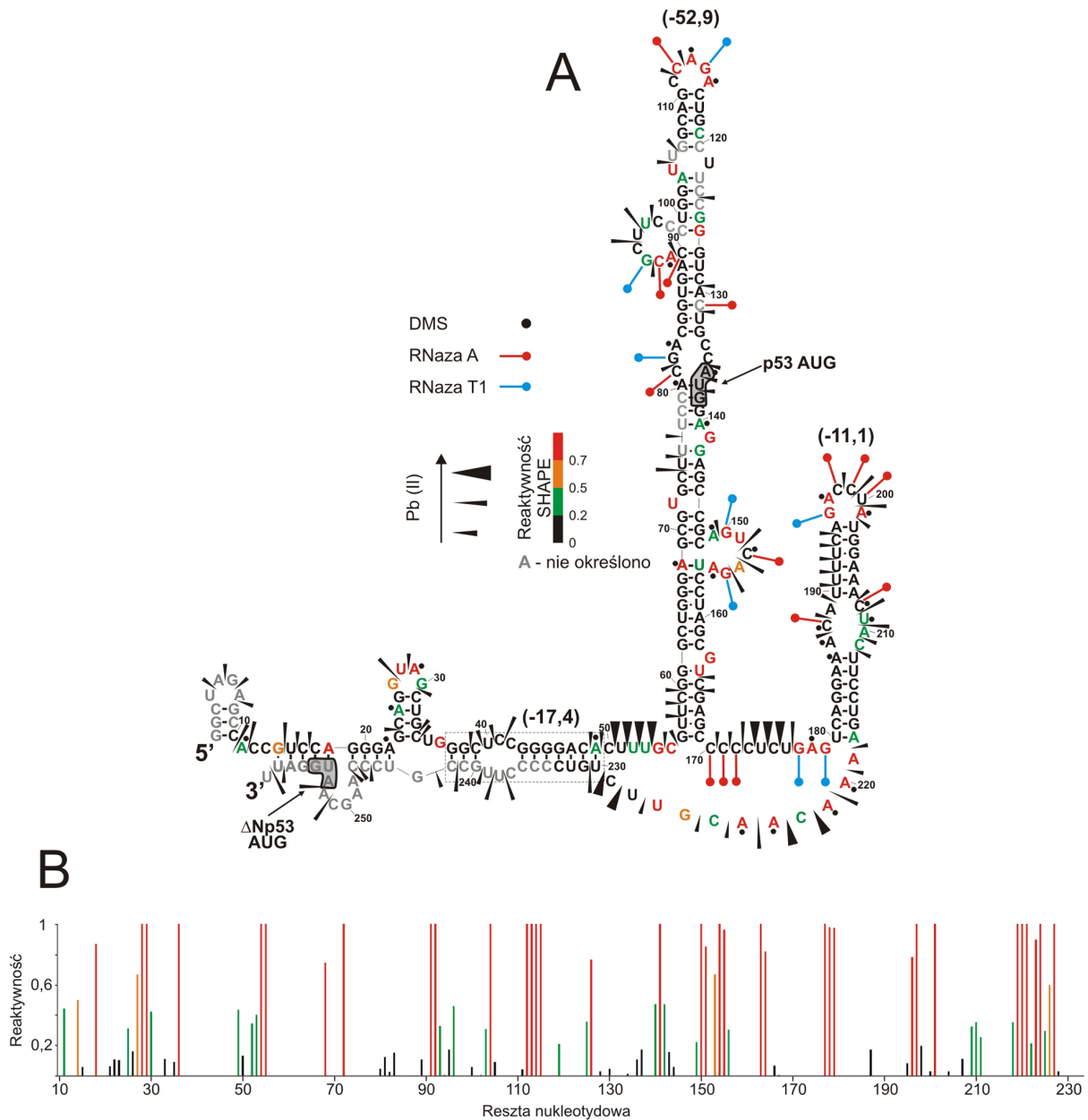
Początkowym etapem badań było sprawdzenie homogenności struktury RNA P1- Δ Np53. W tym celu przeprowadziłem elektroforezę RNA w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących (Rys. 22). Jako czynnik zmienny stosowałem różne stężenie chlorku magnezu oraz różne warunki temperaturowe renaturacji RNA. Na podstawie przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że RNA P1- Δ Np53 charakteryzuje się dużą homogennością struktury, na którą większego wpływu nie miały warunki jonowe jak i temperaturowe, ponieważ cząsteczka ta migrowała w postaci jednego głównego prążka (Forma A). Na autoradiogramach widać także wyżej

migrujący prążek, reprezentujący prawdopodobnie formę dimeryczną RNA (Forma B). Stanowi ona jednak mniej niż 10% głównego produktu, a na jej obecność większy wpływ mają warunki temperaturowe niż jonowe.



Rysunek 22. Analiza migracji RNA P1- Δ Np53 w warunkach natywnych. Autoradiogramy prezentują rozdzielanie elektroforetyczne RNA P1- Δ Np53 w zależności od stężenia chlorku magnezu (2,5 mM, 5 mM, 10 mM) (A) oraz warunków renaturacji (B). K – reakcja kontrolna bez dodatku MgCl₂. Warunki denaturacji: I – 90°C – 3 minuty, a następnie schładzanie do temperatury 37°C w tempie 0,1°C/sekundę, II – 65°C – 3 minuty i 4°C – 10 minut, III – 65°C – 3 minuty i 37°C – 10 minut, IV – 100°C – 1 minuta i 4°C – 10 minut, V – 100°C – 1 minuta, 4°C – 10 minut i 37°C – 10 minut.

Struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53 przedstawiona na rysunku 23 otrzymana została z użyciem programu *RNAstructure* [123]. W przewidywaniu uwzględniono więzy strukturalne obliczone na podstawie analizy ilościowej wyników uzyskanych z wykorzystaniem techniki SHAPE. Zaprezentowano strukturę o najwyższej zgodności z danymi doświadczalnymi, dla której wartość parametru ΔG wynosi -117,3 kcal/mol. Duża, przewidziana przez program stabilność termodynamiczna tej cząsteczki spowodowana jest zapewne wysoką (60%) zawartością par G-C oraz tym, że aż 62% reszt uczestniczy w tworzeniu regionów helikalnych. Struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53 organizuje się głównie w wyniku oddziaływania sekwencji regionu niekodującego 5' (reszty 14–80) z fragmentem sekwencji kodującej (reszty 137–169 i 230–258). Dzięki temu powstaje charakterystyczny motyw strukturalny, którym jest duża struktura typu spinki, obejmująca reszty G56–C169 (w jej obrębie znajduje się kodon inicjacyjny dla białka p53), a ponadto region oddziaływań między częścią 5' (G14–A49) i 3' (U230–U258). Elementem struktury drugorzędowej RNA P1- Δ Np53, który tworzy wyłącznie sekwencja kodująca jest spinka U180–A218. Spinka G56–C169 składa się ze 114 reszt nukleotydowych i jest najstabilniejszym motywem struktury RNA P1- Δ Np53 ($\Delta G = -52,9$ kcal/mol). Posiada dwa wielonukleotydowe wypełnienia: A91–C98 (8 reszt) i A149–A155 (7 reszt), trzy jednonukleotydowe wybrzuszenia U72, G141 i G163 oraz dwie pętle wewnętrzne. W jednej z nich, utworzonych przez reszty C81–A83 i C134–A136, zlokalizowana jest część kodonu inicjacyjnego białka p53 (Rys. 23). Pętla apikalna spinki jest pięcionukleotydowa. Około połowa trzonu spinki G56–C169 tworzy się w wyniku parowania części 5'UTR z sekwencją kodującą, natomiast część apikalna powstaje wskutek wzajemnego parowania dystalnej części regionu niekodującego 5' (reszty C84–G133) (Rys. 23).

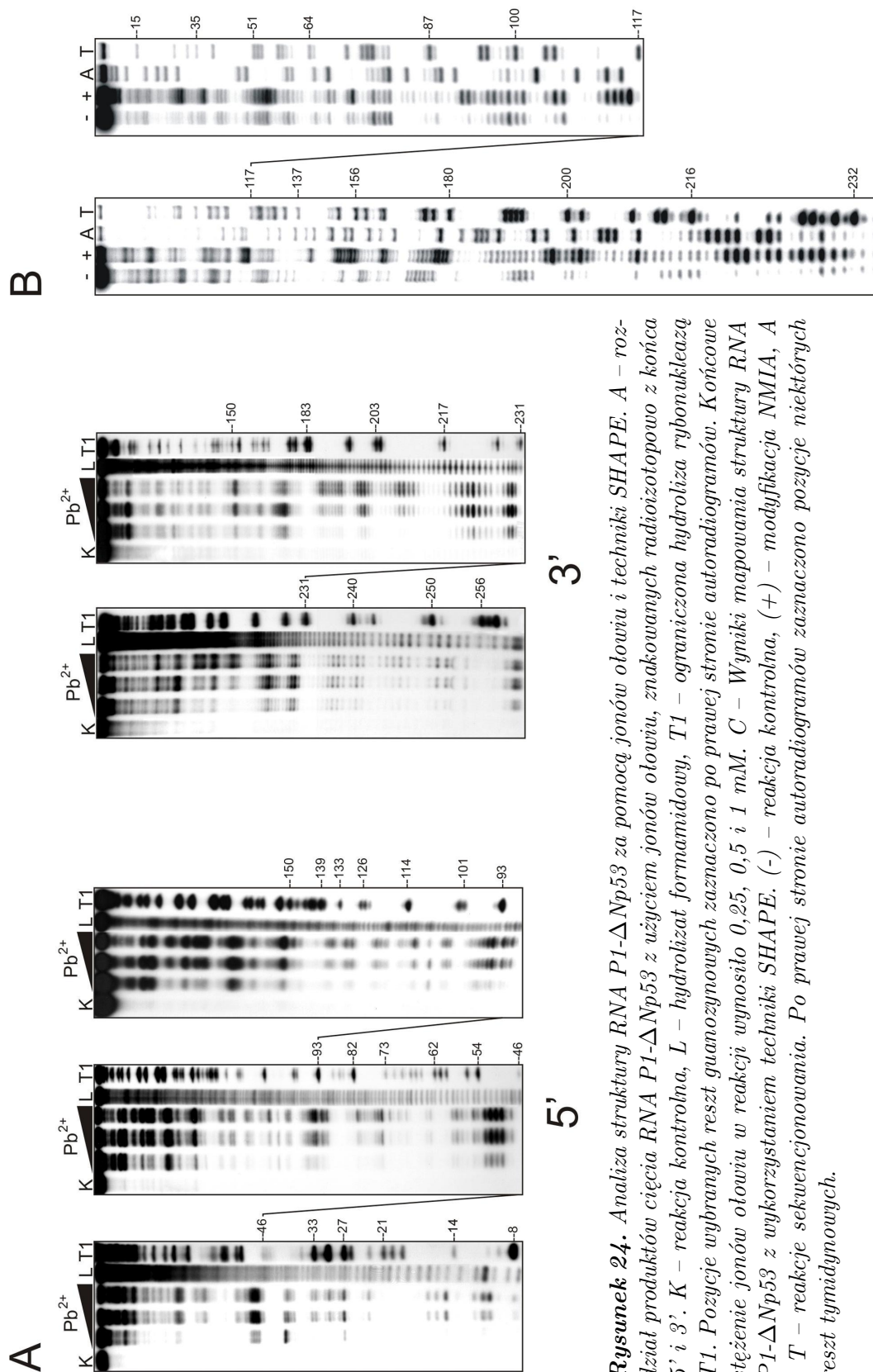


Rysunek 23. Struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53. A – proponowany model struktury drugorzędowej RNA P1- Δ Np53. Wielkość czarnych trójkątów odpowiada sile cięcia jonami ołowiu. Reaktywność reszt nukleotydowych wobec NMIA wyrażona jest kolorami, zgodnie z legendą: 0–0,2 (czarny – niereaktywne), 0,2–0,5 (zielony – słaba reaktywność), 0,5–0,7 (pomarańczowy – średnia reaktywność), powyżej 0,7 (czerwony – silna reaktywność). Kolorem szarym zaznaczono reszty, dla których reaktywność nie została wyznaczona. W nawiasach podano wartość parametru ΔG poszczególnych motywów strukturalnych wyrażoną w kcal/mol. B – wykres reaktywności reszt nukleotydowych wobec NMIA w zależności od ich pozycji w RNA P1- Δ Np53. Kolor słupków jest zgodny z legendą na panelu A.

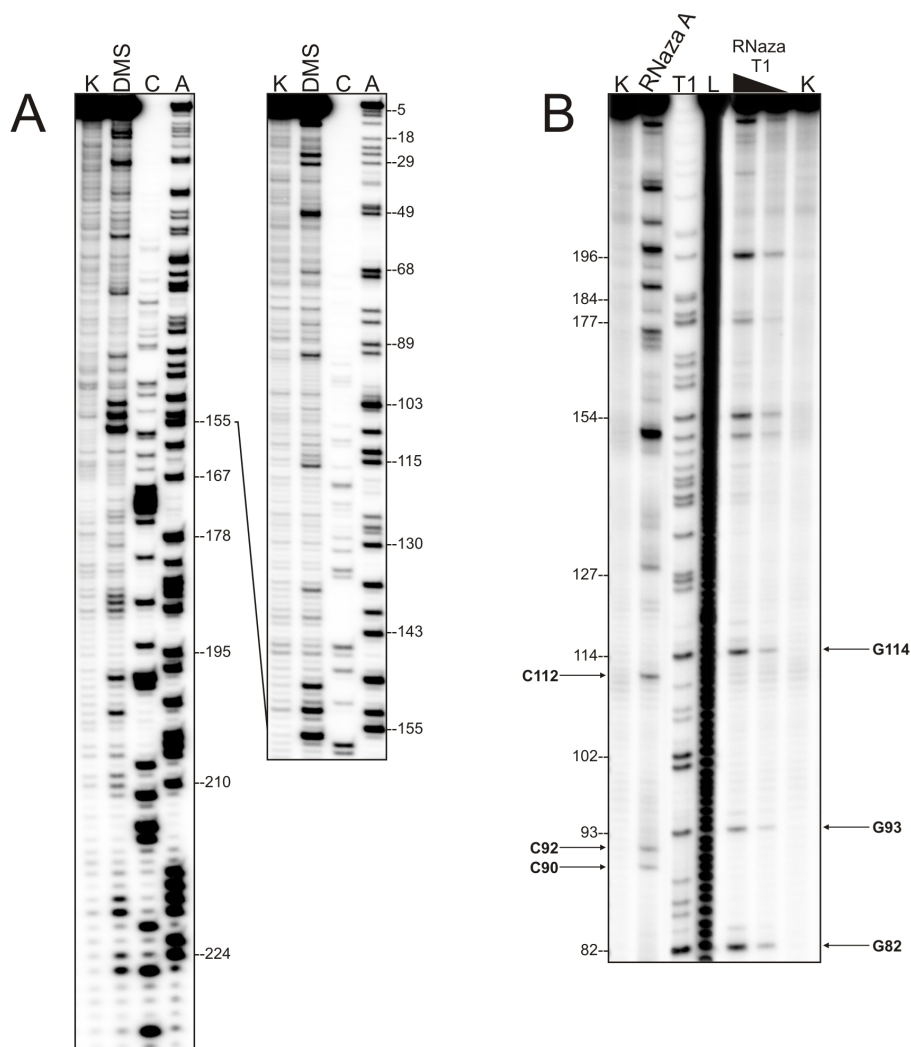
Spinka U180–A218 jest znacznie mniejsza. Zawiera jedno, obustronne wypętlecie, a jej pętla apikalna posiada 6 reszt (Rys. 23). Na uwagę zasługuje duży, 70% udział par typu A-U i G-U, co sugeruje niską stabilność termodynamiczną tego elementu. Potwierdza to wartość parametru ΔG , która dla izolowanej spinki wynosi -11,1 kcal/mol.

Struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53 jest w wysokim stopniu zgodna z wynikami otrzymanymi za pomocą techniki SHAPE. Dotyczy to zwłaszcza modyfikacji spinki G56–C169 w pozycjach dwóch jednostronnych wypętleń (A91–C98 oraz A149–A155), pętli apikalnej (C111–A115), której reszta A115 jest najsilniej modyfikowana w całym RNA oraz jednonukleotydowych wybrzuszeń (U72, G141 i G163) (Rys. 23 i 24). W przypadku jednonukleotydowych wybrzuszeń reaktywnością cechuje się także część par zamykających, zwłaszcza wtedy, gdy są to pary typu A-U lub G-U. Regiony jednoniciowe spinki G56–C169 zostały również dobrze określone z wykorzystaniem metody cięć indukowanych jonami Pb^{2+} , chociaż ich rozkład jest nieco mniej równomierny (Rys. 23 i 24). Wynika to ze specyficzności działania jonów Pb^{2+} , które przecinają RNA z mniejszą intensywnością w obrębie reszt purynowych [120]. Z tego względu nie dochodzi do cięć np. po resztach A113–A115 oraz G150 i G154, które z kolei są silnie rozpoznawane przez NMIA (Rys. 23 i 24). Jony ołowiu indukują także cięcia w regionach przewidzianych w RNA P1- Δ Np53 jako dwuniciowe. Dotyczy to słabych cięć u podstawy spinki G56–C169 oraz odcinka C74–U76 (Rys. 23 i 24). Pewnych informacji o aranżacji struktury spinki G56–C169 dostarcza także obraz rozdziału hydrolizatu T1 w warunkach semidenaturujących. Najślabiej przecinane są wiązania fosfodiesterowe po resztach guanozynowych w pozycjach 65, 66–69, 71, 73, 85, 86, 88 i 133 co świadczy o ich lokalizacji w regionie dwuniciowym (Rys. 24). Pętla apikalna spinki U180–A218 została zmapowana obiema metodami, choć jony Pb^{2+} nie indukują cięć w pozycjach G196 i A197. Pozostaje to jednak w zgodzie ze specyficznością ich działania. Dodatkowo, jony Pb^{2+} indukowały cięcia w asymetrycznej pętli wewnętrznej oraz regionie bogatym w reszty pirymidynowe U190–C194, o przypuszczalnie niskiej stabilności termodynamicznej.

Prezentowana struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53 zgodna jest również z wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem siarczanu dimetylu, wobec którego reaktywne były głównie reszty adenozyne w pozycjach 11, 22, 25, 29, 49, 68, 83, 91, 113, 115, 136, 140, 149, 152, 155, 178, 186, 187, 197, 201, 219, 220, 222, 223 oraz kilka reszt cytydynowych w pozycjach 152, 188 i 208 (Rys. 23 i 25). Struktura spinki G56–C169 i U180–A218 w RNA P1- Δ Np53 pozostaje także w zgodzie z wynikami mapowania enzymatycznego za pomocą rybonukleaz T1 i A. Rybonukleaza T1 indukowała cięcia po resztach guanozynowych w pozycjach 82, 93, 114, 150, 154, 177, 179 i 196, podczas gdy rybonukleaza A przecinała łańcuch RNA po resztach cytydynowych w pozycjach 81, 90, 92, 112, 129, 152, 170–172, 188, 198, 199 i 208 (Rys. 23 i 25).



Rysunek 24. Analiza struktury RNA P1-ΔNp53 za pomocą jonów ołowiu i techniki SHAPE. A – rozdział produktów cięcia RNA P1-ΔNp53 z użyciem jonów ołowiu, znakowanych radioizotopowo z końca 5' i 3'. K – reakcja kontrolna, L – hydrolizat formamidowy, T1 – ograniczona hydroliza rybonukleazą T1. Pozycje wybranych reszt guanozynowych zaznaczono po prawej stronie autoradiogramów. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. C – Wyniki mapowania struktury RNA P1-ΔNp53 z wykorzystaniem techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, A i T – reakcje sekwencjonowania. Po prawej stronie autoradiogramów zaznaczono pozycje niektórych reszt tymidynowych.



Rysunek 25. Analiza struktury RNA P1- Δ Np53 za pomocą siarczanu dimetylu oraz rybonukleazy A i T1. A – modyfikacja chemiczna DMS. K – reakcja kontrolna, DMS – modyfikacja DMS, C i A – reakcje sekwencjonowania. Zaznaczono wybrane reszty adenozytowe. B – elektroforeza produktów hydrolizy RNA P1- Δ Np53 za pomocą rybonukleazy A i T1, znakowanych radioizotopowo na końcu 5'. K – reakcja kontrolna, L – hydrolizat formamidowy, T1 – ograniczona hydroliza rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących. Na rysunku wskazano niektóre reszty cytydynowe i guanozynowe.

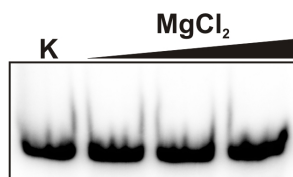
Proponowane oddziaływanie między częścią 5' i 3' w RNA P1- Δ Np53 jest dość dobrze poparte danymi doświadczalnymi. Struktura spinki G23–C34 jest zgodna z wynikami uzyskanymi metodą SHAPE i cięciami indukowanymi jonami Pb^{2+} . Dodatkowo, jony ołowiu rozpoznają regiony C39–C41 i C237–U239 tworzące symetryczną pętlę wewnętrzną oraz klika reszt w regionach jednoniciowych lub w ich pobliżu (Rys. 23 i 24). Silną reaktywnością wobec NMIA cechują się reszty G14, A18 i G36, które leżą w obrębie par zamykających region dwuniciowy lub w regionie jednoniciowym. Bardzo słabe cięcia lub ich brak w pozycjach G37, G38 oraz G43–G46 indukowane za pomocą RNAzy T1 w warunkach semidenaturujących świadczą o ich lokalizacji w regionie helikalnym. Wyznaczenie reaktywności reszt C234–U259 za pomocą techniki SHAPE było niemożliwe, ponieważ do regionu tego hybrydyzował starter DNA używany w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Dwie struktury typu spinki oraz region oddziaływania części 5' i 3' połączone są ze sobą długimi fragmentami jednoniciowymi C50–C55, C170–G179 i A219–C229 tworząc motyw strukturalny typu pętli wieloramiennej, od której odchodzą 3 regiony helikalne (Rys. 23). Wspomniane regiony jednoniciowe są dobrze rozpoznawane przez jony Pb^{2+} , które indukują w tych miejscach najsilniejsze cięcia, a także technikę SHAPE, za wyjątkiem regionu C170–U176, który pomimo silnych cięć jonami Pb^{2+} wykazuje brak reaktywności w stosunku do NMIA.

Interesujące jest położenie kodonu inicjacyjnego dla białka p53 w proponowanej strukturze drugorzędowej RNA P1- Δ Np53. Znajduje się on częściowo w regionie jednoniciowym, a częściowo w dwuniciowym (Rys. 23). Pierwsza reszta nukleotydowa kodonu inicjacyjnego wchodzi w skład symetrycznej pętli wewnętrznej, natomiast druga i trzecia tworzą pary typu Watson-Crick. Pomimo lokalizacji kodonu inicjacyjnego częściowo w regionie jednoniciowym, nie wykazuje on reaktywności względem NMIA. Jednakże obserwuję słabe cięcia indukowane jonami ołowiu występujące po pierwszej i drugiej reszcie kodonu AUG, a także po reszcie C81 znajdującej się po przeciwległej stronie (Rys. 23 i 24).

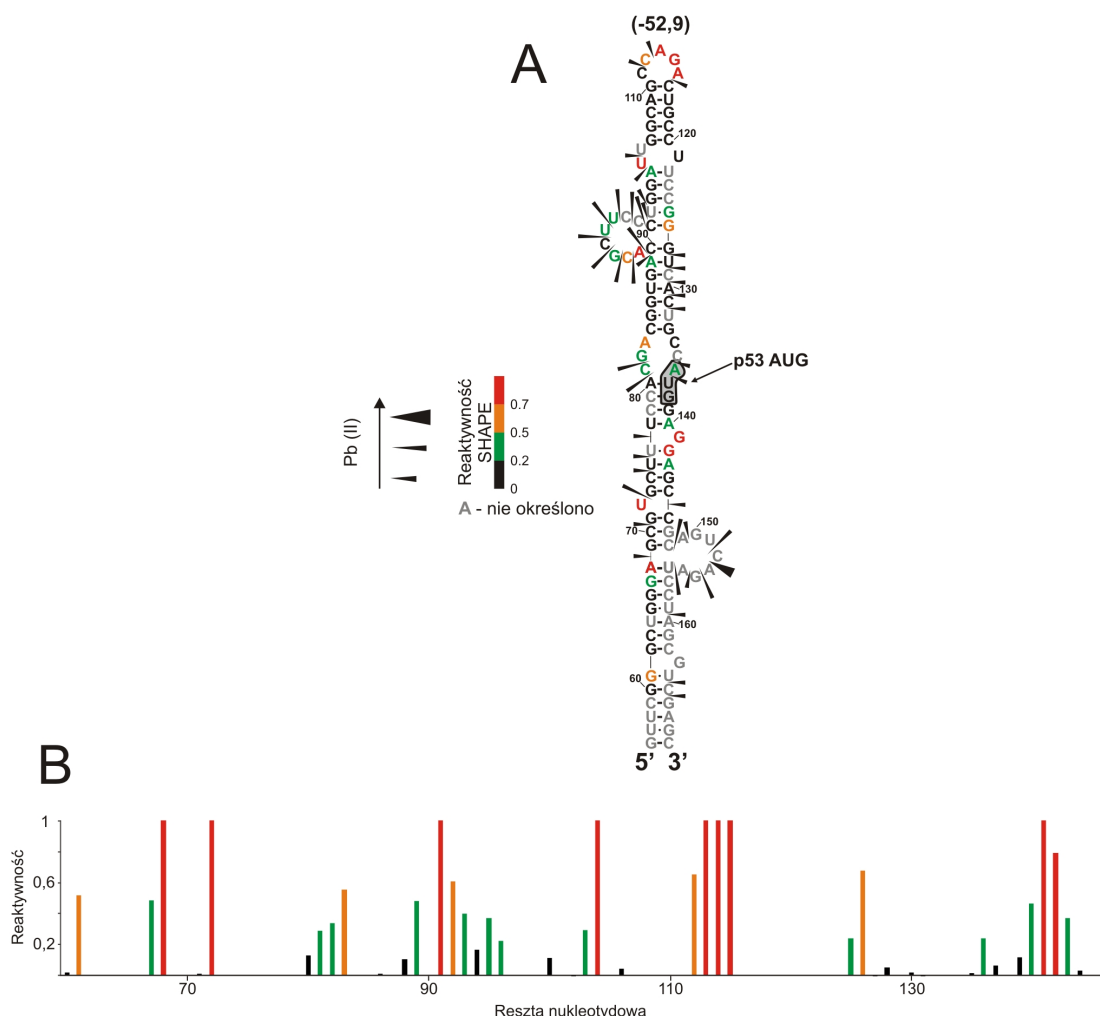
3.1.2. Struktura drugorzędowa RNA H56-169

Oddziaływanie między częścią niekodującą a kodującą w RNA P1- Δ Np53, w wyniku którego powstaje spinka G56–C169, wydaje się mieć bardzo ważne znaczenie dla zwijania regionu terminalnego 5' mRNA p53. Energia stabilizacji tego fragmentu RNA przewidziana *in silico*, wynosi -52,9 kcal/mol, co świadczy o jego dużej stabilności termodynamicznej. Aby sprawdzić czy region ten, jako izolowana cząsteczka RNA, zwija się tak samo jak w RNA P1- Δ Np53 postanowiłem zastosować tzw. „podejście domenowe”. W tym celu otrzymałem RNA H56-169, reprezentujący izolowany fragment sekwencji pomiędzy resztami G56 a C169 i przeprowadziłem mapowanie jego struktury drugorzędowej. Na wstępie wykonałem analizę migracji tej cząsteczki w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących, która wykazała jej homogenność strukturalną, niezależną od stężenia $MgCl_2$ (Rys. 26).

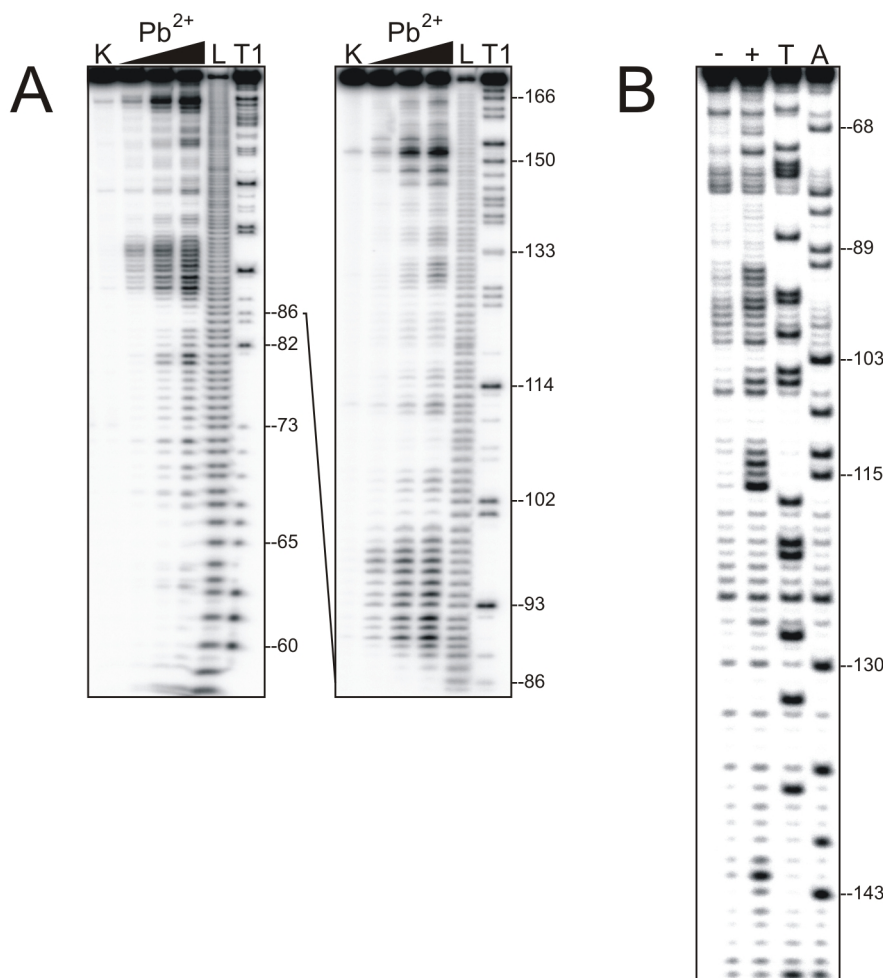


Rysunek 26. Migracja RNA H56-169 w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. K – reakcja kontrolna. Końcowe stężenie chlorku magnezu w reakcji wynosiło 2,5, 5 i 10 mM.

Zarówno metoda cięć indukowanych jonami Pb²⁺ jak i technika SHAPE wykazały, że struktura spinki G56–C169 w formie izolowanej jest taka sama jak struktura odpowiadającego jej regionu w RNA P1-ΔNp53. Reaktywność wykazywały wszystkie regiony zmapowane wcześniej w RNA P1-ΔNp53 jako jednoniciowe. Odnotowałem jedynie zwiększenie intensywności cięć jonami Pb²⁺ wielonukleotyдовых wypętleń A91–C98 i A149–A155 oraz reszt leżących naprzeciwko kodonu AUG dla białka p53 (Rys. 27 i 28). W przypadku techniki SHAPE, kilka reszt nukleotyдовых wykazywało również większą reaktywność. Dotyczy to głównie trójnukleotyдового odcinka C81–A83, wchodzącego w skład pętli wewnętrznej sąsiadującej z kodonem AUG. Niemniej opierając się na wynikach zastosowanego „podejścia domenowego” można stwierdzić, że region G56–C169 związa się niezależnie od reszty cząsteczki i prawdopodobnie występuje jako odrębny motyw strukturalny także w pełnej długości mRNA p53.



Rysunek 27. Struktura drugorzędowa RNA H56-169. A – model struktury RNA H56-169, na którym umieszczono wyniki mapowania z użyciem jonów ołowiu i modyfikacji NMIA, zgodnie z załączoną legendą. W nawiasie podano wartość parametru ΔG wyrażoną w kcal/mol. B – reaktywność reszt nukleotyдовых względem NMIA. Kolor słupków jest zgodny z legendą (panel A).

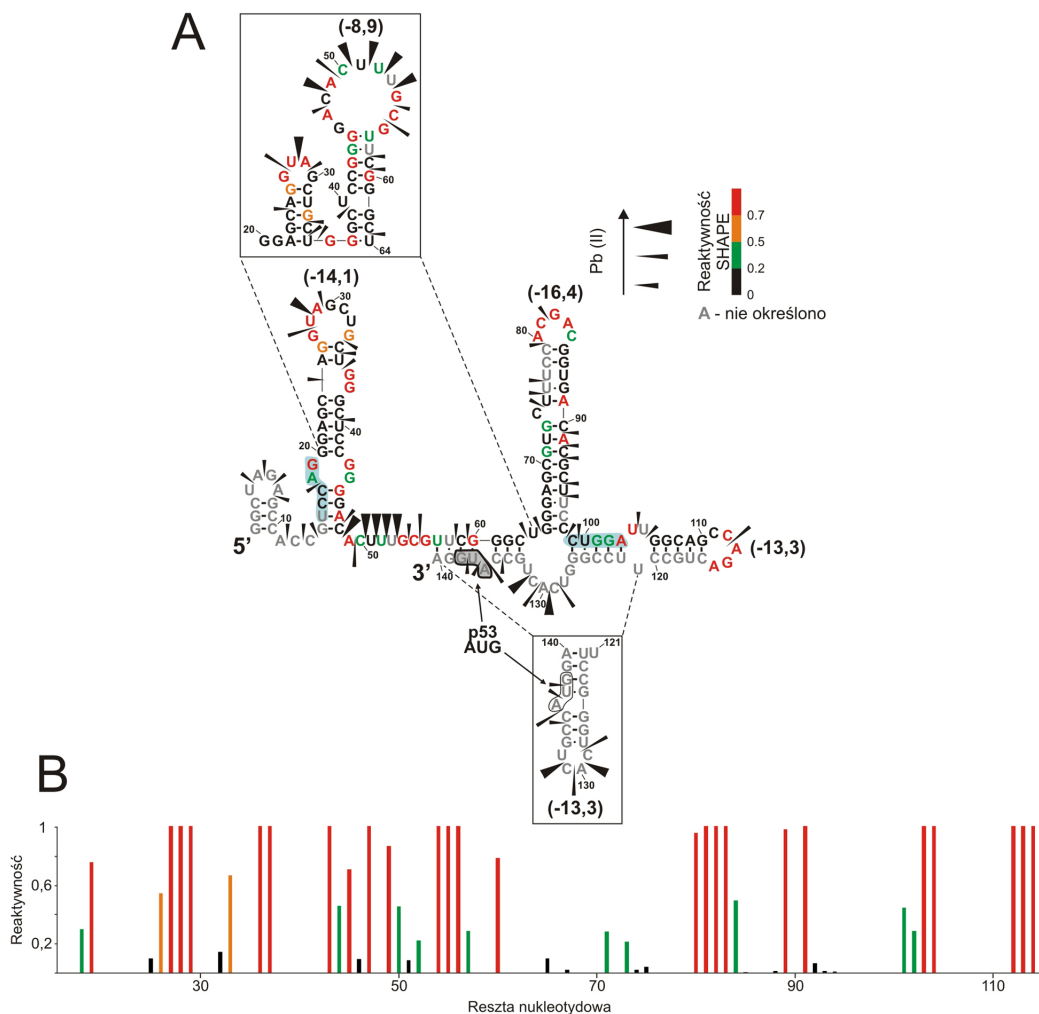


Rysunek 28. Autoradiogramy reprezentujące wyniki badania struktury RNA H56-169. A – rozdziel elektroforetyczny produktów cięcia RNA H56-169 za pomocą jonów ołowiu, znakowanych radioizotopowo z końca 5'. K – reakcja kontrolna, L – hydrolizat formamidowy, T1 – ograniczone trawienie rybonukleazą T1. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. Po prawej stronie autoradiogramów zaznaczono niektóre reszty guanozynowe. B – elektroforeza produktów reakcji uzyskanych z użyciem techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, A i T – reakcje sekwencjonowania przeprowadzone w obecności odpowiednich dideoksynukleotydów (ddA i ddT). Po prawej stronie autoradiogramu wskazano wybrane reszty adenozytowe.

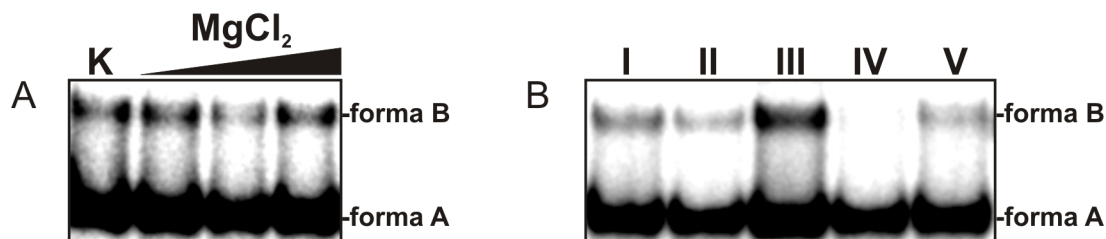
3.1.3. Struktura drugorzędowa RNA P1-p53

Jeżeli oddziaływanie części niekodującej z kodującą ma istotne znaczenie dla struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53, można przypuszczać, że struktura izolowanego 5'UTR będzie mieć odmienną aranżację. Z drugiej strony, analiza struktury tego regionu mogłaby wskazać, które elementy zwijają się w ten sam sposób, niezależnie od tego, czy obecna jest część kodująca między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i Δ Np53. Wyniki dotyczące mapowania struktury drugorzędowej RNA P1-p53 przedstawiają rysunki 29 i 31. Program *RNAstructure* przewiduje dla tej cząsteczki kilka struktur o zbliżonej energii stabilizacji. Dwie z nich są najbardziej zgodne z wynikami mapowania. Parametr ΔG dla proponowanej struktury RNA P1-p53 ma wartość -59,8 kcal/mol. W alternatywnej strukturze tego RNA, zaproponowanej przez program ($\Delta G = -61,8$ kcal/mol), dochodzi do utworzenia krótkiego regionu dwuniciowego

między resztami U15–G19 i C99–A103 (Rys. 29). Powoduje to reorganizację struktury regionów G20–U64 oraz U121–A140. Zdolność do parowania regionów U15–G19 oraz C99–A103 może potwierdzać reaktywność wobec NMIA kilku reszt wchodzących w ich skład (A18, G19, G101, G102, A103). W obydwu proponowanych strukturach, regiony G1–C10, G65–C98 oraz G106–C120 pozostają niezmienione (Rys. 29). Obserwacja, że program *RNAstructure* przewiduje kilka struktur drugorzędowych o zbliżonej energii, do których dobrze pasują dane doświadczalne może sugerować, że RNA P1-p53 występuje w formie przynajmniej dwóch konformerów strukturalnych. Jednakże analiza migracji RNA P1-p53 w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych nie potwierdziła tego przypuszczenia (Rys. 30). Podobnie jak w przypadku RNA P1- Δ Np53, zastosowane warunki jonowe i temperaturowe nie miały większego wpływu na obraz migracji RNA P1-p53. Chociaż oprócz głównego prążka widać także wyżej migrującą, prawdopodobnie dimeryczną formę RNA P1-p53, to nie stanowiła ona więcej niż 10% głównego produktu.

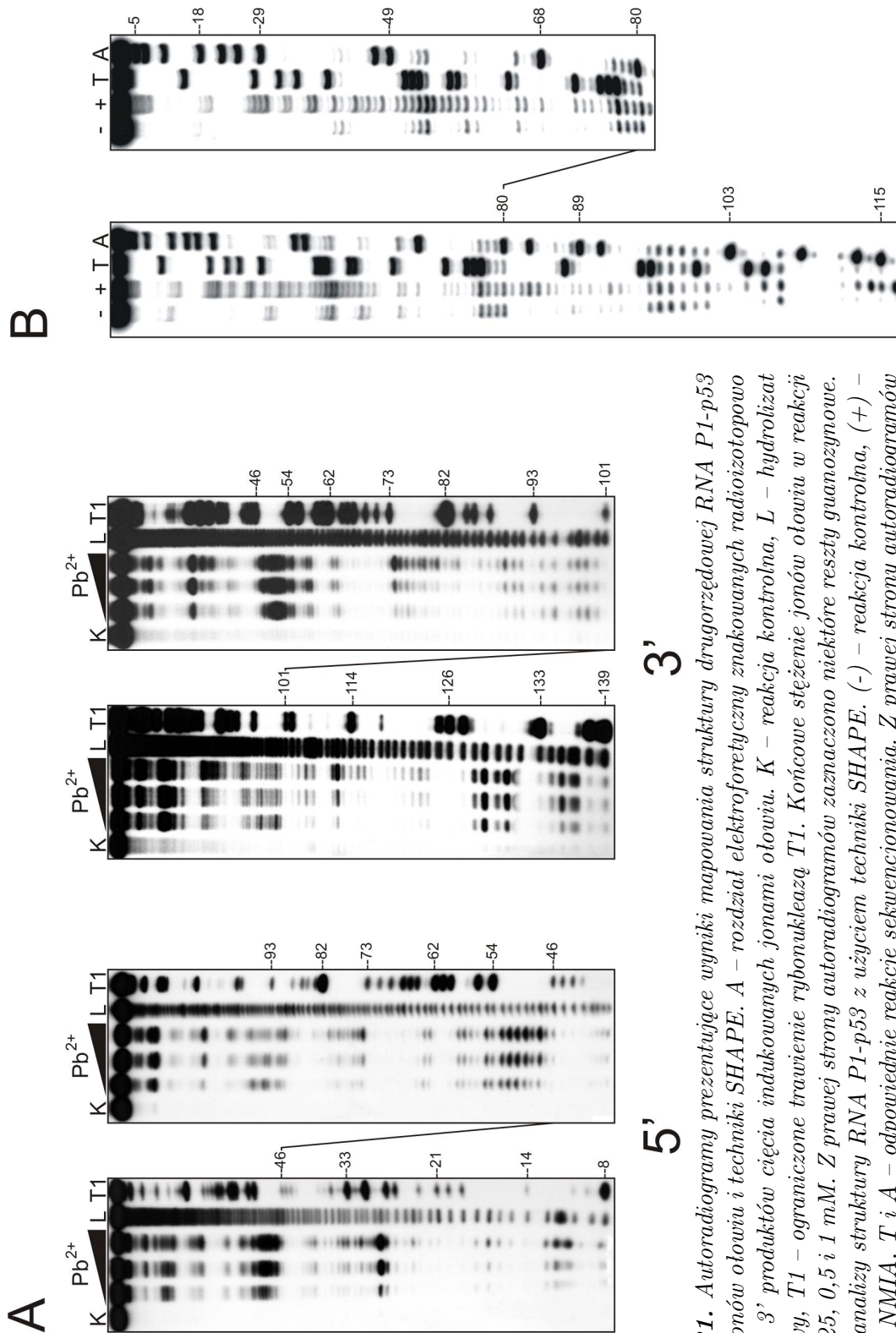


Rysunek 29. Struktura drugorzędowa RNA P1-p53. A – proponowany model struktury RNA P1-p53. Oznaczenia rysunku są zgodne z legendą. Zaprezentowano alternatywny sposób zwinięcia RNA P1-p53. Kolorem zielonym zacieniowano odcinki sekwencji U15-G19 i C99-A103, które oddziałują ze sobą w alternatywnej strukturze RNA P1-p53. B – wykres reaktywności względem NMIA w zależności od reszty nukleotydowej. Kolor słupków koresponduje z legendą (panel A).



Rysunek 30. Analiza migracji RNA P1-p53 w warunkach natywnych. Autoradiogramy prezentują rozdzielanie elektroforyczne RNA P1-p53 w zależności od stężenia chlorku magnezu (2,5 mM, 5 mM, 10 mM) (A) oraz warunków renaturacji (B). K – reakcja kontrolna bez dodatku MgCl₂. Warunki renaturacji: I – 90°C – 3 minuty, a następnie schładzanie do temperatury 37°C w tempie 0,1°C/sekundę, II – 65°C – 3 minuty i 4°C – 10 minut, III – 65°C – 3 minuty i 37°C – 10 minut, IV – 100°C – 1 minuta i 4°C – 10 minut, V – 100°C – 1 minuta, 4°C – 10 minut i 37°C – 10 minut.

Izolowany region 5'UTR mRNA p53 przyjmuje odmienną strukturę niż RNA P1-ΔNp53, tworząc kilka krótkich motywów typu spinki. Wykorzystanie techniki SHAPE pozwoliło na zmapowanie pętli apikalnych wszystkich struktur spinkowych w RNA P1-p53, a ponadto niesparowania i jednostronnego wypętlenia w regionie spinki G14–C48 oraz leżącego poniżej fragmentu jednoniciowego (Rys. 29 i 31). Proponowana struktura RNA P1-p53 koresponduje dobrze również z wynikami cięcia jonami ołowiu. Najsilniejsze cięcia obserwuję w regionach jednoniciowych A49–G56 oraz G127–U132, a także po resztach G27 i U28 (Rys. 29 i 31). Cięcia występują też w dwuniciowym trzonie spinki G65–C98, co spowodowane jest prawdopodobnie dużym udziałem par typu A-U i G-U w tym regionie RNA P1-p53. Ciekawe, że odcinek sekwencji C99–G126 przyjmuje taką samą strukturę jak odpowiadający mu region w RNA P1-ΔNp53, gdzie tworzy apikalną część spinki G56–C169 (Rys. 23 i 29). Motyw ten jest więc jedynym wspólnym elementem struktury dla obydwu cząsteczek RNA.



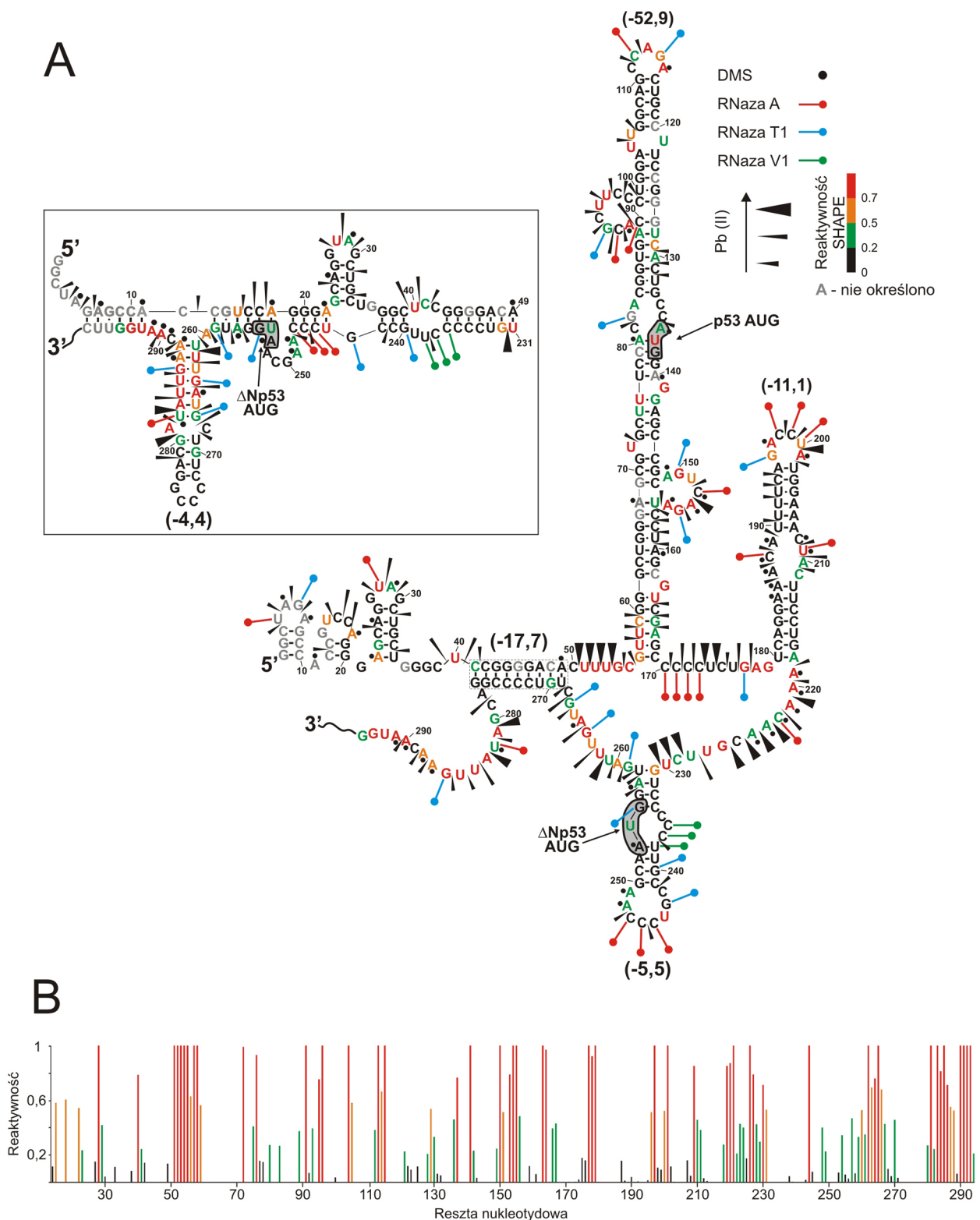
Rysunek 31. Autoradiogramy prezentujące wyniki mapowania struktury drugorzędowej RNA P1-p53 za pomocą jonów ołowiu i techniki SHAPE. A – rozdział elektroforetyczny znakowanych radioizotopowo z końca 5' i 3' produktów cięcia indukowanych jonami ołowiu. K – reakcja kontrolna, L – hydrolizat formamidowy, T1 – ograniczone trawienie rybonukleazą T1. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. Z prawej strony autoradiogramów zaznaczono niektóre reszty guanozynowe. B – wyniki analizy struktury RNA P1-p53 z użyciem techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, T i A – odpowiednie reakcje sekwencjonowania. Z prawej strony autoradiogramów zaznaczono wybrane reszty adenozyminowe.

3.1.4. Badanie zachowawczości struktury regionu terminalnego 5' w dłuższych fragmentach mRNA p53

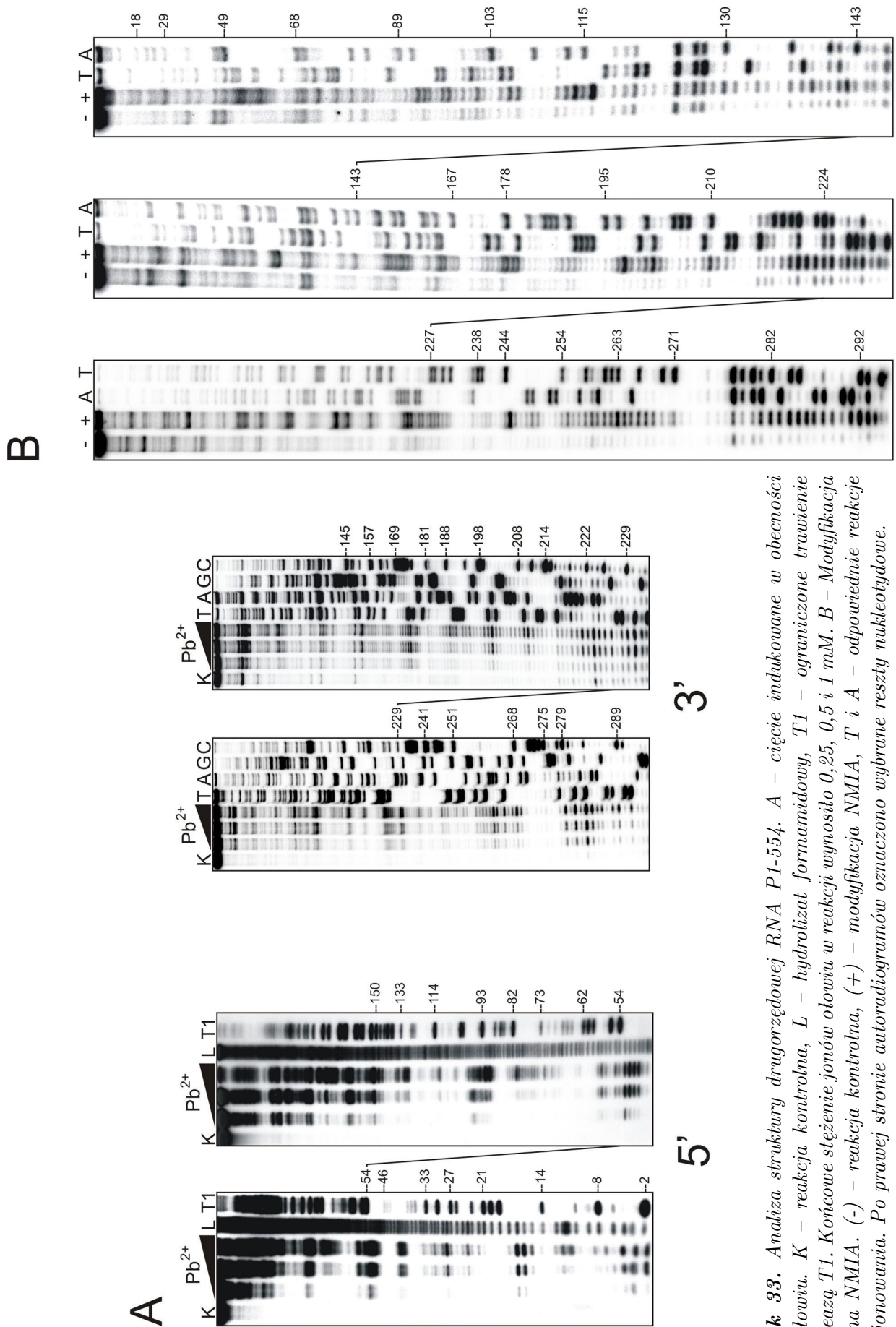
3.1.4.1. Struktura drugorzędowa RNA P1-554

Ponieważ część sekwencji między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i Δ Np53 ma duże znaczenie w zwijaniu się struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53, zadałem sobie pytanie, czy dalsza część sekwencji może odgrywać równie istotną rolę. Aby to sprawdzić zbadałem strukturę drugorzędową RNA P1-554. Cząsteczka ta zawierała region niekodujący 5', odcinek sekwencji między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i jego izofromy oraz dodatkowo 300 reszt nukleotydowych sekwencji kodującej. Długość cząsteczki była tak dobrana, aby zapewnić poprawne zwijanie także okolicy kodonu AUG dla izofromy Δ Np53. Do analizy struktury wykorzystałem technikę SHAPE, metodę cięć indukowanych jonami ołowiu, modyfikację chemiczną za pomocą siarczanu dimetylu, a także mapowanie enzymatyczne z wykorzystaniem RNazy A, T1 i V1.

Rysunek 32 przedstawia strukturę drugorzędową RNA P1-554 otrzymaną przy użyciu programu *RNAstructure*, w oparciu o więzy strukturalne obliczone na podstawie analizy ilościowej wyników. Porównanie rozkładu cięć i modyfikacji RNA P1-554 oraz RNA P1- Δ Np53 wskazuje, że reszty G43–C229 w obydwu cząsteczkach przyjmują taką samą strukturę drugorzędową (Rys. 23 i 32). Oznacza to, że po wydłużeniu cząsteczki o 300 reszt nukleotydowych zachowane zostały dwie charakterystyczne struktury typu spinki (G56–C169 i U180–A218), co sugeruje ich niezależne od reszty mRNA p53 zwijanie. Jony ołowiu indukują cięcia w RNA P1-554 zasadniczo tak samo jak w RNA P1- Δ Np53. Nieznaczne różnice rozkładu cięć w RNA P1-554 dotyczą ich braku w regionie C74–U76, silniejszych cięć wielonukleotydowych wypętleń A91–C98 i A149–A155 oraz kilku dodatkowych cięć lub zmian w ich intensywności w innych regionach (Rys. 32 i 33). Wyniki analizy SHAPE są również zgodne z proponowaną strukturą tej cząsteczki. Różnice w reaktywności są obecne przede wszystkim w trakcie U51–C59, który w RNA P1-554 ulega bardzo silnej modyfikacji. Silna reaktywność, zwłaszcza reszt G56–C59 może rodzić przypuszczenie, że podstawa spinki G56–C169 w RNA P1-554 istnieje w formie jednoniciowej. Co więcej, w części struktur RNA zaproponowanych przez program *RNAstructure* region G56–U58 i A167–C169 jest jednoniciowy, co doprowadza do skrócenia spinki G56–C169 o 3 pary zasad. Jednakże region C165–C169 posiada jedynie słabą reaktywność wobec NMIA (reszty G166 i A167), a wobec jonów ołowiu nie wykazuje zwiększonej intensywności cięć, w porównaniu do RNA P1- Δ Np53 (Rys. 23, 32, 33). Pozwala mi to sądzić, że ten region w RNA P1-554 występuje jednak w formie dwuniciowej, choć prawdopodobnie o zaburzonej strukturze helikalnej. Większą reaktywnością wobec NMIA cechują się także reszty w pobliżu kodonu inicjacyjnego dla białka p53 (A80, A83, A136 i U137) oraz leżący w sekwencji powyżej odcinek U128–A130 (Rys. 32 i 33).

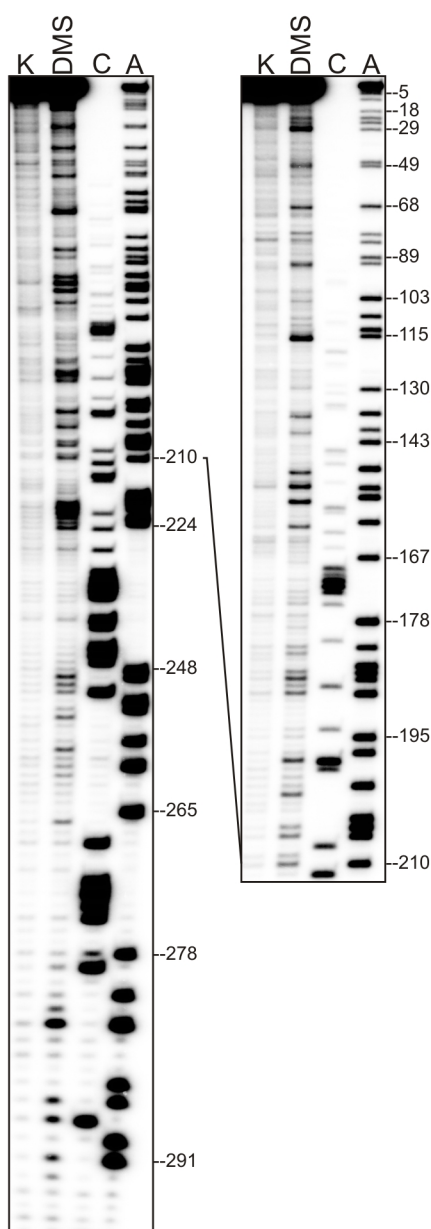


Rysunek 32. Struktura drugorzędowa RNA P1-554. A – Na modelu struktury drugorzędowej zaznaczono cięcia i modyfikacje chemiczne z uwzględnieniem ich intensywności (legenda). Alternatywną strukturę okolicy kodonu inicjacyjnego izoformy $\Delta Np53$ ujęto w ramkę. W nawiasach podano wartość parametru ΔG poszczególnych motywów strukturalnych wyrażoną w kcal/mol. B – reaktywność reszt nukleotydowych względem NMIA w zależności od pozycji w RNA P1-554. Kolory słupków korespondują z legendą (panel A).



Rysunek 33. Analiza struktury drugorzędowej RNA P1-554. A – cięcie indukowane w obecności jonów ołowiu. K – reakcja kontrolna, L – hydrolizat formamidowy, T1 – ograniczone trawienie rybonukleazą T1. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. B – Modyfikacja chemiczna NMIA. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, T i A – odpowiednie reakcje sekwencjonowania. Po prawej stronie autoradiogramów oznaczono wybrane reszty nukleotydowe.

W regionie G43–C229 RNA P1-554 zachowany został niemal ten sam rozkład cięć indukowanych za pomocą rybonukleaz A i T1, co w RNA P1- Δ Np53 (Rys. 32 i 66). Niewielkie różnice widać jedynie dla rybonukleazy A, która w RNA P1-554 nie rozpoznała kilku reszt cytydynowych (C81 i C131). Wynika to prawdopodobnie z wybranej metody detekcji cięć. Dla RNA P1-554 stosowałem bowiem reakcję odwrotnej transkrypcji, która tworzy dość duże tło, przez co może uniemożliwiać detekcję niektórych słabszych cięć. W przypadku RNA P1- Δ Np53 rozdzielałem w żelu produkty hydrolizy znakowane radioizotopowo. Stosując modyfikację chemiczną siarczanem dimetylu, ogólny rozkład modyfikacji również nie uległ zmianie. Silniejszą reaktywność wykazują jedynie reszty zlokalizowane w okolicy obustronnego wybrzuszenia spinki U180–A218 (Rys. 32 i 34).

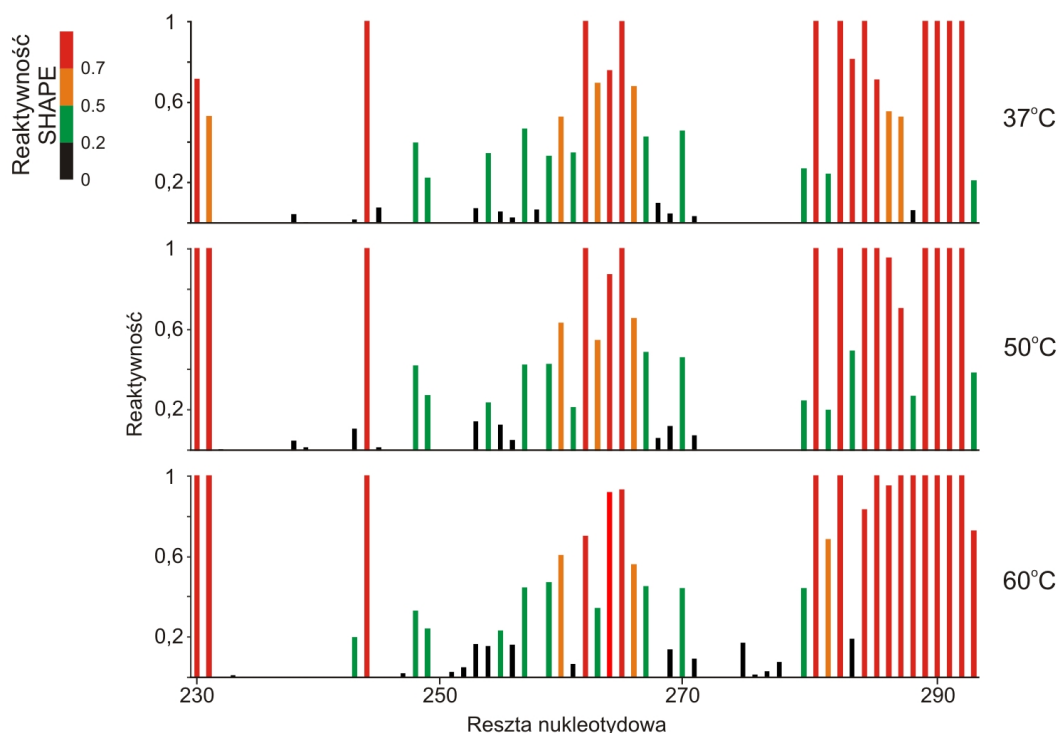


Rysunek 34. Analiza struktury drugorzędowej RNA P1-554 za pomocą modyfikacji chemicznej siarczanem dimetylu. K – reakcja kontrolna, DMS – modyfikacja DMS, C i A – reakcje sekwencjonowania. Po prawej stronie autoradiogramów wskazano wybrane reszty adenozynowe.

Reszty G231–U258 tworzą w RNA P1-554 autonomiczną strukturę typu spinki zawierającą kodon inicjacyjny, od którego rozpoczyna się synteza izoformy Δ Np53 (Rys. 32). Wartość parametru ΔG dla izolowanej spinki wynosi zaledwie -5,5 kcal/mol, co może świadczyć o jej niskiej stabilności termodynamicznej. Spinka G231–U258 oddzielona jest od innych motywów strukturalnych regionami jednoniciowymi wykazującymi silną reaktywność wobec jonów ołowiu jak i NMIA (Rys. 32 i 33). Obecność wspomnianej struktury spinkowej powiększa o dodatkową (czwartą) helisę, region pętli wieloramiennej (Rys. 32). Struktura drugorzędowa spinki G231–U258 nie jest jednak jednoznaczna. Pomimo dużej pętli apikalnej oraz wewnętrznego wypętlenia obserwuję tylko kilka, zazwyczaj słabych modyfikacji. Jedynie reszty U244 i A248 wykazują większą reaktywność wobec NMIA i DMS. Chociaż regiony jednoniciowe spinki zawierają reszty pirymidynowe to widać jedynie kilka słabszych cięć indukowanych jonami ołowiu (Rys. 32 i 33). Niejednoznacznych wyników dostarczyło też wykorzystanie rybonukleaz. Rybonukleaza A zmapowała zgodnie z oczekiwaniem trzy reszty cytydynowe w pętli apikalnej spinki. Natomiast rybonukleaza T1 rozpoznała także trzy reszty guanozynowe, z czego tylko jedna znajduje się w przewidywanym regionie jednoniciowym (Rys. 32 i 66). W obecności rybonukleazy V1 cięcia mają miejsce tylko w pozycjach C236–U238 (Rys. 66). Reszty C236 i C237 w proponowanej strukturze leżą w regionie jednoniciowym, a więc cięcia indukowane przez RNazę V1 mogą świadczyć o ich zaangażowaniu w oddziaływania warstwowe. Analizując położenie kodonu inicjacyjnego izoformy Δ Np53 zauważyłem, że w proponowanej aranżacji spinki G231–U258 znajduje się on w bardzo podobnym otoczeniu strukturalnym jak kodon AUG białka p53. Druga reszta kodonu inicjacyjnego (U254) uległa wypętleniu, podczas gdy pierwsza i trzecia pozostają sparowane (Rys. 32). W obrębie kodonu inicjacyjnego obserwuję słabą reaktywność reszt A253 (DMS), U254 (NMIA) oraz G255 (rybonukleaza T1), wynikającą najprawdopodobniej z obecności niesymetrycznej pętli wewnętrznej.

Pomimo niewielkiej, przewidywanej stabilności termodynamicznej, spinka G231–U258 występuje we wszystkich strukturach, jakie zaproponował program *RNAstructure*. W celu znalezienia możliwych aranżacji struktury sekwencji G231–U258 użyłem również innych programów (*Mfold*, *Kinefold*, *RNAfold*) [71, 124, 125]. W alternatywnej strukturze regionu G231–U258 uzyskanej z użyciem programu *Mfold* zwiija się on identycznie jak w RNA P1- Δ Np53. Z kolei, sekwencja leżąca poniżej przyjmuje strukturę spinki obejmującej reszty U261–A288 (Rys. 32). Jej trzon zbudowany jest z 11 par zasad, z czego aż 9 to pary typu AU lub GU, co wpływa na wartość parametru ΔG , wynoszącą zaledwie -4,4 kcal/mol. W alternatywnej strukturze większość reszt budujących spinkę U261–A288 cechuje silna dostępność do cięcia jonami ołowiu oraz modyfikacji NMIA. Wyjątkiem jest część apikalna, której pętla nie wykazuje reaktywności wobec żadnej z zastosowanych sond (Rys. 32–34, 66). Niejednoznaczne wyniki analizy struktury regionu U230–G294 mogą sugerować, że w tym fragmencie mRNA p53 może dochodzić do zawiązywania się oddziaływań trzeciorzędowych. Ze względu na to, że w obydwu proponowanych strukturach regionu U230–G294 dochodzi do utworzenia struktur typu spinki o niskiej przewidywanej

trwałości termodynamicznej, postanowiłem przeprowadzić topnienie temperaturowe tego regionu, monitorowane za pomocą techniki SHAPE. W wyższej temperaturze powinienem obserwować rozplatanie motywów typu spinki manifestujące się wzrostem reaktywności reszt, które je tworzą. Jednakże nawet w temperaturze 60 °C nie ma prawie żadnego wzrostu reaktywności reszt w regionie U230–G294 (Rys. 35). Wzrost temperatury powoduje jedynie zwiększoną reaktywność wobec NMIA reszt A287–C289.

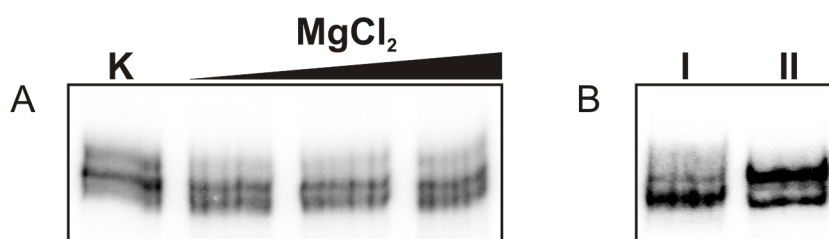


Rysunek 35. Zależna od temperatury modyfikacja chemiczna RNA P1-554 (reszty U230–G294) za pomocą NMIA. Wykresy reprezentują reaktywność reszt nukleotydowych, jaka została wyznaczona w temperaturze 37, 50 i 60 °C. Kolory słupków korespondują z legendą.

W zaproponowanej strukturze RNA P1-554 również dochodzi do oddziaływania początkowej części regionu niekodującego 5' z sekwencją kodującą, jednak innego typu niż w RNA P1- Δ Np53. Tworzy się ono między resztami C41–A49 i U269–G277 (Rys. 32). Powstały region dwuniciowy składa się z dziewięciu par zasad, z czego aż siedem stanowią pary G-C. Przekłada się to na wysoką wartość parametru ΔG wynoszącą -17,7 kcal/mol. W stosunku do RNA P1- Δ Np53 fragment ten uległ wydłużeniu o 2 pary zasad. Zachowanie tego motywu helikalnego w podobnej formie w obydwu RNA, możliwe jest dzięki powtórzeniu sekwencji 5'-UGUCCCC-3' w pozycji U269–C275, która oddziałuje z resztami C43–A49 (Rys. 32). Taką aranżację potwierdzają wyniki analizy intensywności cięć RNazą T1 w warunkach semidenaturujących, ponieważ wszystkie reszty guanozynowe odcinka C41–A49 są rozpoznawane bardzo słabo lub w ogóle (Rys. 33). W RNA P1-554 dochodzi też prawdopodobnie do oddziaływania dalekiego zasięgu między resztami G36–C39, a dalszą częścią RNA P1-554. Obserwuję bardzo słabe cięcia RNazą T1 w warunkach semidenaturujących reszt G36, G37 i G38, przy jednoczesnym braku cięć i modyfikacji

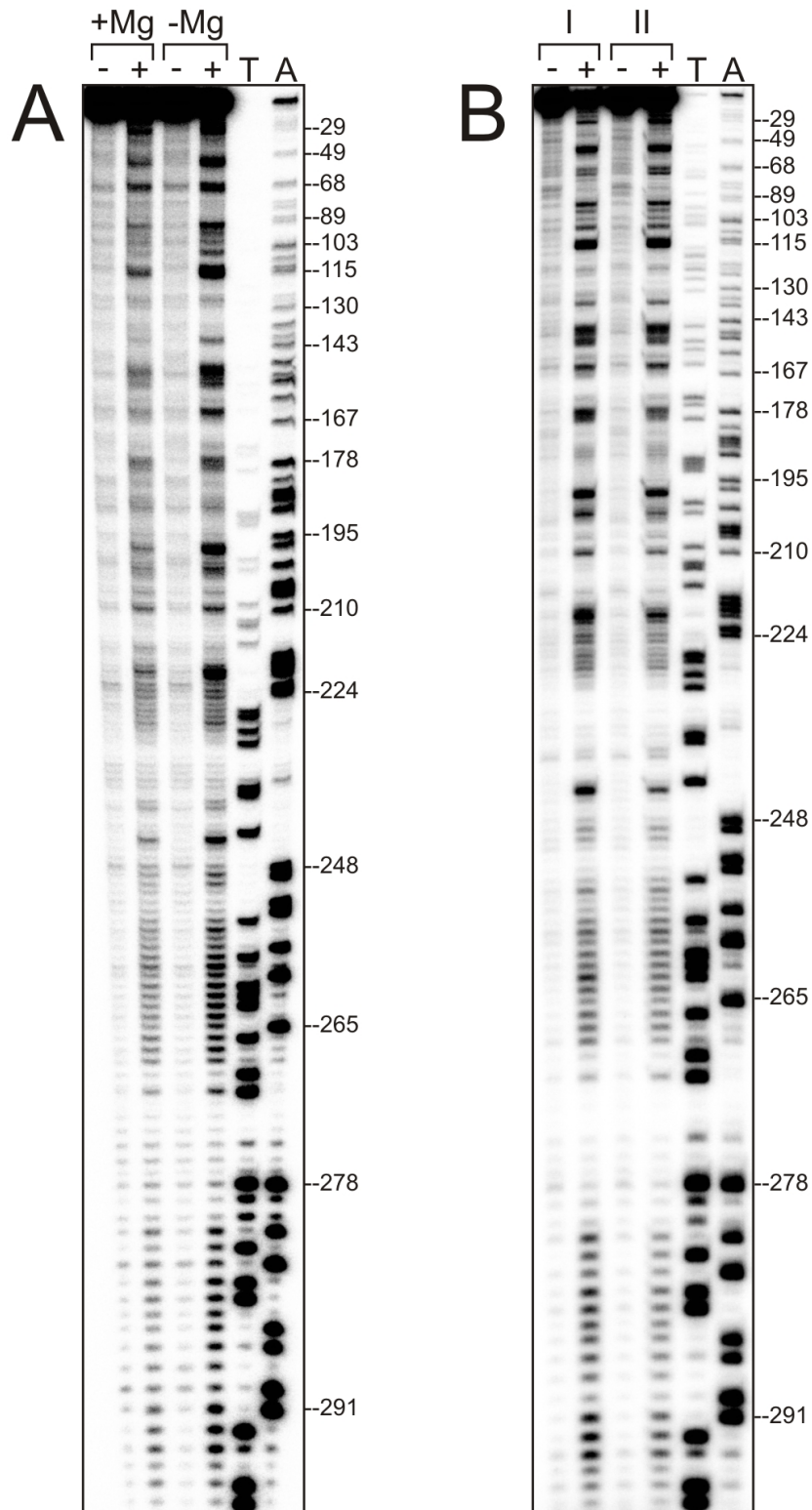
indukowanych sondami rozpoznającymi fragmenty jednoniciowe w strukturze. Sugeruje to, że ten odcinek sekwencji może istnieć w postaci regionu helikalnego (Rys. 33).

Niejednoznaczne wyniki mapowania regionu U230–G294, ale też znaczna długość RNA P1-554 skłoniły mnie do zbadania homogenności tej cząsteczki w warunkach natywnych podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym. Przy braku jonów Mg^{2+} RNA P1-554 występuje jako jedna forma, choć można zauważyć dwa dodatkowe, słabsze prążki, powyżej i poniżej głównego produktu (Rys. 36). Po dodaniu do reakcji chlorku magnezu o stężeniu w zakresie 2,5–10 mM wyodrębniła się szybciej migrująca forma RNA, przy czym jej ilość zależna była od obecności ale nie od stężenia jonów Mg^{2+} .



Rysunek 36. Migracja RNA P1-554 w żelu poliakryloamidowym w warunkach natywnych w zależności od stężenia $MgCl_2$ (A) oraz KCl (B). K – reakcja kontrolna, I – 125 mM KCl, II – 40 mM KCl. Końcowe stężenie $MgCl_2$ w reakcji wynosiło 2,5, 5 i 10 mM.

Aby przekonać się, czy heterogenność RNA P1-554 w obecności $MgCl_2$ związana jest ze zmianami struktury w regionie terminalnym 5' przeprowadziłem analizę SHAPE. Wynika z niej, że niezależnie od jonów Mg^{2+} rozkład modyfikacji analizowanego regionu pozostaje niezmienny, również w regionie U230–G294 (Rys. 37). Na podstawie tego można przypuszczać, że potencjalne rearanżacje struktury indukowane jonami Mg^{2+} mają miejsce w dalszych regionach RNA P1-554. W obecności jonów Mg^{2+} widać jedynie ogólny spadek podatności na modyfikację chemiczną. Dodatkowo zauważyłem, że zmienność form RNA P1-554 w warunkach natywnych zależy od stężenia soli jednowartościowej (KCl). W niskim stężeniu chlorku potasu (40mM) obserwuję dwie formy RNA P1-554 pozostające w stosunku około 2:1, natomiast w wyższym stężeniu (125 mM) w zasadzie tylko jedną, szybciej migrującą formę (Rys. 36). Analiza struktury RNA P1-554 w różnym stężeniu jonów potasu z wykorzystaniem techniki SHAPE nie wykazała jednak różnic w strukturze badanego regionu, zatem prawdopodobne zmiany struktury, mają także miejsce w obrębie reszt 295–554 (Rys. 37).

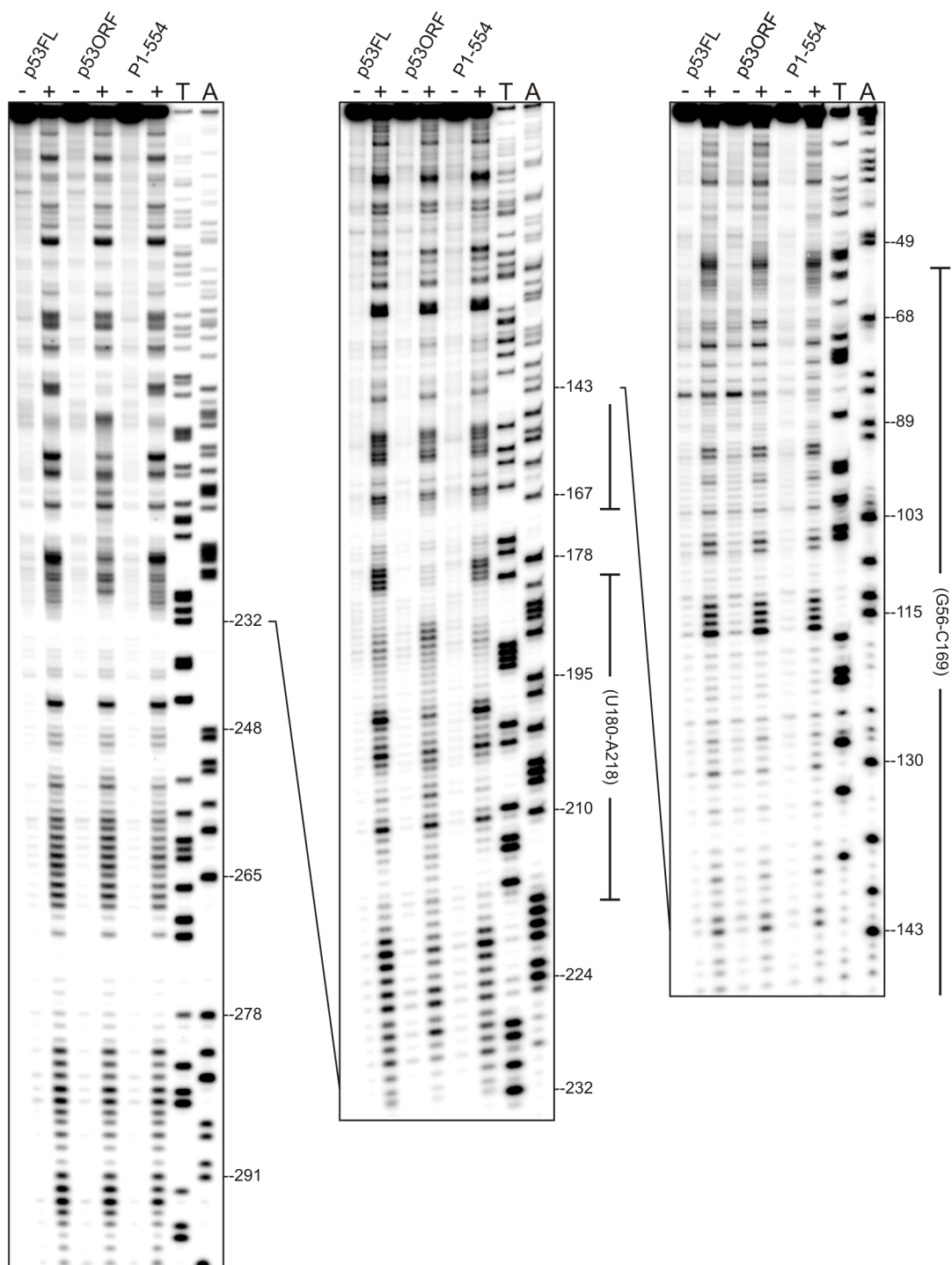


Rysunek 37. Badanie struktury RNA P1-554 w zależności od stężenia jonów Mg^{2+} (A) i K^+ (B). (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, +Mg – reakcja w obecności 5 mM $MgCl_2$, I i II – reakcja w obecności 40 i 125 mM KCl. Na rysunku zaznaczono wybrane reszty adenozynowe.

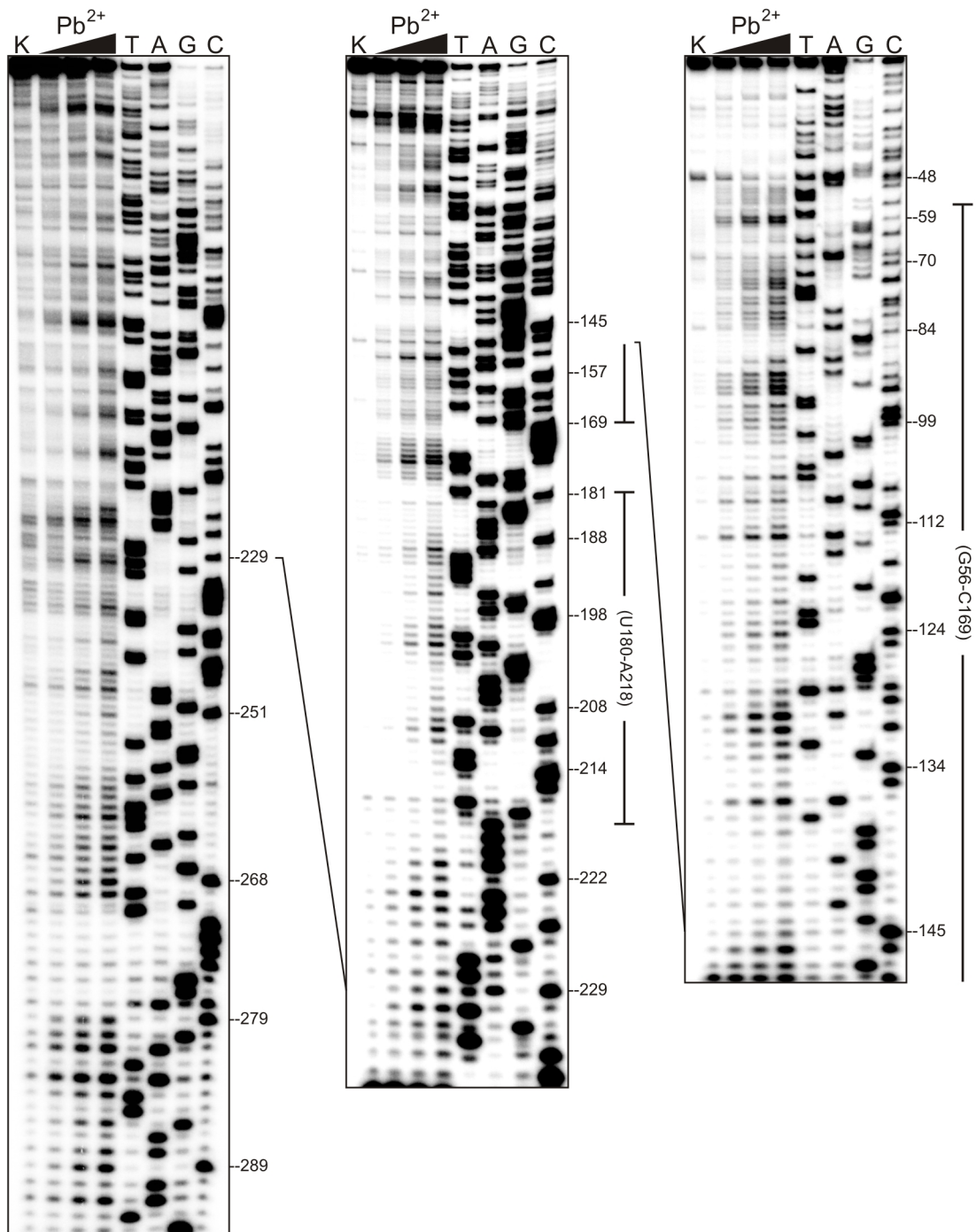
3.1.4.2. Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' w pełnej długości mRNA p53

Pod koniec 2010 roku ukazała się publikacja, w której proponowane jest oddziaływanie dalekiego zasięgu między regionem niekodującym 5' i 3' mRNA p53 i jego udział w regulacji translacji białka p53 (Rozdział 2.11.3) [84]. Regionami uwikłanymi w to oddziaływanie miałyby być reszty G82–G102, które w proponowanej przeze mnie strukturze regionu terminalnego 5' mRNA p53 zlokalizowane są w spince G56–C169 oraz reszty C1652–C1669 regionu niekodującego 3' (Rys. 19 i 32). Autorzy postulują, że oddziaływanie tych dwóch fragmentów sekwencji prowadzi do utworzenia regionu dwuniciowego, który odgrywa bardzo istotną rolę w wiązaniu białka rybosomalnego RPL26 do mRNA p53 [84]. Wyniki mapowania zaprezentowane przez autorów są jednak moim zdaniem niejednoznaczne. Dlatego też postanowiłem sprawdzić dostępnymi mi metodami, czy opisane oddziaływanie ma rzeczywiście miejsce. W tym celu otrzymałem dwie cząsteczki RNA. Pierwszą z nich był pełnej długości mRNA p53 (RNA p53FL) zawierający region niekodujący 5', otwartą ramkę odczytu oraz region niekodujący 3' (łącznie 2505 reszt nukleotydowych) (Rys. 21). Drugą był p53ORF składający się z regionu niekodującego 5' oraz otwartej ramki odczytu (łącznie 1317 reszt nukleotydowych) (Rys. 21). Cząsteczka ta miała posłużyć jako kontrola udziału regionu niekodującego 3' w tworzeniu potencjalnego oddziaływania 5' i 3'UTR. Odpowiednie DNA uzyskałem z wykorzystaniem techniki PCR na matrycy cDNA z wątroby zdrowego człowieka. Cząsteczki RNA otrzymałem za pomocą reakcji transkrypcji *in vitro*. Doświadczenia mapowania struktury drugorzędowej RNA p53FL oraz p53ORF prowadziłem równoległe z RNA P1-554.

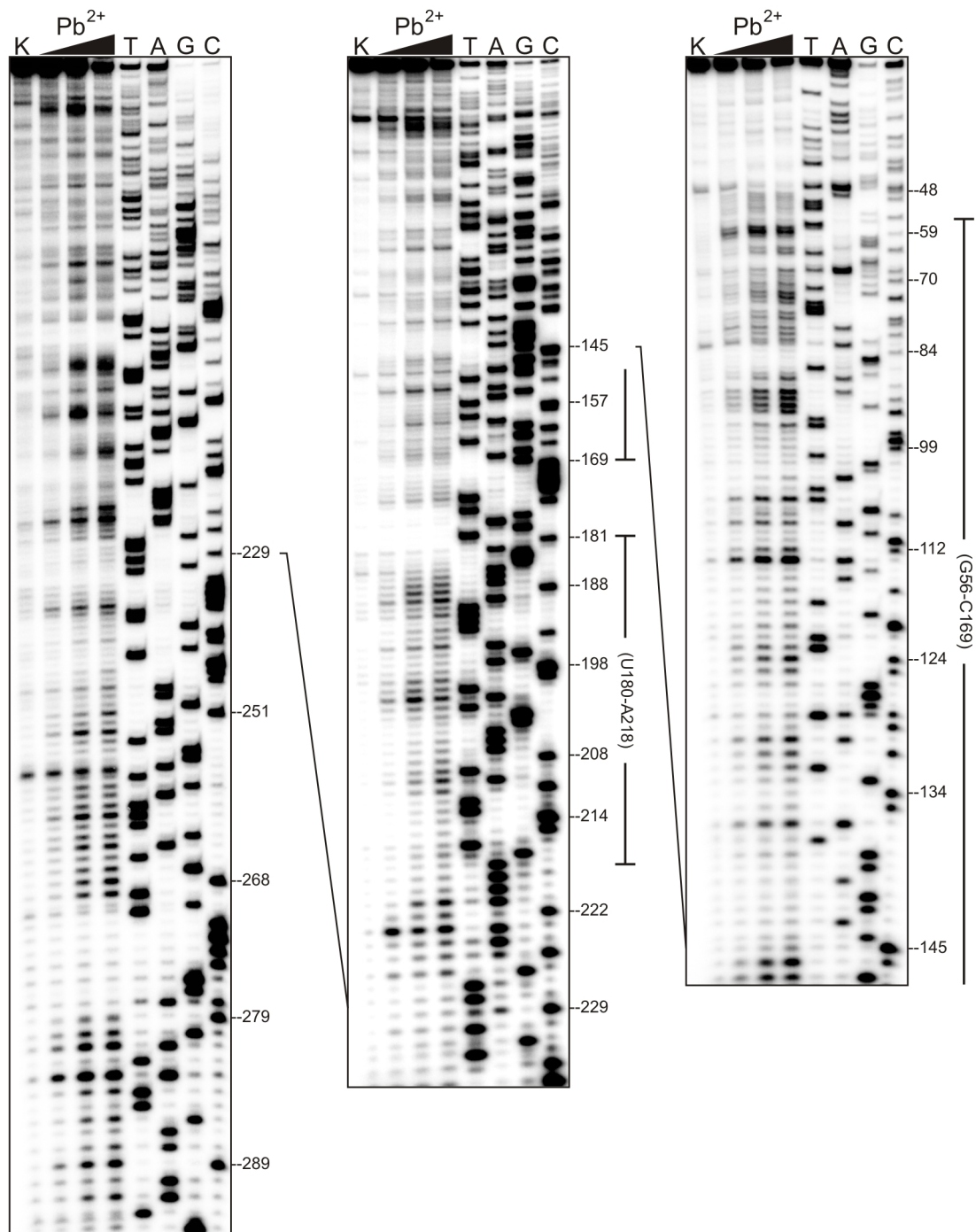
Rysunki 38–41 przedstawiają wyniki mapowania struktury RNA p53FL, p53ORF i P1-554 z wykorzystaniem techniki SHAPE oraz cięć indukowanych jonami ołowiu. Wynika z nich, że region terminalny 5' mRNA p53 również w pełnej długości mRNA przyjmuje identyczną strukturę drugorzędową z zachowaniem charakterystycznych motywów strukturalnych zmapowanych w krótszych fragmentach tzn. w RNA P1-554 i P1- Δ Np53. Porównując wyniki dla RNA p53FL i RNA P1-554 występują wszystkie charakterystyczne modyfikacje oraz cięcia, także w regionie, który potencjalnie mógłby wchodzić w oddziaływanie z 3'UTR (Rys. 38, 39, 41). Nie obserwuję dodatkowych modyfikacji lub cięć, które mogłyby świadczyć o możliwych rearanżacjach struktury reszt G82–G102. Jedyną różnicą w stosunku do RNA P1-554 jest większa dostępność do cięcia jonami ołowiu po reszcie A252 w RNA p53FL i p53ORF (Rys. 40 i 41). Chociaż reszta ta sąsiaduje bezpośrednio z pierwszą resztą nukleotydową kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53 nie doszło do innych zmian w reaktywności tego regionu.



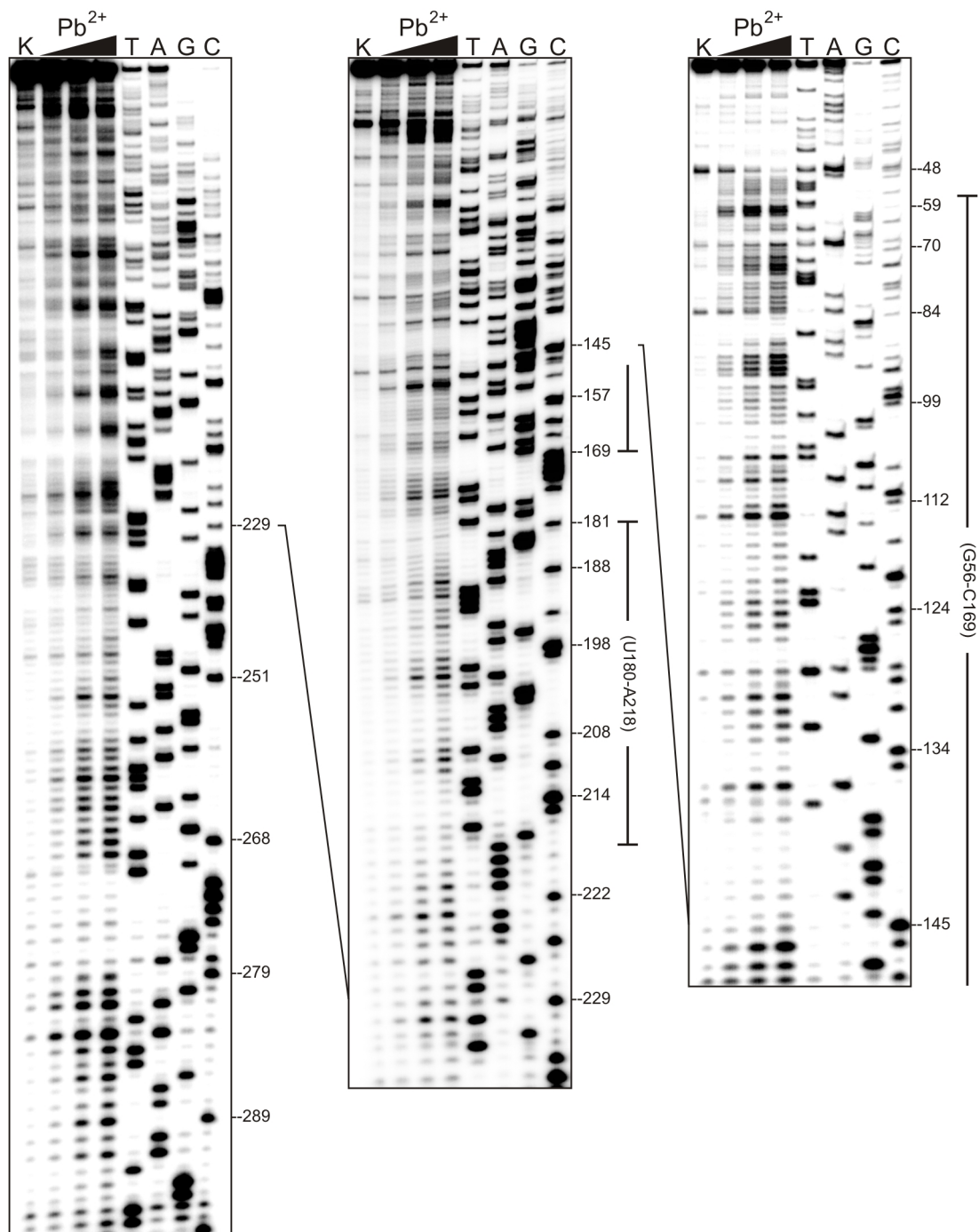
Rysunek 38. Badanie struktury drugorzędowej RNA p53FL, p53ORF i P1-554 za pomocą techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, T i A – reakcje sekwencjonowania. Po prawej stronie autoradiogramów zaznaczono pozycje niektórych reszt adenozynowych. Pionowymi liniami wskazano regiony odpowiadające spinkom G56–C169 i U180–A218.



Rysunek 39. Rozdział elektroforetyczny produktów cięcia RNA P1-554 indukowanych jonami ołowiu. K – reakcja kontrolna, T, A, G, C – reakcje sekwencjonowania. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. Zaznaczono wybrane reszty cytydynowe oraz lokalizację spinek G56–C169 i U180–A218.

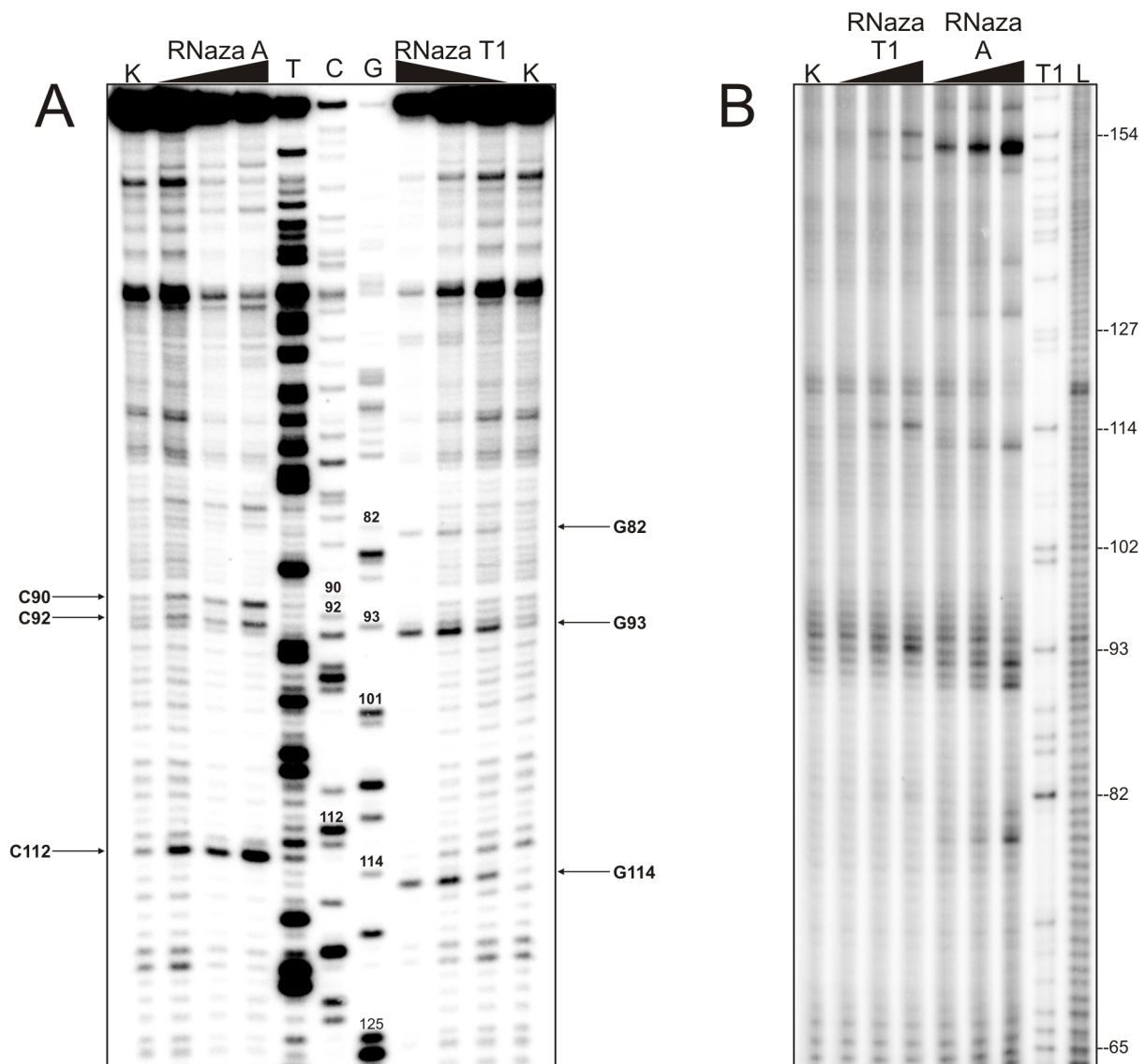


Rysunek 40. Rozdział elektroforetyczny produktów cięcia RNA p53ORF indukowanych jonami ołowiu. K – reakcja kontrolna, T, A, G, C – reakcje sekwencjonowania. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5, 1 mM. Zaznaczono wybrane reszty cytydynowe oraz lokalizację spinek G56–C169 i U180–A218.



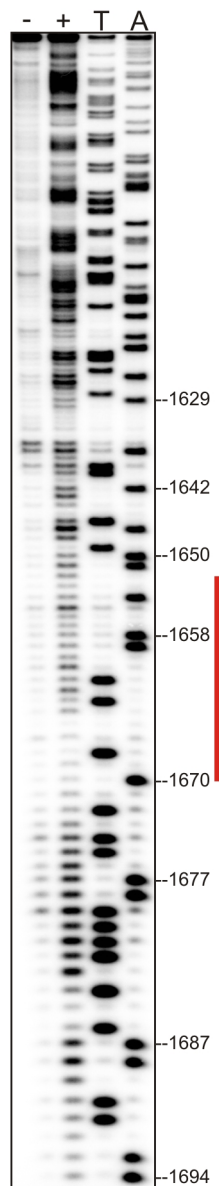
Rysunek 41. Rozdział elektroforetyczny produktów cięcia RNA p53FL indukowanych jonami ołowiu. K – reakcja kontrolna, T, A, G, C – reakcje sekwencjonowania. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5, 1 mM. Zaznaczono wybrane reszty cytydynowe oraz lokalizację spinek G56–C169 i U180–A218.

Otoczenie strukturalne odcinka G82–G102 w RNA p53FL zbadalem również za pomocą rybonukleazy A i T1. Cięcia identyfikowane były z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji. Podobnie jak w RNA P1-554 oraz P1-ΔNp53 tak i w przypadku RNA p53FL zidentyfikowałem charakterystyczne cięcia w obecności rybonukleazy A (reszty C90, C92, C112) oraz rybonukleazy T1 (reszty G82, G93, G114) (Rys. 42). Ponadto, analiza produktów cięcia RNA p53FL znakowanego radioizotopowo z końca 5' za pomocą obydwu enzymów, dodatkowo potwierdziła ten wynik (Rys. 42). Zaobserwowałem również inne charakterystyczne cięcia w dystalnej części spinki G56–C169 (reszta C152 – rybonukleaza A, reszty G150, G154 – rybonukleaza T1).



Rysunek 42. Analiza produktów cięcia RNA p53FL za pomocą rybonukleazy A i T1. A – rozdziel produktów cięcia, do identyfikacji których wykorzystano reakcję odwrotnej transkrypcji. B – rozdziel produktów cięcia RNA p53FL znakowanego radioizotopowo na końcu 5'. K – reakcja kontrolna, T, C, G – reakcje sekwencjonowania, L – hydrolizat formamidowy, T1 – ograniczona hydroliza rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących. Zaznaczono wybrane reszty cytydynowe i guanozynowe.

Jeżeli potencjalne oddziaływanie między 5' i 3'UTR miałyby miejsce to regiony, które byłyby w to zaangażowane powinny być częściowo jednoniciowe. W 5'UTR charakter taki ma odcinek A91–C98 (Rys. 32). Zainteresowało mnie, czy w regionie niekodującym 3', reszty mogące wchodzić w postulowane oddziaływanie są dostępne do modyfikacji za pomocą NMIA. W tym celu przeprowadziłem analizę struktury części 3'UTR mRNA p53 w interesującym mnie regionie. Reszty C1652–C1669 wykazują jedynie słabą lub brak reaktywności, również we fragmencie sekwencji G1656–U1662, potencjalnie mogących oddziaływać z wypełnieniem A91–C98 spinki G56–C169 (Rys. 43).



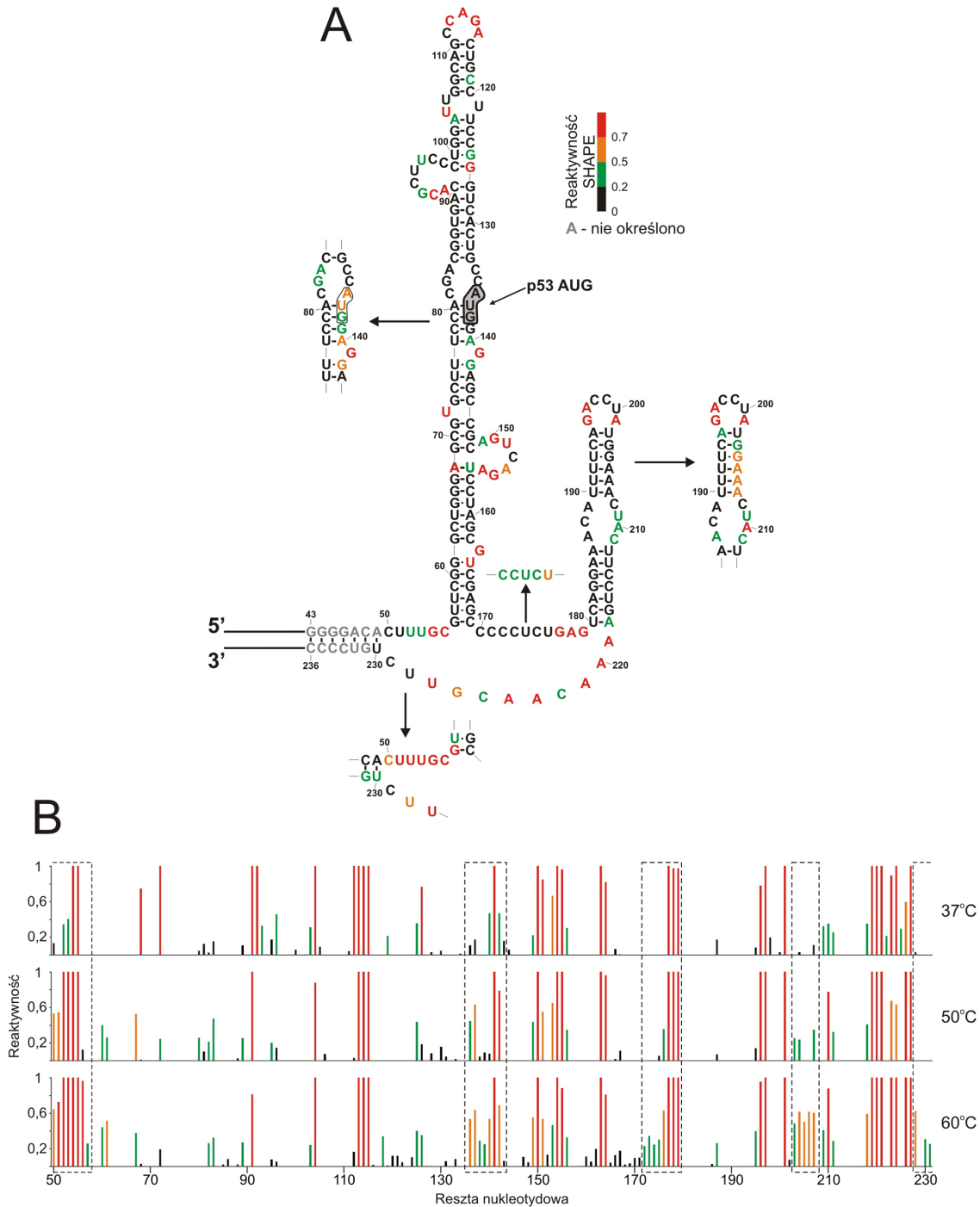
Rysunek 43. Badanie struktury drugorzędowej regionu niekodującego 3' mRNA p53 za pomocą techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, A i T – reakcje sekwencjonowania. Na rysunku zaznaczono wybrane pozycje reszt adozynowych. Czerwoną linią wskazano region obejmujący reszty G1656–U1662.

Bardzo ciekawe wyniki otrzymałem badając strukturę drugorzędową RNA p53ORF. Podczas gdy większość analizowanego regionu cechowała się taką samą reaktywnością wobec NMIA jak w RNA p53FL i P1-554, doszło do znaczących zmian w spince U180–A218 oraz przyległych regionach jednoniciowych. Zaobserwowałem brak lub osłabienie reaktywności reszt C171–G179 (region jednoniciowy), G196, A197, A201 (pętla apikalna spinki) oraz większości reszt w regionie jednoniciowym A219–U230 (Rys. 38). Wzrost reaktywności dotyczył reszt A185–A187 oraz A205 i A206. Zmiany w reaktywności zidentyfikowane za pomocą techniki SHAPE pozostają w zgodzie z danymi otrzymanymi z wykorzystaniem jonów ołowiu. Do zaniku cięć dochodzi w regionie C171–G177 oraz w większości pozycji w odcinku A219–U230 (Rys. 40). Zwiększoną podatnością na cięcie cechują się reszty A185–A187 spinki U180–A218. Zmiany te sugerują wystąpienie rearanżacji struktury w tym regionie mRNA. Jednakże analiza struktur drugorzędowych wygenerowanych przez program *RNAstructure* wykazała, że region ten przyjmuje zawsze taką samą formę, niezależnie od kontekstu sekwencji, w jakim się znajduje. Ciekawe jest, że w krótszych fragmentach mRNA p53 (RNA P1- Δ Np53 i RNA P1-554) oraz w pełnej długości mRNA p53 nie ma zmian reaktywności w regionie C171–U230 (Rys. 23, 32, 38, 41).

3.1.5. Badanie stabilności termodynamicznej elementów struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53

Aby uzyskać więcej informacji na temat stabilności termodynamicznej elementów strukturalnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53 przeprowadziłem doświadczenie topnienia temperaturowego cząsteczki RNA P1- Δ Np53. Potencjalne zmiany w reaktywności reszt nukleotydowych śledziłem z użyciem techniki SHAPE. Mapowanie struktury przeprowadziłem w temperaturze 37, 50 i 60 °C. Chociaż globalna struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53 została zachowana, to porównując wyniki doświadczeń przeprowadzonych w temperaturze 37 i 60 °C, można zauważyć, że niektóre regiony znacząco zmieniły swoją reaktywność. Dotyczy to odcinka A136–G142, który zawiera kodon inicjacyjny dla białka p53, jak również reszt G82 i A83, leżących po stronie 5' pętli wewnętrznej (Rys. 44). Stąd otoczenie strukturalne kodonu AUG białka p53 wydaje się być termodynamicznie mniej stabilne niż pozostałe części spinki G56–C169. Innym regionem, w którym doszło do zwiększenia reaktywności jest odcinek sekwencji bogaty w reszty pirymidynowe C172–U176. Chociaż reszty te ulegają silnemu cięciu jonami ołowiu, to w temperaturze 37 °C z nieznanymi powodów nie ulegają modyfikacji NMIA (Rys. 23 i 32). W temperaturze 60 °C stają się jednak reaktywne, co może oznaczać ich jednoniciowy charakter (Rys. 44). W wyższej temperaturze również sekwencja G203–A207 uległa zwiększonej modyfikacji NMIA (Rys. 44). Jest ona częścią spinki U180–A218, a duża zawartość par A-U sugeruje, że jest to mniej stabilny region badanego RNA. Wzrost reaktywności reszt G203–A207 jest zgodny z danymi uzyskanymi z wykorzystaniem cięć indukowanych jonami ołowiu w temperaturze 37 °C, gdzie obserwowałem cięcia po resztach pirymidynowych U190–C194, które wraz z G203–A207 tworzą region dwuniciowy (Rys. 23). Zwięk-

szoną reaktywność widać również w obrębie reszt C50–G61. Fragment ten ulega także silniejszej modyfikacji NMIA w RNA P1-554, co może sugerować, że również podstawa spinki G56–C169 jest jednym z mniej stabilnych elementów strukturalnych.



Rysunek 44. Wyniki analizy topnienia temperaturowego RNA P1- Δ Np53 otrzymane za pomocą techniki SHAPE. A – struktura drugorzędowa RNA P1- Δ Np53 z naniesionymi wynikami analizy reaktywności poszczególnych reszt w temperaturze 37 °C (kolory zgodne z legendą). Elementy struktury RNA P1- Δ Np53, które wykazywały zwiększoną podatność na modyfikację NMIA w temperaturze 60 °C zaznaczono strzałkami. B – reaktywność reszt nukleotydomowych w zależności od ich pozycji w RNA P1- Δ Np53 w temperaturze 37, 50 i 60 °C. Kolor słupków koresponduje z legendą (panel A).

3.1.6. Analiza zmienności genetycznej regionu terminalnego 5' genu p53

Wyniki mapowania struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53, które wykazały duży stopień uporządkowania jego struktury drugorzędowej, skierowały moją uwagę na to, czy znajdzie to odzwierciedlenie również na poziomie odpowiednich sekwencji u innymi organizmów. Jeśli tak, mogłoby to świadczyć, że struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA p53 jest zachowana w podobnej formie nie tylko u człowieka. Gen p53 jest jednym z najczęściej badanych pod względem występowania nie tylko mutacji, ale także polimorfizmów toteż spodziewałem się, że istnieje wiele informacji odnośnie interesującego mnie regionu. Okazało się jednak, że dostępne dane literaturowe dotyczą tylko części kodującej, najczęściej domeny oddziaływania z DNA. Z tego względu przeprowadziłem analizę zmienności sekwencji regionu terminalnego 5' genu p53. Skupiłem się tylko na polimorfizmach pojedynczego nukleotydu, ponieważ mutacje lub zmiany obejmujące większe odcinki sekwencji mogą powodować istotne zmiany w funkcjonowaniu białka p53. Analizę zmienności rozpocząłem od przeszukania dostępnych baz danych, pod kątem polimorfizmów typu SNP w regionie terminalnym 5' genu p53. Następnie, wykorzystałem wyniki tej analizy do przewidywania wpływu polimorfizmów na strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53 *in silico*. W kolejnym etapie przeprowadziłem doświadczenia mające na celu określenie stopnia zmienności regionu terminalnego 5' genu p53 u człowieka, a także analizę porównawczą sekwencji tego regionu u innych organizmów.

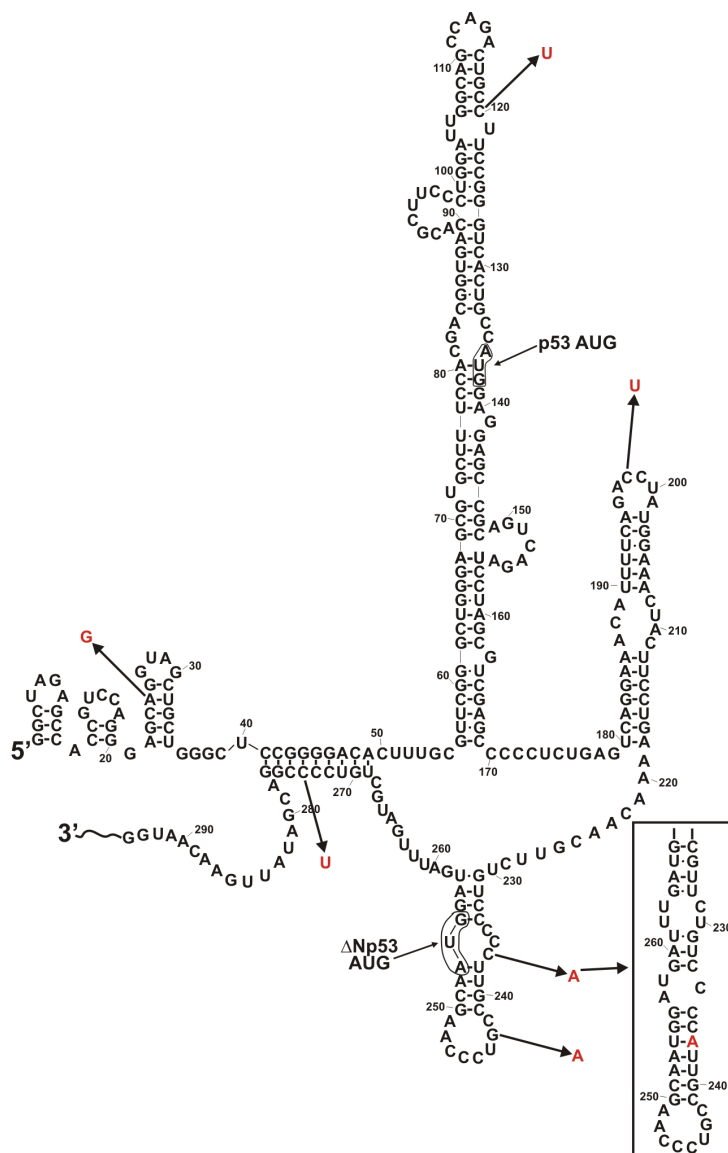
3.1.7. Zmiany polimorficzne pojedynczego nukleotydu w regionie terminalnym 5' genu p53 i ich potencjalny wpływ na strukturę drugorzędową RNA – analiza *in silico*

W celu znalezienia SNP w regionie terminalnym 5' genu p53 skorzystałem z bazy danych SNPdb (ang. *short genetic variations database*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) oraz SNPper (<http://snpper.chip.org>). Poszukiwania ograniczyłem do sekwencji odpowiadającej resztom 1–294 w mRNA p53, ponieważ jest to minimalna sekwencja umożliwiająca utworzenie takiej samej struktury drugorzędowej tego regionu jak w pełnej długości mRNA. W analizowanym regionie zidentyfikowano dotychczas tylko sześć SNP (Tab. 1). Można sądzić, że powodem tego jest ogólny brak badań tej części genu p53 lub też potencjalnie silna zachowawczość sekwencji.

Jedynie dwa SNP zlokalizowane są w regionie niekodującym 5', natomiast pozostałe w części kodującej, spośród których tylko ten w kodonie 47 prowadzi do zmiany aminokwasu z proliny na serynę (Tab. 1). SNP w pozycjach 25, 120, 274 występują w regionie dwuniciowym, a pozostałe zlokalizowane są w regionach jednoniciowych (pętle apikalne lub wypętlenia wewnętrzne) (Rys. 45). SNP w pozycjach 25, 120, 198, 243 i 274 są zmianami polegającymi na tranzycji (zamiana zasady purynowej na inną purynową lub pirymidynowej na inną pirymidynową). Dla jednego SNP, pozycja 237, ma miejsce transwersja (zamiany zasady pirymidynowej na purynową,

Tabela 1. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w regionie terminalnym 5' genu p53.

pozycja/kodon	region genu	zmiana nt	wpływ
25/-	5'UTR (egzon 1)	A/G	-
120/-	5'UTR (egzon 2)	C/T	-
198/21	ORF (egzon 2)	C/T	synonimiczna
237/34	ORF (egzon 4)	C/A	synonimiczna
243/36	ORF (egzon 4)	G/A	synonimiczna
274/47	ORF (egzon 4)	C/T	niesynonimiczna Pro/Ser



Rysunek 45. Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w regionie terminalnym 5' mRNA p53. Rysunek przedstawia proponowany model struktury drugorzędowej RNA P1-554 z naniesionymi pozycjami SNP (czerwony). Region, którego struktura drugorzędowa ulega zmianie wskutek obecności SNP ujęto w ramkę.

w tym przypadku cytozynowej na adeninową) (Rys. 45). W celu zbadania, czy znane SNP mogą wpływać na strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53, przeprowadziłem analizę *in silico*. Każdą zmianę reszty nukleotydowej umieściłem osobno w sekwencji RNA

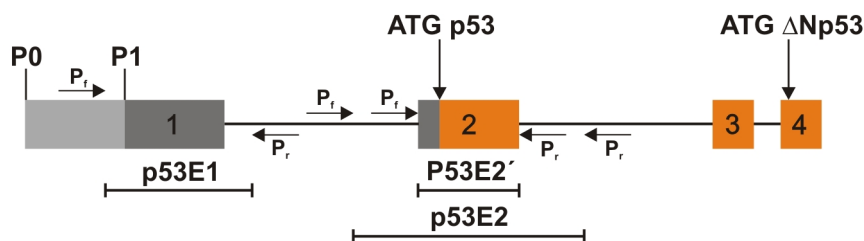
P1-554, która następnie została wprowadzona do programu *RNAstructure* i zwinięta przy domyślnych ustawieniach. Tylko dla SNP w pozycji 237 transwersja reszty C w A doprowadziła do zmiany przewidywanej struktury drugorzędowej (Rys. 45). SNP zlokalizowane we fragmentach dwuniciowych spowodowały utworzenie par typu G-U, co umożliwiło zachowanie helikalnego charakteru tych regionów. W wyniku zmiany rodzaju zasady azotowej reszta A237 utworzyła parę z resztą U254, wchodzącą w skład kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53. Rezultatem tego jest nie tylko wydłużenie regionu dwuniciowego w spince G231–U258, ale też ułożenie kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53 w regionie dwuniciowym (Rys. 45). Niestety brak jest danych dotyczących częstotliwości występowania tego SNP w populacji oraz jego potencjalnego wpływu na poziom syntezy izoformy Δ Np53.

3.1.7.1. Analiza zmienności sekwencji regionu terminalnego 5' genu p53 za pomocą techniki SSCP

Najprostszą metodą pozwalającą wykryć zmiany w sekwencji DNA jest sekwencjonowanie. Staje się to jednak kosztowne w przypadku większej ilości prób. W takiej sytuacji niezwykle przydatne są metody przesiewowe, dzięki którym można wstępnie wytypować próby mające zmienioną sekwencję. Jedną z takich technik jest polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów, SSCP (ang. *single strand conformational polymorphism*). U podstaw techniki SSCP leży zdolność tworzenia przez jednoniciowe fragmenty DNA struktur drugo- i trzeciorzędowych w warunkach natywnych [126]. W zależności od długości i składu nukleotydowego dany fragment może przyjmować odmienną strukturę przestrzenną, zależną nawet od zmiany pojedynczej reszty nukleotydowej. Rezultatem jest zmieniona ruchliwość elektroforetyczna takich cząsteczek DNA, pozwalająca wykryć zmiany w sekwencji [126]. Dlatego też zdecydowałem się użyć techniki SSCP do badania zmienności regionu terminalnego 5' genu *p53*.

Ze względu na to, że sekwencja regionu niekodującego 5' i części kodującej między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i izoformy Δ Np53 leży w obrębie czterech pierwszych egzonów, niezbędne było otrzymanie kilku fragmentów DNA do analizy SSCP. Metoda ta daje bowiem największą wykrywalność zmian, gdy analizowane fragmenty mają długość od 200 do 400 reszt nukleotydowych [126]. Zdecydowałem się na przeprowadzenie analizy SSCP tylko dla egzonu pierwszego i drugiego. Egzon trzeci jest zbyt krótki na osobną analizę i niezbędna byłaby amplifikacja tego regionu wraz z przyległą sekwencją intronu 3, a to mogłoby prowadzić do fałszywie pozytywnych rezultatów, wskutek zmian sekwencji w intronie 3. Region niekodujący 5' genu *p53* obejmuje egzon 1 oraz 28 reszt nukleotydowych egzonu 2. Aby przeprowadzić analizę zmienności całego 5'UTR oraz przyległej części kodującej musiałem otrzymać dwa fragmenty DNA. Pierwszy z nich to DNA p53E1 obejmujący egzon 1, rozpoczynający się w miejscu inicjacji transkrypcji P1, a drugi to DNA p53E2, zawierający cały egzon 2 (28 reszt nukleotydowych 5'UTR oraz 74 początkowe reszty części kodującej) (Rys. 46). Obydwa fragmenty DNA zawierały także przyległe sekwencje pochodzące z intronów lub regionu genu *p53* powyżej promotora P1

o długości kilkudziesięciu reszt nukleotydowych. Do sekwencji tych hybrydowały startery w reakcji PCR, co wydłużało amplifikowany fragment, w celu jak najdokładniejszej analizy SSCP. W rezultacie, fragment p53E1 miał długość 206 nt, a p53E2 221nt. Analizę zmienności planowałem przeprowadzić na 96 próbkach DNA genomowego pochodzących od zdrowych osobników rasy kaukaskiej zdefiniowanych pod względem płci i wieku (48 kobiet i 48 mężczyzn). Próbkę zakupiono w *European Collection of Cell Cultures* (ECACC).



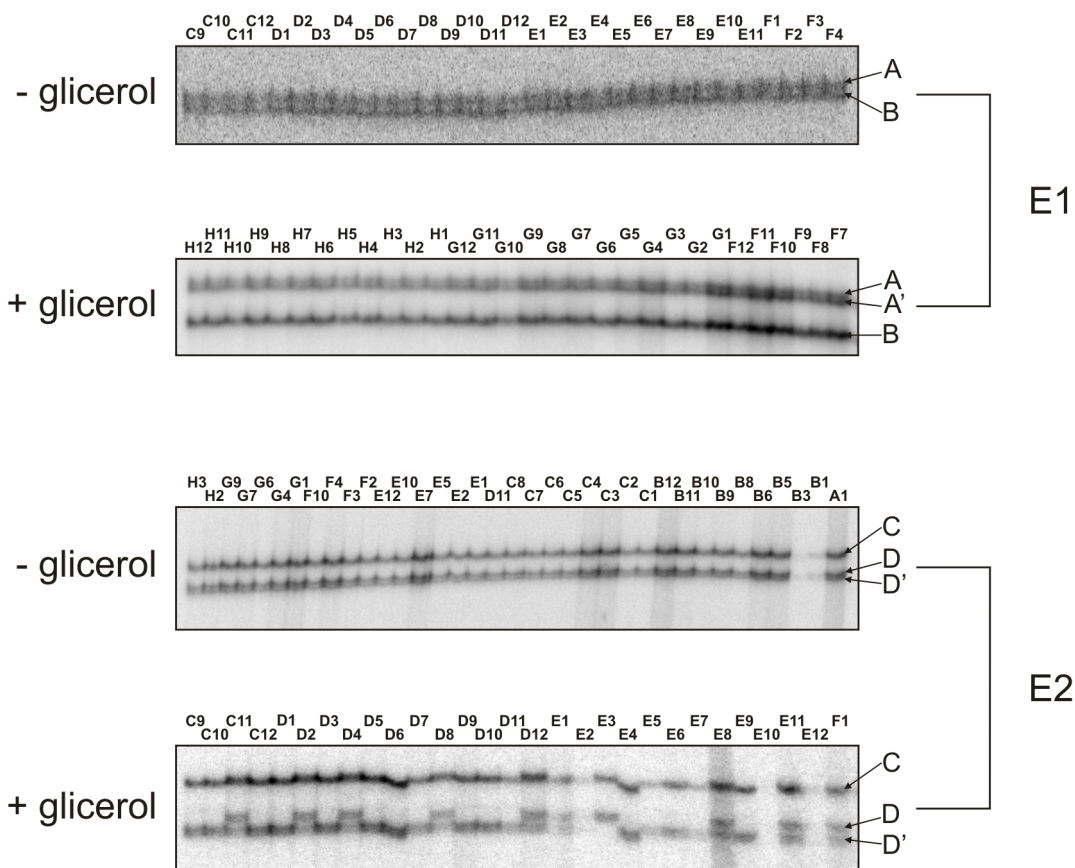
Rysunek 46. Schematyczne przedstawienie fragmentów DNA genu p53 użytych w analizie SSCP. Na rysunku zaznaczono pozycje starterów DNA użytych w celu namnożenia badanych DNA.

Pierwszym etapem analizy SSCP była amplifikacja DNA p53E1 i p53E2 na matrycy genomowego DNA. W celu późniejszej wizualizacji, startery do reakcji PCR wyznakowano radioizotopowo. Po reakcji PCR do prób dodawano roztwór do denaturacji i obciążania próbek DNA z formamidem. Następnie, przeprowadzano denaturację przez 10 minut w temperaturze 95 °C po czym próby schładzano do temperatury pokojowej i nakładano do kieszonek w żelu poliakryloamidowym, uformowanych za pomocą grzebienia typu „zęby rekina”. Każda próba rozdzielana była w dwóch żelach poliakryloamidowych, różniących się obecnością czynnika zmiennego – 10% glicerolu. Użycie glicerolu podyktowane było tym, że pełni on rolę „lekkiego” czynnika denaturującego, co przekłada się często na poprawę rozdziału i tym samym detekcję zmian w sekwencji.

Analiza SSCP DNA p53E1

Rysunek 47 prezentuje przykładowe autoradiogramy z rozdziału elektroforetycznego DNA p53E1. W żelach bez glicerolu można zauważyć przynajmniej dwa prążki (A i B) (Rys. 47). Jednakże nie nastąpiła ich zadowalająca separacja, a co za tym idzie istniała możliwość współmigracji kilku konformerów strukturalnych w postaci jednego prążka. Podjąłem próby, aby zwiększyć rozdzielczość uzyskanych obrazów, jednak ani dłuższa elektroforeza ani zwiększenie czasu denaturacji do 20 minut, nie przyniosły oczekiwanych efektów. Pomimo niedostatecznej separacji prążków nie zaobserwowałem jakichkolwiek zmian w migracji, które mogłyby świadczyć o obecności polimorfizmów.

Lepsze obrazy rozdziału DNA p53E1 udało mi się uzyskać dopiero w żelach z dodatkiem 10% glicerolu (Rys. 47). Z interpretacji autoradiogramów wynika, że pojedynczy prążek A zawiera



Rysunek 47. Przykładowe autoradiogramy reprezentujące analizę polimorfizmu w obrębie fragmentów p53E1 i p53E2. Oznakowanie linii odpowiada przyjętym podczas analizy nazwom próbek genomowego DNA. Z prawej strony autoradiogramów wskazano konformery pojedynczej nici DNA.

prawdopodobnie dwie formy strukturalne, które migrowały na tej samej wysokości w żelu bez glicerolu. Obserwuję 3 prążki: A, A' oraz B. Prążki A i A' odpowiadają najprawdopodobniej różnym formom strukturalnym tej samej nici DNA. Pomimo nie do końca zadowalającej separacji konformerów pojedynczych nici DNA p53E1, nie odnotowałem żadnych zmian w mobilności elektroforetycznej analizowanego fragmentu. Sugeruje to, że w egzonie 1 genu p53 nie występują zmiany w sekwencji we wszystkich przeanalizowanych próbach genomowego DNA.

Analiza SSCP DNA p53E2

Dla DNA p53E2 na żelach bez glicerolu obserwuję przynajmniej trzy prążki. Są to wyżej migrujący prążek C oraz położone bardzo blisko siebie prążki D i D', które prawdopodobnie reprezentują alternatywne formy strukturalne jednej z nici DNA (Rys. 47). Pomimo nieco lepszego rozdziału DNA p53E2 w żelach bez glicerolu w stosunku do DNA p53E1, również i w tym przypadku nie ma zmienionego rozkładu prążków, co mogłoby wskazywać na występowanie polimorfizmów.

Dopiero analiza SSCP DNA p53E2 w żelach z glicerolem zaowocowała zmiennym rozkładem prążków. Występuje ponownie prążek C oraz niżej migrujące D i D' (Rys. 47). Są trzy możliwe

układy prążków: gdy jest tylko jeden z prążków (D lub D') oraz gdy obecne są obydwa, przy czym w każdej z kombinacji znajduje się zawsze prążek C. W celu pogrupowania zmian, układ prążków C+D oraz C+D' sklasyfikowałem jako homozygoty. Próby reprezentowane przez najczęstszy układ C+D można określić jako homozygoty częste (nie posiadają zmian w allelach genu p53), natomiast układ C+D' jako homozygoty rzadkie (posiadają zamianę sekwencji w obydwu allelach genu p53). Próbom reprezentowanym przez układ konformerów C+D+D' przypisałem heterozygotyczność, w których tylko jeden z alleli posiada zmianę sekwencji. Manifestuje się to jednoczesnym występowaniem prążków C i D'. Dla 27 prób nie udało mi się uzyskać wyników z powodu braku produktów amplifikacji lub niedostatecznej separacji prążków.

W celu sprawdzenia, czy różnice w migracji konformerów pojedynczych nici DNA p53E2 spowodowane są zmianami w sekwencji egzonu 2 przeprowadziłem reakcję sekwencjonowania. Wytypowałem do tego dwie próby, z których jedna należała do grupy homozygot rzadkich, a druga do heterozygot. Analiza wyników wykazała brak zmian sekwencji w egzonie 2, co oznacza, że zmiany mobilności elektroforetycznej były najprawdopodobniej wynikiem różnic w sekwencjach flankujących egzon 2 (Rys. 48).

A1-DNAE2

A1-DNAE2 : GATCCCCACTTTTCCTCTTGCA**CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAC**
 Pr : GATCCCCACTTTTCCTCTTGCA**CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAC**
 Pf : GATCCCCACTTTTCCTCTTGCA**CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAC**

A1-DNAE2 : GAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGA
 Pr : GAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGA
 Pf : GAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGGA

A1-DNAE2 : TCAGACCTATGGAAACTGTGAGTGGATCCATTGGAAGGGCAGGCCCA
 Pr : TCAGACCTATGGAAACTGTGAGTGGATCCATTGGAAGGGCAGGCCCA
 Pf : TCAGACCTATGGAAACTGTGAGTGGATCCATTGGAAGGGCAGGCCCA

E11-DNAE2

E11-DNAE2 : CCCCACTTTTCCTCTTGCA**CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAC**
 Pr : CCCCACTTTTCCTCTTGCA**CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAC**
 Pf : CCCCACTTTTCCTCTTGCA**CAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCAC**

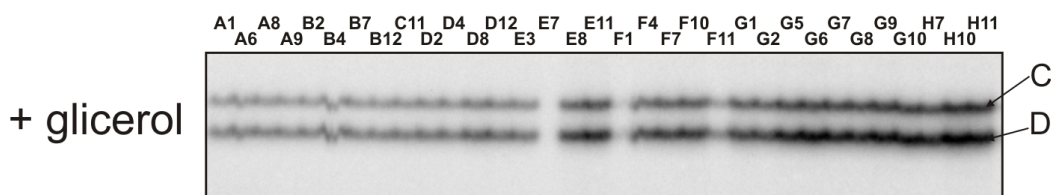
E11-DNAE2 : GAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGG
 Pr : GAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGG
 Pf : GAGGAGCCGCAGTCAGATCCTAGCGTCGAGCCCCCTCTGAGTCAGG

E11-DNAE2 : TTTTCAGACCTATGGAAACTGTGAGTGGATCCATTGGAAGGGCAGG
 Pr : TTTTCAGACCTATGGAAACTGTGAGTGGATCCATTGGAAGGGCAGG
 Pf : TTTTCAGACCTATGGAAACTGTGAGTGGATCCATTGGAAGGGCAGG

Rysunek 48. Porównanie sekwencji DNA p53E2 (próby A1 i E11) z sekwencją genu p53 za pomocą programu ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Kolorem pomarańczowym zaznaczono sekwencje regionu niekodującego 5' oraz egzonu 2.

Otrzymany wynik skłonił mnie do skrócenia długości DNA p53E2 w celu wyeliminowania sekwencji otaczających badany region. Zaprojektowałem 2 nowe startery, które hybrydyzowały do genu p53 tuż przed miejscem składania 5' i 3' egzonu 2 (Rys. 46). Analiza SSCP nowego

fragmentu, nazwanego p53E2' (148 reszt nukleotydowych) powinna wykazać, które z prób posiadają zmiany wyłącznie w egzonie 2. Na rysunku 49 przedstawiony jest autoradiogram analizy SSCP DNA p53E2' w żelu z dodatkiem 10% glicerolu. Nieoczekiwanie, wszystkie próby migrowały w identyczny sposób. Obecny był tylko układ prążków C+D, reprezentujący homozygoty częste, nieposiadające zmian w sekwencji. Taki obraz świadczy o tym, że wszystkie zmiany, jakie zaobserwowałem w analizie SSCP DNA p53E2, zlokalizowane są w sekwencjach flankujących. Oznacza to, że nie tylko egzon 1 ale i egzon 2, cechuje się bardzo silną zachowawczością sekwencji. Dla trzech analizowanych prób genomowego DNA, z powodu trudności w otrzymaniu produktu PCR, nie udało się przeprowadzić ich analizy techniką SSCP.



Rysunek 49. Autoradiogram przedstawiający wyniki analizy SSCP polimorfizmu DNA p53E2' w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem 10% glicerolu. Oznakowanie linii odpowiada przyjętym podczas analizy nazwom próbek genomowego DNA. Po prawej stronie autoradiogramu wskazano konformery pojedynczej nici DNA.

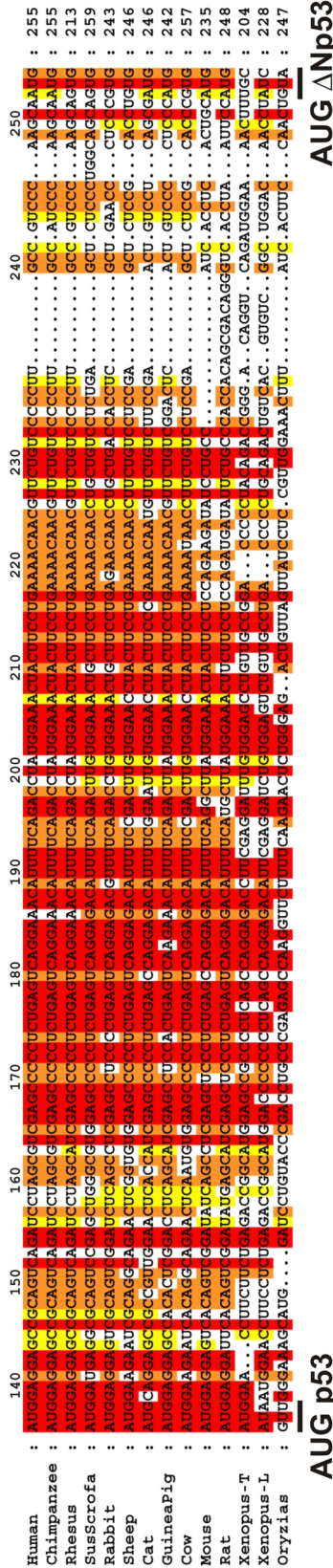
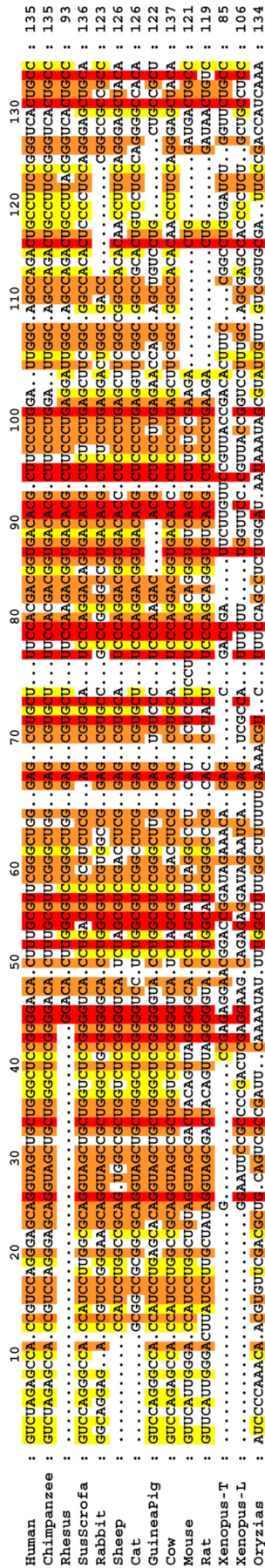
3.1.7.2. Porównanie sekwencji regionu terminalnego 5' mRNA p53 u różnych organizmów

Analizując strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53 zainteresowało mnie także to, czy u innych organizmów może dochodzić do tworzenia podobnej aranżacji struktury tego regionu. Idealnym do tego celu narzędziem jest program *MARNA* (ang. *multiple alignment of RNAs*), ponieważ bierze on pod uwagę nie tylko sekwencję pierwszorzędową, ale też i strukturę drugorzędową porównywanych sekwencji [127]. Analizę przeprowadziłem dla 14 organizmów, dla których dostępne były odpowiednie sekwencje w bazie danych RefSeq (ang. *reference sequence*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>). Jako sekwencji referencyjnej użyłem regionu terminalnego 5' ludzkiego mRNA rozpoczynającego się w miejscu inicjacji transkrypcji P1. Struktura drugorzędowa tego regionu wynikająca z danych doświadczalnych została wprowadzona do programu w formacie *dot bracket*.

Biorąc pod uwagę wszystkie 14 organizmów widać sporą dysproporcję między powtarzalnością sekwencji regionu niekodującego 5' i części kodującej (Rys. 50). Sekwencja kodująca zaangażowana w tworzenie struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53 jest w dużej części wysoce zachowawcza. Dotyczy to zwłaszcza regionu obejmującego reszty U164–G231, dla którego podobieństwo sekwencji wynosi przeważnie powyżej 80% (Rys. 50). W strukturze drugorzędowej reszty te tworzą spinkę U180–A218, wraz z przyległymi regionami jednoniciowymi (Rys. 32). Z kolei, w regionie niekodującym 5' nie można wskazać dłuższych regionów cechujących się wysoką zachowawczością sekwencji (Rys. 50). Może to być częściowo spowodowane włączeniem do analizy niższych

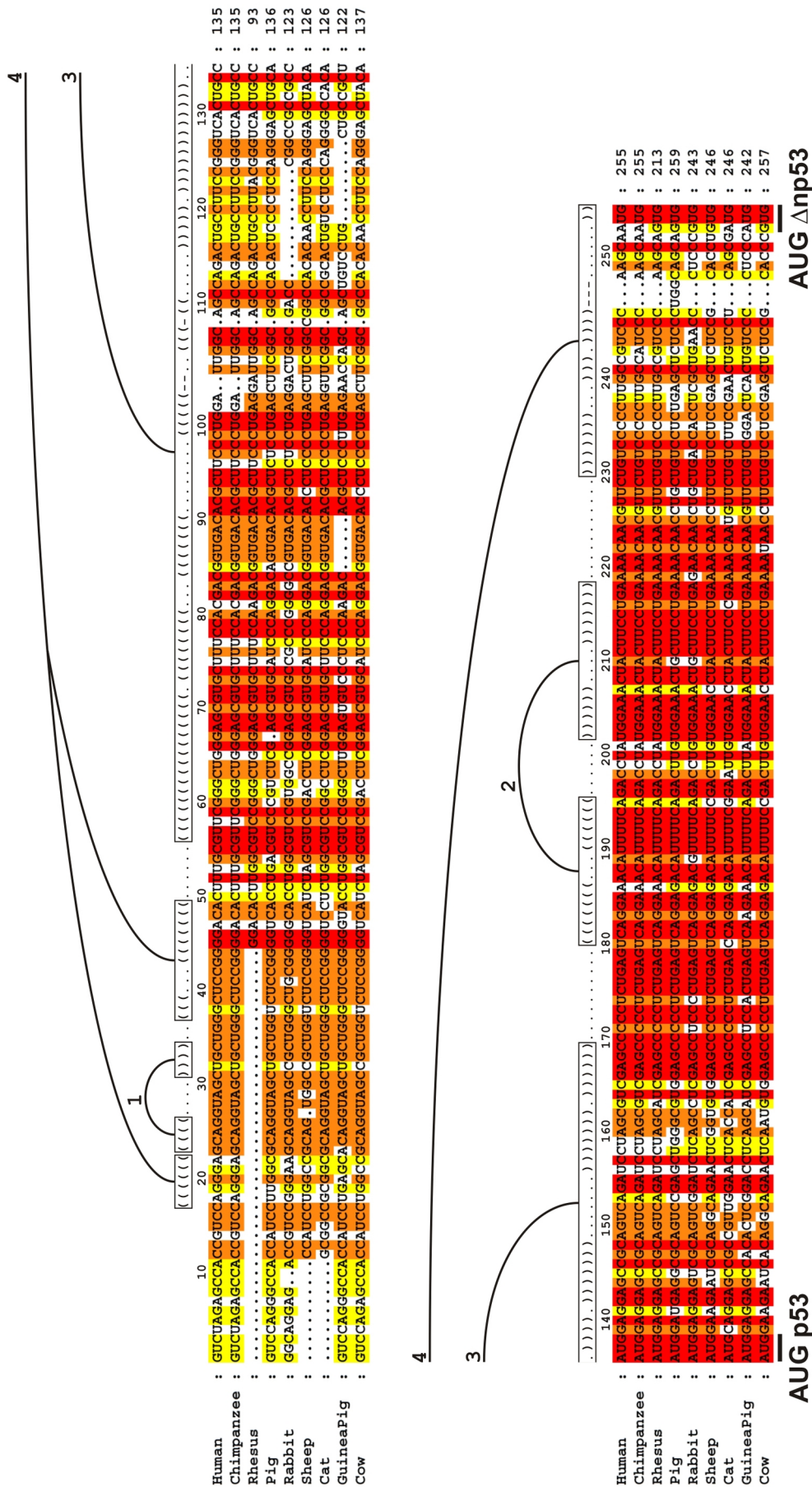
organizmów, takich jak żaba szponiasta (*Xenopus laevis* i *Xenopus tropicalis*) czy ryżówka japońska (*Oryzias latipes*). W celu uwydatnienia tych fragmentów 5'UTR, które wykazują większą zachowawczość sekwencji wykluczyłem z analizy pięć organizmów cechujących się najmniejszym podobieństwem do sekwencji ludzkiej (żaby, ryżówkę japońską, mysz i szczura). W rezultacie również w regionie niekodującym 5' można wskazać regiony, które cechują się często ponad 80% zachowawczością. Są to odcinki obejmujące reszty G23–G46, zlokalizowane w początkowej części 5'UTR, G54–G60, tworzące stronę 5' podstawy spinki G56–C169, G66–C74, leżące po przeciwległej stronie wypętlania A148–A155 oraz G86–G101, w obrębie którego zlokalizowane jest wielonukleotydowe wypętlanie A91–C98 (Rys. 51). Z drugiej strony, najmniejsze podobieństwo sekwencji obserwuję dla reszt G102–C135, które w strukturze drugorzędowej stanowią apikalną część spinki G56–C169 (Rys. 32). Natomiast w części kodującej najbardziej zachowawczym fragmentem są nadal reszty U164–G231.

3.1. Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się w miejscu inicjacji transkrypcji P1



AUG p53

Rysunek 50. Porównanie sekwencji regionu terminalnego 5' mRNA p53 u 14 organizmów przeprowadzone za pomocą programu MARNA. Kolor reszt nukleotydowych wyraża stopień podobieństwa sekwencji (czerwony – 100%, pomarańczowy $\geq 80\%$, żółty $\geq 60\%$). Na rysunku zaznaczono pozycje kodonów inicjujących białka p53 i izoformy $\Delta Np53$.



Rysunek 51. Porównanie sekwencji regionu terminalnego 5' mRNA p53 przeprowadzone za pomocą programu MARNA u 9 organizmów wykazujących największą zachowawczość sekwencji. Struktura drugorzędowa tego regionu określona doświadczalnie została umieszczona nad sekwencjami w formacie dot bracket. Kolor reszt nukleotydowych wyraża stopień podobieństwa sekwencji (czerwony – 100%, pomarańczowy ≥ 80%, żółty ≥ 60%). Na rysunku zaznaczono pozycje kodonów inicjacyjnych białka p53 i izoformy ΔNp53.

3.1.8. Dyskusja uzyskanych wyników

Nadrzędnym celem doświadczeń opisanych w niniejszym rozdziale było poznanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53. Początkowo, do realizacji tego celu użyto dwóch cząsteczek RNA. RNA P1-p53 stanowił izolowany region niekodujący 5', podczas gdy RNA P1- Δ Np53 przedłużony był dodatkowo o 120 reszt nukleotydowych sekwencji kodującej (Rys. 21). W celu udokładnienia otrzymanych wyników w kolejnych doświadczeniach zastosowano dłuższe (RNA P1-554, p53ORF) jak i krótsze (RNA H56-169) fragmenty, a także pełnej długości mRNA p53 (Rys. 21). Przeprowadzone przez mnie doświadczenia wykazały, że w tworzeniu prawidłowej struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' kluczowe znaczenie ma oddziaływanie, do jakiego dochodzi między regionem niekodującym 5' a częścią kodującą mRNA. Dzięki temu powstają charakterystyczne motywy strukturalne takie jak spinka G56–C169 czy dwuniciowy region utworzony przez oddziaływanie między częścią 5' i 3'.

3.1.8.1. Spinka G56–C169, główny motyw strukturalny regionu terminalnego 5' mRNA p53

Struktura spinki G56–C169 tworzy się w wyniku parowania sekwencji regionu niekodującego 5' (reszty G56–C135) z początkowym fragmentem sekwencji kodującej mRNA p53 (reszty A136–C169) (Rys. 32). Wartość parametru ΔG obliczona dla spinki wynosi -52,9 kcal/mol i jest to najstabilniejszy termodynamicznie element w tym regionie mRNA. Wyniki mapowania struktury świadczą, że niezależnie od otoczenia, spinka G56–C169 zostaje zachowana nawet w pełnej długości mRNA p53, co oznacza, że motyw ten może być istotnym elementem strukturalnym i funkcjonalnym. Cząsteczki RNA posiadają złożoną strukturę, która tworzy się w wyniku obecności regionów helikalnych oraz szeregu innych motywów struktury drugo- i trzeciorzędowej, wpływających w istotny sposób nie tylko na ich różnorodność, ale również mogących stanowić miejsca oddziaływania ligandów takich jak białka czy jony [128, 129]. Z tego powodu kilka elementów struktury spinki G56–C169 zasługuje na większą uwagę.

Jednym z częstszych motywów strukturalnych w cząsteczkach RNA są jednonukleotydowe wybrzuszenia (ang. *bulge loops*). Stanowią one niesparowaną resztę nukleotydową zlokalizowaną w regionie dwuniciowym [128, 129]. Ich występowanie związane jest z możliwością tworzenia oddziaływań trzeciorzędowych, a także wiązaniem ligandów. Często przyczyniają się też do zgięć regionu helikalnego oraz zaburzenia jego struktury [128, 129]. Istnieją dwie główne konformacje wybrzuszonej reszty nukleotydowej. W pierwszej z nich, *bulged in*, reszta nukleotydowa skierowana jest do wewnątrz helisy RNA i zazwyczaj oddziałuje warstwowo z resztami sąsiadującymi. Druga konformacja, *bulged out*, ma miejsce, gdy reszta ulega wybrzuszeniu na zewnątrz helisy [128, 129]. Wówczas oddziaływania warstwowe zachodzą często między resztami zamykającymi wybrzuszenie. W spince G56–C169 znajdują się aż trzy jednonukleotydowe wybrzuszenia. W dwóch przypadkach są to reszty guanozynowe (G141 i G163), a w jednym urydynowa (U72) (Rys. 32). W celu dokładniejszego zbadania potencjalnej konformacji wybruszonych reszt skorzystałem

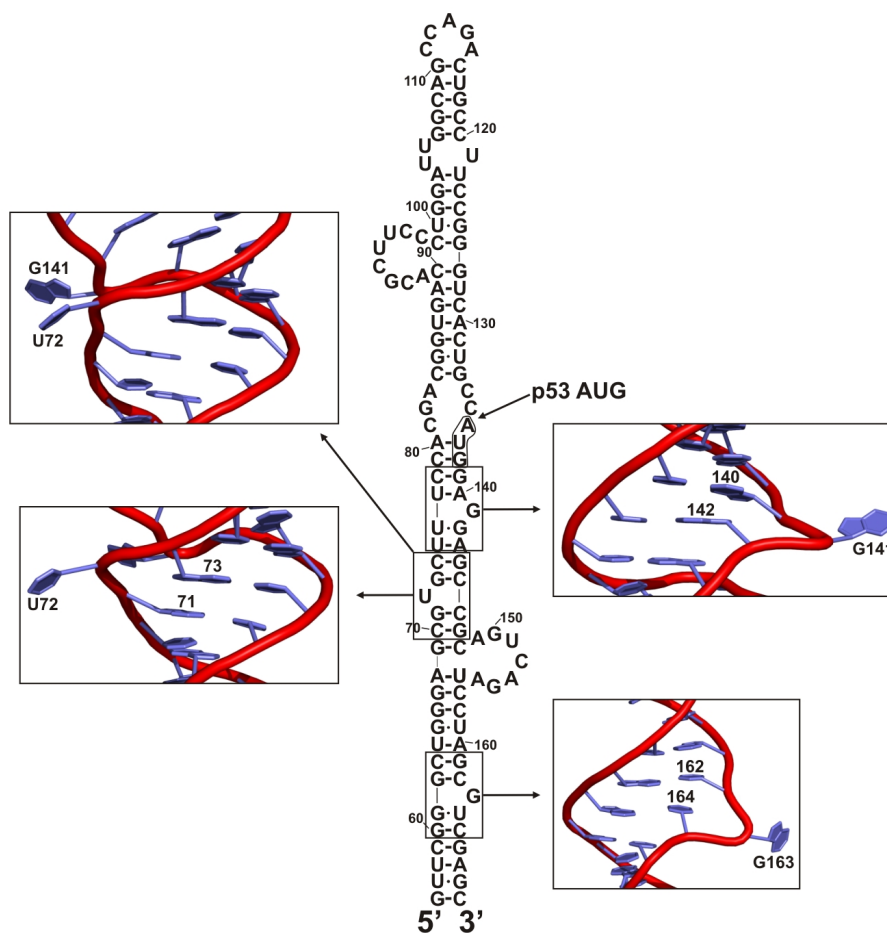
ze stworzonej w naszym Instytucie bazy danych *FRABASE*, która pozwala na wyszukiwanie zdefiniowanych motywów strukturalnych w cząsteczkach RNA w oparciu o dane krystalograficzne, spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego oraz mikroskopii elektronowej, zdeponowane w bazie danych PDB (ang. *protein data bank*) [130]. Dostępne są dane opisujące wybrzuszone reszty guanozynowe i urydynowe w identycznym lub bardzo podobnym kontekście sekwencji jak w spince G56–C169 (Tab. 2). Na tej podstawie można przypuszczać, że U72 i G163 ulegają wybrzuszeniu na zewnątrz helisy RNA. Dla G141 możliwa jest zarówno konformacja *bulged out* jak i *bulged in*. Co ciekawe, wszystkie trzy wybrzuszenia są wysoce reaktywne wobec NMIA, natomiast ich reaktywność wobec jonów ołowiu jest bardzo słaba. Wynika to z tego, że obecność i intensywność cięć w dużej mierze zależy nie tylko od rodzaju wybrzuszonej reszty, ale też sekwencji par zamykających [120].

W celu wizualizacji możliwej struktury trzeciorzędowej wybruszonych reszt skorzystałem ze stworzonego w naszym Instytucie programu *RNAComposer* [131]. Program ten na podstawie danych zdeponowanych w bazie PDB przewiduje strukturę trzeciorzędową badanego RNA. Ponadto, w przewidywaniach uwzględniana jest określona doświadczalnie struktura drugorzędowa cząsteczki [131].

Reszta U72 przyjmuje najprawdopodobniej konformację typu *bulged out* (Rys. 52). Taka konformacja często umożliwia zachowanie struktury RNA w formie A dzięki temu, że pomiędzy sąsiadującymi resztami dochodzi do stabilizujących oddziaływań warstwowych [128]. Prawdopodobnie dlatego reszty zamykające wybrzuszenie U72 oraz leżące dalej w sekwencji nie wykazują reaktywności wobec większości z zastosowanych sond tym bardziej, że są one zaangażowane w tworzenie par typu G-C (Rys. 23, 27, 32). W bazie danych *FRABASE* dostępnych jest aż 26 struktur przestrzennych RNA, w których wybrzuszona reszta urydynowa znajduje się w identycznym kontekście sekwencji jak U72 w mRNA p53 (Tab. 2). Co więcej, w dwóch przypadkach identyczna jest również sekwencja par zasad leżących dalej w sekwencji. Taki układ obserwowany jest w cząsteczce 23S rRNA podjednostki rybosomalnej 50S z chloroplastu szpinaku oraz w strukturze krótkiego dupleksu RNA [132, 133]. W obydwu cząsteczkach układ oddziaływań warstwowych wygląda identycznie (Rys. 53). Pomiedzy parami G-C, które sąsiadują z wybrzuszeniem oddziaływania warstwowe są bardzo słabe (między resztami guanozynowymi) lub ich nie ma (między resztami cytydynowymi). Reszty budujące te pary są jednak stabilizowane przez oddziaływania warstwowe z parami zasad leżącymi dalej w sekwencji (Rys. 53). Bardzo ciekawe jest to, że reszta guanozynowa po stronie 5' wybrzuszenia oddziałuje warstwowo nie z sąsiednią resztą cytydynową, a leżącą na przeciwnej nici resztą guanozynową (Rys. 53). Mamy zatem do czynienia z tzw. *cross strand stacking*. Tego typu interakcje są bardzo istotne m.in. w stabilizacji oddziaływania kodon–antykonon oraz w wiązaniu białka L25 do cząsteczki 5S rRNA [134, 135]. Nie wykluczone, że oddziaływanie tego typu może być również istotne w tworzeniu

Tabela 2. Konformacja wybranych reszt wrydynowych i guanozynowych w identycznym lub podobnym kontekście sekwencji jak U72, G141 i G163 w mRNA p53, uzyskana za pomocą bazy danych FRABASE. Wybrzone reszty podkreślono. Pogrubioną czcionką zaznaczono sekwencje identyczne z otoczeniem omawianych jednonukleotydowych wybrzuszeń.

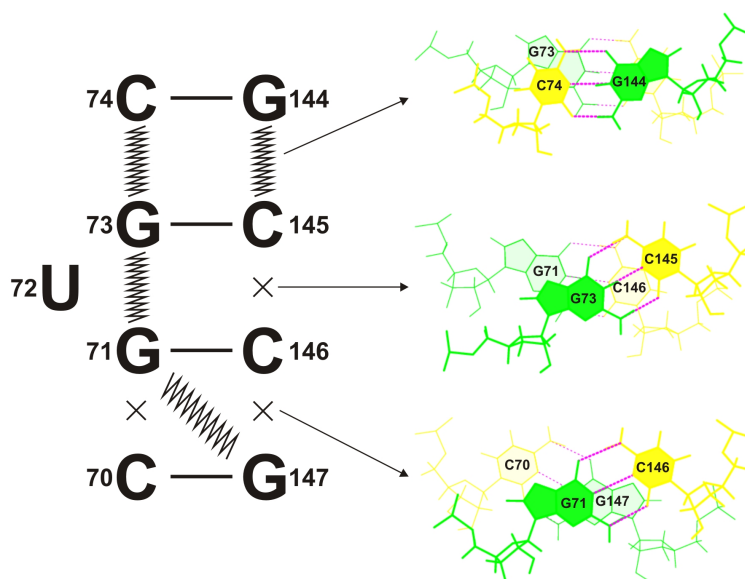
U72				
Kod PDB	sekwencja	struktura drugorzędowa	typ wybrzuszenia	cząsteczka
2K41	CGUGC-GCCG	((.(()))	bulged out	RNA
3BBO	CGUGC-GCCG	((.(()))	bulged out	rybosom
1BIV	GUG-CC	(. ())	bulged in	RNA
1C2W	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
1FFK	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
1I95	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
1J5A	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
1JOX	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
1K73	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
1P5M	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
1P5O	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
1S2F	GUG-CC	(. ())	bulged in	RNA
1S9S	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
1ZBN	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
2A64	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
2L1F	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
2XZM	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
2ZY6	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
3IYR	GUG-CC	(. ())	bulged out	RNA
3IZ7	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
3IZ9	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
3IZE	GUG-CC	(. ())	bulged in	rybosom
3JYV	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
3O58	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
3UZH	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
4A18	GUG-CC	(. ())	bulged out	rybosom
G141				
3J0V	AUUC-GAGGA	((.))	bulged in	rybosom
1J5A	UU-GGA	((.))	bulged out	rybosom
1VT2	UU-GGA	((.))	bulged out	rybosom
3KNO	UU-GGG	((.))	bulged in	rybosom
G163				
1FFK	GG-UGC	((.))	bulged out	rybosom
1J5A	GG-UGC	((.))	bulged out	rybosom
1U9S	GG-UGC	((.))	bulged out	RNA
1VS5	GG-UGC	((.))	bulged out	rybosom
1VS6	GA-UGC	((.))	bulged out	rybosom
1X8W	GG-CGC	((.))	bulged out	RNA
2KPV	AG-CGU	((.))	bulged out	RNA
3DIG	GG-UGC	((.))	bulged out	RNA
3IZ9	AG-CGU	((.))	bulged in	rybosom
3IZ9	GG-CGC	((.))	bulged in	rybosom
3NDB	GG-CGC	((.))	bulged out	RNA
3SUY	GA-UGU	((.))	bulged out	RNA



Rysunek 52. Struktura drugorzędowa spinki G56–C169 oraz przewidywana struktura przestrzenna wybrzuszonych reszt U72, G141 oraz G163 otrzymana za pomocą programu *RNAComposer* [131].

struktury i w funkcji regionu terminalnego 5' mRNA p53. O ważnej roli reszty U72 może świadczyć także to, że jako jedyna spośród jednonukleotydujących wybrzuszeń zachowana jest w sekwencji niemal wszystkich analizowanych organizmów (Rys. 50).

Odnosnie wybrzuszenia G141, w zależności od badanej cząsteczki RNA, reaktywność wykazują też sąsiednie pozycje A140 i G142 (Rys. 23, 27, 32). Sądzę, że można to wytłumaczyć tym, że reszty te tworzą pary typu A-U i G-U, w wyniku czego region ten może wykazywać lokalne rozluźnienie struktury. Przemawiają za tym cięcia przeciwległego odcinka C74–U76 indukowane jonami ołowiu w RNA P1- Δ Np53 oraz w H56-169 (Rys. 23 i 27). W RNA P1-554 region ten nie jest rozpoznawany przez jony ołowiu, jednakże reszty U75 i U76 wykazują reaktywność wobec NMIA. Może to sugerować pewien potencjał do zachodzenia zmian w strukturze drugorzędowej tej części mRNA p53. Mniejszą stabilność termodynamiczną regionu zawierającego wybrzuszoną G141 potwierdza także topnienie temperaturowe, w którym wspomniana reszta, a także sąsiednie pozycje znalazły się w siedmionukleotydującej sekwencji, która wykazuje zwiększoną dostępność do modyfikacji w temperaturze 60 °C (Rys. 45). Z powodu niewielkiej ilości danych trudno stwierdzić, w jakiej konformacji może być reszta G141. Program *RNAComposer* przewiduje, że reszta ta występuje w konformacji *bulged out* (Rys. 52). W bazie danych *FRABASE* istnieje jednak



Rysunek 53. Potencjalny układ oddziaływań warstwowych w sąsiedztwie wybrzuszenia U72. Zygzak – oddziaływania warstwowe, X – brak oddziaływań warstwowych.

struktura przestrzenna rybosomu bakteryjnego, w której niemal w takim samym kontekście sekwencji reszta guanozynowa posiada konformację *bulged in* (Tab. 2) [136]. Na podstawie mapowania struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 bardziej prawdopodobne wydaje się, że reszta G141 znajduje się w konformacji *bulged in*. Tłumaczyć by to mogło cięcia i modyfikacje par zamykających wybrzuszenie (Rys. 23, 27, 32). Skierowana do wnętrza helisy RNA „duża” zasada purynowa może bowiem doprowadzić do lokalnego zaburzenia struktury. Ma to właśnie miejsce w przypadku wybrzuszonej reszty G713 w 16S rRNA, gdzie pomimo zachowania formy A-RNA w tym regionie, helisa ulega poszerzeniu i rozkręceniu [136]. Jeżeli przyjmie się, że reszta G141 w mRNA p53 posiada jednak konformację *bulged out*, to dochodzi do ciekawej sytuacji. W strukturze trzeciorzędowej przewidzianej przez program *RNAComposer* pomimo tego, że wybrzuszone reszty U72 i G141 dzielą 4 pary zasad, to znalazły się one po tej samej stronie helisy RNA i niemal w tej samej płaszczyźnie (Rys. 52). Podobny efekt zaobserwowano w elemencie dimeryzacji wirusa HIV (ang. *human immunodeficiency virus*), DIS (ang. *dimerization initiation site*), gdzie dwie wybrzuszone reszty adenozynowe, które dzieli aż 8 par zasad znajdują się blisko siebie w przestrzeni, a skutek takiego ułożenia następuje zmniejszenie szerokości bruzdy większej [137]. Tego typu aranżacje mogą być istotne dla tworzenia kontaktów trzeciorzędowych oraz wiązania białek lub jonów, które stabilizowałyby strukturę cząsteczki RNA. Możliwe, że region zawierający wybrzuszone reszty U72 i G141 w mRNA p53 uczestniczy w tworzeniu takich oddziaływań, istotnych chociażby dla dostępności leżącego w sąsiedztwie kodonu inicjacyjnego białka p53 do komponentów maszyny translacyjnej.

Niestety dotychczas brak jest struktur przestrzennych cząsteczek RNA, w których wybrzuszone reszty guanozynowe znajdowałyby się w takim samym otoczeniu jak G163. Niemniej większość

wybrzuszonych reszt guanozynowych znalezionych w bazie danych *FRABASE* posiada konformację typu *bulged out*. Oprócz reszty G163 wysoką reaktywnością względem NMIA cechuje się sąsiadująca z nią U164, co może częściowo tłumaczyć jej zaangażowanie w tworzenie słabszej pary typu G-U (Rys. 23 i 32). Dodatkowo, wyniki mapowania struktury wskazują, że podstawa spinki G56–C169 jest stosunkowo mało stabilnym elementem strukturalnym. Wynika to z badań topnienia temperaturowego, gdzie w RNA P1- Δ Np53 m.in. reszta G61 parująca się z U164 wykazuje większą dostępność do modyfikacji w temperaturze 60°C, co sugeruje możliwość lokalnych zaburzeń struktury helikalnej w tym regionie (Rys. 44). Świadczą o tym także cięcia indukowane jonami ołowiu oraz liczne modyfikacje NMIA w tej części spinki G56–C169 w RNA P1-554 (Rys. 32).

Charakterystycznym elementem struktury spinki G56–C169 są dwa wielonukleotydyde wypętlania. Jedno z nich zawiera osiem reszt nukleotydydowych (A91–C98), a drugie siedem (A149–A155) (Rys. 32). Badania nad rolą wielonukleotydydowych wypętleń w strukturze i funkcji RNA dotyczą zwykle motywów składających się z 2–4 reszt nukleotydydowych. Niewiele informacji istnieje na temat tego, jaką rolę mogą pełnić większe wypętlania. Jednym ze skutków ich występowania może być zgięcie helisy RNA [138]. Dlatego, potencjalnymi miejscami zgięć w spince G56–C169 mogą być wypętlania A91–C98 i A149–A155. Jeśli tak jest, to ich obecność może wpływać na odpowiednie ułożenie przestrzenne fragmentów helikalnych tworzących spinkę i tym samym indukować tworzenie oddziaływań trzeciorzędowych lub stanowić regiony istotne dla wiązania ligandów (jonów lub białek). Dobrym przykładem jest zachowawcze, pięcionukleotydyde wypętlanie RNA telomerazy, które prowadzi do zgięcia cząsteczki RNA w tym miejscu aż o 90°C, co ma istotny wpływ na aktywność enzymatyczną [139]. Podobnie, pięcionukleotydyde wypętlanie w domenie II elementu IRES wirusa zapalenia wątroby typu C, HCV (ang. *hepatitis c virus*) oraz wirusa klasycznego pomoru świń, CSFV (ang. *classical swine fever virus*) prowadzi do jej zgięcia, co ma duże znaczenie podczas formowania dojrzałego rybosomu [140]. Z kolei, bogate w reszty pirymidynowe, pięcionukleotydyde wypętlanie w elemencie IRES wirusa polio oraz wirusa coxsackie B3, wymagane jest do oddziaływania z białkiem PCBP2 (ang. *poly-rC binding protein 2*), wpływając istotnie na stymulację translacji [141, 142]. Z analizy porównawczej sekwencji regionu terminalnego 5' mRNA p53 wynika, że region obejmujący reszty A91–C98 jest wysoce zachowawczy u szeregu organizmów (Rys. 51). Sugeruje to, że obecność tego wypętlania może być bardzo istotna dla struktury i/lub funkcji tej części mRNA p53 np. w tworzeniu oddziaływań trzeciorzędowych, interakcji z rybosomem lub niekanonicznymi czynnikami białkowymi podczas inicjacji translacji zależnej od IRES. Zachowawczość sekwencji widać także w trakcie A149–A155, jednakże przynajmniej częściowo może to być spowodowane jego lokalizacją już w części kodującej białko p53 (Rys. 50 i 51).

Istnieją doniesienia, że pomimo potencjalnej swobody konformacyjnej wielonukleotydowych wypętleń, kąt skrętu helisy zwykle nie ulega dużym fluktuacjom [143, 144]. Być może jest tak w przypadku spinki G56–C169, ponieważ zarówno izolowany motyw w postaci RNA H56-169 jak i RNA P1- Δ Np53 nie wykazują heterogenności podczas elektroforezy w warunkach natywnych (Rys. 22 i 26). Można by się spodziewać, że w sytuacji, gdy skręt helisy w miejscu wielonukleotydowych wypętleń byłby zmienny, indukowałoby to zmiany w przestrzennym kształcie cząsteczki RNA. Manifestowałoby się to wówczas występowaniem alternatywnych form strukturalnych, których jednak dla RNA H56-169 i P1- Δ Np53 nie obserwujemy. Domena II elementu IRES wirusa HCV posiadająca zachowawcze, pięcionukleotydowe wypętlenie, przyjmuje taką samą aranżację strukturalną zarówno w formie izolowanej jak i związanej do podjednostki rybosomalnej 40S [145, 146]. Jeżeli struktura przestrzenna spinki G56–C169 jest trwała, to może ona być ważnym ogniwem w oddziaływaniu mRNA p53 z maszyną translacyjną podczas zależnej od kapu lub elementu IRES inicjacji translacji białka p53 oraz izoformy Δ Np53. Konformacja ta mogłaby być utrzymywana dzięki oddziaływaniom wodorowym i warstwowym między resztami wchodzącymi w skład wielonukleotydowych wypętleń. Na podstawie danych doświadczalnych można przypuszczać, że jeśli tego typu oddziaływania mają miejsce, to zachodzą one w obrębie reszt A91–C98, gdyż część znajdujących się tam reszt nie wykazuje reaktywności wobec NMIA (Rys. 23 i 32). Niestety, na podstawie przewidywanej struktury trzeciorzędowej spinki G56–C169 otrzymanej za pomocą programu *RNAComposer* nie można jednoznacznie określić konformacji wielonukleotydowych wypętleń. Powodem tego jest brak struktur przestrzennych zawierających tak duże wypętlenia w podobnym kontekście sekwencyjnym. Z tego względu przewidywania struktury tego fragmentu mRNA p53 prowadzone były bez koordynatów pochodzących z bazy danych PDB.

Struktura drugorzędowa spinki G56–C169 jest bardzo ciekawa również z tego względu, że zlokalizowany jest w niej kodon inicjacyjny dla białka p53, położony częściowo w regionie jednoniciowym. Reszta A136 leży w symetrycznej pętli wewnętrznej, podczas gdy U137 i G138 zaangażowane są w tworzenie regionu helikalnego (Rys. 52). Przy założeniu, że reszty wchodzące w skład pętli wewnętrznej mogą ze sobą tworzyć wiązania wodorowe, dochodziłoby do utworzenia dwóch niestandardowych par A-C i znajdującej się między nimi pary G-C. Pary A-C mogą tworzyć dwa wiązania wodorowe, a ich geometria podobna jest do par typu G-U i tylko w nieznacznym stopniu zaburza formę A-RNA [147]. Reszty nukleotydowe pętli wewnętrznej są jednak rozpoznawane przez sondy strukturalne wrażliwe na regiony jednoniciowe. Dotyczy to reszt C81 i G82 rozpoznawanych odpowiednio przez RNazę A i T1 (Rys. 23 i 32). Ponadto, część reszt jest reaktywna wobec NMIA i DMS (A83, A136) (Rys. 23 i 32). Występują także słabe cięcia indukowane jonami ołowiu. Jeśli w obrębie pętli wewnętrznej zachowane zostają wiązania wodorowe to obecność niestandardowych par w pewnym stopniu może prowadzić do zaburzenia struktury dwuniciowej tej części spinki G56–C169. Warte uwagi jest to, że reszty pętli wewnętrznej wykazują największą dostępność do cięcia i modyfikacji w RNA H56-169 sugerując,

że w szerszym kontekście sekwencji fragment ten może być dodatkowo stabilizowany, być może przez oddziaływanie z innymi elementami struktury regionu terminalnego 5' (Rys. 27).

W literaturze brak jest informacji dotyczących charakterystyki otoczenia strukturalnego kodonów inicjacyjnych w cząsteczkach mRNA. Wynika to w dużej mierze z badania regionów niekodujących 5' głównie w aspekcie funkcjonalnym, a rola struktury RNA dyskutowana jest bardzo często tylko w oparciu o wyniki przewidywań *in silico*. Niemniej dla mRNA kodujących kolagen typu I, interferon γ , transporter kwasu ureidobursztynowego, URE2 (ang. *ureidosuccinate transport protein 2*) oraz białko BRCA1 (ang. *breast cancer 1*) zaobserwowano ulokowanie kodonu inicjacyjnego w dwuniciowym lub częściowo dwuniciowym regionie, choć w znacznie mniej stabilnych motywach strukturalnych niż spinka G56–C169 [148-151]. Pozycja kodonu inicjacyjnego, w strukturze drugorzędowej mRNA może mieć istotne znaczenie w jego dostępności dla komponentów maszynierii translacyjnej i tym samym wpływać na poziom syntezy białka. Dostępność kodonu AUG może być regulowana np. przez ulokowanie go w regionie o niskiej stabilności termodynamicznej. Taka sytuacja może mieć miejsce w mRNA p53, ponieważ topnienie temperaturowe wykazało, że siedmionukleotydowa sekwencja zawierająca trójnukleotyd AUG staje się znacznie bardziej reaktywna w temperaturze 60 °C. Świadczy to o większej dostępności tego regionu do potencjalnych oddziaływań z ligandami, być może wskutek sąsiedztwa pętli wewnętrznej oraz wybrzuszonej reszty G141. W cząsteczkach mRNA, dla których struktura regionu niekodującego 5' została określona doświadczalnie, analiza dotyczyła w większości jedynie izolowanego 5'UTR, przez co badaczom umykało zarówno to, w jakim otoczeniu strukturalnym położony jest kodon inicjacyjny oraz jaką rolę w strukturze regionu terminalnego 5' może pełnić sekwencja kodująca [73, 152-157]. Potwierdzają to moje badania, gdyż izolowany region 5'UTR mRNA p53 ma znacząco różną strukturę niż kiedy występuje w dłuższych fragmentach mRNA (Rys. 29 i 32). Moim zdaniem może to mieć poważne implikacje, ponieważ bardzo często analiza funkcjonalna regionu niekodującego 5' mRNA p53 przeprowadzana była albo na izolowanym regionie albo na sekwencji kodującej pozbawionej tego fragmentu [22, 34, 53, 158]. Z tego powodu wiele obserwacji może wymagać reinterpretacji, co częściowo wynika z otrzymanych przeze mnie rezultatów translacji *in vitro* (Rozdział 3.2).

Bardzo istotnym spostrzeżeniem dotyczącym regionu terminalnego 5' mRNA p53 jest to, że jego struktura drugorzędowa zostaje zachowana w identycznej formie także w pełnej długości mRNA. Według mojej wiedzy jest to pierwsze tego typu doniesienie dotyczące ludzkich cząsteczek mRNA i świadczy o niezależnym od reszty cząsteczki zwijaniu tego regionu. Podobnego spostrzeżenia dokonano jedynie dla mRNA kodującego onkogen BRCA1, gdzie struktura drugorzędowa jednego z wariantów regionu terminalnego 5' miała taką samą aranżację również w dłuższym, obejmującym 11 z 24 egzonów, fragmencie mRNA [150]. Wyniki te sugerują, że regiony terminalne 5' przynajmniej części komórkowych mRNA, podobnie jak u niektórych wirusów

RNA, mogą związać się niezależnie i stanowić odrębne jednostki strukturalne odgrywające ważną rolę w regulacji translacji białek. Na obecność silnie zdefiniowanych elementów strukturalnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53, takich jak spinka G56–C169, może w istotny sposób wpływać zachowawczość sekwencji. Na podstawie przeprowadzonego badania zmienności genetycznej nie wykryto zmian w sekwencji tego regionu genu *p53*, przynajmniej w przeanalizowanych przeze mnie próbkach DNA. Jest to moim zdaniem bardzo istotna informacja, przynajmniej z dwóch powodów. Po pierwsze, jest to jak dotąd jedyna znana mi próba kompleksowej analizy zmienności regionu terminalnego 5' genu *p53*. Po drugie, brak zmian w sekwencji nie tylko 5'UTR, ale też przyległej części kodującej może oznaczać jej istotną rolę w strukturze i funkcji tego regionu. Porównanie sekwencji u innych organizmów wykazało, że w regionie terminalnym 5' znajduje się kilka fragmentów cechujących się wysoką zachowawczością. Największe podobieństwo widać w odcinku sekwencji między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i Δ Np53 (Rys. 51). Wynika to najprawdopodobniej z tego, że region ten leży już w części kodującej, a dodatkowo stanowi jeden z pięciu regionów w białku p53, które wykazują zachowawczość sekwencji aminokwasowej nie tylko u ssaków, ale też u niższych organizmów [5]. W regionie niekodującym 5' kilka fragmentów sekwencji jest zachowane przynajmniej u ssaków. Jest to m.in. region wybrzuszonej reszty U72, a także wielonukleotydowe wypełnienie A91–C98 (Rys. 51). Z kolei, fragment obejmujący reszty G102–A130 cechuje najmniejsze podobieństwo sekwencji (Rys. 51). Jest to ciekawa obserwacja, ponieważ tworzy on apikalną część spinki G56–C169, jedyny wspólny element dla izolowanego regionu niekodującego 5' oraz fragmentów przedłużonych o część kodującą (Rys. 29, 23, 32). Oznacza to, że być może u człowieka oraz innych ssaków naczelnych mogą występować różnice w strukturze i funkcji tego regionu mRNA p53.

Określona przez grupę Dasa struktura regionu terminalnego 5' mRNA p53 (RNA p53+39 IRES) jest częściowo zgodna z otrzymaną przeze mnie dla RNA P1- Δ Np53 [69]. Obydwie cząsteczki związają się podobnie w obrębie reszt G69–C148, które tworzą zasadniczą część spinki G56–C169. Różnica w tym regionie dotyczy lokalizacji pary C90–G127. W RNA p53+39 IRES znajduje się ona po stronie 3' wielonukleotydowego wypełnienia A91–C98, podczas gdy w RNA P1- Δ Np53 po stronie 5' (Rys. 15 i 23). Z kolei reszty, które w RNA P1- Δ Np53 budują podstawę spinki G56–C169, w RNA p53+39 IRES przyjmują odmienną strukturę. Wynikiem tego jest powiększenie wielonukleotydowego wypełnienia A149–A155 z 7 do prawie 20 reszt nukleotydowych oraz zaangażowania reszt C170–G179 w tworzenie regionu dwuniciowego, podczas gdy w RNA P1- Δ Np53 przyjmują one formę jednoniciową (Rys. 15 i 23). Podobieństwo rozkładu cięć i modyfikacji jest zasadniczo zgodne. Jednakże w RNA p53+39 IRES cięcia indukowane rybonukleazą T1 mają miejsce w pozycjach G161, G163, G166 i G168, które w proponowanej przeze mnie strukturze regionu terminalnego 5' leżą w regionie dwuniciowym u podstawy spinki G56–C169 (Rys. 15 i 23). Obserwacja ta jest prawdopodobnie przyczyną różnic w strukturze RNA p53+39 IRES i P1- Δ Np53. Moim zdaniem poziom siły cięcia dla tych reszt w RNA p53+39 IRES był zbliżony do intensywności w reakcji kontrolnej [69]. Stąd uwzględnienie ich jako więzów do przewidywania

struktury mogło, w mojej opinii, wpłynąć na niewłaściwą interpretację wyników.

Biorąc pod uwagę powyższą dyskusję uważam, że region mRNA p53 obejmujący spinkę G56–C169, ze względu na cechy struktury drugorzędowej i potencjalny udział w regulacji translacji białka p53 i Δ Np53 jest na tyle ciekawym obiektem, że zasadne jest podjęcie prób jego krystalizacji, co mam nadzieję przeprowadzić w przyszłości.

3.1.8.2. Struktura spinki U180–A218 oraz pozostałych elementów regionu terminalnego 5' mRNA p53

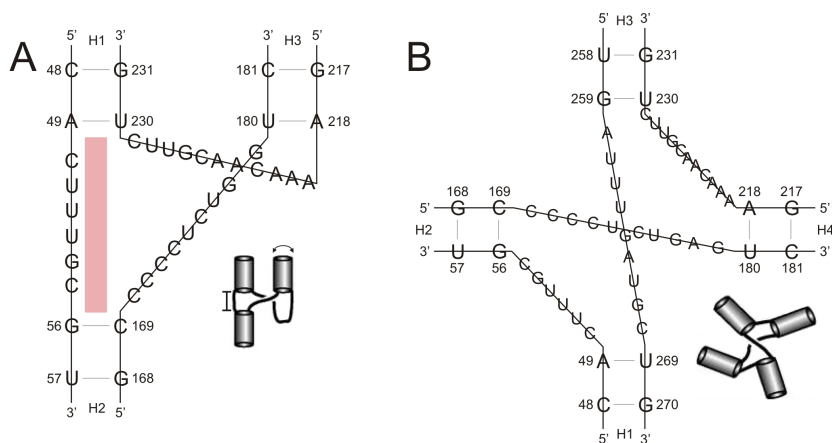
Drugim charakterystycznym motywem strukturalnym regionu terminalnego 5' mRNA p53 jest spinka U180–A218. Jako jedyna utworzona jest wyłącznie z reszt nukleotydowych sekwencji kodującej i cechuje się dość niską stabilnością termodynamiczną ($\Delta G = -11,1$ kcal/mol) (Rys. 32). Dotyczy to zwłaszcza apikalnej części spinki (reszty U190–A207) gdzie trzon zawiera tylko jedną parę G-C. Niską stabilność tego fragmentu potwierdzają cięcia indukowane jonami ołowiu po stronie 5' trzonu w RNA P1- Δ Np53 oraz doświadczenie topnienia temperaturowego, z którego wynika, że w temperaturze 60 °C silną reaktywnością cechuje się odcinek sekwencji po stronie 3' trzonu (G203–A207) (Rys. 23 i 44). Wskazuje to na większą dostępność tego elementu do oddziaływania z potencjalnymi ligandami. Jak dotąd, zidentyfikowano dwa białka, które wiążą się do spinki U180–A218 mRNA p53: Hdm2 i hnRNP C1/C2 [34, 72]. W oddziaływaniu z tymi białkami prawdopodobnie istotne znaczenie ma struktura spinki, ponieważ wprowadzenie mutacji w tym regionie wpływało na zmianę ich powinowactwa oraz na efektywność translacji p53 [34, 72]. Istotną rolę tego motywu sugeruje też silne podobieństwo sekwencji u wielu organizmów, co pozwala sądzić, że może on u nich istnieć w bardzo podobnej formie strukturalnej (Rys. 51).

Chociaż otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, że spinka U180–A218 przyjmuje strukturę niezależnie, to analiza danych literaturowych pozwala mi przypuszczać, że w jej zwijaniu mogą brać udział sąsiednie regiony. W części swoich badań grupa Dasa stosowała cząsteczkę RNA obejmującą tylko reszty pomiędzy kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i izoformy Δ Np53 (RNA p53-1/+39), a więc pozbawioną regionu 5'UTR [69]. Porównując wyniki próbkowania struktury tego RNA za pomocą RNazy T1 i V1 z RNA obejmującym reszty 1–251 można zauważyć zanik cięć w części apikalnej spinki U180–A218 w pozycjach G203 i A206 [69]. Z kolei, w doświadczeniach grupy Fahraeusa mających na celu poznanie oddziaływania białka Hdm2 z mRNA p53 zauważono, że zmiana jednej reszty (A201→G) w regionie U180–A218 ma wpływ na osłabienie powinowactwa tego białka. Ma to miejsce jednak tylko wtedy, gdy region ten znajduje się w szerszym kontekście sekwencyjnym, w porównaniu do izolowanego motywu [34]. Fakt, że obie grupy użyły fragmentów mRNA p53 pozbawionych sekwencji 5'UTR wskazuje na możliwy udział innych regionów w części kodującej mRNA w prawidłowej aranżacji spinki U180–A218. Ponadto, w swoich badaniach obserwuję zmianę rozkładu cięć i modyfikacji spinki U180–A218

oraz przyległych regionów jednoniciowych w RNA p53ORF w stosunku do RNA P1- Δ Np53, P1-554 i p53FL (Rys. 38–41). Chociaż nie potrafię jednoznacznie wyjaśnić, dlaczego różnice w reaktywności tego regionu widzę tylko w jednym fragmencie mRNA p53, to jednak wskazuje to na większy potencjał do rearanżacji struktury spinki U180–A218 aniżeli innych motywów w regionie terminalnym 5' mRNA p53.

Motywy strukturalne typu spinki w regionie terminalnym 5' mRNA p53 połączone są długimi regionami jednoniciowymi (Rys. 32). Obecność fragmentów jednoniciowych łączących trzy i więcej helis prowadzi do powstania tzw. pętli wieloramiennych (ang. *multibranch loops*). Ten typ motywu występuje w wielu cząsteczkach RNA i związany jest z szeregiem różnych funkcji odpowiadając pośrednio za właściwości katalityczne rybozomu hammerhead czy aktywność translacyjną elementu IRES wirusa HCV [159]. Pętli wieloramiennie związane są także często ze stabilizacją globalnej struktury RNA, gdyż między poszczególnymi helisami może dochodzić do oddziaływań współosiowych (ang. *coaxial stacking*) [159]. Ponadto, odpowiadają za właściwą topologię poszczególnych części cząsteczki RNA, co ma istotne znaczenie dla jej struktury przestrzennej. W regionie terminalnym 5' mRNA p53, w zależności od długości wariantu sekwencyjnego, dochodzi do utworzenia pętli wieloramiennej złożonej z trzech (RNA P1- Δ Np53) lub czterech helis (RNA P1-554) (Rys. 23 i 32).

Potencjalne oddziaływania współosiowe między regionami helikalnymi w mRNA p53 mogą mieć istotne znaczenie dla formowania struktury przestrzennej. Program *Junction Explorer*, służący do przewidywania oddziaływań współosiowych w pętlach wieloramiennych zaproponował, że w przypadku RNA P1- Δ Np53 możliwe są one między regionami helikalnymi utworzonymi przez reszty C41–A48 i U230–C236, a spinką G56–C169 (Rys. 54) [159]. W takiej konfiguracji stabilizacji ulegałyby podstawa spinki G56–C169, podczas gdy spinka U180–A218 miałaby swobodę konformacyjną. Potwierdzeniem tego może być zwiększona reaktywność reszt leżących u podstawy spinki G56–C169 w RNA P1- Δ Np53 w temperaturze 60 °C, co może być spowodowane zanikiem oddziaływań współosiowych (Rys. 44). Wynik ten jest bardzo ciekawy, jeśli porównamy go do RNA P1-554. Program *Junction Explorer* w tym wypadku nie przewidział możliwości istnienia tego typu oddziaływań (Rys. 54). Moim zdaniem mogą to popierać dwa spostrzeżenia. Pierwsze z nich dotyczy silnej reaktywności wobec NMIA reszt u podstawy spinki G56–C169 w RNA P1-554 już w temperaturze 37 °C, która może wynikać z braku oddziaływań współosiowych (Rys. 32). Kolejne dotyczy heterogenności RNA P1-554 jaką zaobserwowałem podczas elektroforezy w warunkach niedenaturujących (Rys. 36). Może ona wynikać nie jak sugerowałem wcześniej, z rearanżacji struktury, do których dochodzi w dystalnej części tej cząsteczki, lecz ze swobody konformacyjnej motywów strukturalnych regionu terminalnego 5', niezwiązanych oddziaływaniami współosiowymi.



Rysunek 54. Przewidywanie oddziaływań wspólosiowych w RNA P1- Δ Np53 (A) i RNA P1-554 (B) za pomocą programu *Junction Explorer* [159]. Na rysunku zaznaczono oddziaływania wspólosiowe (różowy) oraz przewidywane ułożenie przestrzenne regionów helikalnych.

Chociaż pętle wieloramienne złożone z 4 helis połączonych długimi regionami jednoniciowymi obserwowano do tej pory głównie w rybosomalnych cząsteczkach RNA to niewykluczone, że w mRNA p53 taki motyw mógłby mieć istotne znaczenie strukturalne i funkcjonalne [159]. Pętle wieloramienne zwiększają bowiem zdolność tworzenia oddziaływań trzeciorzędowych w RNA oraz sprzyjają wiązaniu ligandów [159]. Nie wykluczone, że niejednoznaczność struktury drugorzędowej RNA P1-554 w regionie kodonu AUG izoformy Δ Np53 wynika właśnie z tworzenia kontaktów trzeciorzędowych, istotnych dla struktury przestrzennej. Funkcja postulowanego elementu IRES w mRNA p53 mogłaby się więc opierać w dużej mierze na topologicznej roli pętli wieloramiennej. Dzięki motywom strukturalnym w spince G56–C169 oraz pętli wieloramiennej element IRES mógłby przyjmować orientację przestrzenną, odpowiednią dla oddziaływania z rybosomem podczas niezależnej od kapu inicjacji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53. Uważam, że hipotezę tą warto sprawdzić.

Otoczenie kodonu inicjacyjnego dla białka Δ Np53 jest jedynym fragmentem regionu terminalnego 5' mRNA p53, co do którego struktury można mieć wątpliwości. Pomimo użycia kilku sond chemicznego i enzymatycznego mapowania nie udało mi się jednoznacznie wskazać struktury drugorzędowej tego regionu. W strukturze otrzymanej z użyciem programu *RNAstructure*, do której najlepiej pasują wyniki doświadczalne, sekwencja wokół kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53 przyjmuje postać niewielkiej spinki obejmującej reszty G231–U258 (Rys. 32). Z taką aranżacją najmniej zgodne są wyniki uzyskane z użyciem jonów ołowiu, ponieważ pomimo dużej zawartości reszt pirymidynowych w regionach jednoniciowych dochodzi jedynie do kilku słabych cięć w pętli apikalnej oraz u podstawy spinki (Rys. 32). Reszty budujące pętlę apikalną wykazują jednak reaktywność wobec innych sond, poza C242, która jako jedyna nie jest rozpoznawana przez żadną z nich (Rys. 32). Do cięcia i modyfikacji dostępne są także niektóre reszty tworzące region dwuniciowy spinki, na co z pewnością duży wpływ mają liczne pary typu A-U i G-U.

Koresponduje z tym także niska wartość parametru ΔG dla spinki, która została obliczona jedynie na -5,5 kcal/mol. Na tej podstawie można sądzić, że jest to jeden z najmniej stabilnych elementów struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53. Z drugiej strony, analiza suboptymalnych struktur drugorzędowych wykazała, że motyw ten zachowany jest niemal we wszystkich strukturach, jakie zostały przewidziane w oparciu o wyniki uzyskane za pomocą techniki SHAPE.

W proponowanej strukturze kodon inicjacyjny dla izoformy $\Delta Np53$, podobnie jak dla białka o pełnej długości, leży częściowo w regionie jednoniciowym, tworzącym asymetryczną pętlę wewnętrzną (Rys. 32). W tym wypadku to druga reszta kodonu jest w regionie jednoniciowym, chociaż trzeba zauważyć, że reszty A253 i G255 są rozpoznawane za pomocą modyfikacji DMS i cięcia RNazą T1. Sugeruje to, że sekwencja kodonu AUG może być bardziej dostępna do oddziaływania niż inne rejony spinki G231–U258. W przeciwieństwie do spinki G231–U258, w proponowanej strukturze RNA P1-554, region obejmujący reszty G259–G294 bardzo dobrze koresponduje z uzyskanymi wynikami. Sekwencja ta tworzy dwa długie regiony jednoniciowe, cechujące się wysoką reaktywnością wobec jonów ołowiu i NMIA (Rys. 32). Z kolei, centralna część tej sekwencji oddziałuje z regionem niekodującym 5' tworząc fragment dwuniciowy, na co wskazuje jego bardzo słaba dostępność do modyfikacji chemicznej i cięcia rybonukleazami (Rys. 32). Biorąc pod uwagę występowanie tego dwuniciowego motywu w pełnej długości mRNA p53 oraz niemal w identycznej formie także w RNA P1- $\Delta Np53$ może on przypuszczalnie pełnić istotną rolę w strukturze regionu terminalnego 5'. Oddziaływanie tego typu może prowadzić do izolacji potencjalnego elementu IRES, jako odrębnej domeny strukturalnej od reszty cząsteczki, ułatwiając tym samym wiązanie podjednostki rybosomalnej lub białek zaangażowanych w inicjację i regulację procesu translacji. Aranżację podobnego typu zaobserwowano już u wirusów HCV i HIV, których RNA zawierają element IRES w regionie terminalnym 5' [160].

Niejednoznaczność struktury spinki G231–U258 wobec otrzymanych wyników skierowała moją uwagę na możliwość odmiennej struktury drugorzędowej tego regionu lub też zawiązywania się oddziaływań trzeciorzędowych. Analiza suboptymalnych struktur przewidzianych nie tylko przez program *RNAstructure*, ale też *Mfold* i inne wykazała, że możliwa jest alternatywna aranżacja struktury drugorzędowej wokół kodonu inicjacyjnego dla izoformy $\Delta Np53$. W alternatywnej strukturze nie dochodzi do utworzenia spinki G231–U258, gdyż sekwencja ta oddziałuje z regionem niekodującym 5' (Rys. 32). Powoduje to, że RNA P1-554 do reszty U259 przyjmuje identyczną strukturę jak w RNA P1- $\Delta Np53$. Niestety zaangażowanie reszt G231–U258 w RNA P1- $\Delta Np53$ w wiązanie startera DNA do reakcji odwrotnej transkrypcji uniemożliwiło mi porównanie rozkładu modyfikacji z odpowiadającym regionem w RNA P1-554. Porównując dwie możliwe aranżacje struktury wokół kodonu inicjacyjnego dla izoformy $\Delta Np53$ moim zdaniem bardziej prawdopodobna jest ta, w której tworzy się spinka G231–U258. Jest tak między innymi dlatego, że w alternatywnej strukturze cięcia indukowane za pomocą rybonukleazy A w obrębie

reszt A245–C247 przypadająby w regionie dwuniciowym, utworzonym przez pary typu G-C, co wydaje się mało prawdopodobne zważywszy na to, jakie regiony w strukturze rozpoznaje ten enzym (Rys. 32). Dodatkowo, w RNA P1- $\Delta Np53$, reszty G231–U258 są dość dobrze rozpoznawane przez jony ołowiu, natomiast w RNA P1-554 odcinek ten cechuje się bardzo słabą podatnością na cięcie, co może sugerować, że w obydwu cząsteczkach przyjmuje odmienną strukturę (Rys. 23 i 32). W alternatywnej strukturze mało prawdopodobne wydaje się także utworzenie spinki U261–A288, ponieważ reszty które tworzyłyby jej trzon cechuje bardzo duża reaktywność wobec NMIA oraz jonów ołowiu, a ponadto tworzą ją prawie wyłącznie pary typu AU i GU (Rys. 32). Z kolei, pętla apikalna tej spinki nie wykazuje reaktywności wobec żadnej z zastosowanych sond.

Oddziaływania trzeciorzędowe mogłyby częściowo tłumaczyć niejednoznaczne wyniki mapowania regionu otaczającego kodon inicjacyjny dla białka $\Delta Np53$. Na taką możliwość wskazuje topnienie temperaturowe tego regionu, ponieważ dostępność reszt G231–U258, pomimo niskiej, przewidywanej stabilności termodynamicznej spinki, prawie w ogóle nie uległa zmianie, nawet w temperaturze 60 °C (Rys. 35). Potencjalnym miejscem, które może być uwikłane w oddziaływania trzeciorzędowe są reszty C235, C236 i C237, leżące po przeciwnej stronie kodonu inicjacyjnego białka $\Delta Np53$. Jest to region, który nie jest rozpoznawany przez enzymy i reagenty mapujące regiony jednoniciowe, a jednocześnie bardzo silnie cięty przez rybonukleazę V1 (Rys. 32). Jeśli więc proponowana struktura spinki G231–U258 jest prawdziwa, istnieje możliwość, że między resztami C235–C237 dochodzi do oddziaływań warstwowych lub parują się one z inną sekwencją tworząc np. strukturę pseudowęzła. Analiza *in silico* z wykorzystaniem programu *RNAstructure*, *IPKnot*, *PKnotsRG*, *Kinefold* oraz *HotKnots* nie wskazała jednak na możliwość zawiązywania się tego typu struktury w regionie terminalnym 5' mRNA p53 [161-163]. Jednakże biorąc pod uwagę niemal identyczny rozkład modyfikacji i cięć regionu obejmującego spinkę G231–U258 w RNA P1-554 i p53FL, to potencjalne miejsca oddziaływań trzeciorzędowych powinny leżeć w pierwszych 554 resztach mRNA p53.

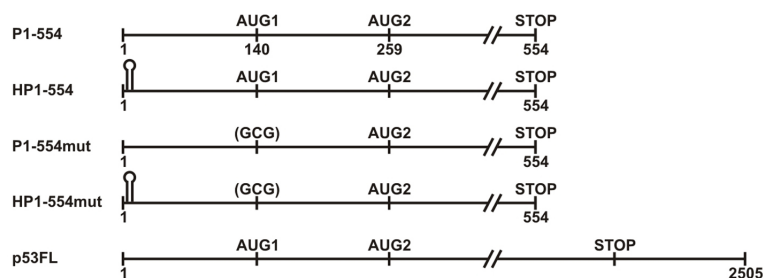
3.2. Rola regionu terminalnego 5' mRNA p53 w inicjacji translacji białka p53 i izoformy $\Delta Np53$

Region terminalny 5' mRNA p53 pełni ważną rolę w procesie inicjacji translacji białka p53 i izoformy $\Delta Np53$. Do tej pory ukazało się przynajmniej kilka publikacji, skupionych wokół próby wyjaśnienia, jakie mechanizmy odpowiadają za syntezę obydwu białek [20-23, 53]. W toku prowadzonych badań odkryto potencjalny element IRES w regionie terminalnym 5' mRNA p53, który umożliwia syntezę obydwu białek w sposób niezależny od kapu [21, 22]. Ponadto, zidentyfikowano szereg białek, które biorą istotny udział w regulacji jego ekspresji na poziomie translacji [68]. Znakomita większość doświadczeń przeprowadzona została jednakże z użyciem fragmentów mRNA p53 pozbawionych regionu niekodującego 5'. Z tego względu posiadane

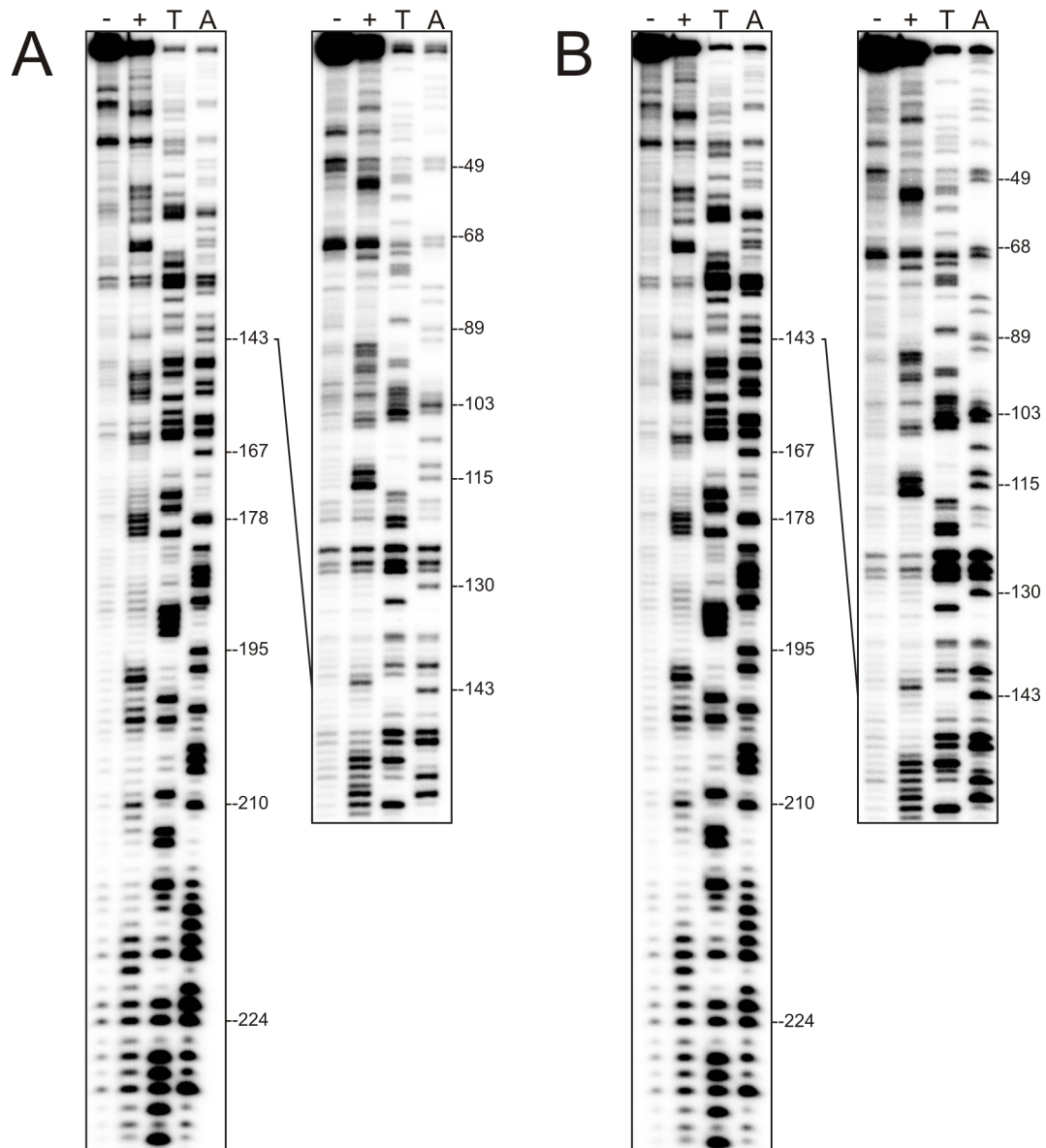
fragmenty mRNA p53 postanowiłem użyć do zbadania jak właściwe otoczenie strukturalne kodonów inicjacyjnych wpłynie na efektywność inicjacji translacji białka p53 i izoformy $\Delta Np53$. W doświadczeniach wykorzystałem modelowy układ do badania translacji *in vitro*, jakim jest lizat z retikulocytów królika. System ten jest stosowany w wielu laboratoriach i pozwala na prostą, szybką i niewymagającą specjalistycznego sprzętu analizę funkcjonalną.

3.2.1. Analiza efektywności translacji *in vitro* modelowych konstruktów mRNA p53

Początkowe doświadczenia wykonywałem z użyciem pełnej długości mRNA p53 (RNA p53FL), aby sprawdzić, na jakim poziomie i w jakim stosunku syntetyzowane jest białko p53 oraz izoforma $\Delta Np53$ z naturalnego transkryptu. Szczegółową analizę przeprowadziłem z użyciem RNA P1-554 oraz szeregu pochodnych tej cząsteczki (Rys. 55). Pierwszą z nich był RNA HP1-554, który na końcu 5' zawierał stabilną termodynamicznie strukturę typu spinki ($\Delta G = -34,9$ kcal/mol). Modyfikacji tej dokonałem, ponieważ występowanie takiej struktury na końcu 5' transkryptu zwykle blokuje lub silnie obniża zależną od kapu inicjację translacji [164]. Powinno to umożliwić zaobserwowanie aktywności translacyjnej potencjalnego elementu IRES. Kolejny wariant (RNA P1-554mut) zawierał mutację kodonu inicjacyjnego dla białka p53 (AUG \rightarrow GCG prowadzącą do zamiany metioniny w glicynę). Tak skonstruowany RNA pozwolił mi na zbadanie tego czy i w jakim stopniu synteza z kodonu inicjacyjnego dla izoformy $\Delta Np53$ jest zależna od kapu. Trzeci wariant, RNA HP1-554mut, zawierał zarówno stabilną spinkę na końcu 5' jak i mutację kodonu inicjacyjnego dla białka p53. RNA P1-554, HP1-554, P1-554mut oraz HP1-554mut posiadały wprowadzony na końcu 3' kodon terminacyjny UAA, kończący syntezę białka. Aby mieć pewność, że stabilna struktura typu spinki w RNA HP1-554 oraz mutacja wprowadzona w RNA P1-554mut nie będą miały wpływu na strukturę drugorzędową badanego regionu mRNA p53, przeprowadziłem analizę SHAPE tych cząsteczek w celu wykrycia potencjalnych zmian w ich strukturze. Z porównania rozkładu modyfikacji RNA HP1-554 i P1-554mut z RNA P1-554 wynika, że nie doszło do zmiany rozkładu modyfikacji, zatem wszelkie różnice w aktywności translacyjnej tych cząsteczek nie będą wynikały z rearanżacji ich struktury drugorzędowej (Rys. 56).

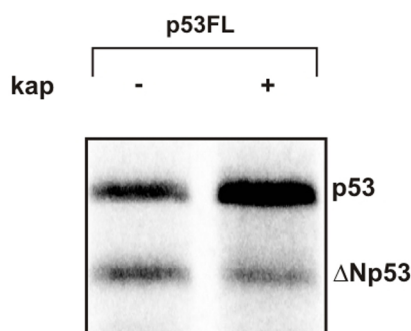


Rysunek 55. Schematyczne przedstawienie cząsteczek RNA użytych w doświadczeniach translacji *in vitro*. Szczegółowy opis w tekście.



Rysunek 56. Analiza struktury drugorzędowej RNA HP1-554 (A) i P1-554mut (B) za pomocą techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja chemiczna NMIA, A i T – reakcje sekwencjonowania. Po prawej stronie wskazano wybrane reszty adenozynowe.

Zarówno białko p53 jak i izoforma $\Delta Np53$ (odpowiednio 393 i 354 reszty aminokwasowe) z pełnej długości mRNA były syntetyzowane w stosunku około 2:1, jeśli transkrypt nie zawierał struktury kapu na końcu 5' (Rys. 57). Jednakże gdy ten sam transkrypt posiadał strukturę kapu, stosunek ilości obydwu białek wzrósł do około 5:1 na korzyść p53 (Rys. 57). Bardzo podobny stosunek odnotowano także w warunkach *in vivo* [25]. Zastosowanie układu translacji *in vitro* dobrze odzwierciedla zatem warunki komórkowe.



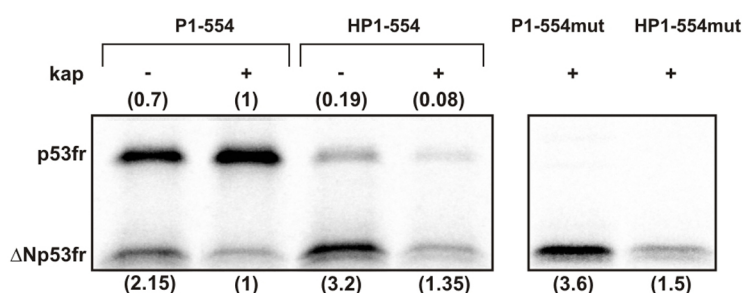
Rysunek 57. Rozdział produktów reakcji translacji *in vitro* RNA p53FL w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Dalsze, szczegółowe badania przeprowadziłem z wykorzystaniem RNA P1-554 oraz wariantów tej cząsteczki. Po przeprowadzeniu translacji *in vitro* produkty reakcji rozdzielane były w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących w obecności SDS. Otrzymane autoradiogramy poddawałem analizie ilościowej z wykorzystaniem programu *MultiGauge* (Fuji Film). Dla uproszczenia, w dalszej części tekstu kodon inicjacyjny dla białka p53 określony został jako AUG1, natomiast dla izoformy $\Delta Np53$ jako AUG2. Produkty białkowe powstające z RNA P1-554 i jego wariantów określone zostały jako p53fr (140 reszt aminokwasowych) oraz $\Delta Np53$ fr (101 reszt aminokwasowych). Wszystkie zmiany w ilości powstających produktów odnosiłem do poziomu translacji RNA P1-554 zawierającego strukturę kapu.

Z cząsteczki RNA P1-554 bez kapu białka p53fr oraz $\Delta Np53$ fr syntetyzowane były w stosunku około 2:1 (Rys. 58). Jednocześnie, zaobserwowałem niższą efektywność translacji z kodonu AUG1 (do poziomu 0,7) i ponad dwukrotny wzrost z kodonu AUG2 (do poziomu 2,15) w porównaniu do cząsteczki zawierającej kap. W przypadku RNA P1-554 posiadającego strukturę kapu wzajemny stosunek obydwu białek wyniósł około 5:1. Wyższy poziom syntezy p53fr z tego transkryptu pozwala sądzić, że w dużej mierze translacja białka p53 jest zależna od kapu. Ponadto wydaje się, że w zastosowanych warunkach *in vitro* RNA P1-554 dobrze oddaje właściwości, jakie posiada pełnej długości mRNA p53.

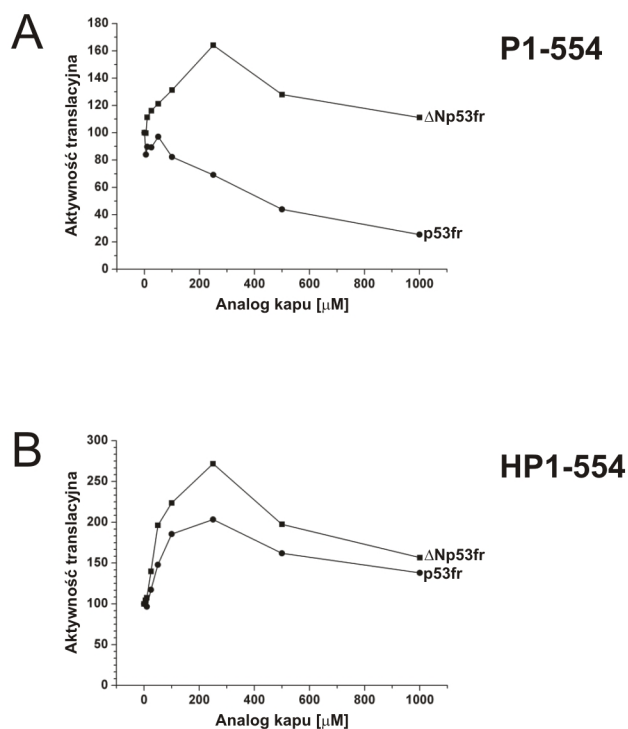
Wprowadzenie stabilnej struktury spinki na końcu 5' RNA P1-554 bardzo silnie obniżyło translację z kodonu AUG1 (do poziomu 0,19 dla cząsteczki niekapowanej i 0,08 dla cząsteczki kapowanej) (Rys. 58). Nieoczekiwanie, efektywność translacji z kodonu AUG2 wzrosła, szczególnie

dla cząsteczki bez kapu (do poziomu 3,2). Natomiast w obecności kapu jego aktywność translacyjna pozostała niemal na takim samym poziomie, jak kapowanego RNA P1-554 (1,35) (Rys. 58). Podobny poziom syntezy z kodonu AUG2 miał miejsce dla cząsteczek posiadających mutację kodonu inicjacyjnego dla białka p53. Odnosnie kapowanego RNA P1-554mut poziom translacji z AUG2 wzrósł ponad trzykrotnie, podczas gdy aktywność translacyjna kapowanego RNA HP1-554mut, zawierającego stabilną spinę na końcu 5', była prawie taka sama jak kapowanego RNA P1-554, posiadającego obydwa kodony inicjacyjne (Rys. 58).



Rysunek 58. Translacja *in vitro* RNA P1-554 oraz wariantów tej cząsteczki. Wartości liczbowe oznaczają stopień stymulacji lub inhibicji translacji p53fr i $\Delta Np53fr$ w stosunku do poziomu syntezy tych białek z kapowanego RNA P1-554.

Aby uzyskać dodatkowe informacje na temat kontroli procesu translacji z kodonów inicjacyjnych mRNA p53 postanowiłem przeprowadzić translację *in vitro* w obecności wolnego analogu kapu, m⁷G(5')ppp(5')G. Analog ten wiąże się do czynnika inicjacyjnego eIF4E, w wyniku czego dochodzi do inhibicji translacji zależnej od kapu, ponieważ w takiej formie nie może on oddziaływać z końcem 5' mRNA [165]. Lizat z retikulocytów królika wstępnie inkubowałem z analogiem o wzrastającym stężeniu (0–1000 μ M), a następnie dodawałem kapowany RNA P1-554 lub HP1-554, inicjując tym samym syntezę białek. W przypadku RNA P1-554 translacja z kodonu AUG1 uległa znaczącej inhibicji (Rys. 59). Chociaż zmiany nie były duże przy niskich stężeniach analogu (do 250 μ M) i nie przekraczały 30% to przy 1000 μ M translacja spadła o około 75% wartości początkowej. Odmienny efekt widać dla kodonu AUG2, gdzie doszło do bardzo silnej stymulacji translacji. Widać to szczególnie wyraźnie przy 250 μ M stężeniu analogu kapu (Rys. 59). Poziom translacji przekroczył wówczas 160% wartości początkowej. Przy wyższych stężeniach analogu dochodzi do obniżenia syntezy z kodonu AUG2, jednak pozostaje ona powyżej wartości początkowej. W obecności analogu kapu translacja RNA HP1-554, posiadającego stabilną strukturę typu spinki na końcu 5', uległa drastycznej stymulacji z obydwu kodonów inicjacyjnych w bardzo podobny sposób (Rys. 59). W zakresie 100–250 μ M stężenia analogu poziom syntezy z AUG1 wyniósł 180–200%, a z AUG2, 220–270% wartości początkowej. Przy wyższych stężeniach analogu translacja z obydwu kodonów wykazuje podobną tendencję do spadku, jednakże zawsze pozostaje powyżej wartości początkowej.



Rysunek 59. Analiza ilościowa translacji RNA P1-554 (A) i HP1-554 (B) w zależności od stężenia analogu kapu.

3.2.2. Dyskusja uzyskanych wyników

W przypadku mRNA p53 postulowano, że niezależna od kapu synteza białka p53 oraz izoformy $\Delta Np53$ jest możliwa dzięki istnieniu elementu IRES w regionie terminalnym 5' [21, 22]. Grupa Zhanga w swoich badaniach wykorzystwała jedynie niepełnej długości region 5'UTR, podczas gdy grupa Dasa użyła 5'UTR oraz wariant przedłużony o 120 reszt sekwencji kodującej (Rys. 12) [21, 22]. Z kolei, grupa Fahraeusa w większości doświadczeń stosowała warianty mRNA p53 pozbawione 5'UTR [53]. W świetle tych informacji ciekawe było, jak otrzymane przeze mnie wyniki badań funkcjonalnych *in vitro*, z użyciem wariantów mRNA p53 posiadających odpowiednią aranżację struktury regionu terminalnego 5', korespondują z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi. Interesujące było również, czy na ich podstawie można zaproponować alternatywny mechanizm syntezy białka p53, a także jego izoformy $\Delta Np53$ i czy jest to rzeczywiście translacja zależna od elementu IRES.

Doświadczenia translacji *in vitro*, które przeprowadziłem miały także na celu porównanie efektywności translacji wariantów mRNA p53, które różniły się między sobą obecnością kapu, stabilnej struktury spinki na końcu 5' oraz mutacją kodonu inicjacyjnego białka p53. Miało to posłużyć do weryfikacji zaproponowanego wcześniej niezależnego od kapu mechanizmu syntezy białka p53 i izoformy $\Delta Np53$.

3.2.2.1. Inicjacja translacji białka p53 jest głównie zależna od obecności kapu

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że translacja białka p53 jest głównie zależna od kapu. Pierwszą i najbardziej znamioną obserwacją, jakiej dokonałem, jest silna stymulacja syntezy z kodonu AUG1, gdy RNA P1-554 posiada na końcu 5' kap (Rys. 58). Już to sugeruje, że większość białka p53 w zastosowanych warunkach powstaje w procesie zależnym od kapu. Kolejnym wynikiem potwierdzającym to przypuszczenie jest to, że stabilna struktura typu spinki na końcu 5' RNA HP1-554 spowodowała prawie całkowite zahamowanie syntezy z kodonu AUG1 (Rys. 58). Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, ponieważ stabilne struktury spinkowe zlokalizowane zaledwie kilka reszt od końca 5' uniemożliwiają tworzenie się kompleksu inicjacyjnego [164, 166]. W takiej sytuacji, pomimo obecności kapu, stabilna struktura drugorzędowa stanowi zawadę przestrzenną dla oddziaływania czynnika eIF4E z końcem 5' mRNA, co w przypadku RNA HP1-554 manifestuje się silnym obniżeniem poziomu syntezy białka z kodonu AUG1. Nawet, jeśli kompleks inicjacyjny tworzy się na końcu 5' kapowanego RNA HP1-554, to stabilna termodynamicznie spinka skutecznie blokuje migrację kompleksu inicjacyjnego wzdłuż regionu niekodującego 5'.

W obecności analogu kapu, dochodzi do bardzo silnego obniżenia translacji z kodonu AUG1 (Rys. 59). Dodanie analogu do mieszaniny reakcyjnej znacznie osłabia zdolność zależnego od kapu tworzenia kompleksu inicjacyjnego, w wyniku sekwestracji czynnika eIF4E. W związku z tym, obserwowana wraz ze wzrostem stężenia analogu inhibicja syntezy białka p53 ponownie sugeruje głównie zależny od kapu mechanizm inicjacji. Translacja z kodonu AUG1 RNA HP1-554, a także RNA P1-554 w obecności analogu kapu jest silnie obniżona, lecz nie zostaje zahamowana całkowicie (Rys. 58 i 59). Można przypuszczać, że pozostała aktywność translacyjna wynika z tego, że pomimo stabilnej struktury spinki w RNA HP1-554, części kompleksów inicjacyjnych udaje się utworzyć i rozpleść spinkę albo jest ona rezultatem wewnętrznej inicjacji translacji. Za drugim wyjaśnieniem mogą przemawiać doświadczenia translacji *in vitro* RNA HP1-554. Otóż, wraz ze wzrostem stężenia analogu początkowo dochodzi do bardzo silnej stymulacji syntezy z kodonu AUG1 (Rys. 59). W wyższych stężeniach analogu translacja spada, lecz cały czas pozostaje powyżej wartości początkowej. Potencjalnie, w tych warunkach, translacja RNA HP1-554 zachodzi dzięki elementowi IRES, który umożliwia wewnętrzną inicjację translacji z kodonu AUG1. Preinkubacja lizatu z analogiem kapu prowadzi do inaktywacji czynnika eIF4E, co z kolei powoduje, że pozostałe składniki kompleksu inicjacyjnego (podjednostka 40S, kanoniczne czynniki inicjacyjne oraz inicjatorowy tRNA^{Met}) istnieją w niezwiązanej formie. Element IRES ma wtedy dostęp do składników niezbędnych do inicjacji syntezy białka p53. Dodatkowo, stymulacja translacji z kodonu AUG1 wraz ze wzrostem stężenia analogu sugeruje, że wewnętrzna inicjacja translacji może być zależna przynajmniej od niektórych kanonicznych czynników inicjacyjnych,

ponieważ w takich warunkach część z nich powinna występować w formie niezwiązanej z kompleksem inicjacyjnym.

Niski poziom translacji z kodonu AUG1 podczas zablokowania zależnej od kapu syntezy jest również zgodny z doniesieniem, że cząsteczki mRNA, które cechuje wysoki poziom inicjacji translacji zależnej od IRES posiadają relatywnie mniej stabilną strukturę drugorzędową w 5'UTR przewidzianą *in silico* [167]. mRNA p53 należałby więc do cząsteczek mRNA, które cechuje niska aktywność translacyjna elementu IRES, wskutek stabilnych elementów struktury drugorzędowej w regionie terminalnym 5'. Moim zdaniem wewnętrzna inicjacja translacji białka p53 w normalnych warunkach jest najprawdopodobniej „maskowana” przez zależny od kapu proces jego syntezy. Z drugiej strony zaobserwowany wzrost efektywności translacji zależnej od elementu IRES, w odpowiedzi na czynniki stresowe lub na określonych etapach cyklu komórkowego, świadczy o ścisłej kontroli jego aktywności np. przez liczne czynniki białkowe oddziałujące z regionem terminalnym 5' mRNA p53. Dokładne poznanie i zrozumienie tego procesu wymaga intensywnych badań.

Kontekst sekwencji kodonu inicjacyjnego jest jednym z kluczowych czynników wpływających na poziom syntezy białka [168]. U ssaków optymalna sekwencja wokół kodonu AUG stanowi ciąg reszt GCC(A/G)CCAUGG określane mianem „sekwencji Kozak”. Krytyczny wpływ na syntezę białka ma występowanie reszty purynowej w pozycji -3, a także reszty guanozynowej w pozycji +4, ponieważ ich zmiana bardzo silnie obniża translację [168]. Na podstawie obecności lub braku odpowiednich reszt nukleotydowych w tych pozycjach miejsca inicjacji określa się jako silne i słabe.

Kodon inicjacyjny dla białka p53 zlokalizowany jest w sekwencji ACUGCCAUGG. Odpowiada ona dobrze kryteriom kontekstu sekwencji Kozak, co powinno objawiać się silną translacją. W komórce poziom p53 jest jednak bardzo niski. Spowodowane jest to głównie zależną od Hdm2 ubikwitynacją i degradacją w degradosomie [5]. Z drugiej strony, niski poziom translacji p53 obserwowany jest również w warunkach *in vitro* w obecności inhibitora proteasomu, MG132, co oznacza udział także innych czynników w negatywnej regulacji translacji tego białka [83, 169]. Ponadto, konstrukty zawierające izolowany region 5'UTR, który poprzedzał gen reporterowy, cechowały się silną stymulacją translacji z kodonu AUG dla białka p53 [22]. Dane te sugerują, że zaangażowanie sekwencji zawierającej ten kodon w tworzenie stabilnej struktury drugorzędowej może przynajmniej w części odpowiadać za niską translację białka p53 *in vivo*. Już klasyczne doświadczenia Marylin Kozak wykazały, że stabilna struktura drugorzędowa może silnie hamować translację [164]. Nieco później zbadano wpływ pozycji struktury typu spinki w stosunku do kapu, jej stabilność termodynamiczną oraz zawartość par G-C, na translację w komórkach oraz *in vitro* [166]. Wynika z nich, że struktura spinkowa o wartości parametru ΔG poniżej -50 kcal/mol nadal umożliwia translację mRNA, jednak tylko wtedy, gdy zawartość par G-C jest na odpowiednio niskim poziomie. Elementem strukturalnym w regionie terminalnym 5' mRNA p53 spełniającym

te kryteria jest spinka G56–C169, która jest relatywnie stabilna termodynamicznie (-52,9 kcal/mol), a zawartość par G-C wynosi 61%. Stąd kombinacja tych dwóch parametrów, a także obserwowana w doświadczeniu topnienia temperaturowego, mniejsza stabilność termodynamiczna otoczenia kodonu inicjacyjnego dla białka p53, mogą powodować, że pomimo jego lokalizacji w stabilnej strukturze drugorzędowej białko to może ulegać translacji, choć na niskim poziomie. Możliwość rozplatania struktury spinki G56–C169 wyraźnie sugerują także wyniki translacji *in vitro* RNA P1-554mut, zawierającego mutację w pozycji kodonu inicjacyjnego dla białka p53. Wzrost efektywności syntezy z kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53 wskazuje, że przynajmniej część kompleksów inicjacyjnych tworzących się na końcu 5' ma zdolność migracji przez strukturę spinki G56–C169 (Rys. 58).

3.2.2.2. Translacja izoformy Δ Np53 wykazuje cechy inicjacji wewnętrznej z użyciem elementu IRES

Otrzymane wyniki wyraźnie świadczą o głównie niezależnym od kapu mechanizmie inicjacji translacji izoformy Δ Np53. Z kapowanego RNA P1-554 nastąpiło obniżenie poziomu translacji z kodonu AUG2, w stosunku do cząsteczki pozbawionej kapu (czyli odwrotnie niż z kodonu AUG1) (Rys. 58). Oczywiście, efekt ten można wytłumaczyć tym, że w przypadku kapowanego RNA P1-554 większość kompleksów inicjacyjnych rozpoczyna syntezę od kodonu AUG1 według mechanizmu zależnego od kapu. Obniżona zostaje więc dostępność czynników translacyjnych i podjednostek rybosomalnych, co manifestuje się niższą translacją z AUG2. Jednakże taką samą tendencję widać dla kapowanego RNA HP1-554, gdzie również dochodzi do obniżenia syntezy z kodonu AUG2 (Rys. 58). W tej sytuacji, stabilna struktura na końcu 5' wyklucza tworzenie kompleksów inicjacyjnych zależnie od kapu i translację według mechanizmu skaningowego. Translacja z kodonu AUG2 kapowanego HP1-554 może więc przebiegać według procesu inicjacji wewnętrznej. Znamienne jest także to, że poziom translacji z kodonu AUG2 jest niemal identyczny z kapowanymi RNA P1-554 i HP1-554 (Rys.58). Prawdopodobnie nie dochodzi więc do sytuacji, w której kompleksy inicjacyjne pomijają kodon AUG1 i rozpoczynają syntezę od kodonu AUG2. Jeśli miałyby to miejsce, powinienem obserwować wzrost translacji z kodonu AUG2 w RNA P1-554 w stosunku do HP1-554. Wyklucza to możliwość skaningu przeciekowego, sugerując jednocześnie mechanizm inicjacji wewnętrznej.

Podobnej interpretacji dostarcza analiza wyników translacji *in vitro* otrzymana z wykorzystaniem wariantów mRNA p53 posiadających zmutowany kodon AUG1. Dla kapowanego RNA P1-554mut poziom translacji z kodonu AUG2 wzrasta w porównaniu do RNA P1-554, posiadającego obydwa kodony inicjacyjne (Rys. 58). Może być to spowodowane tym, że ze względu na brak kodonu AUG1 większość kompleksów inicjacyjnych, jakie tworzą się na końcu 5' zależnie od kapu, dociera do kodonu AUG2. Ponadto oznacza to ponownie, że kompleksy inicjacyjne są przynajmniej w pewnym stopniu zdolne rozplęść struktury drugorzędowe utworzone w regionie terminalnym 5', takie jak spinka G56–C169. Jednakże dla kapowanego RNA HP1-554mut, zawierającego stabilną strukturę spinki na końcu 5', ponownie obserwuję spadek translacji z

AUG2 do poziomu porównywalnego z translacją RNA P1-554 czy HP1-554 w wersji kapowanej (Rys. 58). Na tej podstawie można przypuszczać, że za poziom translacji z kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53 odpowiada w większości mechanizm wewnętrznej inicjacji translacji.

Dodatkowych spostrzeżeń sugerujących wewnętrzną inicjację translacji izoformy Δ Np53 dostarczyły doświadczenia z wykorzystaniem analogu kapu. Zarówno w przypadku RNA P1-554 jak i HP1-554 dochodzi do bardzo silnej stymulacji syntezy z kodonu AUG2 (Rys. 59). Biorąc pod uwagę inaktywację czynnika eIF4E przez analog kapu, a także bardzo podobną stymulację translacji z kodonu AUG2 w RNA P1-554 i HP1-554 można sądzić, że wzrost syntezy spowodowany jest aktywnością potencjalnego elementu IRES, który warunkach inhibicji translacji zależnej od kapu ma dostęp do niezbędnych czynników maszynerii translacyjnej. Otrzymany przeze mnie wynik jest bardzo ciekawy, szczególnie gdy porówna się go z rezultatami grupy Fahraeusa. Stosując analog kapu, odnotowali podobnie jak ja, silne obniżenie syntezy z kodonu inicjacyjnego dla białka p53 [53]. Natomiast w przypadku syntezy z kodonu AUG dla izoformy Δ Np53 efekt był odmienny, ponieważ wraz ze wzrastającym stężeniem analogu nie dochodziło do stymulacji syntezy, lecz do jej obniżania, choć w mniejszym stopniu niż z kodonu dla białka p53 [53]. Moim zdaniem, różnica ta mogła być spowodowana brakiem prawidłowej struktury drugorzędowej w regionie terminalnym 5' mRNA p53, ponieważ stosowali oni fragmenty mRNA p53 pozbawione 5'UTR. Nie dochodziło wówczas do utworzenia istotnych elementów struktury w tym regionie jak spinka G56–C169. Jeśli więc za syntezę izoformy Δ Np53 odpowiada w głównej mierze translacja zależna od IRES, to struktura spinki G56–C169 może być istotną częścią tego elementu.

3.2.2.3. Inne, potencjalne mechanizmy inicjacji translacji izoformy Δ Np53

Inicjacja translacji z alternatywnych kodonów AUG może zachodzić według trzech głównych mechanizmów: reinicjacji, skaningu przeciekowego oraz z wykorzystaniem elementów IRES. Chociaż dane literaturowe oraz wyniki otrzymane przeze mnie sugerują, że izoforma Δ Np53 powstaje głównie wskutek wewnętrznej inicjacji translacji to warto moim zdaniem przedyskutować także inne możliwości [21, 22]. Początkowo sugerowano, że izoforma Δ Np53 może powstawać z wykorzystaniem mechanizmu reinicjacji z mRNA zawierającego intron 2 (mRNA p53I2) [20]. Mechanizm reinicjacji dotyczy tych cząsteczek mRNA, które mają małe otwarte ramki odczytu leżące powyżej głównego kodonu inicjacyjnego, uORF. W mRNA p53 zawierającym intron 2, uORF mógłby być odcinek sekwencji od kodonu inicjacyjnego dla białka p53 do kodonu terminacyjnego w intronie 2 (Rys. 10). Dotychczas nie potwierdzono jednak tego, czy kodon AUG dla białka p53 w mRNA p53I2 jest aktywny translacyjnie. Nie podjęto bowiem próby identyfikacji krótkiego peptydu potencjalnie powstającego z tego kodonu. Dopiero badania przeprowadzone w naszym laboratorium przez mgr inż. Agnieszkę Górską dowiodły, że w warunkach *in vitro* z transkryptu zawierającego intron 2 może zachodzić translacja z kodonu inicjacyjnego dla białka p53, co uprawdopodobnia obecność uORF i mechanizm reinicjacji (Górska et al., publikacja w

przygotowaniu). Nie wiadomo jednak, czy mRNA p53I2 jest funkcjonalny w komórce, tym bardziej że izoforma $\Delta Np53$ powstaje też z mRNA p53 niezawierającego intronu 2 (Rys. 57 i 58). Z drugiej strony, występowanie mRNA p53I2 tylko w niektórych komórkach może świadczyć o tym, że jeśli cząsteczka ta jest funkcjonalna, to może brać udział w odrębnym mechanizmie regulacji poziomu izoformy $\Delta Np53$.

Drugi mechanizm, który potencjalnie mógłby odpowiadać za inicjację translacji izoformy $\Delta Np53$ to tzw. skaninyg przeciekowy. Dochodzi do niego w sytuacji, gdy pierwszy kodon inicjacyjny w cząsteczce mRNA znajduje się w nieoptymalnym kontekście sekwencji Kozak. Wówczas, w zależności od siły kontekstu pierwszego kodonu AUG, większa lub mniejsza część kompleksów inicjacyjnych pomija go i rozpoczyna syntezę od kolejnego napotkanego kodonu inicjacyjnego [3]. W mRNA p53 kontekst kodonu AUG dla białka o pełnej długości zawiera jednak optymalne nukleotydy w obydwu krytycznych pozycjach (-3R oraz +4G). Biorąc pod uwagę tylko siłę kontekstu sekwencji Kozak wydaje się mało prawdopodobne, aby ten typ inicjacji odpowiadał za syntezę izoformy $\Delta Np53$. Co więcej, obserwowano już, że struktury drugorzędowe typu spinki poniżej kodonu inicjacyjnego mogą wzmacniać rozpoznanie trypletu AUG, z powodu spowolnienia migracji kompleksu inicjacyjnego i tym samym wydłużenia czasu oddziaływania kodon-antykodeon [170]. W mRNA p53 kodon AUG dla pełnej długości białka zlokalizowany jest w termodynamicznie stabilnej spinie G56-C169. Z tego powodu spowolnienie migracji małej podjednostki rybosomalnej w tym miejscu powinno doprowadzić do jeszcze częstszego rozpoznania AUG p53, zmniejszając tym samym prawdopodobieństwo dalszej migracji kompleksu inicjacyjnego. Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia translacji *in vitro* również świadczą przeciw mechanizmowi skaninygu przeciekowego. W przypadku translacji kapowanego RNA P1-554 dochodzi do bardziej efektywnej syntezy z kodonu AUG1 w porównaniu do cząsteczki pozbawionej kapu co sugeruje, że większość rybosomów formujących się w otoczeniu tego kodonu powstaje drogą zależną od kapu i mechanizmu skanowania mRNA (Rys. 58). Można by się więc spodziewać, że jeśli izoforma $\Delta Np53$ powstaje jednak wskutek skaninygu przeciekowego, to efektywność translacji z kodonu AUG2 powinna również wzrastać. Obserwowany efekt jest jednak odwrotny i synteza z AUG2 spada, co ponownie świadczy o innym sposobie inicjacji. Przemawiają za tym także wyniki grupy Fahraeus. Wprowadzili oni mutacje osłabiające siłę kontekstu kodonu inicjacyjnego białka p53. Wraz z jego osłabianiem zauważyli, zgodnie z oczekiwaniem, obniżoną translację białka p53 z jednoczesnym wzrostem poziomu izoformy $\Delta Np53$ [53]. Oznacza to, że kompleksy inicjacyjne mają zdolność pomijania kodonu inicjacyjnego dla białka p53, jednakże dopiero wtedy, gdy kontekst sekwencji Kozak jest nieoptymalny.

Chociaż dokładne poznanie mechanizmu syntezy izoformy $\Delta Np53$ wymaga jeszcze wielu badań, to biorąc pod uwagę powyższą dyskusję można przypuszczać, że powstaje ona na zasadzie

wewnętrznej inicjacji translacji, dzięki elementowi IRES zlokalizowanemu w regionie terminalnym 5' mRNA p53.

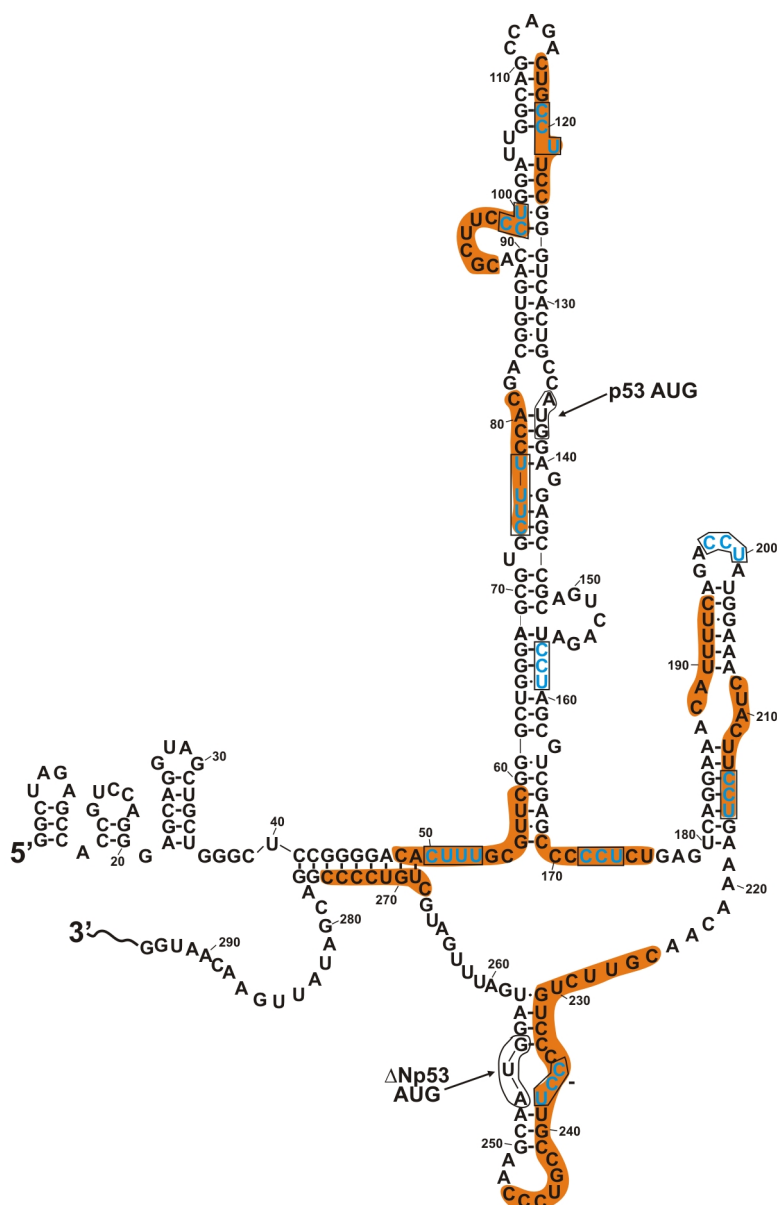
3.3. Oddziaływanie białka wiążącego się z traktami polipirymidynowymi (PTB1) z regionem terminalnym 5' mRNA p53

3.3.1. Potencjalne miejsca wiązania białka PTB1 w regionie terminalnym 5' mRNA p53

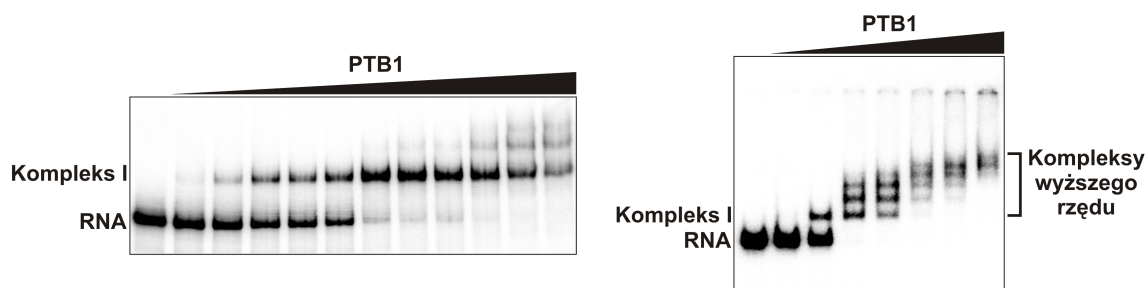
Do tej pory podjęto kilka prób określenia sekwencji najwyższej zgodności dla wiązania białka PTB1 do cząsteczek RNA, jednakże nie została ona wyznaczona dokładnie. W przypadku wirusowych RNA zaobserwowano większe powinowactwo białka PTB1 do traktów polipirymidynowych zawierających sekwencje CUUU [171]. Z kolei, w komórkowych mRNA ważną rolę odgrywają powtórzenia CCU będące częścią dłuższej sekwencji bogatej w reszty pirymidynowe [172]. Swoje badania rozpocząłem od sprawdzenia, czy powyższe motywy sekwencyjne znajdują się w analizowanym przeze mnie regionie mRNA p53. W sekwencji regionu terminalnego 5' występuje dziewięć regionów bogatych w reszty pirymidynowe, z czego dwa przekraczają długość dziesięciu reszt: C48–C59 i C225–C247 (Rys. 60). Najdłuższy jest region obejmujący reszty C225–C247, w którym są zaledwie trzy reszty purynowe. W regionie terminalnym 5' mRNA p53 są dwa fragmenty CUUU (obydwa wchodzą w skład dłuższych regionów polipirymidynowych) oraz siedem powtórzeń CCU, z czego pięć zawartych jest w dłuższych, bogatych w reszty pirymidynowe odcinkach (w tym C225–C247) (Rys. 60). Regiony te mogą być potencjalnymi miejscami wiązania białka PTB1.

3.3.2. Mapowanie struktury RNA P1- Δ Np53 w kompleksie z białkiem PTB1

Analizę oddziaływania białka PTB1 z mRNA p53 rozpocząłem od scharakteryzowania kompleksów, jakie tworzy z RNA P1- Δ Np53, najkrótszym fragmentem zawierającym dwa charakterystyczne motywy typu spinki, zidentyfikowane przeze mnie w badaniach struktury drugorzędowej (Rys. 23). Analizę prowadziłem z wykorzystaniem techniki opóźnionej migracji kompleksów w żelu poliakryloamidowym, EMSA (ang. *electrophoretic mobility shift assay*). Początkowo, wykonałem szereg doświadczeń mających na celu dobranie optymalnych warunków tworzenia kompleksów rybonukleoproteinowych oraz rozdziłu elektroforetycznego. Najlepsze rezultaty uzyskałem po inkubacji RNA P1- Δ Np53 z białkiem PTB1 w zakresie temperaturowym 25-37°C przez 15–20 minut, a następnie elektroforezę w 5% żelu poliakryloamidowym o usiecianiu 40:1 w temperaturze 4°C. Jako bufor elektroforetyczny stosowałem 0,5 x TB. Dla stężenia białka zapewniającego całkowite związanie RNA P1- Δ Np53 obserwowałem pojedynczy kompleks rybonukleoproteinowy (kompleks I) (Rys. 61). Przy wyższych stężeniach białka dochodziło do



Rysunek 60. Sekwencje bogate w reszty pirymidynowe w regionie terminalnym 5' mRNA p53. Na strukturze drugorzędowej RNA P1-554 kolorem pomarańczowym zaznaczono sekwencje polipirymidynowe. Powtórzenia CUUU i CCU ujęto w ramki i zaznaczono kolorem niebieskim.

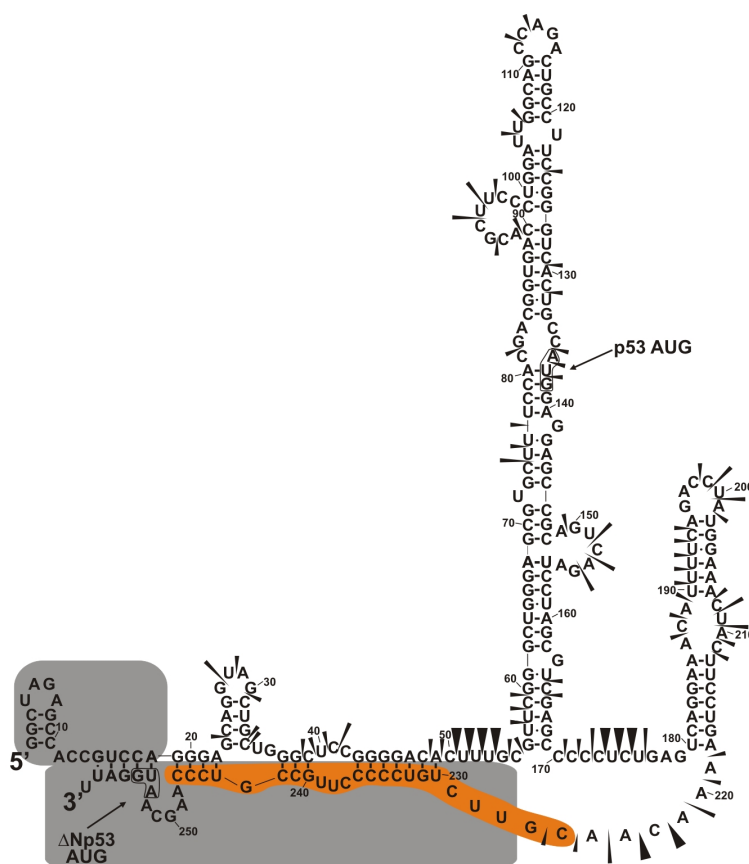


Rysunek 61. Analiza tworzenia kompleksów rybonukleoproteinowych między białkiem PTB1 a znakowanym radioizotopowo na końcu 5' RNA P1- Δ Np53 w zakresie stężenia białka 100–2000 nM.

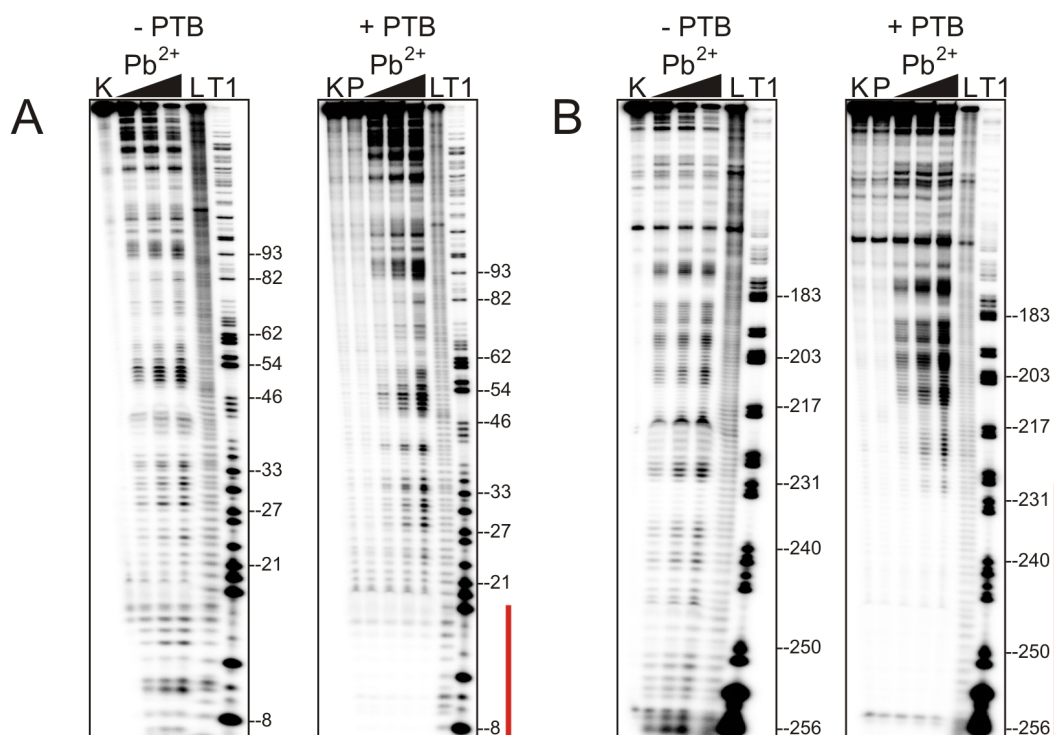
tworzenia kompleksów wyższego rzędu. Dodatkowe doświadczenie, w którym zastosowałem szersze spektrum stężenia PTB1 potwierdziło to spostrzeżenie, co oznacza najprawdopodobniej wiązanie

więcej niż jednej kopii PTB1 do RNA P1- Δ Np53 (Rys. 61). Tym samym świadczy to o obecności kilku miejsc wiązania lub oddziaływaniu PTB1-PTB1 w wyższych stężeniach białka i jego oligomeryzacji.

Mapowanie miejsc kontaktu białka PTB1 z RNA P1- Δ Np53 planowałem przeprowadzić za pomocą techniki SHAPE, modyfikacji siarczanem dimetylu oraz cięć indukowanych jonami ołowiu. Użycie NMIA oraz DMS prowadziło jednak do rozpadu kompleksów już na wstępnym etapie modyfikacji, co obserwowałem analizując przebieg reakcji w żelu poliakryloamidowym. Jedynie w przypadku jonów ołowiu kompleks nie ulegał dysocjacji. Nastąpił całkowity zanik lub silne osłabienie cięć w regionie oddziaływania części 5' i 3' w RNA P1- Δ Np53 (Rys. 62 i 63). Dotyczy to regionu G1-C17 oraz U227-U259, w którego obszarze znajduje się najdłuższy region polipirymidynowy, zawierający dodatkowo sekwencję CCU. Region ten jest prawdopodobnie głównym miejscem wiązania PTB1 do RNA P1- Δ Np53. Ponadto, zaobserwowałem wzrost reaktywności reszt U40 i C41, które leżą w obszarze obustronnego wypętlenia, po przeciwnej stronie reszt U227-U259 (Rys. 63). Porównując rozkład i intensywność cięć wolnego RNA z RNA pozostającym w kompleksie nie zanotowałem zmian w innych regionach struktury RNA P1- Δ Np53.



Rysunek 62. Wpływ wiązania białka PTB1 na strukturę drugorzędową RNA P1- Δ Np53. Kolorem szarym zaznaczono regiony chronione przed cięciem jonami ołowiu. Kolorem pomarańczowym wskazano region polipirymidynowy C225-C247.

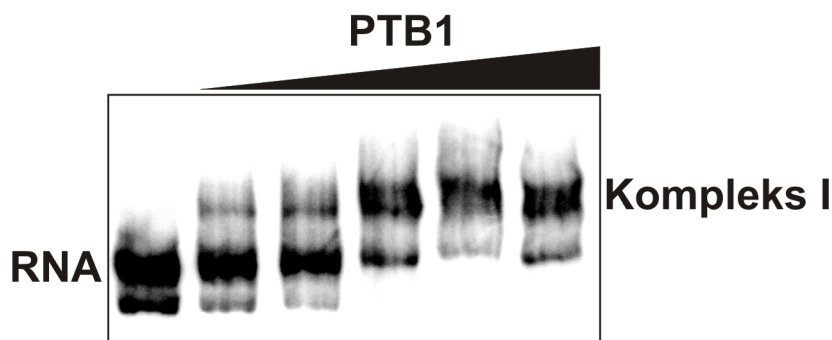


Rysunek 63. Mapowanie struktury RNA P1- Δ Np53 w kompleksie z białkiem PTB1 za pomocą jonów ołowiu. Rozdział materiału znakowanego radioizotopowo z końca 5' (A) i 3' (B). K – reakcja kontrolna, P – reakcja kontrolna w obecności białka PTB1, L – hydrolizat formamidowy, T1 – ograniczona hydroliza rybonukleazą T1. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. Kolorem czerwonym zaznaczono regiony różniące się dostępnością do cięcia w obecności białka PTB1.

3.3.3. Badanie struktury drugorzędowej RNA P1-554 w kompleksie z białkiem PTB1

Sekwencja, z którą w RNA P1- Δ Np53 oddziałuje PTB1 (reszty U227–U259) przyjmuje prawdopodobnie inną aranżację struktury w RNA P1-554 (Rys. 23 i 32). Z tego powodu zdecydowałem, aby dalsze doświadczenia mapowania struktury przeprowadzić na kompleksach białka PTB1 z RNA P1-554. Wstępna analiza warunków tworzenia kompleksów oraz ich rozdzielności elektroforetycznej w żelu natywnym wykazała, że jedyną zmianą jaką musiałem wprowadzić, w stosunku do RNA P1- Δ Np53, było mniejsze (75:1) usieciowanie żelu poliakryloamidowego, zważywszy na większą masę cząsteczkową kompleksów PTB1 z RNA P1-554 (około 250 kDa). Podobnie jak w przypadku RNA P1- Δ Np53, dla stężenia białka zapewniającego całkowite związanie RNA obserwuję pojedynczy, trwały w zastosowanych warunkach kompleks I (Rys. 64). Przy wyższych stężeniach PTB1 również dochodzi do tworzenia kompleksów wyższego rzędu, lecz ich duża masa cząsteczkowa uniemożliwiła uzyskanie zadowalającego rozdzielności elektroforetycznej nawet w 5% żelu poliakryloamidowym o usieciowaniu 80:1.

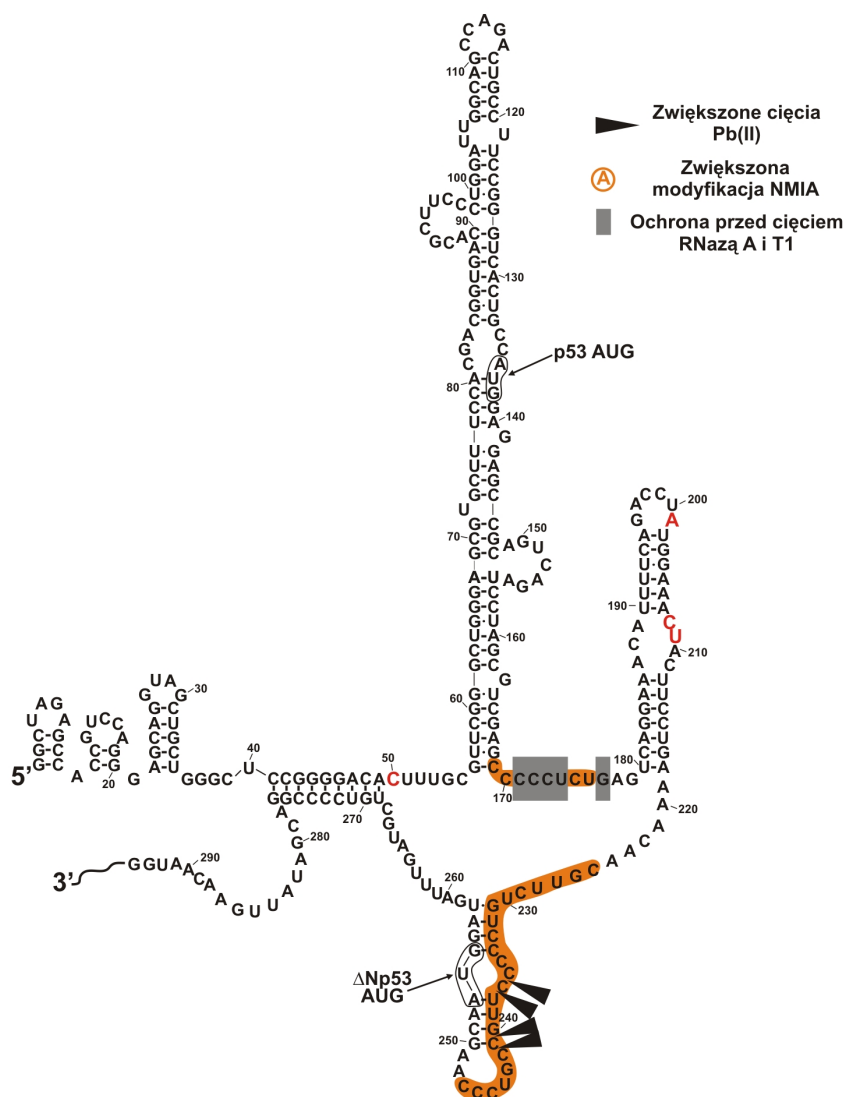
Mapowanie struktury RNA P1-554 w kompleksie z białkiem PTB1 rozpocząłem od sprawdzenia, czy podobnie jak dla RNA P1- Δ Np53, modyfikacja za pomocą NMIA i DMS doprowadzi do rozpadu kompleksów. Okazało się, że w obecności NMIA kompleks jest zachowany, jednakże



Rysunek 64. Analiza migracji kompleksów białka PTB1 z RNA P1-554 w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych. Zakres stężenia białka PTB1 wynosił 100–1000 nM.

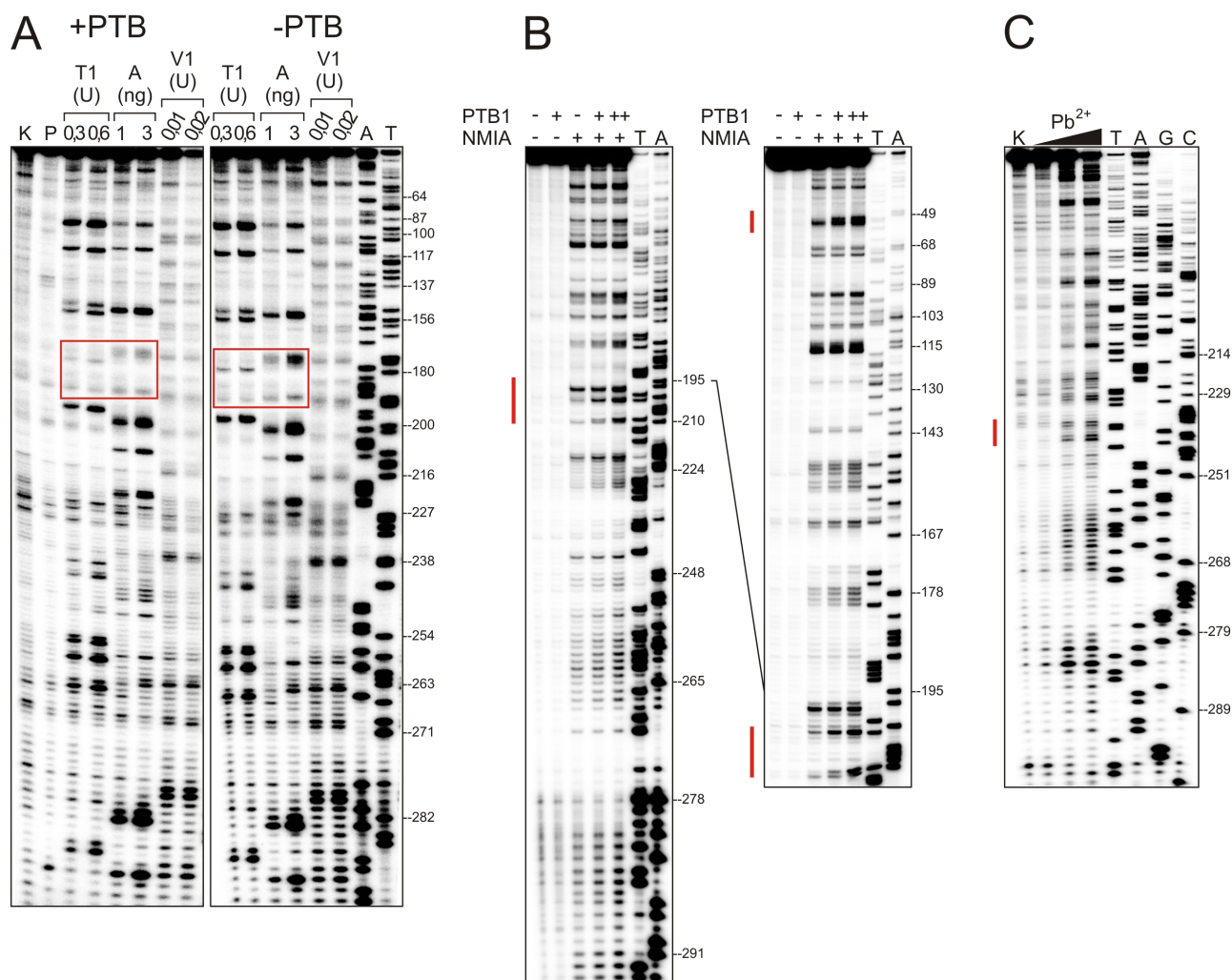
DMS powodował wytrącanie RNA lub kompleksów PTB1 z RNA w kieszonce żelu podczas elektroforezy, co eliminowało ten reagent. W obecności jonów ołowiu, tak jak w przypadku RNA P1- Δ Np53, kompleksy pozostawały stabilne.

Wyniki analizy struktury RNA P1-554 w kompleksie z PTB1, przy stężeniu białka zapewniającym powstanie kompleksu I przedstawiono na rysunku 65 i 66. Użycie jonów ołowiu oraz techniki SHAPE pozwoliło mi na wskazanie miejsc w RNA, w których dochodzi prawdopodobnie do lokalnych zmian struktury drugorzędowej, wskutek wiązania białka. Stosując jony ołowiu zaobserwowałem odmienny wynik niż dla RNA P1- Δ Np53. Mianowicie, nie doszło do osłabienia lub zaniku cięć, lecz wzrostu ich intensywności po resztach C236, C237, G240 i C241 (Rys. 65). Znajdują się one w strukturze spinki C231–U258 i jednocześnie w najdłuższym trakcie polipirymidynowym C225–C247, który był silnie chroniony przed cięciem w RNA P1- Δ Np53 w kompleksie z PTB1. Interesujące jest, że reszty C236, C237 leżą w obustronnym wypętleniu, naprzeciwko kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53 (Rys. 65). W pozostałych regionach badanego RNA, nie doszło do zmian w rozkładzie i intensywności cięć, podobnie jak w RNA P1- Δ Np53. Stosując technikę SHAPE odnotowałem zmiany w dostępności do modyfikacji reszt w innych regionach RNA P1-554. Dotyczy to wzrostu reaktywności reszty C50, wchodzącej w skład jednoniciowego odcinka polipirymidynowego C50–C55, a także leżących w apikalnej części spinki U180–A218 reszt A201, C208 i U209 (Rys. 65). Reszta A201 leży poniżej powtórzenia CCU, podczas gdy reszty C208 i U209 wchodzi w skład dłuższego regionu bogatego w reszty pirymidynowe C208–U216. Technikę SHAPE wykorzystałem także do modyfikacji RNA P1-554 przy stężeniu PTB1 prowadzącym do utworzenia kompleksów wyższego rzędu, lecz nie zaobserwowałem dodatkowych zmian w reaktywności reszt nukleotydowych (Rys. 66).



Rysunek 65. Struktura drugorzędowa RNA P1-554 w kompleksie z białkiem PTB1. Na rysunku zaznaczono regiony, w których wskutek wiązania białka doszło do wzrostu lub spadku reaktywności reszt. Kolorem pomarańczowym zaznaczono sekwencje bogate w reszty pirymidynowe C169–U176 i C225–C247.

Wyniki otrzymane z użyciem jonów ołowiu i techniki SHAPE wskazują miejsca w RNA P1-554, w których wskutek wiązania białka PTB1 dochodzi raczej do lokalnych rearanżacji. Na ich podstawie nie można wskazać regionu uwikłanego w bezpośrednie oddziaływanie z białkiem. Dlatego też zdecydowałem się na użycie rybonukleazy T1, V1 i A. Enzymy nukleolityczne są znacznie większe niż standardowe reagenty chemiczne, toteż powinny być bardziej wrażliwe na zawadę przestrzenną, jaką jest białko związane do RNA. Stosując rybonukleazę T1 i V1 nie odnotowałem jednak różnic w rozkładzie i intensywności cięć w analizowanym RNA za wyjątkiem reszty G177, która była słabiej rozpoznawana przez rybonukleazę T1 w obecności białka (Rys. 66). Użycie rybonukleazy A pozwoliło zaobserwować osłabienie cięć jednoniciowego regionu polipirymidynowego C171–U174 (Rys. 66). Można sądzić, że jest to miejsce w RNA P1-554, z którym oddziałuje białko PTB1.



Rysunek 66. Analiza struktury drugorzędowej RNA P1-554 w kompleksie z białkiem PTB1. A – mapowanie struktury za pomocą rybonukleazy A, T1 i V1. K – reakcja kontrolna, P – reakcja kontrolna w obecności białka. B – mapowanie struktury za pomocą techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna (+) – modyfikacja NMIA, A, T – reakcje sekwencjonowania. Na czerwono zaznaczono regiony wykazujące różnicę w reaktywności po związaniu białka. C – mapowanie struktury za pomocą jonów ołowiu. K – reakcja kontrolna, T, A, G, C – reakcje sekwencjonowania. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM.

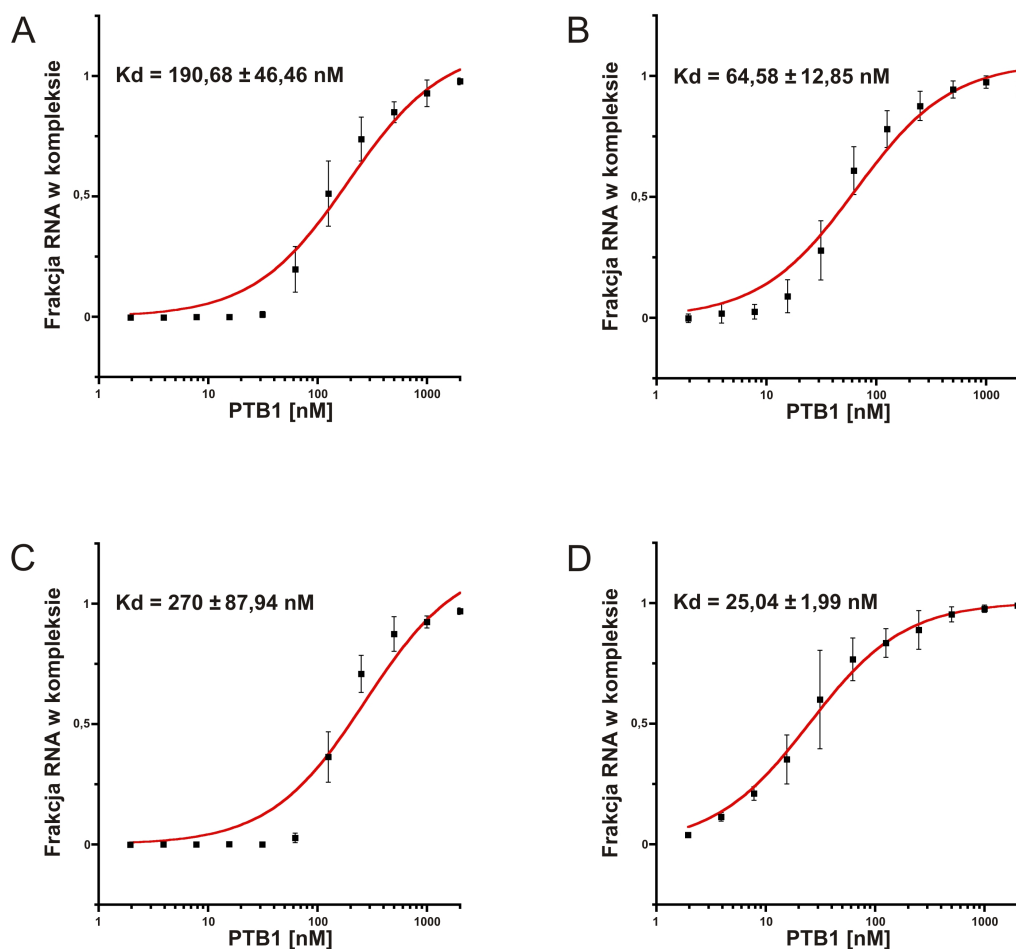
3.3.4. Analiza tworzenia kompleksów między białkiem PTB1 a fragmentami mRNA p53 za pomocą techniki *filter binding assay*

Analiza struktury RNA P1-ΔNp53 i P1-554 w kompleksie z białkiem PTB1 może sugerować, że białko to w nieco odmienny sposób wiąże się do obydwu cząsteczek RNA. Było więc interesujące, czy odmienny wpływ białka na strukturę RNA będzie korespondował z powinowactwem PTB1 do tych fragmentów mRNA p53. W celu określenia stałej dysocjacji tworzenia się kompleksów, K_d (ang. *dissociation constant*) zastosowałem technikę zatrzymywania kompleksów rybonukleoproteinowych na filtrach nitrocelulozowych (ang. *filter binding assay*). Wybrałem układ doświadczalny, w którym używa się dwóch membran. Pierwsza z nich zatrzymuje kompleksy białko–RNA, natomiast druga RNA niezwiązany. Umożliwia to dokładne określenie frakcji związanej przez białko RNA, a co za tym idzie wyznaczenie stałej dysocjacji [173]. Dodatkową

zaletą tej techniki jest możliwość użycia systemu płytek wielodołkowych i pipety wielokanałowej, co pozwala na jednoczesne badanie tworzenia kompleksów w różnych układach doświadczalnych i zminimalizowanie błędów pipetowania. Należy zaznaczyć, że za pomocą tej techniki można określić stałą dysocjacji tylko dla pierwszego powstającego kompleksu rybonukleoproteinowego. Analiza ilościowa tworzenia kompleksów wyższego rzędu jest niemożliwa.

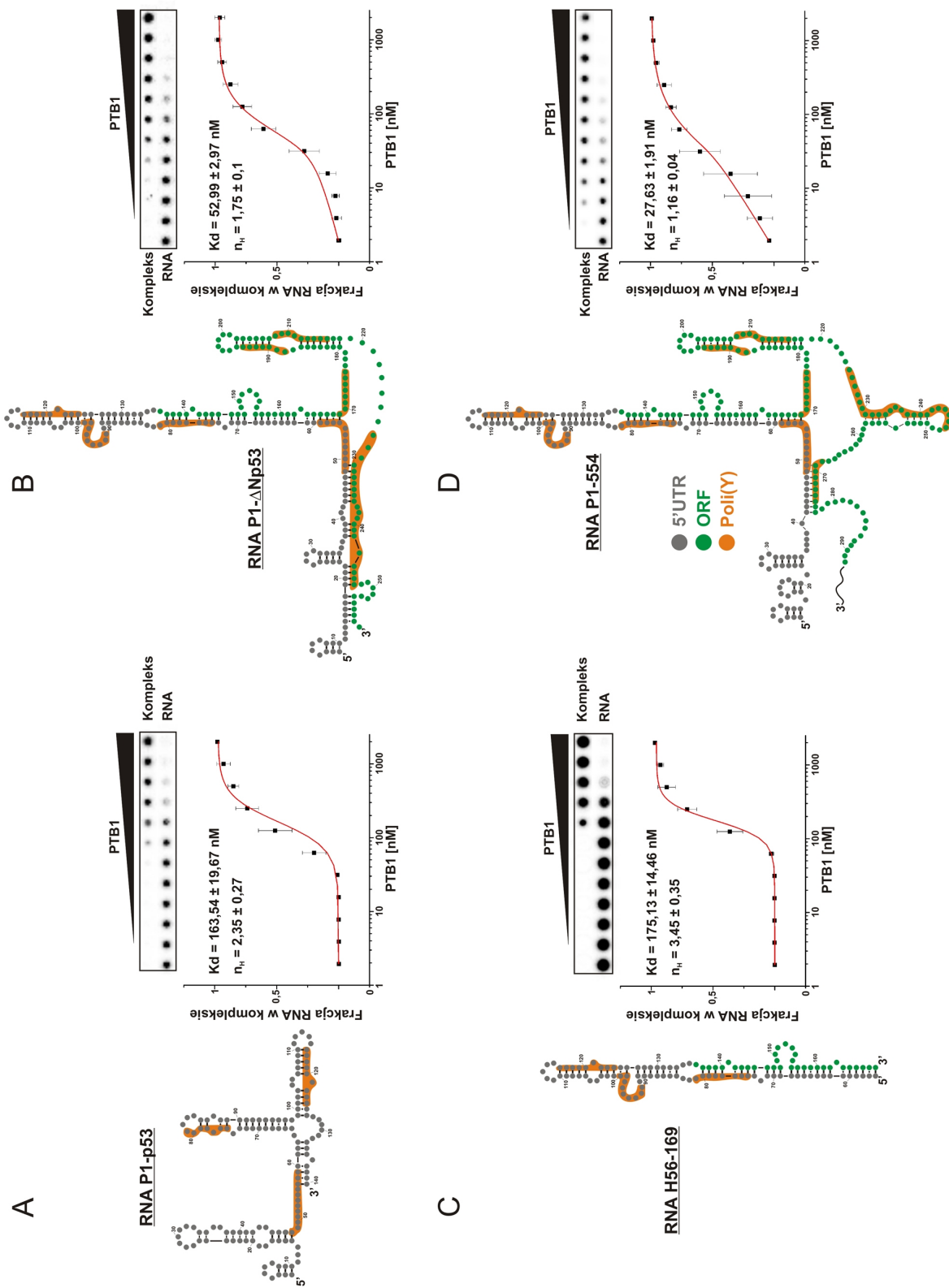
W analizie tworzenia kompleksów z białkiem PTB1 wykorzystałem fragmenty regionu terminalnego 5' mRNA p53, których strukturę drugorzędową określiłem już wcześniej. Były to RNA P1- Δ Np53, P1-554, P1-p53 oraz H56-169 (Rys. 21). Cząsteczki RNA poddawano renaturacji przez ogrzanie do temperatury 65 °C i powolne schłodzenie do temperatury pokojowej. Tworzenie kompleksów inicjowane było poprzez dodanie białka do określonego końcowego stężenia i inkubację na lodzie przez 15 minut, po czym próbki nanoszono na membranę i filtrowano. Następnie, membrany suszono i przeprowadzano autoradiografię z użyciem ekranów odwzorowujących. Na podstawie analizy ilościowej wykazano, że w każdym przypadku frakcja związanego RNA przy najwyższym stężeniu białka była zawsze powyżej 95%. W kolejnym etapie przeprowadzano analizę ilościową w celu wyznaczenia stałej dysocjacji.

Z analizy wyników zaprezentowanych na rysunku 67 wynika, że białko PTB1 wykazuje zróżnicowane powinowactwo do badanych cząsteczek RNA. Początkowo, stałą dysocjacji kompleksów RNA-PTB1 wyznaczyłem z równania Michaelis-Menten, jednak krzywe otrzymane w ten sposób dla RNA P1- Δ Np53, P1-p53 oraz H56-169 nie pokrywały się dobrze z punktami doświadczalnymi (Rys. 67). Rezultatem tego był dość duży błąd dopasowania do krzywej, zwłaszcza dla RNA H56-169 i P1-p53 (odpowiednio, 46,46 i 87,94 nM). Dla RNA P1-554, dzięki dobremu dopasowaniu krzywej do punktów doświadczalnych, błąd jest znacznie mniejszy i wynosi zaledwie 1,99 nM. Powodem tak dużego błędu w przypadku RNA H56-169 i P1-p53 może być to, że model Michaelis-Menten opisuje proste układy, gdzie np. jedna cząsteczka białka wiąże jedną cząsteczkę substratu. Z użyciem techniki EMSA wykazałem jednak, że fragmenty mRNA p53 mogą wiązać prawdopodobnie więcej niż jedną kopię PTB1, co manifestuje się powstaniem kompleksów wyższego rzędu (Rys. 61). Taka sytuacja komplikuje układ doświadczalny i wymaga zastosowania innej metody obliczeniowej. Dodatkowo, kompleksy wyższego rzędu mogą sugerować, że wiązanie PTB1 jest kooperatywne, gdzie związanie jednej kopii białka stymuluje wiązanie kolejnych. Z tego powodu stałą dysocjacji postanowiłem wyznaczyć za pomocą równania Hilla, które jednocześnie pozwala określić w sposób ilościowy kooperatywność procesu (współczynnik Hilla „ n_H ”). Jeżeli $n_H > 1$ oznacza to, że wiązanie jest pozytywnie kooperatywne, czyli wiązanie jednej kopii białka stymuluje wiązanie kolejnych. Jeśli natomiast $n_H = 1$, to wówczas wiązanie nie jest kooperatywne. Wartość $n_H < 1$ oznacza, że wiązanie jest negatywnie kooperatywne, czyli wiązanie jednej kopii białka osłabia wiązanie kolejnych.



Rysunek 67. Wykres tworzenia kompleksów między białkiem PTB1 a RNA P1-p53(A), P1- Δ Np53 (B), H56-169 (C) i P1-554 (D). Podane wartości K_d obliczono na podstawie równania Michaelis-Menten.

Analizując wykresy otrzymane z użyciem równania Hilla można zauważyć bardzo dobre dopasowanie krzywej do punktów doświadczalnych dla wszystkich badanych fragmentów (Rys. 68). Dla RNA P1-p53, P1- Δ Np53 oraz H56-169 obliczona na podstawie równania Hilla stała dysocjacji jest niższa z jednocześnie znacznie mniejszym błędem. Jedynie dla RNA P1-554 obliczona wartość K_d jest nieznacznie wyższa od wyznaczonej za pomocą równania Michaelis-Menten ($27,63 \pm 1,91$ nM w porównaniu do $25,04 \pm 1,99$ nM). Analiza wyników potwierdziła moje przypuszczenie, że wiązanie PTB1 do badanych fragmentów mRNA p53 jest kooperatywne. Dla wszystkich cząsteczek RNA współczynnik Hilla przyjmował wartość $n_H > 1$. Najwyższa wartość współczynnika n_H została wyznaczona dla kompleksów PTB1 z RNA H56-169 ($3,45 \pm 0,35$) oraz RNA P1-p53 ($2,35 \pm 0,27$). Ciekawe, że dla tych obydwu cząsteczek RNA wyznaczona wartość K_d jest na bardzo zbliżonym poziomie i wynosi $175,13 \pm 14,46$ nM dla RNA H56-169 oraz $163,54 \pm 19,67$ nM dla RNA P1-p53. W przypadku tych cząsteczek oraz RNA P1- Δ Np53 kooperatywność wiązania potwierdza również kształt krzywych w skali logarytmicznej, który przyjmuje charakterystyczny dla tego typu wiązania kształt litery „S” (Rys. 68). Dla RNA P1-554 kształt ten jest również zachowany, jednak nie tak wyraźny jak dla pozostałych cząsteczek RNA.

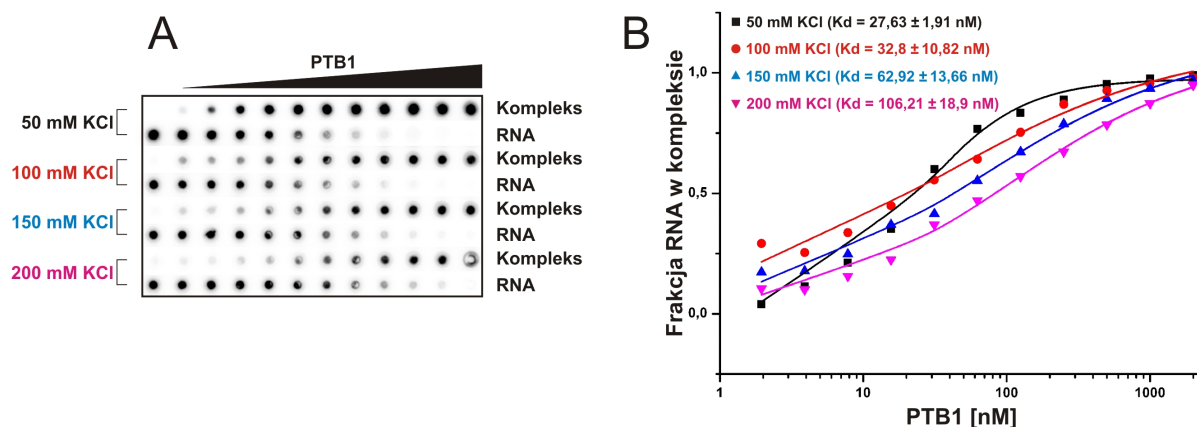


Rysunek 68. Wykresy tworzenia kompleksów między białkiem PTB1 a RNA P1-p53 (A), P1- Δ Np53 (B), H56-169 (C) i P1-554 (D). Podano wartości statycznych dysocjacji i współczynnika Hilla. Po prawej stronie wykresów przedstawiono schematycznie strukturę drugorzędową badanych cząsteczek RNA.

Obliczone za pomocą równania Hilla stałe dysocjacji dla kompleksów PTB1 z RNA P1- Δ Np53 oraz P1-554 są znacznie niższe niż dla RNA P1-p53 i H56-169 i wynoszą odpowiednio $52,99 \pm 2,97$ nM oraz $27,63 \pm 1,91$ nM. Wartość współczynnika Hilla, choć znacznie niższa niż dla RNA P1-p53 i H56-169, wynosi $1,75 \pm 0,1$ dla RNA P1- Δ Np53 oraz $1,16 \pm 0,04$ dla RNA P1-554.

Po wyznaczeniu stałych dysocjacji postanowiłem określić specyficzność oddziaływania PTB1 z regionem terminalnym 5' mRNA p53. W tym celu przeprowadziłem szereg doświadczeń, w których analizowałem wpływ różnych zmiennych na tworzenie kompleksów: stężenia soli jednowartościowej, temperatury oraz obecności nośnikowego tRNA lub surowiczej albuminy wołowej w reakcji. Wykorzystałem do tego celu analizę tworzenia kompleksów między PTB1 a RNA P1-554, ponieważ cząsteczka ta posiada takie samo otoczenie strukturalne regionu terminalnego 5' jak w pełnej długości mRNA p53. Ponadto, najniższa wartość Kd świadczy o silnym powinowactwie PTB1. Niekiedy stosowałem też krótsze fragmenty mRNA p53.

W pierwszym doświadczeniu zbadałem wpływ stężenia chlorku potasu na tworzenie kompleksów PTB1 z RNA P1-554. Okazało się, że stężenie soli jednowartościowej ma istotny wpływ na wartość wyznaczonej stałej dysocjacji. Wraz ze wzrostem stężenia KCl obserwowałem bowiem 4-krotny spadek wartości Kd (Rys. 69).

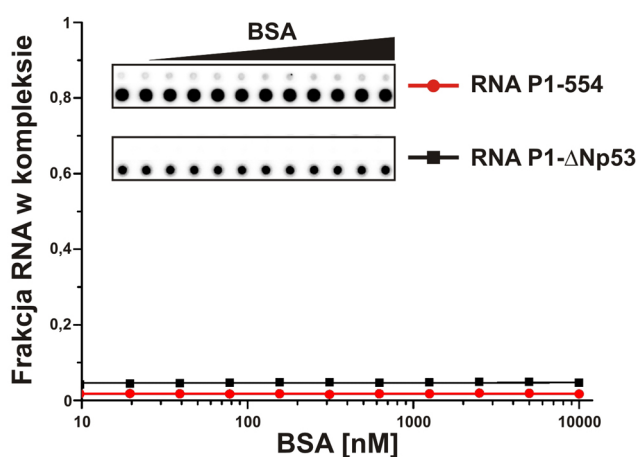


Rysunek 69. Wpływ stężenia KCl na wartość Kd kompleksów białka PTB1 z RNA P1-554. (A) – autoradiogramy prezentujące wynik analizy filter binding assay. (B) Wykresy krzywych tworzenia kompleksów. Podane wartości stałych dysocjacji obliczono na podstawie równania Hilla.

Następnie sprawdziłem, czy RNA P1-554 oddziałuje specyficznie z białkiem PTB1. W tym celu wykonałem analizę tworzenia kompleksów z surowiczą albuminą wołową, BSA (ang. *bovine serum albumin*). Tworzenie się kompleksów BSA-RNA świadczy, że cząsteczka RNA może wykazywać niespecyficzne powinowactwo również do badanego białka. Z kolei, aby sprawdzić, czy oddziaływanie jest specyficzne od strony białka przeprowadziłem analizę tworzenia kompleksów w

obecności 100-krotnego nadmiaru nośnikowego tRNA. Wzrost stałej dysocjacji w takim przypadku sugerowałby niespecyficzne wiązanie PTB1 do cząsteczek tRNA.

W obecności BSA nie dochodzi do utworzenia kompleksów z RNA P1-554 nawet przy 10 μ M stężeniu białka (Rys. 70). Podobnie, dodanie 100-krotnego nadmiaru tRNA nie ma większego wpływu na wyznaczoną wartość Kd kompleksów (Tab. 3). Obydwa doświadczenia potwierdziły zatem, że oddziaływanie między fragmentami mRNA p53 a białkiem PTB1 jest specyficzne.



Rysunek 70. Analiza tworzenia kompleksów RNA P1- Δ Np53 i RNA P1-554 z surowiczą albuminą wołową za pomocą techniki filter binding assay.

Tabela 3. Wartości Kd obliczone dla kompleksów białka PTB1 z badanymi fragmentami mRNA p53 w zależności od obecności nośnikowego tRNA.

	P1- Δ Np53 Kd	P1-554 Kd	P1-p53 Kd	H56-16 Kd
- tRNA	52,99 nM	27,63 nM	163,5 nM	175,13 nM
+ tRNA	61,89 nM	30,16 nM	157,18 nM	207,53 nM

Bardzo ważnymi czynnikami podczas oddziaływania białko–RNA są temperatura i czas inkubacji, często wpływające w zasadniczy sposób na efektywność tworzenia kompleksów. Ma to bardzo istotne znaczenie, zwłaszcza przy niskich stężeniach białka, gdzie tworzenie kompleksów wymaga zazwyczaj więcej czasu. W celu sprawdzenia, czy wybrana początkowo temperatura 4 °C oraz 15 minutowy czas inkubacji są optymalne, przeprowadziłem analizę tworzenia kompleksów PTB1 ze wszystkimi badanymi cząsteczkami RNA w temperaturze 25 °C oraz dodatkowo wydłużonym do 30 minut czasem inkubacji. Wyższa temperatura i dłuższy czas inkubacji negatywnie wpływają na tworzenie kompleksów. W temperaturze 25 °C, w zależności od cząsteczki RNA, następuje wzrost wartości Kd o około 50%, świadczący o spadku powinowactwa białka do RNA (Tab. 4). Niespodziewanie, wartość Kd w temperaturze 25 °C dla RNA P1-p53 pozostała na identycznym poziomie jak w 4 °C.

Tabela 4. Wartości K_d obliczone dla kompleksów białka PTB1 z badanymi fragmentami mRNA p53 w zależności od temperatury i czasu inkubacji.

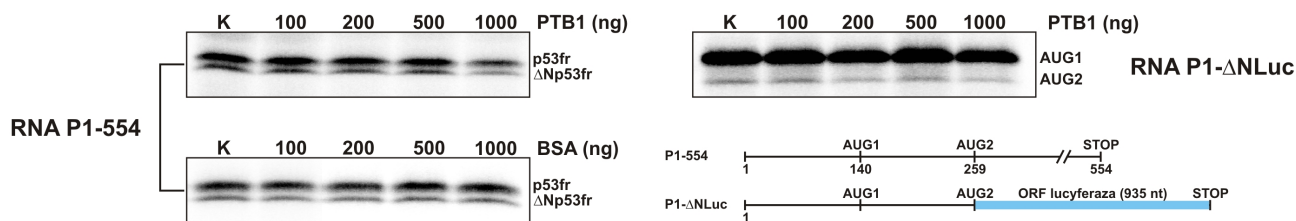
	P1- Δ Np53 K_d	P1-554 K_d	P1-p53 K_d	H56-169 K_d
4 °C, 30 min	52,99 nM	27,63 nM	163,5 nM	175,13 nM
25 °C, 30 min	76,25 nM	48,16 nM	163,12 nM	265,75 nM

3.3.5. Wpływ obecności białka PTB1 na translację białka p53 i izoformy Δ Np53 *in vitro*

Z przeprowadzonych dotychczas przeze mnie badań wynika, że zróżnicowane powinowactwo białka PTB1 do RNA P1- Δ Np53 i RNA P1-554 może wynikać z odmiennej struktury tych cząsteczek w regionie obejmującym kodon inicjacyjny dla izoformy Δ Np53. Postanowiłem sprawdzić, czy odnotuję również różnice we wpływie PTB1 na syntezę białka p53 i izoformy Δ Np53. Przeprowadziłem translację *in vitro* dwóch cząsteczek RNA w obecności białka PTB1. Pierwszą z nich był RNA P1-554 posiadający strukturę kapu na końcu 5'. Drugą cząsteczką był RNA P1- Δ Np53Luc, składający się z regionu terminalnego 5' mRNA p53 (odpowiadającego RNA P1- Δ Np53) wprowadzonego przed gen reporterowy lucyferazy z *Renilla reniformis* (Rys. 71). Cząsteczka ta została otrzymana w naszym laboratorium przez mgr inż. Agnieszkę Górską, która wykazała, że dwa charakterystyczne motywy strukturalne typu spinki w regionie terminalnym 5' (G56–C169 i U180–A218) zostały zachowane, pomimo sekwencji lucyferazy (Górska et al., publikacja w przygotowaniu). Użycie RNA P1- Δ Np53Luc pozwoliło mi zbadać potencjalną rolę otoczenia strukturalnego kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53 na funkcję białka PTB1 w inicjacji translacji.

Rysunek 71 ilustruje wpływ białka PTB1 na translację białka p53fr i Δ Np53fr, syntetyzowanych z kapowanego RNA P1-554 w lizacie z retikulocytów królika. Wzrastająca ilość białka w lizacie prowadzi do obniżonej translacji, zarówno p53fr jak i Δ Np53fr. Przy mniejszych ilościach PTB1 (100–500 ng) efekt inhibicji nie przekracza 25% w stosunku do reakcji kontrolnej. Jednakże w obecności 1000 ng białka PTB1 poziom syntezy p53fr i Δ Np53fr spada niemal o połowę (Rys. 71). W analogicznym doświadczeniu, w celu wykluczenia niespecyficznego efektu spowodowanego wprowadzeniem egzogenego białka do lizatu, zamiast PTB1 użyłem białka BSA, które nie oddziałuje z mRNA p53. Można zauważyć, że wzrastająca ilość BSA w reakcji nie ma większego wpływu na translację p53fr i Δ Np53fr (Rys. 71). Potwierdza to, że efekt inhibicji translacji p53fr i Δ Np53fr obserwowany po dodaniu PTB1, jest specyficzny.

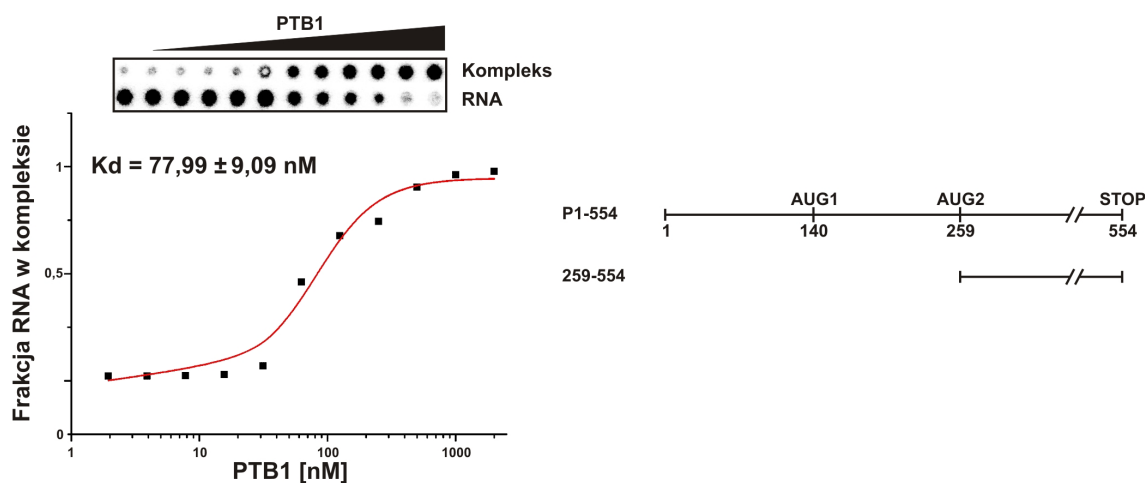
Zbadałem także wpływ PTB1 na translację z kodonów inicjacyjnych białka p53 i izoformy Δ Np53 przeprowadzając translację *in vitro* RNA P1- Δ Np53Luc. Wzrost ilości białka PTB1 podczas reakcji translacji *in vitro* kapowanego RNA P1- Δ Np53Luc prowadził do inhibicji syntezy zarówno z kodonu inicjacyjnego dla białka p53, jak i izoformy Δ Np53. Inhibicja była jednak



Rysunek 71. Translacja *in vitro* RNA P1-554 i P1-ΔNp53Luc w obecności białka PTB1 lub BSA. K – reakcja kontrolna. Na rysunku zaprezentowano schematycznie RNA P1-ΔNp53Luc.

mniejsza niż w przypadku RNA P1-554 (Rys. 71). Dodatkowo, poziom inhibicji translacji z obydwu kodonów inicjacyjnych był nierównocenny i dla białka powstającego z AUG p53 wynosił poniżej 20%, podczas gdy dla białka syntetyzowanego z AUG ΔNp53 ponad 30%.

Słabsza inhibicja translacji RNA P1-ΔNp53Luc w stosunku do RNA P1-554 może wynikać z tego, że sekwencja dystalnej części RNA P1-554 także bierze udział w oddziaływaniu z białkiem PTB1. W celu sprawdzenia tej możliwości skonstruowałem RNA 259-554, który zawiera sekwencję mRNA p53 poniżej kodonu inicjacyjnego dla białka ΔNp53, a zatem pozbawiony jest sekwencji polipirymidynowej C225–C247 (Rys. 72). Analizę oddziaływania między RNA 259-554 a białkiem PTB1 przeprowadziłem za pomocą techniki filter binding assay, w analogicznych warunkach jak dla innych badanych fragmentów mRNA p53. Ku mojemu zaskoczeniu okazało się, że PTB1 ma zdolność oddziaływania również z dalszą częścią sekwencji kodującej mRNA p53. Obliczona stała dysocjacji miała wartość $77,99 \text{ nM} \pm 9,09 \text{ nM}$ (Rys. 72). Oznacza to, że w RNA 259-554 znajduje się przynajmniej jedno miejsce wiązania białka PTB1, choć najprawdopodobniej o mniejszym powinowactwie niż to w regionie terminalnym 5' mRNA p53.



Rysunek 72. Analiza tworzenia kompleksów białka PTB1 z RNA 259-554. Na rysunku widnieje również schemat RNA 259-554. Podana wartość stałej dysocjacji obliczono na podstawie równania Hilla.

3.3.6. Dyskusja uzyskanych wyników

Rola regionów niekodujących w kontroli ekspresji genów na poziomie translacji związana jest często z ich oddziaływaniem z różnego rodzaju ligandami [174]. Ma to miejsce także w przypadku mRNA p53, ponieważ dotychczas zidentyfikowano już przynajmniej kilka białek oddziałujących z regionem niekodującym 5' oraz przyległą częścią kodującą. Postuluje się, że w istotny sposób wpływają one na regulację translacji białka p53 i izoformy Δ Np53. Jednym z takich białek jest PTB1, które bierze udział w regulacji translacji wielu wirusowych i komórkowych mRNA posiadających element typu IRES w regionie niekodującym 5' [74]. Z danych literaturowych wynika, że PTB1 wykazuje zróżnicowane powinowactwo do izolowanego regionu 5'UTR mRNA p53 oraz 5'UTR przedłużonego o 120 reszt nukleotydowych sekwencji kodującej, które w moich badaniach odpowiadają RNA P1-p53 i P1- Δ Np53 (Rys. 21) [69]. Nie określono jednak, czy różnice te są konsekwencją obecności kilku miejsc wiązania PTB1 (w części niekodującej i/lub kodującej) czy też zróżnicowanego powinowactwa białka do posiadających, jak wykazałem, różną strukturę drugorzędową RNA P1-p53 i P1- Δ Np53. Nie zidentyfikowano także miejsc wiązania PTB1 oraz nie określono stałej dysocjacji kompleksów PTB1 z mRNA p53. Nieznany jest także potencjalny wpływ wiązania PTB1 na strukturę regionu terminalnego 5' mRNA p53. Z powyższych względów postanowiłem zbadać dokładnie proces tworzenia kompleksów rybonukleoproteinowych między białkiem PTB1 a fragmentami mRNA p53. Dane literaturowe sugerują zaangażowanie PTB1 w pozytywną regulację translacji białka p53 i izoformy Δ Np53 w warunkach stresu [69]. Ze względu na bardzo niski poziom syntezy obydwu białek w warunkach normalnych, nie udało się jednak dotychczas zidentyfikować jaki wpływ ma to białko na translację p53 i Δ Np53, gdy na komórce nie działają czynniki stresowe. Z tego powodu zbadałem jak białko PTB1 wpłynie na poziom syntezy białka p53 i izoformy Δ Np53 *in vitro*.

Wykorzystanie techniki opóźnionej migracji kompleksów rybonukleoproteinowych w żelu poliakrylamidowym pozwoliło mi na wstępną charakterystykę oddziaływania PTB1 z badanymi RNA. Wzrastające stężenie białka prowadziło do powstania pojedynczego, wyraźnego prążka, reprezentującego przypuszczalnie kompleks RNA z jedną cząsteczką PTB1 (Rys. 61 i 64). Smużenie się prążków w żelu, może być spowodowane dysocjacją kompleksu białko-RNA podczas elektroforezy. Innym powodem może być współistnienie kompleksów, w których białko związane jest do różnych regionów w cząsteczce RNA i/lub w różnej orientacji, co doprowadza do ich odmiennego kształtu przestrzennego i tym samym zaburzonego obrazu migracji. W przypadku kompleksów PTB1 z RNA P1- Δ Np53 prążki są jednak ostre i wyraźne, co pozwala mi sądzić, że białko jest „trwale” związane do RNA i najprawdopodobniej oddziałuje z jednym miejscem cząsteczki w ściśle określonej orientacji przestrzennej (Rys. 61). Pierwszy kompleks jaki tworzy się między PTB1 a RNA P1-554 jest również dobrze wyodrębniony w żelu (Rys. 64). Przy wyższych stężeniach PTB1, zarówno w przypadku RNA P1- Δ Np53 jak i P1-554, dochodzi do tworzenia kompleksów wyższego rzędu, zawierających przypuszczalnie wiele kopii białka. Chociaż uważa się,

że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za funkcję PTB1 jest tworzenie multimerycznych kompleksów zawierających wiele kopii tego białka, to tylko w kilku przypadkach zbadano to w sposób ilościowy. Wykazano, że kompleksy PTB1 z fragmentem pre-mRNA dla receptora kwasu γ -aminomasłowego ($\text{GABA}_{A\gamma 2}$), a także z RNA odpowiadającym regionowi 3'UTR wirusa HCV, zawierają odpowiednio osiem i sześć cząsteczek białka [79, 175]. Tworzenie kompleksów wyższego rzędu oraz kooperatywność wiązania wskazują, że również w oddziaływaniu PTB1–mRNA p53 może brać udział więcej niż jedna kopia białka.

Badanie struktury drugorzędowej RNA w kompleksie z PTB1 przeprowadziłem dla cząsteczek P1- Δ Np53 oraz P1-554. Otrzymane wyniki były odmienne dla obydwu RNA. Analiza struktury RNA P1- Δ Np53 w kompleksie za pomocą metody cięć indukowanych jonami ołowiu wykazała obecność jednego, głównego miejsca wiązania białka, które w strukturze drugorzędowej RNA P1- Δ Np53 obejmuje oddziaływania między częścią 5' i 3' (Rys. 62 i 63). Zanik cięć, sugerujący ochronę reszt nukleotydowych, ma miejsce przede wszystkim w najdłuższym w całej cząsteczce regionie polipirymidynowym C225–C247 (Rys. 62). Co więcej, zanik cięć obserwuję również poniżej tej sekwencji, gdzie przeważają reszty purynowe. Jest to zgodne z danymi literaturowymi, gdyż wiązanie PTB1 do długich regionów zbudowanych z reszt pirymidynowych powodowało także ochronę przyległych reszt guanozynowych przed hydrolizą za pomocą rybonukleazy T1 [79]. Wiązanie białka nie prowadzi do rozpadu regionu dwuniciowego między częścią 5' i 3' w RNA P1- Δ Np53, gdyż region A18–A49 nie wykazywał zwiększonej reaktywności. Niewielki wzrost intensywności cięć widać jedynie w pozycjach A40 i C41, które w strukturze drugorzędowej RNA P1- Δ Np53 zlokalizowane są już w regionie przewidzianym jako jednoniciowy (Rys. 62). Może to oznaczać, że PTB1 wiążące się do regionu terminalnego 5' mRNA p53 nie wykazuje aktywności białka opiekuńczego (ang. *RNA chaperone*), rozplatającego regiony dwuniciowe w RNA. Taki mechanizm działania białka PTB1 w inicjacji translacji komórkowych mRNA posiadających element typu IRES sugerowano już wcześniej [73]. Zanik cięć indukowanych jonami ołowiu dotyczy także początkowego odcinka RNA P1- Δ Np53 (Rys. 62 i 63). Chociaż w jego obrębie nie ma ciągu reszt pirymidynowych, to nie można wykluczyć, że ochrona pozycji może wynikać z bezpośredniego wiązania białka PTB1. Zaobserwowałem bowiem, że białko to ma zdolność wiązania się także do izolowanego regionu 5'UTR (RNA P1-p53), choć ze znacznie słabszym powinowactwem niż do RNA P1- Δ Np53 (Rys. 68). Sugeruje to obecność dodatkowych miejsc wiązania również w 5'UTR mRNA p53. Inną przyczyną ochrony początkowych reszt 5'UTR przed cięciem jonami Pb^{2+} może być ich „przesłanianie” przez białko związane po przeciwległej stronie regionu dwuniciowego. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne, ponieważ jony ołowiu w przeciwieństwie do innych sond strukturalnych, nie powinny być wrażliwe na zawadę przestrzenną w postaci związanego białka, chyba że reszty te uwikłane są w bezpośrednie oddziaływanie z białkiem. Poza omawianym regionem w RNA P1- Δ Np53 wiązanie PTB1 nie prowadzi do zmiany rozkładu i intensywności cięć innych motywów struktury drugorzędowej. Oznacza to, że przynajmniej w stężeniu białka zapewniającym utworzenie kompleksu I nie dochodzi do istotnych

rearanżacji struktury drugorzędowej tej cząsteczki. Niestety próby określenia wpływu białka PTB1 na strukturę RNA P1- Δ Np53 za pomocą techniki SHAPE i modyfikacji siarczanem dimetylu zakończyły się niepowodzeniem ze względu na dysocjację białka od RNA już na wstępnym etapie modyfikacji. Przyczyną tego jest być może modyfikacja reszt aminokwasowych w białku zaangażowanych w wiązanie RNA. Możliwe jest również, że kompleksy ulegają rozpadowi wskutek mniejszego powinowactwa PTB1 do RNA P1- Δ Np53 niż do RNA P1-554. Sugeruje to, że w oddziaływaniu PTB1 z RNA P1- Δ Np53 mogą nie brać udziału wszystkie 4 motywy typu RRM białka.

Analiza struktury RNA P1-554 w kompleksie z PTB1 dała niejednoznaczne wyniki. Jony ołowiu indukują cięcia w pozycjach C236, C237, G240, C241 sekwencji polipirymidynowej C225–C247 (Rys. 65 i 66). Jest to więc odmienny efekt w stosunku do tego regionu w RNA P1- Δ Np53. Należy jednak podkreślić, że odcinek C225–C247 w RNA P1- Δ Np53 i P1-554 przyjmuje prawdopodobnie inną strukturę drugorzędową (Rys. 23 i 32). Pojawienie się cięć w tym regionie RNA P1-554 świadczy, że fragment ten, inaczej niż w RNA P1- Δ Np53, może nie być zaangażowany w bezpośrednie wiązanie białka PTB1. Obecność cięć sugeruje ponadto lokalne zmiany struktury tego regionu, do których dochodzi po związaniu białka. Mogłyby one polegać na niwelacji potencjalnych oddziaływań warstwowych lub trzeciorzędowych, gdyż region ten w niezwiązanym RNA P1-554 rozpoznaje także rybonukleaza V1 (Rys. 32). W obecności białka PTB1 reszty te są jednak nadal bardzo silnie rozpoznawane przez ten enzym, co może oznaczać zachowanie potencjalnych oddziaływań w tym regionie lub być może tylko ich subtelną zmianę (Rys. 66). Jeśli główna różnica w strukturze między RNA P1- Δ Np53 a RNA P1-554 dotyczy odcinka C225–C247, to zważywszy na większe powinowactwo PTB1 do RNA P1-554 można przypuszczać, że struktura tego regionu ma istotne znaczenie dla prawidłowego oddziaływania tego białka z regionem terminalnym 5' mRNA p53.

Analiza SHAPE nie potwierdziła wyników otrzymanych z użyciem jonów ołowiu, gdyż region C225–C247 nie wykazywał zmienionego rozkładu i siły modyfikacji. Użycie techniki SHAPE wskazało jednak, że podczas wiązania białka w stężeniu prowadzącym do powstania kompleksu I dochodzi do wzrostu reaktywności reszt spinki U180–A218 (A201, C208 i U209), co sugeruje udział tego elementu w wiązaniu PTB1 (Rys. 65 i 66). Potwierdzają to częściowo dane literaturowe, gdyż grupa Dasa zaobserwowała, że białko PTB1 ma bardzo zbliżone powinowactwo zarówno do cząsteczki RNA p53+39 IRES (odpowiednik RNA P1- Δ Np53 w moich badaniach) jak i RNA p53-1/+39, która stanowiła część kodującą między kodonami inicjacyjnymi dla białka p53 i Δ Np53 (Rys. 16) [69]. Z analizy struktury RNA p53-1/+39 przeprowadzonej przez autorów wynika, że spinka U180–A218 jest wspólnym elementem struktury RNA p53+39 IRES i p53-1/+39. Jeżeli PTB1 nie oddziałuje bezpośrednio z tym motywem, to możliwe jest, że podobnie jak

region C225–C247 jest on jednym z elementów „szkieletu” tworzącego odpowiednie otoczenie strukturalne, istotne w wiązaniu białka do regionu terminalnego 5' mRNA p53.

Przeprowadzenie analizy SHAPE przy stężeniu PTB1 prowadzącym do powstania kompleksów wyższego rzędu wykazało, że nie dochodzi do rearanżacji struktury, a jedynie niewielkiego wzrostu modyfikacji reszt już wcześniej zidentyfikowanych (Rys. 66). Taki obraz uprawdopodobnia model oddziaływania PTB1, w którym kompleksy wyższego rzędu mogą tworzyć się na zasadzie jego multimeryzacji wskutek oddziaływania białko–białko. Wprawdzie wykazano, że białko PTB1 jest monomerem w roztworze, to jednak pomimo tego proponuje się, że po związaniu do RNA jego konformacja przestrzenna może się zmieniać, dzięki czemu możliwe staje się oddziaływanie PTB1–PTB1 i multimeryzacja [79, 176]. Chociaż do tej pory nie ma bezpośrednich dowodów na takie oddziaływanie, to PTB1 ma duży potencjał do wiązania innych czynników białkowych takich jak Raver1 czy hnRNP L [177, 178]. Nie można więc wykluczyć, że białko to może tworzyć formy dimeryczne, a także kompleksy wyższego rzędu po związaniu do cząsteczki mRNA p53. Prawdopodobne miejsce wiązania białka PTB1 w RNA P1-554 wskazało użycie rybonukleazy A i T1. Osłabienie siły cięć obserwowane w regionie jednoniciowym C170–G179 (Rys. 66). Oprócz tego, że w obecności rybonukleazy A chronione były reszty C171–U174, osłabienie cięcia rybonukleazą T1 także po reszcie G177 sugeruje, że niemal cały region C170–G179 może być zaangażowany w wiązanie PTB1.

Próbie określenia wymogów sekwencyjnych i strukturalnych RNA niezbędnych do wiązania białka PTB1 podejmowano już wiele razy, lecz do dziś nie określono tych kryteriów dostatecznie dobrze. Wynika to między innymi z tego, że białko PTB1 posiada 4 motywy typu RRM, z których każdy ma zdolność wiązania się do cząsteczek RNA [175, 179]. Chociaż powinowactwo każdego z motywów różni się zazwyczaj bardzo mocno, to z użyciem skróconych wersji białka zauważono niejednokrotnie, że najistotniejsze są motyw 3 i 4, które drastycznie zwiększają zdolność PTB1 do tworzenia kompleksów z RNA [79, 175, 180]. Rola 1 i 2 motywu jest także ważna, ponieważ dopiero wszystkie 4 motywy RRM pozwalają na uzyskanie największego powinowactwo białka do RNA. W przypadku oddziaływania białka PTB1 z fragmentami regionu terminalnego 5' mRNA p53 nie potrafimy wskazać, które motywy RRM zaangażowane są w wiązanie do RNA. Pewnych informacji dostarczyć mogą jednak doświadczenia przeprowadzone w celu wyznaczenia stałych dysocjacji. Otóż, największe powinowactwo PTB1 wykazuje do RNA P1-554 i P1- Δ Np53, co świadczy, że przynajmniej odnośnie pierwszej cząsteczki nie tylko wymogi sekwencyjne, ale też i strukturalne wydają się spełnione do optymalnego wiązania białka (Rys. 68). Co więcej, wartość stałej dysocjacji dla pierwszego tworzącego się kompleksu PTB1 z RNA P1-554 jest na poziomie porównywalnym z tworzącymi się między PTB1 a elementami IRES wirusa EMCV (40 nM) czy FMDV (30 nM), dla których wykazano, że wszystkie 4 motywy RRM oddziałują z cząsteczką RNA [180-183]. Powinowactwo PTB1 ulega jednak drastycznemu obniżeniu względem RNA P1-p53

i H56-169. Co ciekawe, wartość stałej dysocjacji dla obydwu cząsteczek jest niemal identyczna (Rys. 68). Biorąc pod uwagę to, że struktura obydwu RNA jest zasadniczo różna, można przypuszczać, że otoczenie strukturalne sekwencji docelowej dla białka PTB1 w tych cząsteczkach RNA nie ma większego znaczenia. Z drugiej strony możliwy jest jednak scenariusz, w którym w sekwencji RNA P1-p53 i H56-169 mogą znajdować się miejsca wiązania dla tych motywów RRM, które wykazują słabsze powinowactwo do RNA. Dopiero w dłuższych fragmentach mRNA p53 pojawiają się miejsca wiązania dla motywów RRM wykazujących większe powinowactwo, co przekłada się na znacznie silniejsze oddziaływanie PTB1 z RNA P1- Δ Np53 i P1-554. Jeszcze inna możliwość dotyczy tego, że powinowactwo części motywów RRM, które nie biorą udziału w początkowym oddziaływaniu z RNA, zwiększa się dopiero po związaniu PTB1 do RNA za pomocą pozostałych motywów [79, 175]. Jednakże aby sprawdzić, która z tych możliwości ma miejsce, niezbędne jest użycie wariantów białka posiadających tylko wybrane motywy RRM. Przeprowadzenie takich doświadczeń jest w moich planach badawczych na przyszłość.

Białko PTB1 pełni swoje funkcje oddziałując z cząsteczkami RNA przynajmniej na kilka sposobów. W jądrze komórkowym działanie PTB1 jako supresora składania pre-mRNA tłumaczy się modelem, w którym wiele kopii tego białka wiąże się do sekwencji polipirymidynowych w pre-mRNA tworząc tzw. strefę wyciszania (ang. *zone of silencing*), co uniemożliwia wiązanie innych czynników białkowych [184]. Podczas oddziaływania PTB1 z mRNA p53 model taki jest jednak mało prawdopodobny, ponieważ w analizowanym przeze mnie regionie nie ma tak długich fragmentów polipirymidynowych jak te w prekursorowych mRNA. Ponadto, w wyższych stężeniach białka nie obserwuję ochrony przed modyfikacją chemiczną dodatkowych pozycji w RNA, co sugeruje, że wiązanie kolejnych kopii PTB1 zachodzi na zasadzie oddziaływania białko-białko (Rys. 66). Odnośnie udziału białka PTB1 w inicjacji translacji mRNA komórkowych oraz wirusowych RNA proponowane są dwa hipotetyczne modele. W pierwszym, białko PTB1 ma zdolność wiązania do elementu IRES dopiero po uprzednim związaniu innego czynnika białkowego np. unr (ang. *upstream of N-ras*) [73]. Dopiero wtedy PTB1 indukuje rearanżacje struktury elementu IRES, prowadzące do pojawienia się większej ilości regionów jednoniciowych, co jak się przypuszcza ma istotne znaczenia dla wiązania kompleksu inicjacyjnego [73]. PTB1 działa wówczas, jako białko opiekuńcze RNA, którego rolą jest rozplatanie części struktur dwuniciowych w elemencie IRES stwarzając odpowiednie otoczenie do wiązania małej podjednostki rybosomalnej i innych czynników translacyjnych. Taki model wiązania PTB1 w przypadku mRNA p53 jest również mało prawdopodobny, ponieważ białko to oddziałuje silnie z RNA P1- Δ Np53 i P1-554 pod nieobecność jakichkolwiek innych czynników białkowych. Dodatkowo, jego wiązanie nie indukuje istotnych zmian w rozkładzie modyfikacji i cięć RNA, co mogłoby świadczyć o rearanżacjach struktury w regionie terminalnym 5', wskutek rozplatania fragmentów helikalnych.

Drugi model wiązania PTB1 do cząsteczek RNA proponuje się dla wirusowych elementów IRES. Wiązanie PTB1 nie powoduje istotnych rearanżacji struktury, lecz raczej zmianę dostępności niektórych reszt nukleotydowych [79, 171, 185, 186]. Dodatkowo, PTB1 wiążąc się do RNA, oddziałuje często z regionami, które oddalone są od siebie w strukturze drugorzędowej [182, 183, 187]. Uważa się, że taki sposób wiązania stabilizuje element IRES, ułatwiając wiązanie kompleksu inicjacyjnego i stymulację translacji. Oddziaływanie PTB1 z oddalonymi od siebie regionami struktury drugorzędowej możliwe jest dzięki „rozciągniętej” konformacji jakie białko to przyjmuje w roztworze. Pozwala to na interakcje poszczególnych motywów RRM z cząsteczką RNA na odcinku wielu reszt nukleotydowych [188]. Model ten wydaje się najbardziej pasować do tego, co obserwujemy podczas oddziaływania PTB1 z regionem terminalnym 5' mRNA p53. Wiązanie PTB1 do RNA P1-554 nie prowadziło do zmian struktury poszczególnych motywów RNA, a jedynie do zmian reaktywności niektórych reszt w regionach oddalonych od siebie w sekwencji i strukturze drugorzędowej (spinka U180–A218 i odcinek polipirymidynowy C225–C247) (Rys. 65). Nie można jednak wykluczyć tego, że związanie PTB1 indukuje zmiany w strukturze trzeciorzędowej RNA, których nie obserwujemy z użyciem zastosowanych metod. Wówczas, potencjalną rolę w dopasowaniu między PTB1, a regionem terminalnym 5' mogą pełnić długie regiony jednoniciowe między poszczególnymi motywami strukturalnymi, zapewniające im swobodę konformacyjną. Wyniki doświadczalne wskazują, że do jednego z nich, C170–G179, może wiązać się białko PTB1.

Białko PTB1 jest jednym z czynników ITAF zaangażowanych w pozytywną regulację inicjacji translacji zależnej od elementów IRES w zbadanych do tej pory komórkowych mRNA i wirusowych RNA [189]. Wiązanie białka PTB1 najczęściej stymuluje proces translacji. Dotyczy to zarówno wirusowych RNA (CVB3, Polio, FMDV), jak i szeregu komórkowych mRNA (m.in. Bag-1, Apaf-1, receptor insulinowy, IRF-2 czy p53) [73, 78, 183, 190-194]. Nie wiadomo jaką rolę pełni w tym procesie białko PTB1, jednakże prawdopodobne, że umożliwia wiązanie małej podjednostki rybosomalnej w bezpośrednim sąsiedztwie kodonu inicjacyjnego lub stanowi „pomost” między elementem IRES, a innymi czynnikami białkowymi [172]. Tylko dla kilku komórkowych cząsteczek mRNA są dowody na to, że ich translacja jest negatywnie regulowana przez białko PTB1 na etapie inicjacji. Są to mRNA kodujące białka unr, BiP oraz CDK11p58 [195-197]. Także w tym przypadku nieznanym jest mechanizm działania PTB1. Sugeruje się jedynie, że białko PTB1 może stanowić zawadę przestrzenną dla wiązania innych czynników lub prowadzić do zmiany struktury elementu IRES na „nieaktywną translacyjnie” [196]. Z przeprowadzonych przeze mnie badań translacji *in vitro* wynika, że białko PTB1 obniża efektywność translacji RNA P1-554 z kodonów inicjacyjnych dla białka p53 i izoformy Δ Np53 (Rys. 71). Dla translacji RNA P1 Δ Np53Luc efekt inhibicji jest jednak słabszy. Może to wynikać ze słabszego powinowactwa białka PTB1 do regionu terminalnego 5' obejmującego pierwsze 259 reszt nukleotydowych w stosunku do dłuższego fragmentu mRNA, RNA P1-554. Najprawdopodobniej sekwencja w bezpośrednim sąsiedztwie kodonu AUG dla izoformy Δ Np53 ma zatem znaczenie nie tylko w wiązaniu PTB1, zapewniając odpowiednią aranżację struktury, ale także w jego funkcjonowaniu podczas inicjacji translacji. To

czy białko PTB1 reguluje negatywnie tylko translację mRNA p53 zależną od kapu czy może bierze także udział w kontroli alternatywnego mechanizmu syntezy p53 i Δ Np53 wymaga dalszych badań.

Ciekawe jest, że białko PTB1 ma także powinowactwo do sekwencji poniżej kodonu AUG dla białka Δ Np53 (RNA 259-554), chociaż w mniejszym stopniu niż do RNA P1-554 (Rys. 72). Powodem osłabionego powinowactwa może być występowanie drugorzędowych miejsc wiązania PTB1 w dystalnej części RNA P1-554 lub to, że w RNA 259-554 nie tworzy się odpowiednia struktura drugorzędowa wskutek braku sekwencji leżącej powyżej kodonu inicjacyjnego dla izoformy Δ Np53. Jeśli w sekwencji kodującej mRNA p53 poniżej kodonu AUG dla izoformy Δ Np53 znajdują się dodatkowe miejsca wiązania PTB1, to jedno z nich może leżeć na granicy egzonu 4 i 5. Zlokalizowany jest tam bardzo długi, 36 nukleotydowy odcinek polipirymidynowy, zawierający dodatkowo 4 powtórzenia sekwencji CCU. Jego położenie oraz długość mogą sugerować, że jest to miejsce, do którego białko PTB1 może wiązać się podczas składania pre-mRNA p53. Chociaż do tej pory wykryto kilkanaście izoform mRNA p53 to sama regulacja tego procesu jest nieznana. Z tego względu uważam, że hipoteza udziału białka PTB1 także w składaniu pre-mRNA p53 jest warta sprawdzenia.

Otrzymane przeze mnie wyniki dotyczące inhibicji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53 w obecności PTB1 są odmienne do tych opublikowanych przez grupę Dasa [78]. Trzeba jednak podkreślić, że autorzy obserwowali stymulację translacji białka p53 i Δ Np53 dopiero w warunkach stresu genotoksycznego wywołanego doksorubicyną. W sytuacji braku czynnika stresowego nie zaobserwowali jakiegokolwiek wpływu PTB1 na translację p53 i Δ Np53 [78]. Efekt ten może być spowodowany tym, że białko PTB1 w normalnych warunkach zlokalizowane jest głównie w jądrze komórkowym, przy jednoczesnym poziomie cytoplazmatycznym na granicy detekcji [78, 198]. Stąd wyciszenie ekspresji PTB1 w takich warunkach nie powinno mieć wpływu na translację p53 i Δ Np53, która zachodzi w cytoplazmie. Stymulacja translacji p53 i Δ Np53 nie musi więc wynikać z bezpośredniego udziału w tym procesie białka PTB1. Możliwe jest, że stres komórkowy indukuje również ekspresję innych czynników, które wiążąc się do regionu terminalnego 5' mRNA p53 blokują wiązanie PTB1, przez co nie dochodzi do inhibicji translacji. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga moim zdaniem badań przesiewowych z jednoczesnym monitorowaniem poziomu wszystkich poznanych dotąd czynników zaangażowanych w regulację translacji mRNA p53.

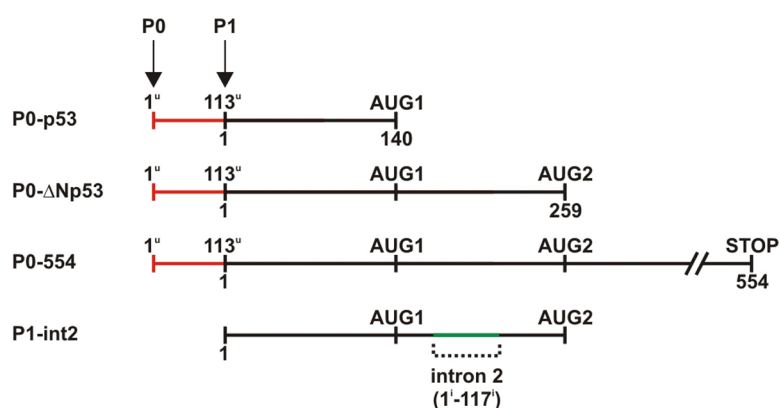
3.4. Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się od promotora transkrypcyjnego P0 oraz posiadających zachowaną sekwencję intronu 2

Po scharakteryzowaniu struktury regionu terminalnego 5' szeregu fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się w miejscu inicjacji transkrypcji P1, w kolejnym etapie zbadałem jaki wpływ na strukturę tego regionu ma odcinek sekwencji pomiędzy promotorami transkrypcyjnymi P0–P1 oraz obecność intronu 2.

Moje zainteresowanie regionem pomiędzy promotorami P0–P1 podyktowane było doniesieniami opisującymi jego negatywny wpływ na aktywność translacyjną mRNA p53 [45, 47]. Nie bez znaczenia były także sugestie, że region ten może tworzyć stabilną strukturę drugorzędową, odpowiadającą za negatywną regulację syntezy białka p53 [45, 47]. Interesowało mnie, czy taki element organizuje się niezależnie od reszty sekwencji oraz czy jego występowanie może mieć wpływ na strukturę motywów leżących poniżej, takich jak spinka G56–C169. Zamierzałem również sprawdzić jak sekwencja międzypromotorowa wpłynie na poziom syntezy białka p53 i izoformy Δ Np53 oraz porównać to z wynikami otrzymanymi dla fragmentów rozpoczynających się w miejscu inicjacji transkrypcji P1. Odnośnie obecności intronu 2 w mRNA p53, przede wszystkim zamierzałem dowiedzieć się, w jaki sposób sekwencja ta wpłynie na strukturę regionu terminalnego 5'. Było to interesujące tym bardziej, że lokalizacja intronu 2 powinna doprowadzić do rozplecenia spinki U180–A218. W zawiązku z powyższym ciekawe było czy może mieć to także wpływ na aranżację innych motywów, takich jak spinka G56–C169.

Zbadałem strukturę drugorzędową 4 cząsteczek RNA. Trzy z nich rozpoczynały się od promotora P0. RNA P0-p53 (253 nt) zakończony był kodonem inicjacyjnym dla białka p53. RNA P0- Δ Np53 (370 nt) kończył się kodonem inicjacyjnym dla izoformy Δ Np53, a RNA P0-554 (667 nt) wydłużony był dodatkowo o 300 nt sekwencji kodującej. Czwarta cząsteczka, RNA P1-int2, rozpoczynała się w miejscu inicjacji transkrypcji P1, a zakończona była kodonem inicjacyjnym dla izoformy Δ Np53 (376 nt) i zawierała sekwencję intronu 2. Wszystkie wymienione fragmenty RNA zostały schematycznie przedstawione na rysunku 73. W celu uniknięcia rozbieżności podczas opisu wyników doświadczalnych zdecydowałem się na wprowadzenie odrębnej numeracji regionu międzypromotorowego P0–P1 (reszty 1^u–113^u, gdzie „u” jest skrótem od ang. *upstream*, czyli „sekwencja powyżej”) oraz intronu 2 (reszty 1ⁱ–117ⁱ, gdzie „i” jest skrótem od intron). Pozostała sekwencja jest zgodna z numeracją cząsteczek RNA rozpoczynających się w miejscu inicjacji transkrypcji P1 (Rys. 21). Początkowym etapem doświadczeń była amplifikacja cząsteczek DNA odpowiadających badanym fragmentom mRNA p53. Cząsteczki P0-p53, P0- Δ Np53 i P0-554 namnożone zostały techniką PCR na bazie matrycy, którą stanowił handlowo dostępny cDNA z wątroby zdrowego człowieka. Początkowo, próba otrzymania DNA P1-int2 na matrycy cDNA

z wątroby nie powiodła się. Było to prawdopodobnie spowodowane tym, że występowanie mRNA p53I2 jest specyficzne tkankowo, a w literaturze można znaleźć przykłady gdzie próby jego amplifikacji także kończyły się niepowodzeniem [53]. Postanowiłem uzyskać sekwencję intronu 2 na matrycy genomowego DNA od zdrowego osobnika, a pozostałe części DNA P1-int2 z cDNA z wątroby. Następnie, przeprowadziłem reakcję PCR, w której nastąpiło złożenie wszystkich fragmentów w jedną cząsteczkę dsDNA. W celu późniejszego otrzymania cząsteczek RNA drogą transkrypcji *in vitro*, w kolejnej reakcji PCR wprowadziłem sekwencję promotorową dla polimerazy RNA z faga T7. Zgodność sekwencji wszystkich fragmentów została potwierdzona przez sekwencjonowanie. Otrzymane RNA oczyszczane były w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących, gdzie reprezentowane były przez pojedyncze prążki.

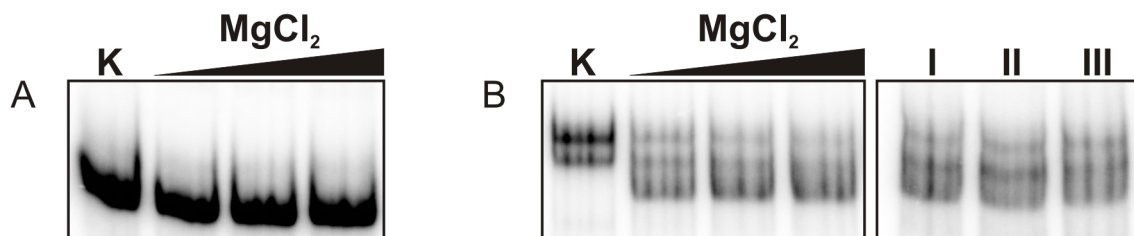


Rysunek 73. Schemat cząsteczek RNA użytych w badaniach struktury drugorzędowej regionu międzypromotorowego oraz transkryptu zawierającego zachowaną sekwencję intronu 2. Szczegółowy opis w tekście.

Pierwszym etapem badań fragmentów mRNA p53 posiadających region międzypromotorowy P0-P1 było sprawdzenie ich homogenności. W tym celu przeprowadziłem rozdział elektroforetyczny cząsteczek RNA znakowanych radioizotopowo w żelu poliakryloamidowym w warunkach natywnych. Jako czynnik zmienny wykorzystałem różne stężenie jonów Mg^{2+} oraz niekiedy zmienne warunki temperaturowe renaturacji.

RNA P0-p53, niezależnie od obecności i stężenia jonów Mg^{2+} , migrował jako pojedynczy prążek, co sugeruje jego homogenność strukturalną (Rys. 74). Analiza migracji RNA P0-ΔNp53 wykazała, że przy braku $MgCl_2$ cząsteczka ta migruje w postaci dwóch prążków w stosunku 2:1 na korzyść wyższego (Rys. 74). Dodanie $MgCl_2$ do reakcji spowodowało pojawienie się trzeciego pasma migrującego szybciej w żelu oraz zmianę stosunku ilości wszystkich form na około 1:1:1. Aby upewnić się, że efekt ten nie jest rezultatem zastosowanych warunków temperaturowych, przeprowadziłem analizę migracji RNA P0-ΔNp53 w zależności od temperatury denaturacji. Inkubacja RNA P0-ΔNp53 w różnych warunkach temperaturowych nie zmieniła jednak sposobu jego migracji w żelu (Rys. 74). Podjąłem dalsze próby w celu otrzymania pojedynczej formy RNA P0-ΔNp53, lecz starania te nie przyniosły oczekiwanego rezultatu. Obserwowana zmienność,

pogłębiana dodatkowo w obecności jonów Mg^{2+} , sugerowała niestabilność strukturalną RNA P0- $\Delta Np53$. Podejrzałem w tym udział reszt 1^u-113^u odpowiadających regionowi P0-P1. Jednakże migracja RNA P0-p53 w warunkach natywnych nie potwierdziła tego przypuszczenia, gdyż cząsteczka ta migrowała w postaci pojedynczego pasma. Taki rezultat może świadczyć, że w RNA P0-p53 i P0- $\Delta Np53$ region P0-P1 przyjmuje odmienną strukturę drugorzędową.

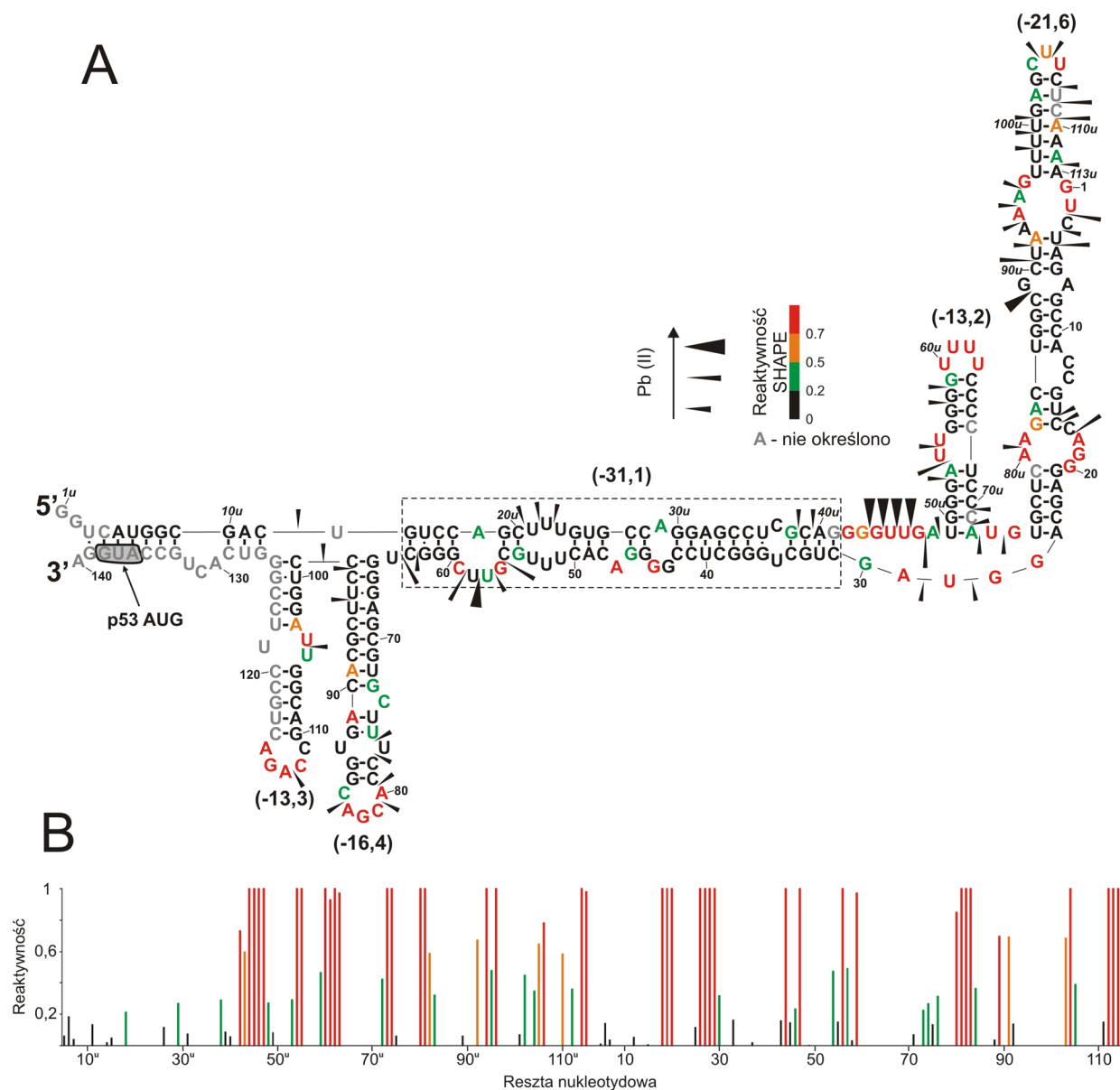


Rysunek 74. Elektroforeza RNA P0-p53 (A) i P0- $\Delta Np53$ (B) w warunkach natywnych, w zależności od stężenia chlorku magnezu (2,5, 5, 10 mM) i warunków denaturacji RNA. I – 65 °C – 3 minuty, a następnie schładzanie do temperatury 37 °C w tempie 0,1 °C/sekundę, II – 90 °C – 3 minuty i 4 °C – 10 minut, III – 90 °C – 3 minuty i 25 °C – 10 minut.

3.4.1. Struktura drugorzędowa RNA P0-p53

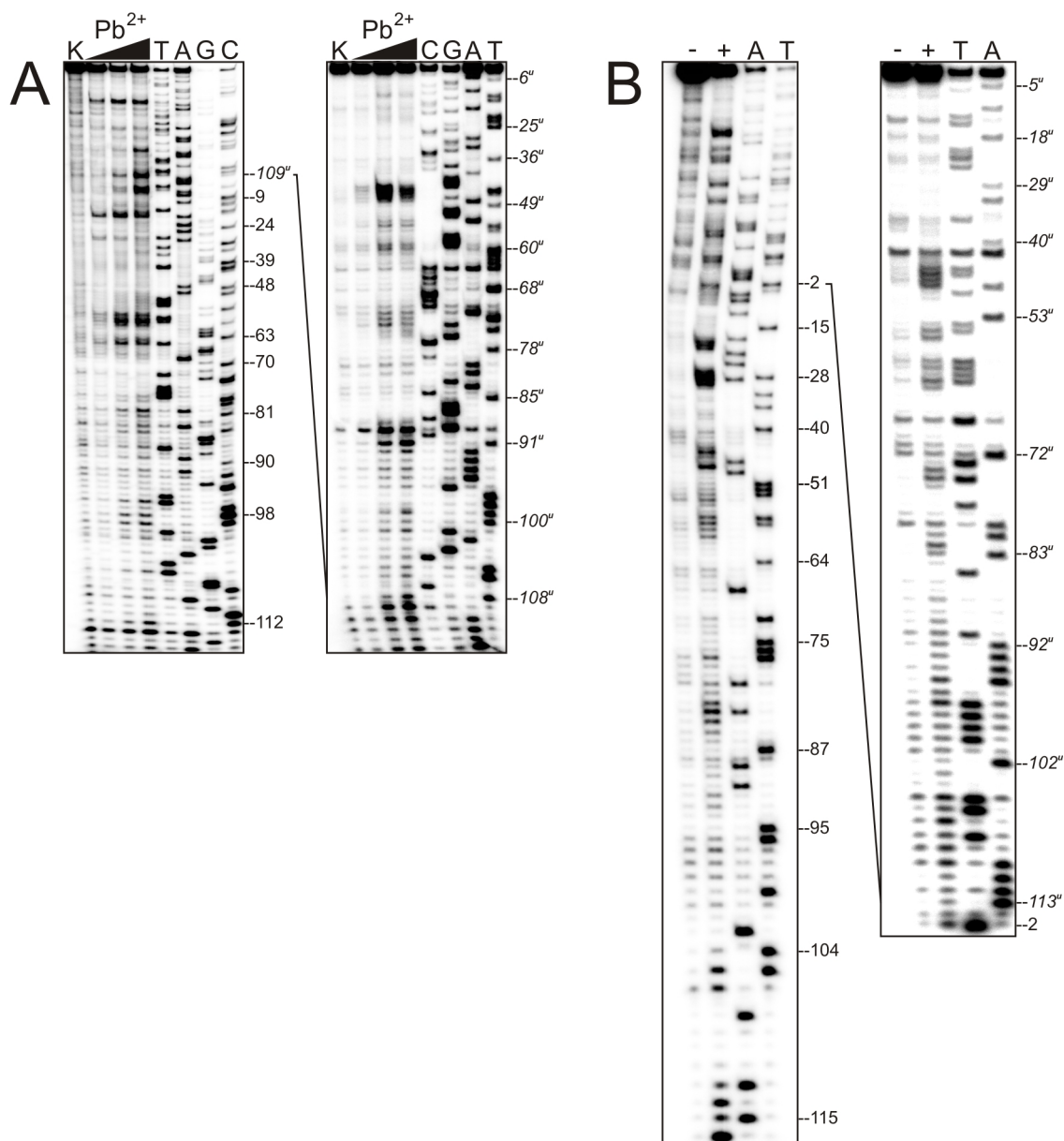
Struktura drugorzędowa RNA P0-p53 o energii swobodnej $\Delta G = -133$ kcal/mol, która jest najbardziej zgodna z wynikami doświadczalnymi została przedstawiona na rysunku 75. W proponowanej przeze mnie strukturze, reszty U3^u-G41^u oraz C31-G139 oddziałują ze sobą tworząc region dwuniciowy z kilkoma wybrzuszeniami i wypętlzeniami. Część tego regionu charakteryzuje się dość dużą stabilnością termodynamiczną ($\Delta G = -31,1$ kcal/mol). W dalszym odcinku, z oddziaływania tego wyłączone są reszty G65-C98 oraz C99-G126, które tworzą dwa motywy typu spinki zbudowane wyłącznie z sekwencji leżącej poniżej promotora transkrypcyjnego P1. Pozostała część sekwencji organizuje się w struktury dwóch spinek: A49^u-U72^u i U75^u-A25. Motywy te są „odizolowane” od reszty RNA regionami jednoniciowymi G42^u-G48^u i G26-G30. Domena A49^u-U72^u wydaje się być stabilnym elementem gdyż na jej trzon zbudowany z dziewięciu par zasad aż siedem to pary G-C. Taka kompozycja przekłada się na stabilność tego motywu, dla którego parametr ΔG , pomimo niewielkich rozmiarów spinki wynosi -13,2 kcal/mol. Spinka U75^u-A25 jest większa, zawiera dwa obustronne, wielonukleotydowe wypętlenia, niestandardowe sparowanie typu G-A oraz trójnukleotydową pętlę apikalną.

Proponowana struktura drugorzędowa RNA P0-p53 dobrze koresponduje z wynikami doświadczalnymi otrzymanymi z wykorzystaniem metody cięć indukowanych jonami Pb^{2+} oraz modyfikacji za pomocą NMIA (Rys. 75 i 76). Do silnego cięcia dochodzi w regionach jednoniciowych G43^u-G47^u oraz G56-C59. Pojedyncze, silne cięcia obserwuję również przy reszcie C88^u w spince U75^u-A25, spowodowane najprawdopodobniej sąsiedztwem niesparowania typu



Rysunek 75. Struktura drugorzędowa RNA P0-p53. A – model struktury drugorzędowej RNA P0-p53 zaproponowany w oparciu o mapowanie za pomocą jonów ołowiu i techniki SHAPE. Wielkość czarnych trójkątów odpowiada sile cięcia jonami ołowiu. Z kolei, reaktywność reszt nukleotydowych wobec NMIA wyrażona jest kolorami, zgodnie z legendą (czarny – niereaktywne, zielony – słabo reaktywne, pomarańczowy – średnio reaktywne, czerwony – silnie reaktywne). Kolorem szarym zaznaczono reszty, dla których reaktywność nie została wyznaczona. W nawiasach podano wartość parametru ΔG poszczególnych motywów strukturalnych wyrażoną w kcal/mol. B – wykres reaktywności reszt nukleotydowych wobec NMIA w zależności od ich pozycji w RNA P0-p53. Kolor słupków jest zgodny z legendą na panelu A.

G-A. Słabsze cięcia mają miejsce w większości pętli apikalnych struktur spinkowych. Ponadto, cięcia zachodzą w regionach helikalnych. Dotyczy to zwłaszcza apikalnej części spinki U75^u-A25 (reszty U98^u-A112^u), co wynikać może z dużego udziału par A-U. Prawdopodobnie z tego powodu, parametr ΔG obliczony dla izolowanego motywu wynosi -21,6 kcal/mol, a więc nieco więcej niż dla znacznie mniejszej spinki A49^u-U72^u.



Rysunek 76. Badanie struktury drugorzędowej RNA P0-p53. A – rozdziel produktów cięcia jonami ołowiu. K – reakcja kontrolna, A, C, T, G – reakcje sekwencjonowania. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. B – mapowanie struktury za pomocą techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, A, T – reakcje sekwencjonowania. Po prawej stronie autoradiogramów wskazano niektóre reszty nukleotydowe.

Technika SHAPE pozwoliła na bardzo dobre zmapowanie pętli apikalnych wszystkich motywów strukturalnych typu spinki w RNA P0-p53, dłuższych regionów jednoniciowych oraz większości reszt, które uległy wybrzuszeniu lub wypętleniu (Rys. 75 i 76). Porównując wyniki otrzymane z wykorzystaniem obydwu reagentów: jonów ołowiu i NMIA można zauważyć istotne rozbieżności. Spowodowane są one dużym udziałem reszt purynowych w regionach jednoniciowych RNA P0-p53, które słabiej rozpoznawane są przez jony ołowiu. Wyjątkiem jest jednak pętla apikalna spinki A49^u–U72^u, która pomimo tego, że zbudowana jest z czterech reszt urydynowych nie jest podatna na cięcia indukowane jonami ołowiu (Rys. 75 i 76). Dochodzi natomiast do silnej modyfikacji za pomocą NMIA. Wyniki otrzymane z użyciem techniki SHAPE potwierdzają także dostępność do

modyfikacji niektórych reszt adenozynowych apikalnej części spinki U75^u–A25 w pozycjach 102^u, 110^u i 112^u.

Interesujące jest występowanie w proponowanej strukturze drugorzędowej RNA P0-p53 spinek G65–C98 i C99–G126. Obie obecne są również w RNA P1-p53, a pierwsza także w RNA P1-ΔNp53 oraz w dłuższych fragmentach mRNA, gdzie stanowi apikalną część spinki G56–C169 (Rys. 75, 23, 29, 32). Strukturę obydwu spinek w RNA P0-p53 potwierdza bardzo zbliżony rozkład cięć indukowanych jonami ołowiu oraz modyfikacji NMIA, w porównaniu do analogicznych regionów w RNA P1-p53 (Rys. 29 i 75). Pokazuje to, że spinka C99–G126 może być stałym elementem struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53, niezależnie od tego z którego promotora transkrypcyjnego rozpoczyna się synteza RNA.

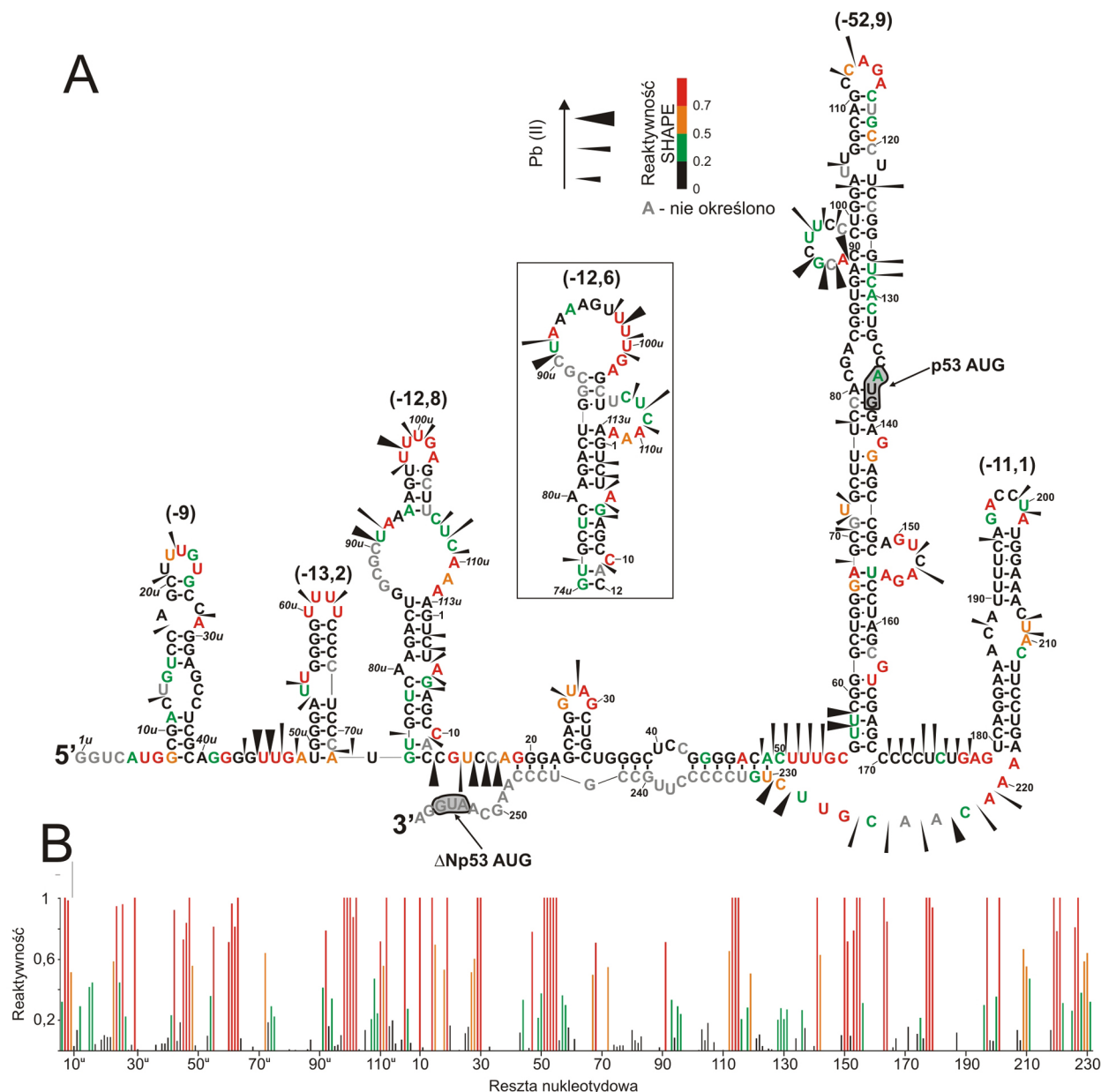
3.4.2. Struktura drugorzędowa regionu międzypromotorowego w dłuższych fragmentach mRNA – RNA P0-ΔNp53 oraz RNA P0-554

Spodziewałem się, że określenie organizacji struktury drugorzędowej RNA P0-ΔNp53 może być niejednoznaczne ze uwagi na heterogenność podczas elektroforezy w warunkach natywnych (Rys. 74). Potwierdziło się to, ponieważ korelacja danych doświadczalnych z proponowaną strukturą drugorzędową regionu międzypromotorowego w cząsteczce RNA P0-ΔNp53 może nastęrczać trudności. W strukturze RNA P0-ΔNp53 o najniższej energii swobodnej, dla której wartość parametru ΔG wynosi -172,3 kcal/mol, reszty G19–C247 przyjmują taką samą strukturę drugorzędową jak w RNA P1-ΔNp53 (Rys. 77). Podobny jest rozkład cięć indukowanych jonami ołowiu oraz modyfikacji NMIA. Silniejsze cięcia zachodzą w pozycjach U57 i U58 leżących u podstawy spinki G56–C169. Ponadto, w obrębie jednostronnego wypętlenia A91–C98 oraz po resztach U122, G127 i U128, leżących po stronie 3' struktury spinkowej. Z kolei, zanik cięć ma miejsce w apikalnej części spinki U180–A218, w bogatym w reszty pirymidynowe trakcie C188–U193 (Rys. 77 i 78). Różnica ta może wynikać z wybranej metody detekcji cięć dla RNA P1-ΔNp53 oraz P0-ΔNp53. Dla RNA P1-ΔNp53 był to rozdział znakowanych radioizotopowo produktów cięcia, podczas gdy większa długość RNA P0-ΔNp53 wymagała wprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji. W metodzie tej obserwuje się dość duże tło na autoradiogramach, a zatem ustalenie pozycji niektórych słabych cięć było niemożliwe. W przypadku wyników otrzymanych dla RNA P0-ΔNp53 za pomocą techniki SHAPE, jedyne wyraźne różnice w stosunku do RNA P1-ΔNp53 dostrzegam we wzroście reaktywności niektórych reszt spinki G56–C169. Dotyczy to reszt C116, G118, C119 oraz leżącego poniżej fragmentu U128–C131 (Rys. 77 i 78). Wzrost modyfikacji sekwencji U128–C131 jest także zgodny z silniejszymi cięciami w tym regionie indukowanymi jonami Pb²⁺.

Region G1^u–A118 (zawierający region międzypromotorowy P0–P1) przyjmuje odmienną strukturę w porównaniu do RNA P0-p53. Jedynym wspólnym motywem jest spinka A49^u–U72^u, co

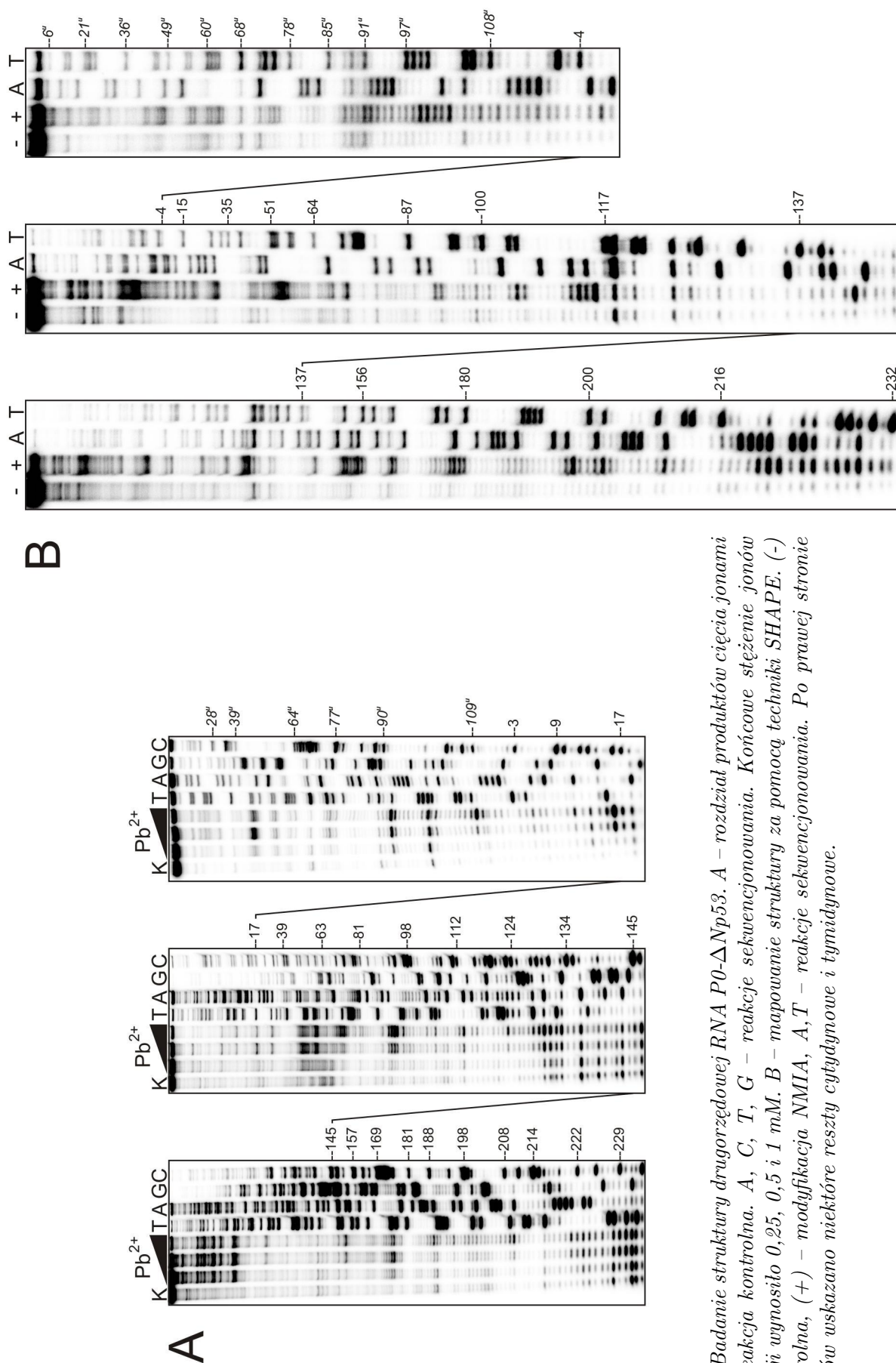
3.4. Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się od promotora transkrypcyjnego P0 oraz posiadających zachowaną sekwencję intronu 2

popiera rozkład cięć indukowanych jonami ołowiu i modyfikacji NMIA (Rys. 77 i 78). Jej obecność także w RNA P0- Δ Np53 sugeruje, że motyw ten ma tą samą strukturę, niezależnie od reszty cząsteczki i może być stałym elementem struktury drugorzędowej regionu międzypromotorowego. Przemawia za tym także analiza wyników otrzymanych z użyciem programu *RNAstructure*, w których spinka A49^u-U72^u jest stałym elementem wielu suboptymalnych struktur RNA P0- Δ Np53.



Rysunek 77. Struktura drugorzędowa RNA P0- Δ Np53. A – model struktury drugorzędowej RNA P0- Δ Np53 zaproponowany w oparciu o dane doświadczalne. Wielkość czarnych trójkątów odpowiada sile cięć indukowanych jonami ołowiu. Kolor reszt nukleotydowych koresponduje z ich reaktywnością wobec NMIA (legenda). W nawiasach podano obliczoną dla poszczególnych motywów wartość parametru ΔG , wyrażoną w kcal/mol. Na rysunku umieszczono także alternatywną strukturę spinka G74^u-C12. B – wykres przedstawiający siłę modyfikacji za pomocą NMIA w zależności od pozycji w RNA P0- Δ Np53. Kolor słupków jest zgodny z legendą na panelu A.

3.4. Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się od promotora transkrypcyjnego P0 oraz posiadających zachowaną sekwencję intronu 2

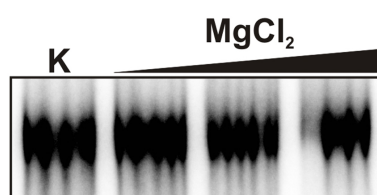


Rysunek 78. Badanie struktury drugorzędowej RNA P0-ΔNp53. A – rozdział produktów cięcia jonami ołowiu. K – reakcja kontrolna. A, C, T, G – reakcje sekwencjonowania. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. B – mapowanie struktury za pomocą techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, A, T – reakcje sekwencjonowania. Po prawej stronie autoradiogramów wskazano niektóre reszty cytydynowe i tymidynowe.

Reszty G74^u–C12, podobnie jak w RNA P0-p53, tworzą strukturę spinkową, lecz o odmiennej aranżacji (Rys. 77). Można w niej wyróżnić dużą, asymetryczną pętlę wewnętrzną zbudowaną głównie z reszt purynowych, dość dobrze zmapowaną przez jony ołowiu i NMIA oraz pięcionukleotydową pętlę apikalną. Dla części reszt pętli wewnętrznej (G87^u–C90^u) nie udało się wyznaczyć reaktywności względem NMIA z powodu bardzo silnego tła w reakcji kontrolnej. Spinka zawiera także jedno niesparowanie typu A-A z silnie reaktywną resztą A5 oraz wybrzuszoną resztę C10, również wykazującą silną reaktywność wobec NMIA (Rys. 77). Obecność pętli wielonukleotydowej, oraz duża zawartość par typu A-U i G-U budujących dwuniciowy trzon pozwalają przypuszczać, że motyw ten jest mało stabilnym elementem struktury RNA P0-ΔNp53. W niektórych suboptymalnych strukturach przewidzianych przez program *RNAstructure* spinka G74^u–C12 przyjmuje odmienną strukturę drugorzędową (Rys. 77). W części podstawowej zbudowana jest tak samo, jednakże część apikalna wygląda odmiennie (reszty G86^u–A112^u). W alternatywnej strukturze spinki G74^u–C12 dochodzi do powiększenia pętli apikalnej z 5 do 14 reszt nukleotydowych, natomiast region C107^u–A112^u tworzy jednostronne wielonukleotydowe wypętlenie. Wyniki mapowania struktury RNA P0-ΔNp53 korespondują dość dobrze z alternatywną aranżacją spinki G74^u–C12. W takim układzie silną reaktywnością cechują się zwłaszcza reszty leżące po stronie 3' pętli apikalnej. Z kolei, brak cięć indukowanych jonami ołowiu po stronie 5' pętli można wytłumaczyć obecnością w tych pozycjach reszt purynowych, słabiej rozpoznawanych przez tą sondę. Z uwagi na brak możliwości jednoznacznego wskazania, która z zaprezentowanych aranżacji spinki G74^u–C12 jest prawidłowa zdecydowałem się na umieszczenie obydwu struktur tym bardziej, że wartość ich parametru ΔG jest niemal identyczna i wynosi -12,8 oraz -12,6 kcal/mol dla struktury alternatywnej. Spinka G74^u–C12 jest charakterystyczna również dlatego, że jest jedynym fragmentem struktury RNA P0-ΔNp53 gdzie dochodzi do parowania sekwencji międzypromotorowej (reszty G74^u–U85^u) z początkowymi resztami regionu poniżej promotora P1 (G1–C12). W rezultacie tworzy się helikalny trzon stanowiący część podstawową tej struktury (Rys. 77).

Początkowe reszty RNA P0-ΔNp53 przyjmują również odmienną strukturę w porównaniu do RNA P0-p53 (Rys. 77). Tworzą one strukturę typu spinki (G8^u–C39^u) o dość niskiej przewidywanej stabilności (ΔG = -9 kcal/mol). Pomimo licznych regionów jednoniciowych, tylko reszty pętli apikalnej oraz A29^u wykazują zwiększoną reaktywność wobec NMIA. W spince G8^u–C39^u obserwuję jedynie kilka słabych cięć indukowanych jonami ołowiu, przy czym wszystkie w regionach przewidzianych jako jednoniciowe. Jedyny dłuższy region jednoniciowy utworzony przez sekwencję międzypromotorową obejmuje reszty A40^u–A48^u (Rys. 77). Jego występowanie potwierdzają cięcia w pozycjach reszt pirymidynowych oraz silne modyfikacje NMIA, za wyjątkiem reszt A40^u, G43^u oraz G44^u.

Z powodu braku jasności, co do organizacji regionu międzypromotorowego postanowiłem zbadać strukturę cząsteczki RNA P0-554, która w stosunku do RNA P0- Δ Np53 posiada (podobnie jak RNA P1-554) dodatkowe 300 reszt sekwencji kodującej (Rys. 73). Zdecydowałem się na ten krok, ponieważ szerszy kontekst sekwencyjny powinien, moim zdaniem ułatwić określenie struktury regionu międzypromotorowego z większym prawdopodobieństwem. Analiza rozdziału RNA P0-554 w warunkach natywnych wskazała na jego homogenność. RNA P0-554 migrował w postaci pojedynczego prążka, niezależnie od obecności i stężenia jonów Mg^{2+} , co sugerowało, że cząsteczka ta istnieje w postaci jednego konformera strukturalnego (Rys. 79).



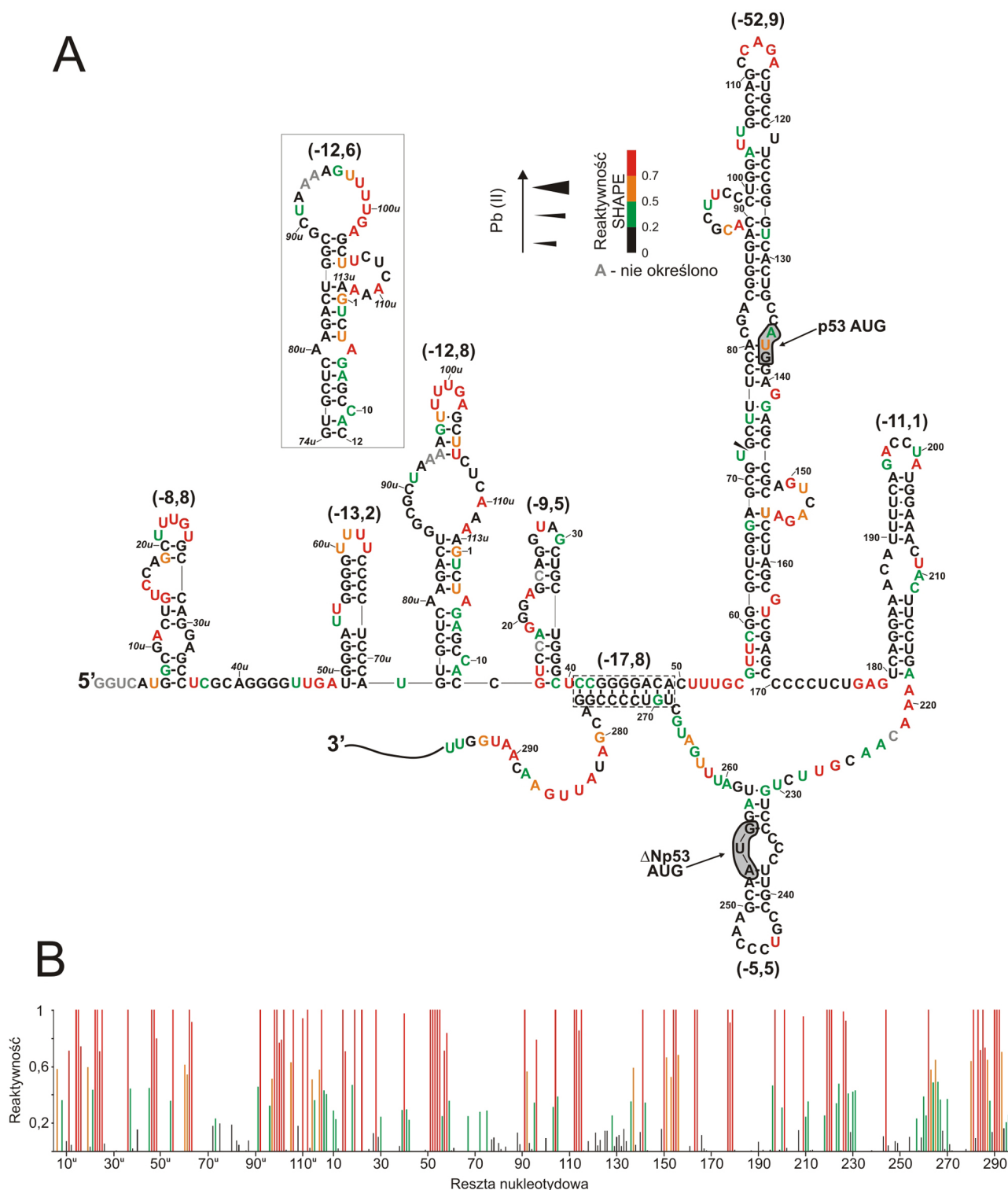
Rysunek 79. Rozdział elektroforetyczny RNA P0-554 w warunkach natywnych, w zależności od stężenia chlorku magnezu (2,5, 5 i 10 mM). K – reakcja kontrolna.

Mapowanie struktury RNA P0-554 przeprowadziłem za pomocą techniki SHAPE. W RNA P0-554 region C40–G292 przyjmuje taką samą strukturę jak w RNA P1-554 (Rys. 32 i 80). Jedyne istotne różnice, jakie odnotowałem to osłabienie modyfikacji reszt U128–A130 oraz brak reaktywności reszt G166 i A167. W porównaniu do RNA P1-554 brak też słabych modyfikacji spinki G231–U258 w pętli apikalnej oraz reszty urydynowej kodonu AUG białka Δ Np53 (Rys. 80 i 81).

Struktura drugorzędowa regionu P0-P1 w RNA P0-554 różni się nieco od jego aranżacji w RNA P0- Δ Np53 (Rys. 80). Niestety dane doświadczalne uzyskane dla spinki G74^u–C12 nie pozwoliły mi na jednoznaczne wskazanie jej struktury. Rozkład modyfikacji tego motywu w RNA P0-554 i P0- Δ Np53 jest bardzo podobny za wyjątkiem regionu helikalnego, gdzie w RNA P0-554 silniejszą reaktywnością cechują się reszty U105^u, G1 oraz U4. Oznacza to, że w obydwu cząsteczkach spinka ta może mieć podobną strukturę drugorzędową.

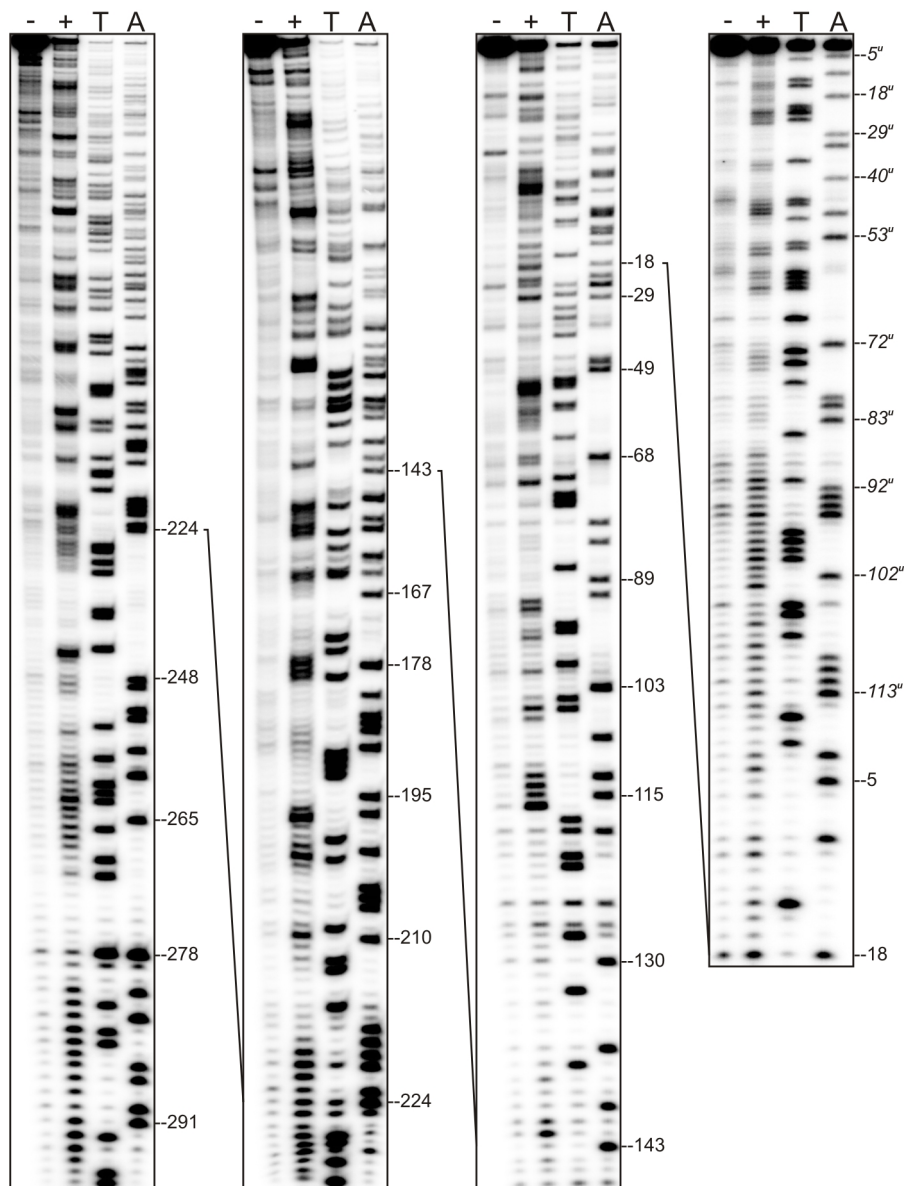
Struktura spinki G7^u–C35^u jest zgodna z rozkładem modyfikacji za pomocą NMIA. Dochodzi do silnej modyfikacji reszt nukleotydowych pętli apikalnej oraz asymetrycznego wypełnienia U15^u–A18^u (Rys. 80 i 81). W mniejszym stopniu, reaktywne są reszty obustronnego wypełnienia, zawierające tandemowe niesparowanie typu G-A, gdzie tylko reszta A11^u wykazuje dostępność do modyfikacji. Na trzon spinki składa się osiem par zasad, z czego aż siedem to pary G-C. Parametr ΔG motywu przewidziany na -8,8 kcal/mol pozwala jednak sądzić o jego niewielkiej stabilności. Reszty G38^u–G44^u są niereaktywne wobec NMIA, co sugeruje ich zaangażowanie w

tworzenie regionu dwuniciowego, być może z dystalną częścią RNA P0-554.



Rysunek 80. Struktura drugorzędowa RNA P0-554. A – model struktury drugorzędowej RNA P0-554 zaproponowany w oparciu o wyniki mapowania za pomocą techniki SHAPE. Kolor reszt nukleotydowych odpowiada sile ich reaktywności względem NMIA, zgodnie z legendą. W nawiasach podano wartość parametru ΔG poszczególnych motywów strukturalnych wyrażoną w kcal/mol. B – wykres reaktywności reszt nukleotydowych w zależności od pozycji w RNA P0-554. Kolor słupków jest zgodny z legendą na panelu A.

W RNA P0-554 struktura spinki U49^u-A72^u pozostaje niezmieniona. Zostały zachowane wszystkie charakterystyczne modyfikacje reszt urydynowych zlokalizowanych w pętli apikalnej oraz jednostronnym wypętleniu (Rys. 80 i 81). Oznacza to, że jest to jedyny wspólny element dla wszystkich fragmentów mRNA p53 posiadających region międzypromotorowy.



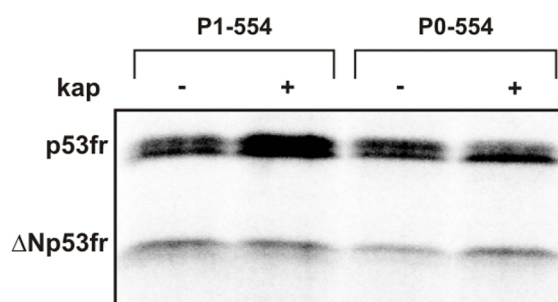
Rysunek 81. Autoradiogramy przedstawiają wyniki mapowania struktury drugorzędowej RNA P0-554 za pomocą techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja chemiczna NMIA, A, T – reakcje sekwencjonowania. Na rysunku zaznaczono niektóre reszty adenozynowe.

3.4.3. Udział regionu międzypromotorowego w translacji białka p53 i izoformy Δ Np53

Dotychczas w literaturze pojawiło się kilka doniesień o negatywnym wpływie regionu międzypromotorowego na translację białka p53, przypuszczalnie w wyniku tworzenia się stabilnej struktury drugorzędowej [45, 47]. Jednakże przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że region ten budują elementy strukturalne o dość niskiej przewidywanej stabilności

termodynamicznej, w porównaniu do chociażby spinki G56–C169. Ponadto, niektóre motywy przyjmują odmienną aranżację w zależności od kontekstu sekwencyjnego w jakim się znajdują, co dodatkowo sugeruje możliwość potencjalnych zmian w strukturze. Przeprowadzone do tej pory badania nad rolą funkcjonalną regionu P0–P1 oparte były na konstrukcjach zawierających kontekst sekwencyjny niewystarczający do zawiązania wszystkich motywów strukturalnych w regionie terminalnym 5' oraz monitorowaniu jego udziału tylko w ekspresji pełnej długości białka p53 [45, 47]. Z tego powodu przeprowadziłem reakcję translacji *in vitro* RNA P0-554, w celu zbadania udziału regionu P0–P1 w translacji nie tylko białka p53, ale też izoformy Δ Np53. Podobnie jak dla RNA P1-554, wykorzystałem do tego celu lizat z retikulocytów królika, w którym monitorowałem poziom translacji białka p53fr i Δ Np53fr powstających z RNA P0-554. Ponadto, RNA P1-554 posłużył za punkt odniesienia do poczynionych obserwacji.

Z RNA P0-554 pozbawionego kapu białko p53fr oraz Δ Np53fr powstają w stosunku około 3:1, natomiast z cząsteczki kapowanej, stosunek ten wyniósł około 2:1 (Rys. 82). Porównując poziom translacji z kodonu AUG1 okazało się, że niezależnie od obecności kapu pozostał on na tym samym poziomie. Jest to odmienny efekt niż dla RNA P1-554, gdzie z kapowanego RNA translacja z AUG1 uległa znaczącej stymulacji (Rys. 58). Sugeruje to, że translacja RNA P0-554, zwłaszcza z kodonu inicjacyjnego dla białka p53, może być w mniejszym stopniu zależna od kapu niż w przypadku RNA P1-554. Z kodonu AUG2 zaobserwowałem jedynie niewielki wzrost translacji z cząsteczki zawierającej kap (Rys. 82).

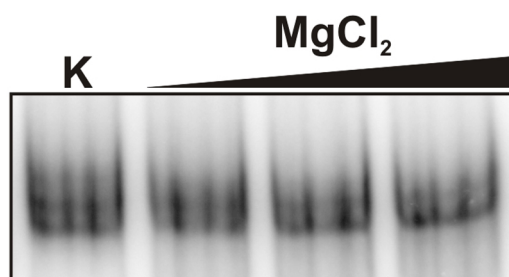


Rysunek 82. Rozdział produktów reakcji translacji *in vitro* RNA P1-554 i P0-554 w warunkach denaturujących.

3.4.4. Wpływ obecności intronu 2 na strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53

Podobnie jak w przypadku innych badanych RNA, na początku przeprowadziłem analizę migracji RNA P1-int2 w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących. Jako czynnik zmienny zastosowałem różne stężenie chlorku magnezu. Przed naniesieniem do kieszonek w żelu, RNA P1-int2 poddawano renaturacji w sposób analogiczny do innych cząsteczek. RNA P1-int2 cechuje prawdopodobnie heterogenność strukturalna, ponieważ cząsteczka ta migruje w postaci

przynajmniej dwóch prążków (Rys. 83). Ponadto, rozmyta postać prążków wskazuje, że dochodzi do przechodzenia jednej formy w drugą. Z kolei, obecność jonów Mg^{2+} nie ma większego wpływu na sposób migracji RNA P1-int2.

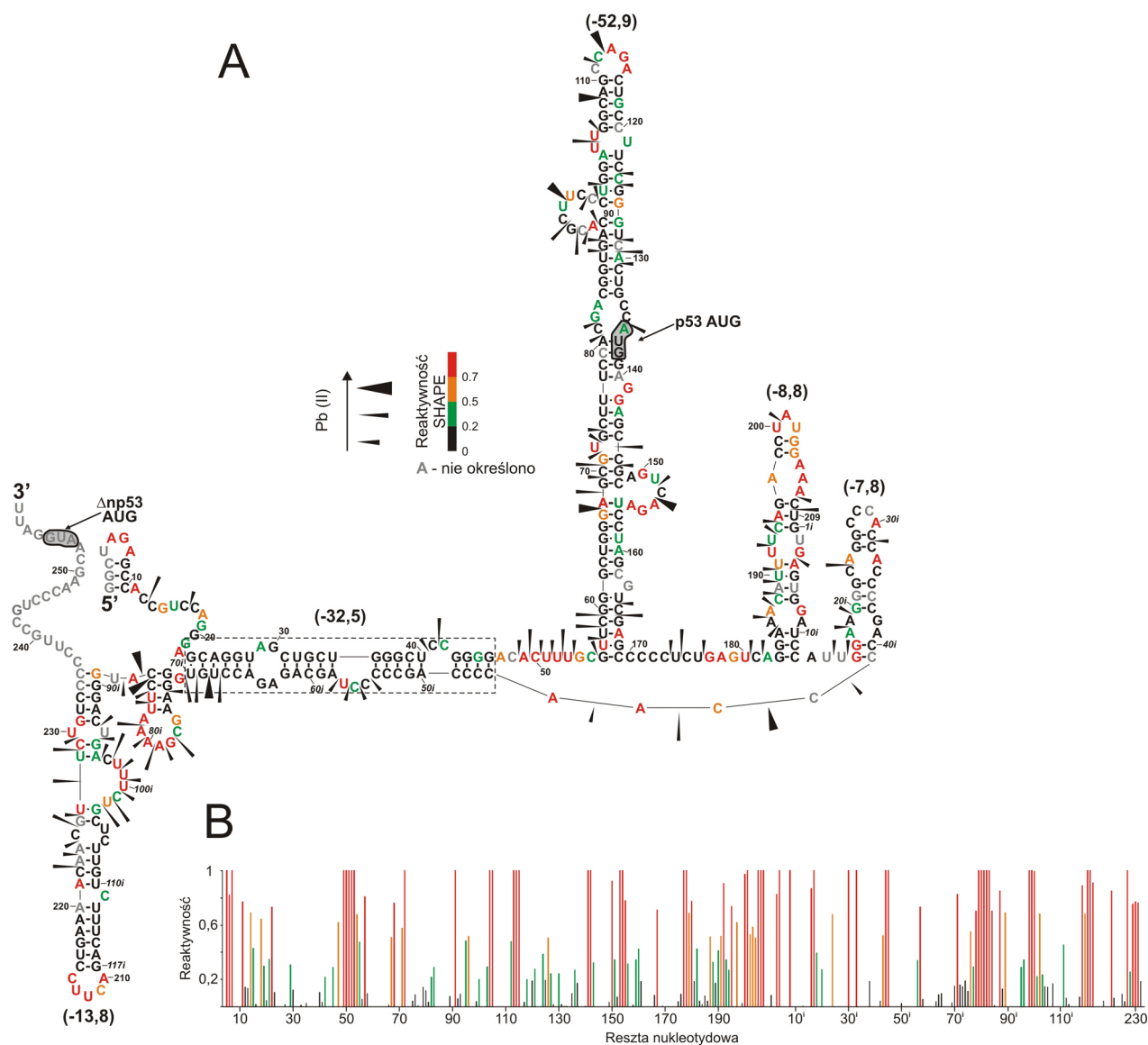


Rysunek 83. Analiza migracji RNA P1-int2 w warunkach natywnych, w zależności od stężenia chlorku magnezu (2,5, 5 i 10 mM). K – reakcja kontrolna.

W proponowanej strukturze RNA P1-int2, pomimo obecności intronu 2, zachowana została struktura drugorzędowa spinki G56–C169 (Rys. 84). Potwierdzają to modyfikacje NMIA jednonukleotydocowych wybrzuszeń U72 i G141, reszt nukleotydocowych pętli apikalnej oraz dwóch wielonukleotydocowych wypętleń (w szczególności regionu A149–A155) (Rys. 85). Wysoki poziom tła w reakcji kontrolnej uniemożliwił określenie reaktywności dla wybrzuszenia G163. Podobnie jak w przypadku RNA P1-554 i H56-169, słabej modyfikacji ulegają reszty wchodzące w skład pętli wewnętrznej, leżącej w sąsiedztwie kodonu inicjacyjnego białka p53 (Rys. 84). Jediną istotną różnicą w stosunku do innych badanych cząsteczek RNA, (P0- Δ Np53, P1-554, P1- Δ Np53) jest silna reaktywność reszty A167 leżącej u podstawy spinki G56–C169. Rozkład cięć indukowanych jonami Pb^{2+} również potwierdza obecność spinki G56–C169. Obserwuję charakterystyczne cięcia wielonukleotydocowych wypętleń A91–C98 oraz A149–A155, pętli apikalnej oraz okolicy kodonu inicjacyjnego dla białka p53 (Rys. 84 i 85). Z drugiej strony dochodzi do silniejszego cięcia w regionie G67–G73 oraz w pozycji C108 w apikalnej części spinki. Pomimo tych różnic, otrzymane wyniki pozwalają z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że spinka G56–C169 zostaje zachowana w RNA P1-int2.

Sekwencja intronu 2 w RNA P1-int2 prowadzi do rozpadu spinki U180–A218 i jednocześnie utworzenia 4 motywów strukturalnych typu spinki, które formują reszty G183–C12ⁱ, G16ⁱ–C41ⁱ, G72ⁱ–C86ⁱ i G89ⁱ–C235 (Rys. 84). Dwie z nich, G183–C12ⁱ oraz G89ⁱ–C235, powstają w wyniku parowania reszt intronu 2 z częścią kodującą mRNA p53, podczas gdy pozostałe utworzone zostają wyłącznie z sekwencji intronu 2.

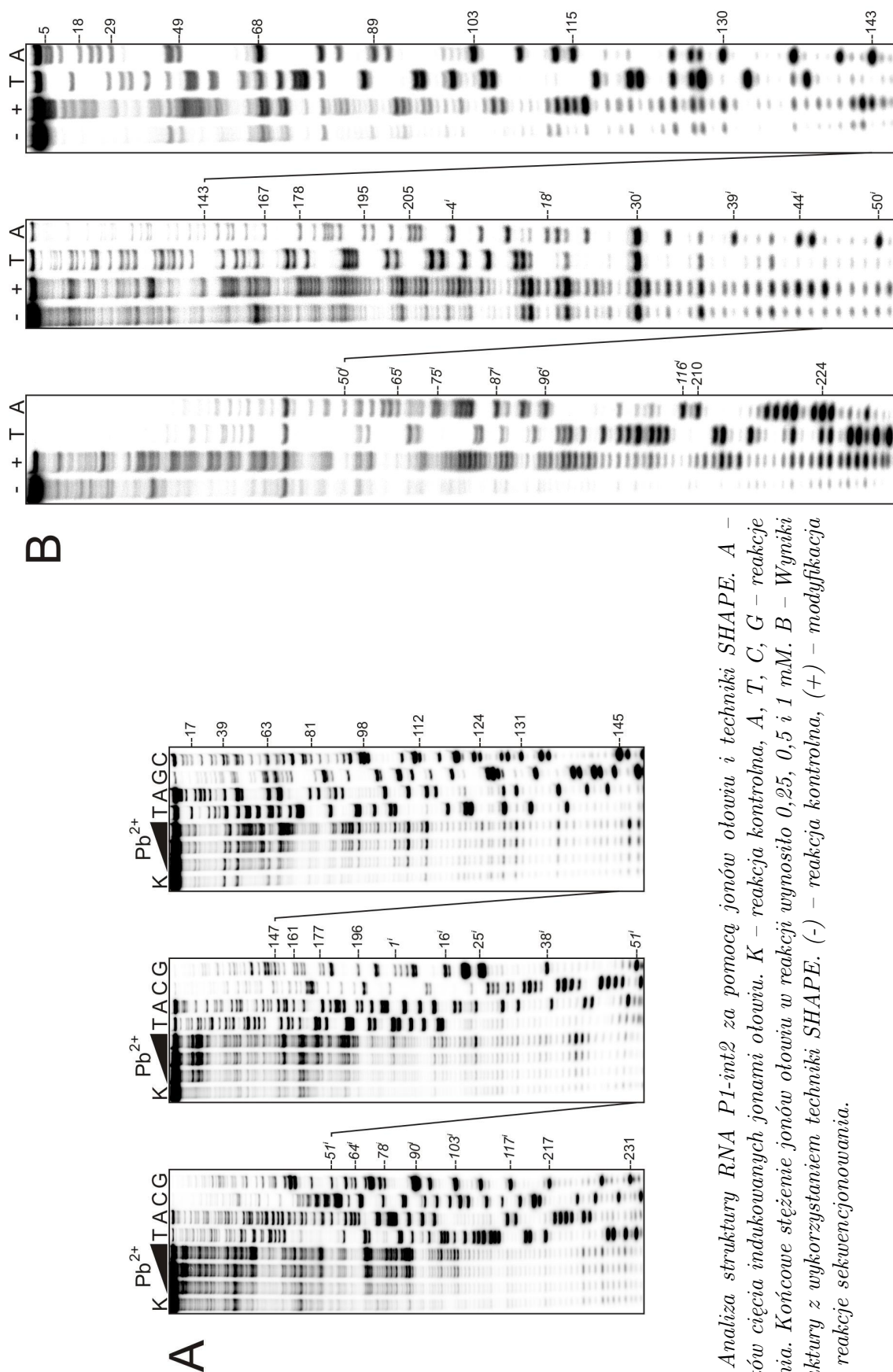
Początkowe reszty intronu 2 (G1ⁱ–C12ⁱ) wchodzi w oddziaływanie z resztami części kodującej (G183–C194), w wyniku czego tworzy się struktura typu spinki obejmująca reszty G183–C12ⁱ (Rys. 84). Motyw ten posiada dwa tandemowe niesparowania, asymetryczną pętlę wewnętrzną oraz trójnukleotydocową pętlę apikalną. Reszty, zwłaszcza purynowe, wchodzące w skład tandemowych



Rysunek 84. Struktura drugorzędowa RNA P1-int2. A – proponowany model struktury drugorzędowej RNA P1-int2 zaproponowany w oparciu o mapowanie za pomocą jonów ołowiu i techniki SHAPE. W nawiasach podano wartość parametru ΔG poszczególnych motywów wyrażoną w kcal/mol. B – wykres reaktywności reszt nukleotydyowych wobec NMIA w zależności od ich pozycji w RNA P1-int2. Kolor słupków jest zgodny z legendą na panelu A.

niesparowań są dość dobrze zmapowane za pomocą techniki SHAPE. Silna reaktywność części apikalnej spinki (A197–A207) wskazuje, że region ten być może istnieje w formie jednoniciowej (Rys. 85). W takiej sytuacji nie doszłoby do sparowania reszt C198 i C199 z G203 i G204, a tym samym zwiększeniu do 11 reszt nukleotydyowych uległaby pętla apikalna. Takiej aranżacji nie popiera jednak to, że pomimo obecności kilku reszt pirymidynowych, w regionie tym obserwujemy tylko jedno słabe cięcie indukowane jonami ołowiu (Rys. 84 i 85). Spinka G183–C12ⁱ wydaje się być termodynamicznie słabym elementem RNA P1-int2. Potwierdzają to liczne modyfikacje i cięcia reszt wchodzących w skład jej trzonu oraz wartość parametru ΔG , która dla izolowanego motywu wynosi tylko -8,8 kcal/mol.

3.4. Struktura drugorzędowa fragmentów mRNA p53 rozpoczynających się od promotora transkrypcyjnego P0 oraz posiadających zachowaną sekwencję intronu 2



Rysunek 85. Analiza struktury RNA P1-int2 za pomocą jonów ołowiu i techniki SHAPE. A – rozdział produktów cięcia indukowanych jonami ołowiu. K – reakcja kontrolna, A, T, C, G – reakcje sekwencjonowania. Końcowe stężenie jonów ołowiu w reakcji wynosiło 0,25, 0,5 i 1 mM. B – Wyniki mapowania struktury z wykorzystaniem techniki SHAPE. (-) – reakcja kontrolna, (+) – modyfikacja NMIA, T i A – reakcje sekwencjonowania.

Reszty G16ⁱ–C41ⁱ tworzą strukturę spinki, która powstaje wyłącznie z sekwencji intronu 2 (Rys. 84). Posiada dwa tandemowe niesparowania oraz czteronukleotydomową pętlę apikalną. Na uwagę zasługuje to, że jej trzon budują wyłącznie pary typu G-C, jednak stabilność termodynamiczna tego motywu jest relatywnie niska ($\Delta G = -7,8$ kcal/mol). Silna reaktywność reszt G16ⁱ oraz G17ⁱ może sugerować, że w rzeczywistości leżą one w regionie jednoniciowym. Silne tło w reakcji kontrolnej w pozycji reszty C41ⁱ oraz dodatkowo U14ⁱ, U15ⁱ i C42ⁱ uniemożliwiło jednoznaczne rozstrzygnięcie tej kwestii.

Leżące poniżej reszty C46ⁱ–U70ⁱ parują z regionem niekodującym 5' mRNA p53 (reszty G23–G46). W wyniku tego dochodzi do utworzenia regionu dwuniciowego, zawierającego liczne pary typu G-C, dla którego wartość parametru ΔG wynosi aż $-32,5$ kcal/mol (Rys. 84). W jego obrębie znajdują się krótkie fragmenty jednoniciowe w postaci wypętleń, których występowanie potwierdzają szczególnie cięcia indukowane za pomocą jonów ołowiu.

Kolejne reszty intronu 2 organizują się w dwie struktury spinkowe (G72ⁱ–C86ⁱ oraz G89ⁱ–C235) (Rys. 84). Obecność pierwszej z nich potwierdzona jest zarówno za pomocą techniki SHAPE jak i cięć indukowanych jonami ołowiu. Dotyczy to siedmionukleotydomowej pętli apikalnej, której wszystkie reszty wykazują reaktywność wobec NMIA. Dodatkowo, szereg z nich cechuje się także podatnością na cięcia jonami ołowiu pomimo tego, że są to w większości reszty purynowe (Rys. 85). Z kolei, spinka G89ⁱ–C235 została utworzona w wyniku parowania dystalnej części intronu 2 (reszty G89ⁱ–G117ⁱ) oraz fragmentu sekwencji kodującej mRNA p53 (C215–C235) (Rys. 84). Proponowana struktura tego motywu pozostaje w zgodzie z wynikami doświadczalnymi. Reaktywnością wobec NMIA cechuje się sześcionukleotydomowe wypętlecie C97ⁱ–U102ⁱ oraz pięcionukleotydomowa pętla apikalna. Region C97ⁱ–U102ⁱ jest również rozpoznawany przez jony ołowiu, jednakże brak cięć w pętli apikalnej, pomimo tego, że zawiera aż cztery reszty pirymidynowe (Rys. 85). Cięcia jonami ołowiu obserwuje też w odcinku sekwencji C222–C229. Ich obecność najprawdopodobniej spowodowana jest sąsiedztwem wielonukleotydomowego wypętlecia oraz licznymi parami typu A-U i G-U.

W RNA P1-int2 zlokalizowane są 3 dłuższe regiony jednoniciowe, oddzielające struktury typu spinki: A47–C55, C170–A182 oraz C42ⁱ–A45ⁱ (Rys. 84). Wszystkie są dobrze zmapowane za pomocą techniki SHAPE i jonów ołowiu, poza resztami C170–U176, które podobnie jak w innych analizowanych fragmentach mRNA p53 (RNA P1- Δ Np53, P1-554, P0- Δ Np53) wykazują brak reaktywności wobec NMIA, a dodatkowo osłabione cięcia indukowane jonami ołowiu.

3.4.5. Dyskusja uzyskanych wyników

Jednym z czynników wpływających na syntezę białek są alternatywne regiony niekodujące 5'. Powstają one w wyniku aktywności dodatkowych promotorów transkrypcyjnych lub alternatywnego składania pre-mRNA [2]. Prowadzi to do wydłużenia sekwencji regionu niekodującego 5', czego istotnym skutkiem może być powstanie stabilnych struktur drugorzędowych. Mogą one wpływać na poziom translacji nie tylko poprzez spowolnienie migracji kompleksu inicjacyjnego, ale też wskutek tworzenia miejsc oddziaływania istotnych czynników regulatorowych [2, 199]. Z tego względu, celem przedstawionej powyżej części mojej pracy badawczej, było określenie struktury drugorzędowej wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53, powstających w wyniku inicjacji transkrypcji z promotora P0 oraz zachowania sekwencji intronu 2 wskutek alternatywnego składania pre-mRNA.

3.4.5.1. Struktura regionu międzypromotorowego mRNA p53

Wcześniejsze dane literaturowe sugerowały, że w rezultacie inicjacji transkrypcji z promotora P0 genu *p53* dochodzi do utworzenia stabilnej struktury drugorzędowej w regionie terminalnym 5', która silnie obniża ekspresję białka p53 [45, 47]. Z moich badań, po raz pierwszy opisujących aranżację struktury tego regionu wynika, że tego typu element nie powstaje. Inicjacja transkrypcji z promotora P0 wydłuża region niekodujący 5' o około 115 reszt nukleotydowych. Ma to bardzo istotne znaczenie dla struktury izolowanego 5'UTR reprezentowanego przez RNA P0-p53. W cząsteczce tej dochodzi do oddziaływania sekwencji międzypromotorowej z odcinkiem sekwencji zlokalizowanym poniżej promotora P1. Powstaje stabilny region dwuniciowy, złożony z reszt G14^u-G41^u oraz C31-C63, dla którego wartość parametru ΔG wynosi aż -31,1 kcal/mol, a więc jest to najbardziej stabilny termodynamicznie element struktury RNA P0-p53 (Rys. 75). Być może ma on wpływ na stabilność cząsteczki, ponieważ analiza migracji w warunkach natywnych wykazała obecność pojedynczego, wyraźnego prążka w żelu, niezależnie od stężenia MgCl₂ (Rys. 74). Stabilny termodynamicznie region dwuniciowy w RNA P0-p53 sprawia, że struktura drugorzędowa poniżej promotora P1 zostaje istotnie zmieniona, a elementami wspólnymi dla RNA P0-p53 i P1-p53 są tylko spinki G65-C98 i C99-G126 (Rys. 29 i 75). Co więcej, spinka C99-G126 jest jedynym wspólnym motywem struktury drugorzędowej, zarówno dla cząsteczek reprezentujących izolowany region niekodujący 5' (P0-p53 i P1-p53), jak i dłuższych fragmentów RNA zawierających część kodującą, gdzie stanowi apikalną część większego motywu, G56-C169 (Rys. 23, 27, 32). Sugeruje to, że fragment ten może odgrywać istotną rolę w strukturze i/lub funkcji regionu terminalnego 5'.

Wydłużenie regionu niekodującego 5' o sekwencję do kodonu inicjacyjnego dla izoformy $\Delta Np53$ w cząsteczkach RNA P0- $\Delta Np53$ i P0-554 wprowadza bardzo istotne zmiany w strukturze regionu międzypromotorowego. Analiza struktury drugorzędowej tych RNA wskazała dwie istotne obserwacje. Pierwszą z nich jest to, że sekwencja między promotorami P0-P1 związa się

niemal niezależnie od reszty cząsteczki, przyjmując postać kilku motywów typu spinki (Rys. 77 i 80). Druga obserwacja dotyczy tego, że struktura regionu poniżej promotora P1 nie uległa zmianie.

Sekwencja międzypromotorowa w dłuższych fragmentach mRNA p53 przyjmuje strukturę kilku motywów typu spinki o dość niskiej przewidywanej stabilności termodynamicznej. Wynik ten nie potwierdza dotychczasowych sugestii jakoby w regionie tym miały istnieć stabilne motywy struktury drugorzędowej [45, 47]. Elementem wykazującym największą stabilność termodynamiczną ($\Delta G = -13,2$ kcal/mol) jest najmniejsza spinka U49^u-A72^u (Rys. 77). Ponadto, jest to jedyny wspólny element struktury, który znajduje się we wszystkich zbadanych cząsteczkach RNA, zawierających sekwencję międzypromotorową (P0-p53, P0- Δ Np53 i P0-554) (Rys. 75, 77, 80). Możliwe więc, że spinka ta jest ważnym elementem struktury tego regionu, pełniąc potencjalną rolę np. w oddziaływaniu z czynnikami białkowymi. O tym, że region P0-P1 nie jest silnie ustrukturalizowany świadczy też nie w pełni zdefiniowana struktura spinki G74^u-C12, która może potencjalnie przyjmować alternatywną strukturę drugorzędową w części apikalnej, obejmującej reszty G86^u-A112^u (Rys. 77).

Jak już wspomniałem, bardzo rzadko podejmowane są badania mapowania struktury drugorzędowej regionów niekodujących mRNA. Jednym z niewielu wyjątków jest region 5'UTR mRNA kodującego supresor nowotworzenia BRCA1, dla którego struktura dwóch wariantów wynikających z aktywności dwóch promotorów transkrypcyjnych, została określona doświadczalnie w naszym Instytucie [150]. W przypadku mRNA BRCA1 wydłużenie regionu 5'UTR w wyniku inicjacji transkrypcji z promotora położonego powyżej prowadzi do bardzo istotnych rearanżacji struktury w całym regionie niekodującym 5'. Dochodzi do utworzenia nowych, bardziej stabilnych motywów strukturalnych, w porównaniu do krótszego wariantu 5'UTR [150]. Autorzy wykazali ponadto, że dłuższy region niekodujący 5' prowadzi do 10-krotnie niższej efektywności translacji genu reporterowego, w porównaniu do krótszego wariantu. W RNA P0- Δ Np53 i P0-554 posiadających sekwencję międzypromotorową nie dochodzi do rearanżacji struktury, gdyż zachowane są charakterystyczne motywy strukturalne poniżej promotora P1, spinki G56-C169 i U180-A218 oraz dwuniciowy segment utworzony przez część 5' i 3' regionu terminalnego 5' (Rys. 77 i 80). Oznacza to, że oddziaływanie między sekwencją poniżej promotora P1, a fragmentem części kodującej (czego wynikiem jest m.in. powstanie spinki G56-C169) jest silniejsze niż potencjalny wpływ sekwencji międzypromotorowej na globalną strukturę regionu terminalnego 5'. Region ten można zatem podzielić na dwie domeny, które związają się niezależnie. Pierwszą z nich jest sekwencja zawarta między promotorami P0-P1, a drugą motywy strukturalne utworzone poniżej promotora P1. Być może takie zróżnicowanie struktury idzie także w parze z odmienną rolą, jaką regiony te mogą pełnić w regulacji ekspresji białka p53 i izoformy Δ Np53.

3.4.5.2. Wpływ sekwencji intronu 2 na strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53

Z najnowszych analiz genomu człowieka wynika, że nawet 95% genów może ulegać alternatywnemu składaniu dzięki występowaniu elementów regulatorowych w sekwencjach egzonów i intronów [200]. Z genu *p53* powstaje przynajmniej kilkanaście izoform mRNA [31, 42, 50]. Jedną z nich jest mRNA p53I2, zawierający zachowaną sekwencję intronu 2 (Rys. 10) [20]. Obecność intronu 2 może mieć nie tylko istotny wpływ na strukturę regionu terminalnego 5', ale także potencjalne implikacje funkcjonalne. Z tego względu interesujące było określenie struktury drugorzędowej RNA P1-int2.

RNA P1-int2 zawiera sekwencję intronu 2 o długości 117 reszt nukleotydowych, którego obecność wprowadza istotne zmiany w strukturze drugorzędowej. Zgodnie z oczekiwaniem nie powstaje spinka U180–A218, ponieważ granica 3' egzonu 2 i granica 5' egzonu 3, pomiędzy którymi leży intron 2, znajduje się w sekwencji wspomnianej spinki. Zamiast tego tworzą się dwa motywy typu spinki G183–C12ⁱ oraz G16ⁱ–C41ⁱ, relatywnie mało stabilne termodynamicznie, co potwierdza fakt, że szczególnie w pierwszej z nich reaktywnością cechują się także reszty zlokalizowane w regionach przewidzianych jako dwuniciowe (Rys. 84). Sugeruje to możliwość potencjalnych rearanżacji struktury tego regionu, co mogłoby odpowiadać za heterogenność RNA P1-int2 podczas elektroforezy w warunkach natywnych (Rys. 83).

Seqwencja intronu 2 w RNA P1-int2 nie prowadzi tylko do rozpadu motywów strukturalnych, ale też do utworzenia nowych oddziaływań. Takim przykładem jest region dwuniciowy, który formuje się między fragmentami regionu niekodującego 5' (reszty G23–G46) i intronu 2 (C46ⁱ–U70ⁱ) (Rys. 84). Wprowadza to drugi obok spinki G56–C169, stabilny motyw strukturalny ($\Delta G = -32,5$ kcal/mol). Ciekawe jest to, że sekwencja regionu 5'UTR zaangażowana w oddziaływanie z intronem 2 pokrywa się częściowo z sekwencją oddziałującą z fragmentem sekwencji kodującej w RNA P1- Δ Np53 i P1-554 (Rys. 23, 32, 84). Podobnie jak w tych cząsteczkach, także i w RNA P1-int2 dochodzi do strukturalnego „odizolowania” regionu terminalnego 5' mRNA p53 od reszty transkryptu. Potencjalnie, może to mieć znaczenie dla funkcjonowania tego regionu jako np. elementu IRES. Pomimo obecności intronu 2 w RNA P1-int2 jeden motyw strukturalny pozostaje w niezmienionej formie. Jest nim spinka G56–C169 (Rys. 84). Chociaż obserwuję w niej pewne zmiany, zwłaszcza w rozkładzie cięć indukowanych jonami ołowiu, to zachowanie tego elementu struktury w RNA P1-int2 świadczy po raz kolejny o jego istotnej roli strukturalnej i funkcjonalnej.

3.4.5.3. Rola regionu międzypromotorowego w regulacji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53

Średnia długość regionów 5'UTR w ludzkich mRNA waha się między 125 a 210 reszt nukleotydowych [4]. Dłuższe regiony niekodujące 5' wpływają zazwyczaj hamująco na proces translacji, z uwagi na prawdopodobieństwo utworzenia stabilnych struktur drugorzędowych,

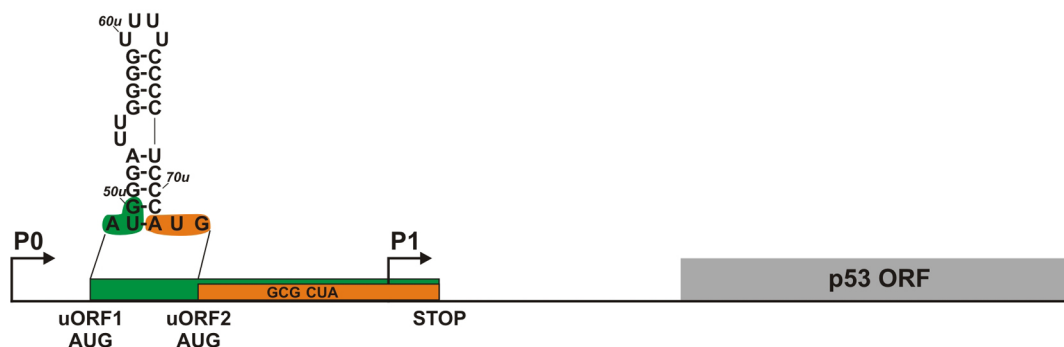
pojawienia się miejsc wiązania czynników białkowych czy też małych otwartych ramek odczytu leżących powyżej głównego kodonu inicjacyjnego [2]. Często dochodzi do współistnienia tych elementów, a ich synergistyczny wpływ może silnie zredukować syntezę białka.

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za zróżnicowanie długości regionu niekodującego 5' mRNA p53 jest wykorzystanie alternatywnego promotora transkrypcyjnego P0, który leży około 115 reszt nukleotydowych powyżej głównego miejsca inicjacji transkrypcji genu *p53* (Rys. 8). Obecność sekwencji międzypromotorowej, pomimo braku wpływu na strukturę drugorzędową elementów leżących poniżej, prowadzi do istotnych różnic w translacji, zwłaszcza białka p53. Otóż, inaczej niż w przypadku RNA P1-554, w RNA P0-554 dodanie kapu na końcu 5' nie ma praktycznie żadnego wpływu na poziom syntezy białka p53 (Rys. 82). W porównaniu do RNA P1-554 ma więc miejsce obniżony poziom translacji.

Przyczyną tego prawdopodobnie nie jest jedynie struktura drugorzędowa RNA. Sekwencja między promotorami P0–P1 nie przyjmuje bowiem stabilnej struktury drugorzędowej, a ponadto nie ma wpływu na aranżację motywów strukturalnych leżących poniżej (Rys. 77). Dane literaturowe wskazują, że wprowadzenie spinki, której wartość ΔG wynosi około -30 kcal/mol, w odległości 12 reszt nukleotydowych poniżej kapu bardzo silnie obniża poziom translacji *in vitro* [168]. Chociaż w RNA P0- $\Delta Np53$ i P0-554 dochodzi do utworzenia struktury typu spinki w odległości około ośmiu reszt nukleotydowych poniżej końca 5' transkryptu, to należy podkreślić, że jej wartość ΔG nie przekracza -10 kcal/mol. Oznacza to ponownie, że za obniżoną translację białka p53 z RNA P0-554, w stosunku do RNA P1-554, mogą odpowiadać inne czynniki niż struktura drugorzędowa.

Przyczyną niższej aktywności translacyjnej RNA P0-554 może być występowanie małych otwartych ramek odczytu leżących powyżej głównego kodonu inicjacyjnego (uORF). uORF kodują krótkie, kilkunastoaminokwasowe peptydy, a ich obecność w cząsteczkach mRNA zwykle obniża translację z głównego kodonu inicjacyjnego [4, 201]. Dzieje się tak, ponieważ kompleksy inicjacyjne, które tworzą się na końcu 5' mRNA docierają najpierw do kodonu inicjacyjnego uORF, zmniejszając tym samym pulę rybosomów zaangażowanych w translację z głównego kodonu inicjacyjnego [4, 201]. Na zdolność uORF do kontroli translacji wpływa szereg cech m.in.: ilość i długość, odległość i położenie w stosunku do głównego kodonu inicjacyjnego, a także kontekst sekwencji Kozak kodonu inicjacyjnego uORF [4, 201]. Badania wskazują, że uORF występują także częściej w mRNA czynników transkrypcyjnych, czynników wzrostu komórek oraz protoonkogenów [202]. Analiza sekwencji międzypromotorowej, którą przeprowadziłem wykazała, że w jej obrębie dochodzi teoretycznie do utworzenia dwóch uORF, które leżą powyżej kodonu inicjacyjnego dla białka p53. Pierwsza z nich rozpoczyna się od AUG w pozycji 48^u–50^u, natomiast

druga od AUG obejmującego reszty 72^u–72^u (Rys. 86).



Rysunek 86. Potencjalne uORF w sekwencji międzypromotorowej mRNA p53. Kolorem zielonym i pomarańczowym zaznaczono uORF1 i uORF2. Szczegółowy opis w tekście.

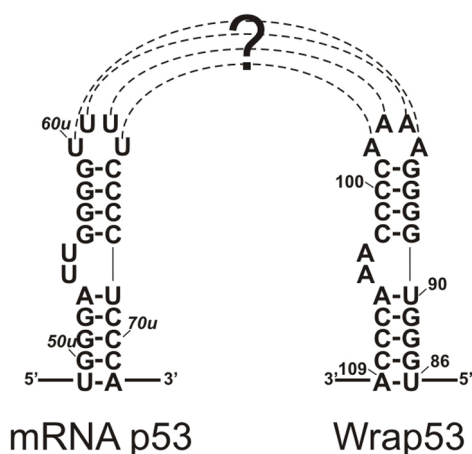
Obydwie ramki kończą się tym samym kodonem terminacyjnym UAG leżącym tuż poniżej promotora P1. Pierwsza uORF koduje peptyd o długości 23, a druga 15 reszt aminokwasowych, przy czym obydwie leżą w tej samej ramce odczytu, co białko p53 i izoforma $\Delta Np53$. Kontekst sekwencji kodonu inicjacyjnego ma bardzo istotne znaczenie dla poziomu syntezy białka [168]. Dla wydajnej translacji niezbędne jest aby w pozycji +4 znajdowała się reszta guanozynowa, a w pozycji -3 reszta purynowa. Jednakże w przypadku kodonów inicjacyjnych uORF zidentyfikowanych na podstawie analizy *in silico*, obserwuje się, że zaledwie połowa z nich spełnia te kryteria [4]. Pozostała część posiada tylko jedną z pozycji zgodną z wymogami sekwencji Kozak. Tak też jest w dłuższej uORF w sekwencji P0–P1, gdzie w pozycji +4 znajduje się reszta guanozynowa. W krótszej uORF pozycje +4 i -3 nie spełniają kryteriów sekwencji Kozak, ponieważ znajdują się w nich reszty pirymidynowe. Oznacza to, że jeśli obydwie uORF są funkcjonalne, to dłuższa powinna wykazywać większą aktywność translacyjną. Ciekawa jest też lokalizacja kodonów inicjacyjnych potencjalnych uORF, ponieważ w strukturze drugorzędowej leżą po stronie 5' i 3' spinki U49^u–A72^u, która jest powtarzającym się elementem struktury regionu międzypromotorowego. Sugeruje to możliwy udział tego motywu w regulacji translacji uORF.

Występowanie uORF może wpływać na poziom translacji z głównego kodonu inicjacyjnego na szereg różnych sposobów. Biorąc pod uwagę położenie potencjalnych uORF w mRNA p53 powyżej kodonu inicjacyjnego dla białka p53 oraz nieoptymalny kontekst sekwencji Kozak, możliwym mechanizmem ich wpływu na syntezę p53 jest reinicjacja translacji. W takiej sytuacji tylko część kompleksów inicjacyjnych zatrzymywałaby się na kodonach inicjacyjnych uORF. Pozostałe migrowałyby dalej, do napotkania kodonu dla białka p53. O takim mechanizmie może świadczyć wynik translacji *in vitro* RNA P0-554, gdyż niezależnie od obecności kapu, translacja z kodonu AUG dla białka p53 pozostawała na takim samym poziomie. Może to sugerować, że wskutek aktywnych translacyjnie uORF w regionie P0–P1, tylko określona pula kompleksów inicjacyjnych osiąga kodon AUG dla białka p53 na zasadzie mechanizmu reinicjacji. Czynnikiem wpływającym

na obniżoną aktywność translacyjną RNA P0-554 może być też to, że w sekwencji uORF znajdują się dwa leżące obok siebie rzadkie kodony dla alaniny i leucyny (Rys. 86). Rzadkie kodony doprowadzają często do spowolnienia migracji rybosomu z uwagi na mniejszą pulę cząsteczek tRNA, które je rozpoznają. Taką zależność zaobserwowano m.in. w przypadku uORF w mRNA kodujących koneksynę 41, a także białko GCN4 (ang. *general control protein 4*), gdzie dodatkowo rzadki kodon wpływa na wydajność reinicjacji translacji [203, 204]. Chociaż wyniki translacji *in vitro* wykazały, że poziom syntezy izoformy Δ Np53 z kapowanego RNA P0-554 jest na zbliżonym poziomie w stosunku do RNA P1-554, to niewykluczone, że potencjalne uORF regulują translację także i tego białka. Wówczas rola uORF obejmowałaby kontrolę stosunku syntezy p53 i Δ Np53. Mogłoby to mieć istotne znaczenie dla funkcjonowania białka p53, zważywszy na to, że izoforma Δ Np53 negatywnie wpływa na jego aktywność [20]. W literaturze istnieją przykłady takiej regulacji, chociażby dla czynników transkrypcyjnych C/EBP α i β (ang. *CCAAT enhancer binding protein α and β*) oraz SCL (ang. *stem cell leukemia*), gdzie aktywność translacyjna uORF odgrywa istotną rolę w syntezie i stosunku pełnej długości białka do skróconych z końca aminowego izoform [205, 206]. Hipoteza regulacji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53 za pomocą potencjalnych uORF jest moim zdaniem bardzo atrakcyjna i warta zbadania.

Rola regionu międzypromotorowego w regulacji translacji mRNA p53 może polegać też na możliwości wiązania ligandów. Dotychczas zidentyfikowano szereg białek oddziałujących z regionem terminalnym 5' mRNA p53, lecz tylko w jednym przypadku stosowano mRNA rozpoczynające się w miejscu inicjacji transkrypcji P0 [89]. Dotyczy to białka Pdcd4, którego wiązanie w regionie terminalnym 5' prowadzi do inhibicji zależnej od kapu translacji p53. Ciekawe jest to, że efekt inhibicji odnotowano tylko wtedy, gdy badano mRNA rozpoczynające się od promotora P0. Białko Pdcd4 nie miało wpływu na translację, gdy użyto transkryptów rozpoczynających się od promotora P1 [89]. Sugeruje to, że miejsce wiązania tego białka znajduje się w sekwencji międzypromotorowej. Chociaż sposób, w jaki wiązanie białka Pdcd4 prowadzi do inhibicji translacji oraz dokładne miejsce wiązania nie są znane, to moim zdaniem, motywem zaangażowanym w to oddziaływanie mogłaby być spinka U49^u-A72^u występująca we wszystkich przeanalizowanych cząsteczkach zawierających region P0-P1. Oddziaływanie białek z małymi motywami typu spinki w cząsteczkach mRNA zaobserwowano już wielokrotnie. Przykładem może być element odpowiedzi na jony żelaza, IRE (ang. *iron responsive element*) w mRNA ferrytyny oraz struktura typu spinki w mRNA syntazy tymidylanowej [207, 208]. Z obydwoma motywami oddziałują odpowiednio białko IRP (ang. *iron response protein*) i syntaza tymidylanowa, co ma istotne znaczenie w translacji. Ponadto, elementy te wykazują zachowawczość sekwencji i struktury u różnych organizmów. Analiza porównawcza sekwencji genu *p53* u człowieka, świnki morskiej, chomika i myszy wykazała, że jest to jeden z najbardziej zachowawczych fragmentów regionu międzypromotorowego [209]. Świadczy to po raz kolejny o jego istotnej roli funkcjonalnej.

Przykładem zaangażowania regionu międzypromotorowego w regulację ekspresji mRNA p53 może być oddziaływanie z antysensownym transkrypcyjnym Wrap53 [90]. Wiązanie tego RNA do regionu niekodującego 5' mRNA p53 wpływa stymulująco na translację białka p53. Chociaż nie poznano mechanizmu oddziaływania RNA Wrap53 z mRNA p53 to ciekawe wydaje się przedyskutowanie tej możliwości w kontekście wyników doświadczalnych jakie otrzymałem analizując strukturę drugorzędową regionu P0–P1. W zależności od tego, z którego promotora transkrypcyjnego rozpocznie się synteza mRNA p53, RNA Wrap53 wykazuje komplementarność z regionem niekodującym 5' na przestrzeni 44 (inicjacja transkrypcji z promotora P1) lub 157 reszt nukleotydowych (inicjacja transkrypcji z promotora P0) (Rys. 18). Większość sekwencji, która wchodzi w oddziaływanie z Wrap53 leży zatem między promotorami P0 i P1. Z reguły inicjacja oddziaływania między dwoma cząsteczkami RNA, prowadząca do powstania regionu dwuniciowego zachodzi w ściśle określonym regionie. Tak na przykład tworzą się oddziaływania typu kissing hairpins między regionami pętlowymi struktur spinkowych, które zaobserwowano np. w procesie dimeryzacji RNA wirusa HIV [210]. Pomimo tego, że regiony oddziaływania w RNA Wrap53 i 5'UTR mRNA p53 są całkowicie komplementarne, to utworzenie dupletu między tymi cząsteczkami powinno przypuszczalnie rozpoczynać się także w ściśle określonym miejscu. Takim regionem mogłaby być charakterystyczna struktura spinki U49^u–A72^u. Chociaż struktura drugorzędowa RNA Wrap53 nie została do tej pory określona, to przewidywania *in silico* które przeprowadziłem wykazały, że region oddziałujący z 5'UTR mRNA p53 może związać się niezależnie od reszty cząsteczki i występuje w niezminionej formie w wielu suboptymalnych strukturach drugorzędowych. Co więcej, sekwencja komplementarna do spinki U49^u–A72^u przyjmuje strukturę drugorzędową typu spinki także w RNA Wrap53. Możliwe, że jest to miejsce, w którym dochodzi do kontaktu Wrap53-mRNA p53 (Rys. 87).



Rysunek 87. Potencjalne miejsce inicjacji oddziaływania między RNA Wrap53 a mRNA p53.

4. Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki mapowania struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53, a także zbadano potencjalne mechanizmy inicjacji translacji białka p53 i jego izoformy Δ Np53. Ponadto, scharakteryzowano oddziaływanie białka wiążącego się z traktami polipirymidynowymi (PTB1) oraz jego wpływ na strukturę i funkcję regionu terminalnego 5' mRNA p53.

Okazuje się, że w formowaniu właściwej struktury regionu terminalnego 5' mRNA p53 kluczowe znaczenie ma oddziaływanie regionu niekodującego 5' z początkowym fragmentem części kodującej. W wyniku tego tworzy się silnie ustrukturalizowana domena typu spinki, G56–C169, w której zlokalizowany jest kodon inicjacyjny białka p53. Wykazano, że struktura drugorzędowa tego elementu oraz drugiej spinki, U180–A218, zachowana jest w dłuższych fragmentach, a także pełnej długości mRNA, co sugeruje ważną rolę tego regionu w regulacji translacji białka p53 i izoformy Δ Np53. Wyniki wskazują, że elementy struktury regionu terminalnego 5', takie jak okolica kodonu inicjacyjnego białka p53 oraz apikalna część spinki U180 – A218 posiadają relatywnie mniejszą stabilność termodynamiczną, co może mieć znaczenie w oddziaływaniu z ligandami. O istotnej roli regionu terminalnego 5' mRNA p53 świadczy również wysoka zachowawczość sekwencji tego regionu, określona na podstawie wyników przeprowadzonej analizy SSCP.

Analiza funkcjonalna przebiegu inicjacji translacji p53 i Δ Np53 *in vitro* wykazała, że translacja białka p53 jest głównie zależna od kapu. Za tym mechanizmem inicjacji przemawia stymulacja translacji przez strukturę kapu na końcu 5', a ponadto silna inhibicja tego procesu w sytuacji, gdy badany RNA zawierał stabilną strukturę typu spinki na końcu 5' lub gdy reakcję prowadzono w obecności analogu kapu. Z kolei, synteza izoformy Δ Np53 wykazuje cechy inicjacji wewnętrznej z wykorzystaniem elementu IRES, ponieważ zarówno obecność kapu jak i stabilnej struktury typu spinki wprowadzonej na końcu 5' modelowego mRNA nie miały wpływu na efektywność translacji. Dodatkowo, w obecności analogu kapu poziom izoformy Δ Np53 gwałtownie wzrastał.

Badanie struktury fragmentów mRNA p53 powstających w wyniku transkrypcji z alternatywnego regionu promotorowego P0, a także w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA wykazało, że w pierwszym przypadku, fragment sekwencji międzypromotorowej nie wpływa na strukturę motywów leżących poniżej, a sam przyjmuje postać kilku elementów typu spinki o przypuszczalnie niskiej stabilności termodynamicznej. Z kolei, zachowanie sekwencji intronu 2 w transkrypcie prowadzi do rozpadu niektórych, bardzo istotnych motywów strukturalnych i

utworzenia nowych, wynikających z oddziaływania regionu niekodującego 5' z sekwencją intronu.

Na podstawie analizy struktury RNA w kompleksie z białkiem PTB1 określono miejsce jego wiązania do mRNA p53, przy czym wydaje się, że PTB1 wiąże się w odmienny sposób do różnych fragmentów tej cząsteczki. Białko PTB1 wykazuje także zróżnicowane powinowactwo do fragmentów regionu terminalnego 5' mRNA p53, przy czym największym powinowactwem cechuje się wobec RNA P1-554. Wiązanie białka PTB1 do regionu terminalnego 5' mRNA p53 nie wywołuje istotnych zmian struktury drugorzędowej, jest kooperatywne i prowadzi do utworzenia kompleksów wyższego rzędu zawierających kilka kopii białka. Z kolei, obecność białka PTB1 w reakcji translacji *in vitro* prowadzi do inhibicji syntezy białka p53 i izoformy $\Delta Np53$, a efekt inhibicji koreluje z długością analizowanych fragmentów mRNA p53.

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 Accument BASIC (Fisher Scientific)

Wirówka 5804R (Eppendorf)

Wirówka 5415D (Eppendorf)

Wirówka próżniowa N 840.3 (Labort)

Cieplarka (Memmert)

Spektrofotometr UV/VIS NanoDrop (Thermo Scientific)

Licznik scyntylicyjny Microplate Counter 2450 (Perkin Elmer)

Zestaw do wizualizacji żeli UVP2000

Skaner radioaktywności Typhoon 8600 (Molecular Dynamics)

Skaner radioaktywności FLA-5100 (Fuji-Film)

Minifold-1 dot-blot system (Whatman)

Suszarka do żeli Gel Dryer 583 (Bio-Rad)

Pompa próżniowa (Laboport)

Komora laminarna aura mini (BioAir)

Zestaw do szybkiej chromatografii cieczowej ÄKTA-FPLC (GE Healthcare)

5.2. Odczynniki i materiały

Większość odczynników pochodziła z firm Sigma, Aldrich, Lab Empire, Invitrogen, Serva, Fluka lub BioRad. Nośnikowy RNA (drożdżowy totalny tRNA) oraz surowicza albumina wołowa pochodziły z firmy Roche, filtry strzykawkowe Milex GP oraz zestaw filtrów wirówkowych do zagęszczania białek z firmy Millipore. Analogi kapu ARCA (ang. *anti-reverse cap analog*) oraz

trimetylowany analog kapu m⁷G(5')ppp(5')G zakupiono w firmie Epicentre Biotechnologies. Membranę Protran BA85 zakupiono w firmie Whatman, natomiast membranę Hybond N+ i złoże Ni-NTA w firmie GE Healthcare.

5.2.1. Związki promieniotwórcze

[γ -³²P] ATP (4000-5000 Ci/mmol) oraz L-[³⁵S] metionina (1000 Ci/mmol) – Hartmann Analytic

5.2.2. Enzymy

XbaI, NheI, NotI, BamHI, PstI, Taq DNA polimeraza, rybonukleaza T1, T4 kinaza polinukleotydoma, T4 RNA ligaza – Fermentas, Csp45I, DpnI, Pfu DNA polimeraza, inhibitor rybonukleaz RNasin – Promega, rybonukleaza V1 – Ambion, rybonukleaza A i lizozym – Sigma.

5.2.3. Zestawy odczynników

- Zestaw do transkrypcji *in vitro* TMAmpliScribe T7, T3, and SP6 High Yield Transcription Kit – Epicentre Biotechnologies
- Zestawy do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakterii – Qiagen oraz Bio Basic
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji Superscript III – Invitrogen
- Lizat z retikulocytów królika – Promega
- Zestaw do oczyszczania RNA po transkrypcji *in vitro* RNeasy MinElute Cleanup Kit – Qiagen

5.2.4. Oligonukleotydy

Wszystkie oligonukleotydy DNA użyte w toku wykonywania pracy doktorskiej zostały zakupione w IBB Warszawa (www.oligo.pl) lub Genomed (www.genomed.pl).

5.2.5. Plazmidy

- plazmid pRL-CMV – Promega
- plazmid pET28A zawierający otwartą ramkę odczytu białka PTB1 pozyskano od prof. Douglasa L. Blacka z Instytutu im. Howarda Hughesa w Los Angeles, USA

5.2.6. Szczepy bakteryjne

E. coli DH5 α oraz *E. coli* BL21 Star (DE3) – Invitrogen

5.2.7. Standardy do oznaczania wielkości makrocząsteczek

- Marker do oznaczania masy białek w żelach denaturujących z SDS – Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder oraz Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder – Fermentas
- Marker do analizy wielkości fragmentów DNA w żelach agarozowych Gene Ruler DNA Ladder Mix – Fermentas
- Marker do analizy wielkości fragmentów RNA w żelach agarozowych RNA Millenium Markers – Ambion

5.2.8. Bufory, roztwory i pożywki

Bufor elektroforetyczny 1xTBE

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

Bufor elektroforetyczny 0,5xTB

50 mM Tris, 50 mM kwas borowy, pH 8,3

Bufor elektroforetyczny 1xTAE

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

Bufor do elektroforezy białek w warunkach denaturujących

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

Bufor do żelu zagęszczającego

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

Bufor do żelu rozdzielającego

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

Roztwór do denaturacji i obciążania próbek białkowych – roztwór SSB

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

Roztwór do denaturacji i obciążania próbek RNA – elektroforeza w żelu agarozowym – roztwór RSB

50 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% glicerol, 0,02% w/v błękit bromofenolowy

Roztwór do denaturacji i obciążania próbek DNA – analiza SSCP

95% formamid, 20 mM EDTA, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

Roztwór do dehydratacji żeli białkowych – roztwór „fixing”

50% metanol, 10% lodowaty kwas octowy

Roztwór do płukania żeli białkowych

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

Roztwór do barwienia żeli białkowych – roztwór „staining”

50% metanol, 10% lodowaty kwas octowy, 0,05% w/v kumasyna Brilliant Blue R-250

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

38,66 g akryloamidu, 1,33 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

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

39,02 g akryloamidu, 0,98 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

40% roztwór żelu poliakryloamidowego 75:1 (w/w)

39,47 g akryloamidu, 0,53 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

30% roztwór żelu białkowego 37,5:1 (w/w)

150 g akryloamidu, 4 g bisakryloamidu, H₂O do 100 ml

Roztwory obciążające próbki zawierające RNA lub DNA

Elektroforeza w warunkach denaturujących:

8 M mocznik, 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

Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

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

Bufor do trawienia rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących

50 mM cytrynian sodu pH 5,3, 7 M mocznik

Bufor DB – „denaturation buffer”

10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA

Bufor FB – „folding buffer”

40 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 130 mM KCl, 0,1 mM EDTA

Bufor PBB – „PTB1 binding buffer”

20 mM HEPES-KOH pH 8,0, 130 mM KCl, 5 mM MgCl₂

Bufor FBA – „filter binding assay buffer”

20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 5% glicerol, 0,1 mM EDTA

Bufor „stop”

8 M mocznik, 20 mM EDTA, 0,02% w/v błękit bromofenolowy, 0,02% w/v ksylencjanol

Bufor A

50 mM fosforan sodu, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8,0

Bufor A z 20 mM imidazolem

50 mM fosforan sodu, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 20 mM imidazol, pH 8,0

Bufor A z 300 mM imidazolem

50 mM fosforan sodu, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 300 mM imidazol, pH 8,0

Bufor do przechowywania białka PTB1

20 mM HEPES-KOH pH 8,0, 100 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA pH 8,0, 10% glicerol

Pożywki do hodowli bakteryjnych***Pożywka płynna SOC***

2 g peptonu, 0,5 g ekstraktu drożdżowego, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl, 1 ml 1M MgCl₂,

1 ml 1M MgSO₄, 2 ml 1M glukozy, H₂O do 100 ml

Pożywka stała LB

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

Pożywka płynna LB

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

Antybiotyki

Kanamycyna – 100 mg/ml H₂O

Ampicylina – 100mg/ml H₂O

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

5.3. Metody standardowe

5.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę wykorzystywano do analizy produktów otrzymanych po badaniu struktury drugorzędowej RNA metodami enzymatycznymi i chemicznymi. Ponadto, do oczyszczania fragmentów RNA po transkrypcji *in vitro*, oligomerów DNA po syntezie chemicznej, a także cząsteczek RNA lub DNA po znakowaniu radioizotopowym. Stosowano żel poliakryloamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akryloamidu do bisakryloamidu) z 8 M mocznikiem oraz bufor elektroforetyczny 1xTBE. Procentowość żelu uzależniona była od długości rozdzielanych fragmentów i wahała się od 8 do 12%. Próbkę obciążano roztworem 8 M mocznika z barwnikami elektroforetycznymi w stosunku 1:1. Każdą elektroforezę poprzedzano preelektroforezą prowadzoną 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: znakowanie radioizotopowe – autoradiografia, oczyszczanie RNA po transkrypcji *in vitro* oraz oligomerów DNA po syntezie chemicznej – wygaszanie światła UV, mapowanie struktury drugorzędowej RNA – ekrany odwzorowujące.

5.3.2. Elektroforeza RNA w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących

Metodę elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących wykorzystywano do analizy homogenności strukturalnej znakowanych radioizotopowo cząsteczek RNA. W zależności od długości analizowanych fragmentów stosowano różną procentowość żelu (od 5 do 10%) oraz usieciowanie (40:1 lub 75:1). Jako bufor elektroforetyczny stosowano 0,5xTB. RNA znakowany radioizotopowo z końca 5' lub 3' denaturowano w buforze zawierającym 10 mM Tris-HCl pH 8,0 i 100 mM KCl przez 3 minuty w temperaturze 90 °C i schładzano do 4 °C w tempie 0,1 °C/sekundę. Następnie, dodawano MgCl₂ do końcowego stężenia 2,5, 5 lub 10 mM i próbkę inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37 °C. Do reakcji kontrolnej zamiast MgCl₂ dodawano wodę. Próbki obciążano 30% glicerolem w stosunku 5:1. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4 °C przy stałym natężeniu prądu 10 mA. Żel przenoszono na bibułę Whatman 3MM i suszono 45 minut w temperaturze 65 °C. Wyniki elektroforezy wizualizowano z wykorzystaniem ekranów odwzorowujących.

5.3.3. 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, zawierających zmutowane warianty DNA P1-554. W zależności od długości rozdzielanych fragmentów stosowano 1–2% (w/v) żel agarozowy z bromkiem etydy (0,1 µg/ml), a jako bufor elektroforetyczny 1xTBE. 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 fragmentów RNA dłuższych niż 500 nukleotydów, otrzymanych metodą transkrypcji *in vitro*. Stosowano 1% (w/v) żel agarozowy i bufor elektroforetyczny 1xTAE. Próbki obciążano roztworem RSB, w stosunku 10:1 z dodatkiem bromku etydy (50 µg/ml). Jako czynnik denaturujący stosowano dejonizowany formamid, którego końcowe stężenie wynosiło 60%. Przed nałożeniem materiału do kieszonek w żelu przeprowadzano denaturację przez 5 minut w temperaturze 95 °C, po czym próbki przenoszono na 10 minut do lodu. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4 °C przy stałym natężeniu prądu 40 mA. RNA obserwowano w świetle UV.

5.3.4. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę stosowano do rozdziału produktów translacji *in vitro* oraz kontrolowania poszczególnych etapów nadekspresji białka PTB1. 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. Próbki zwirowywano, pobierano 10 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.

W przypadku rozdziału preparatów zawierających białko PTB1, po elektroforezie żel umieszczano w roztworze „fixing” i inkubowano 10 minut z okresowym mieszaniem. Następnie, żel umieszczano na 30 minut w roztworze „staining”. Po tej procedurze żel odbarwiano w sterylnej wodzie przez około 12 godzin. Żele zawierające produkty białkowe otrzymane w reakcji translacji *in vitro*, zawierające wbudowaną L-[³⁵S] 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 3MM i suszono 45 minut w temperaturze 65 °C. Wyniki elektroforezy wizualizowano z wykorzystaniem ekranów odwzorowujących.

5.3.5. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

Po elektroforezie prążki odpowiadające oligomerom DNA lub fragmentom RNA wizualizowano w świetle UV. Wycięte pasma żelu inkubowano w buforze do elucji przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z okresowym wytrząsaniem.

5.3.6. Wytrącanie kwasów nukleinowych

Wyeluowane z żelu poliakryloamidowego oligomery DNA lub fragmenty RNA strącano w obecności 300 mM octanu sodu pH 5,2 dodając 3 objętości 96% etanolu. Próbki strącano przez 10 minut w suchym lodzie lub w temperaturze -20 °C przez noc. W przypadku cząsteczek RNA dodawano glikogen do stężenia 20 μ g/ml roztworu. 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: $1A_{260}/ml = 33\mu g/ml$,

ssDNA: $1A_{260}/ml = 33\mu g/ml$,

dsDNA: $1A_{260}/ml = 50\mu g/ml$.

5.3.7. Oznaczanie stężenia białka

Po nadekspresji i oczyszczaniu białka PTB1 całkowitą ilość otrzymanego białka oznaczano na podstawie dwóch metod:

- Pomiarów absorpcji przy długości fali $\lambda = 280$ nm, gdzie po wprowadzeniu współczynnika ekstynkcji, który dla białka PTB1 wynosi $12800\text{ cm}^{-1}/\text{M}^{-1}$ oraz masy cząsteczkowej równej 64,23 kDa dokonywano pomiarów z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop.
- Metody opartej o zastosowanie odczynnika Bradford. 5, 10, 15, 20 i 25 μl preparatu białkowego uzupełniano wodą do objętości 800 μl . Następnie, dodawano 200 μl 5 x stężonego odczynnika Bradford, mieszano i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 595$ nm. Uzyskane wartości porównywano z krzywą wzorcową, otrzymaną w analogiczny sposób w oparciu o standard białkowy surowiczej albuminy wołowej.

5.3.8. Ekstrakcja fenolem

Procedurę wykorzystywano do oczyszczania produktów reakcji PCR oraz wektorów DNA po reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi. Próbkę zawierającą DNA wytrząsano 2 minuty z jedną objętością fenolu (nasyconego buforem TE, pH 8,0) w temperaturze pokojowej i wirowano 1 minutę przy 10000 rpm w celu separacji 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.

5.3.9. Odzyskiwanie RNA z kompleksów rybonukleoproteinowych za pomocą odczynnika Tri Reagent

Odczynnik Tri Reagent używano do odzyskiwania RNA z kompleksów z białkiem PTB1, po mapowaniu struktury drugorzędowej RNA. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano wodę do objętości 50 μl oraz 300 μl odczynnika Tri Reagent i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, dodawano 60 μl chloroformu, wytrząsano przez 15 sekund i ponownie

inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną wirowano przez 15 minut w temperaturze 4 °C przy 10000 rpm. Z zebranej fazy wodnej wytrącano osad, który przemywano 80 µl 70% etanolu i odwirowywano przez 10 minut w temperaturze 4 °C przy 8500 rpm. Wysuszony osad rozpuszczano w wodzie.

5.3.10. Hydrolizat formamidowy

Znakowany radioizotopowo RNA mieszano z formamidem w stosunku 1:5. Próbki inkubowano przez 10 minut w temperaturze 100 °C, po czym dodawano równą objętość roztworu zawierającego formamid oraz barwniki elektroforetyczne i przenoszono na suchy lód. Produkty hydrolizy analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w warunkach denaturujących.

5.3.11. Ograniczone trawienie RNA rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących

Do znakowanego radioizotopowo RNA dodawano bufor do trawienia rybonukleazą T1 w stosunku 1:5. Mieszaninę inkubowano 2 minuty w temperaturze 100 °C, po czym przenoszono na suchy lód. Następnie, dodawano 0,2 U rybonukleazy T1. Reakcję ograniczonego trawienia prowadzono przez 10 minut w temperaturze 55 °C, po czym przerywano przez przeniesienie próbki na suchy lód. Produkty reakcji analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w warunkach denaturujących.

5.4. Metody stosowane w badaniach własnych

5.4.1. Otrzymanie matrycowych DNA

Matrycowe DNA, reprezentujące wybrane fragmenty genu *p53* lub mRNA *p53*, otrzymywano z wykorzystaniem techniki PCR. Posłużyły one do preparatyki RNA metodą transkrypcji *in vitro*. Reakcje PCR prowadzono przy użyciu odpowiednio dobranych starterów DNA oznaczonych jako Pf (ang. *primer forward*) i Pr (ang. *primer reverse*) (Tab. 5). Matrycowe DNA służące do syntezy RNA otrzymano na matrycy cDNA wyizolowanego z ludzkiej wątroby. Namnażanie każdego z analizowanych fragmentów DNA poprzedzała testowa reakcja PCR przeprowadzana w gradiencie temperatury oraz stężenia MgCl₂, w celu znalezienia optymalnych warunków amplifikacji. Mieszanina reakcyjna (reakcja PCR w skali preparatywnej) zawierała 0,5–20 ng matrycowego DNA, dwa startery o stężeniu 0,25 µM, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 1,5–2,5 mM MgCl₂, 200 µM każdego z dNTP oraz 1,5 U Taq DNA polimerazy. Stosowano następujące warunki temperaturowe: 95 °C – 5 minut, a następnie 25–35 cykli: 95 °C

Tabela 5. Startery stosowane w reakcjach PCR.

Cząsteczka DNA	Sekwencja startera w orientacji 5'-3'
H56-169	Pf GTTCGGGCTGGGAGCGTG Pr GCTCGACGCTAGGATCTGAC
P1-p53	Pf CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC Pr TCCATGGCAGTGACCCGGAAGG
P0-p53	Pf GTCATGGCGACTGTCCAGCTTTG Pr TCCATGGCAGTGACCCGGAAGG
P1- Δ Np53	Pf CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC Pr TCCATTGCTTGGGACGGCAAGG
P0- Δ Np53	Pf GTCATGGCGACTGTCCAGCTTTG Pr TCCATTGCTTGGGACGGCAAGG
P1-int2	Pf CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC Pr TCCATTGCTTGGGACGGCAAGG
P1-554, P1-554mut	Pf CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC Pr GTCTTGGCCAGTTGGCAAAACATC
P0-554	Pf GTCATGGCGACTGTCCAGCTTTG Pr GTCTTGGCCAGTTGGCAAAACATC
HP1-554, HP1-554mut	Pf GCGGTCCACCACGGCCGATATCACGGCCGTGGTG- GACCGCACCGTCCAGGGAGCAGG Pr GTCTTGGCCAGTTGGCAAAACATC
p53ORF	Pf CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC Pr TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTC
p53FL	Pf CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC Pr TGGCAGCAAAGTTTTATTGTAAAATAAGAGATCG
259-554	Pf GAUUUGAUGCUGUCCCCGGACG Pr GTCTTGGCCAGTTGGCAAAACATC

– 30 sekund, 58 do 69 °C – 30 sekund, 72 °C – 2 do 4 minut, po czym następowało końcowe wydłużanie w 72 °C przez 10 minut. W celu późniejszego otrzymania cząsteczek RNA za pomocą reakcji transkrypcji *in vitro*, w kolejnym etapie przeprowadzano reakcję PCR w analogicznych warunkach, z tą różnicą, że starter Pf zawierał na końcu 5' dodatkowo sekwencję promotora dla T7 RNA polimerazy (5' – TAATACGACTCACTATA – 3'). Produkty reakcji PCR analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym i oczyszczano z wykorzystaniem ekstrakcji fenolem, strącano, wirowano i rozpuszczano w wodzie.

5.4.2. Trawienie restrykcyjne cząsteczek DNA

Cięcie enzymami restrykcyjnymi stosowano do przygotowywania cząsteczek DNA w celu klonowania do plazmidów oraz do linearyzacji plazmidów. Stosowano różne enzymy w zależności od cząsteczki DNA i pożądanego miejsca cięcia. Mieszanina reakcyjna zawierała od 1 do 2 μ g DNA, handlowo dostępny bufor o składzie dostosowanym do każdego enzymu i 20 U enzymu restrykcyjnego. Reakcję prowadzono przez 2–6 godzin w temperaturze 37 °C, po czym usuwano enzym za pomocą ekstrakcji fenolem. DNA strącano, próbki wirowano i osad rozpuszczano w sterylnej wodzie.

5.4.3. Klonowanie insertu DNA do plazmidu

Insert i wektor po cięciu enzymami restrykcyjnymi mieszano 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*.

5.4.4. Transformacja komórek *E. coli*

Plazmidowy DNA wprowadzano do komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie przez 30 minut. Następnie, dodawano 5 μ l 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 μ l pożywki LB i komórki hodowano przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem (200 rpm). Komórki bakteryjne (50 μ l) rozprowadzono 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 przy 240 rpm. Izolację plazmidu prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników firmy Qiagen lub Bio Basic. Otrzymane plazmidy sekwencjonowano.

5.4.5. Ukierunkowana mutageneza

Metodę wykorzystano do otrzymania cząsteczek DNA P1-554mut i HP1-554mut, posiadających zmutowany kodon inicjacyjny białka p53 (AUG \rightarrow GCG). Mutagenezę poprzedziło klonowanie DNA P1-554 oraz HP1-554 do plazmidu pRL-CMV. W pierwszym etapie ukierunkowanej mutagenezy przygotowywano dwie reakcje PCR zawierające 500 ng plazmidu, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1 mg/ml BSA, 0,1% Triton X-100, 1 μ M stężenie jednego ze starterów posiadających mutację (Pf lub Pr), 250 μ M dNTP i 1 U Pfu DNA polimerazy. Stosowano następujące warunki temperaturowe: 95 °C – 2 minuty i 10 cykli: 95 °C – 50 sekund, 60 °C – 50 sekund, 68 °C – 16 minut, po czym następowało końcowe wydłużanie w 68 °C przez 7 minut. Obie reakcje mieszano ze sobą, dodawano 0,8 U Pfu DNA polimerazy, rozdzielano na dwie równe części i przeprowadzano kolejną reakcję PCR stosując warunki: 95 °C – 2 minuty i 20 cykli: 95 °C – 50 sekund, 60 °C – 50 sekund, 68 °C – 16 minut, po czym następowało końcowe wydłużanie w 68 °C przez 7 minut. Otrzymany DNA poddawano ekstrakcji fenolem, strącano etanolem, próbki wirowano i osad rozpuszczano w wodzie. W celu usunięcia matrycowego plazmidu przeprowadzono trawienie za pomocą enzymu restrykcyjnego DpnI. Mieszanina reakcyjna zawierała handlowo dostępny bufor dla DpnI, 5 μ g DNA, 0,04 μ g/ μ l BSA,

50 U DpnI. Reakcję inkubowano 3 godziny w temperaturze 37 °C. DNA poddawano ekstrakcji fenolem, strącano etanolem, próbki wirowano i osad rozpuszczano w wodzie. Otrzymanym DNA transformowano komórki bakteryjne *E. coli*.

5.4.6. Transkrypcja *in vitro*

Wszystkie analizowane cząsteczki RNA otrzymano przy użyciu zestawu do transkrypcji firmy Epicentre Biotechnologies (AmpliScribe T7, T3, and SP6 High Yield Transcription Kit), zgodnie z wytycznymi producenta. Jako matryce stosowano dwuniciowe cząsteczki DNA otrzymane w reakcji PCR lub plazmidy DNA uprzednio poddane linearyzacji. Mieszanina reakcyjna zawierała 1–2 µg matrycowego DNA, bufor transkrypcyjny, 7,5 mM mieszaninę NTP, 20 mM DTT oraz 2 µl mieszaniny polimeraz 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 w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących i wizualizowano w świetle UV. Wycięte pasma żelu poddawano elucji w buforze elucyjnym. RNA strącano, wirowano i rozpuszczano w wodzie. Cząsteczki RNA dłuższe niż 500 nukleotydów oczyszczano z wykorzystaniem zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit firmy Qiagen. Otrzymane transkrypty rozdzielano w żelu agarozowym w celu analizy jakościowej.

W reakcjach mających na celu otrzymanie RNA z wolną grupą hydroksylową na końcu 5' do mieszaniny transkrypcyjnej dodawano 3'-monofosforan guanozyny do końcowego stężenia 2 mM. W reakcjach mających na celu otrzymanie RNA z wbudowanym na końcu 5' analogiem kapu ARCA dodawano analog do końcowego stężenia 3 mM obniżając jednocześnie stężenie GTP do 0,75 mM.

5.4.7. Znakowanie kwasów nukleinowych

5.4.7.1. Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ³²P

Mieszanina reakcyjna zawierała 10–20 pmoli RNA z wolną grupą hydroksylową na końcu 5' lub 100 pmoli oligomeru DNA, 2 µl [γ -³²P] ATP o aktywności 4000–5000 Ci/mmol, bufor reakcyjny (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 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. Produkty reakcji oczyszczano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących lub z wykorzystaniem zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit firmy Qiagen. Wyznakowane radioizotopowo na końcu 5' cząsteczki wizualizowano przez autoradiografię, wycinano z żelu, eluowano, strącano, wirowano i suszono. Poziom radioaktywności wyznakowanych cząsteczek mierzono za pomocą licznika scyntylicyjnego.

5.4.7.2. Znakowanie RNA na końcu 3' za pomocą [5'-³²P] pCp i T4 RNA ligazy***Znakowanie monofosforanu cytydyny (Cp)***

Mieszanina reakcyjna zawierała 100 pmoli 3'-monofosforanu cytydyny, 2 μ l [γ -³²P] ATP o aktywności 4000-5000 Ci/mmol, bufor reakcyjny (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,1 mM spermidynę) oraz 10 U T4 kinazy polinukleotydowej. Reakcję prowadzono 30 minut w temperaturze 37 °C, a następnie dezaktywowano enzym przez inkubację 5 minut w temperaturze 65 °C. Po zakończeniu reakcji, mieszaninę umieszczano na lodzie.

Reakcja ligacji

Mieszanina reakcyjna zawierała 2–20 pmoli RNA, 20 μ M ATP, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, całość wyznakowanego [5'-³²P] pCp otrzymanego w reakcji opisanej powyżej oraz 10 U T4 RNA ligazy. Przed reakcją przeprowadzano denaturację RNA 2 minuty w temperaturze 100 °C, a następnie próbkę schładzano przez 10 minut w lodzie. Po dodaniu enzymu reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 37 °C. Produkty reakcji oczyszczano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących lub z wykorzystaniem zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit firmy Qiagen. Wyznakowane radioizotopowo na końcu 3' cząsteczki RNA wizualizowano przez autoradiografię, wycinano z żelu, eluowano, strącano, wirowano i suszono. Poziom radioaktywności wyznakowanych cząsteczek oznaczono za pomocą licznika scyntylicyjnego.

5.4.8. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA

Wszystkie prezentowane wyniki doświadczeń mapowania struktury drugorzędowej RNA były wizualizowane z wykorzystaniem autoradiografii lub ekranów odwzorowujących i skanera radioaktywności Typhoon 8600 z oprogramowaniem *ImageQuant* (Molecular Dynamics) oraz FLA-5100 z oprogramowaniem *MultiGauge* (FujiFilm).

5.4.8.1. Cięcie RNA indukowane jonami Pb²⁺

Mieszanina reakcyjna zawierała znakowany radioizotopowo RNA (30000–100000 c.p.m.), 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 40 mM NaCl i 8 μ M nośnikowy tRNA. Bezpośrednio przed reakcją, RNA poddawano renaturacji w temperaturze 65 °C przez 5 minut i inkubację w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Następnie, dodawano świeżo przygotowany roztwór octanu ołowiu do uzyskania końcowych stężeń 0,25, 0,5 i 1 mM. Reakcję prowadzono 5 minut w temperaturze 37 °C i zatrzymywano przez dodanie buforu „stop” w stosunku 1:1 i przeniesienie do suchego lodu. Produkty reakcji rozdzielano w 8 lub 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

W przypadku prowadzenia reakcji na nieznakowanym materiale stosowano 20–100 pmoli nieznakowanego RNA, a reakcję cięcia zatrzymywano dodaniem buforu „stop” bez barwników w stosunku 1:1, uzupełniano wodą do objętości 100 μl , po czym strącano. Produkty reakcji wirowano, suszono i rozpuszczano w wodzie. W kolejnym etapie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu odczynników Superscript III. Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

5.4.8.2. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem techniki SHAPE

Przed reakcją modyfikacji, RNA zawieszony w 20 μl buforu 1xDB, denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 90 °C, po czym schładzano do temperatury 4 °C w tempie 0,1 °C/sekundę. Następnie, dodawano 29 μl buforu 5xFB oraz wodę do końcowej objętości 146 μl i inkubowano 10 minut w temperaturze 37 °C. Mieszaninę dzielono na dwie równe części. Do jednej dodawano 7,3 μl 100–180 mM NMIA rozpuszczonego w bezwodnym DMSO (reakcja „+”), a do drugiej 7,3 μl bezwodnego DMSO (reakcja „-”). Końcowe stężenie NMIA w reakcji wynosiło od 9 do 16 mM. Reakcję modyfikacji prowadzono przez 50 minut w temperaturze 37, 50 lub 60 °C, po czym RNA strącano, wirowano, suszono i rozpuszczano w 10 μl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 z 0,1 mM EDTA.

Miejsca modyfikacji w RNA analizowano w reakcji odwrotnej transkrypcji. Do 2 pmoli RNA dodawano 2 pmole startera DNA znakowanego radioizotopowo na końcu 5' oraz wodę do końcowej objętości 12 μl . RNA denaturowano przez 1 minutę w temperaturze 95 °C i przenoszono na 10 minut do lodu. Do RNA dodawano 8 μl mieszaniny zawierającej (końcowe warunki reakcji: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 6 mM DTT, 0,5 mM każdego z dNTP oraz 50 U odwrotnej transkryptazy). Reakcję prowadzono przez 1 minutę w temperaturze 45 °C, 10–60 minut w temperaturze 52 °C, a następnie przez 5 minut w temperaturze 65 °C. Po zakończeniu reakcji, w celu degradacji RNA, dodawano 1 μl 4M NaOH i inkubowano 5 minut w temperaturze 95 °C. Reakcję zobojętniano przez dodanie 25 μl Tris-HCl. Otrzymane cDNA strącano, wirowano, suszono i rozpuszczano w 20 μl wody. Produkty reakcji analizowano w 8% sekwencyjnym żelu poliakryloamidowym o grubości 0,4 mm, w warunkach denaturujących. Przed nałożeniem na żel próbki denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 95 °C w 8 M moczniku z barwnikami elektroforetycznymi. W celu otrzymania reakcji sekwencjonowania, dNTP zastępowano mieszaniną ddNTP:dNTP w stosunku 4:1 (końcowe stężenia w reakcji: 0,2 mM ddNTP, 0,05 mM dNTP).

5.4.8.3. Modyfikacja chemiczna RNA za pomocą siarczanu dimetylu (DMS)

Mieszaninę reakcyjną zawierającą 2–20 pmoli RNA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 40 mM NaCl poddawano renaturacji w temperaturze 65 °C przez 5 minut i inkubację w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Następnie, dodawano 5% roztwór siarczanu dimetylu w etanolu (końcowe stężenie DMS w reakcji wynosiło 0,25%). Reakcję prowadzono 5 minut w temperaturze

37°C i zatrzymywano przez umieszczenie na lodzie i dodanie 3 objętości 96% etanolu. RNA strącano w obecności glikogenu. Miejsca modyfikacji w RNA analizowano w reakcji odwrotnej transkrypcji. Produkcji reakcji analizowano w 8 lub 12% sekwencyjnym żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

5.4.8.4. Enzymatyczne mapowanie struktury drugorzędowej RNA

Mieszanina reakcyjna zawierała znakowany radioizotopowo RNA (30000–100000 c.p.m.) lub 10 pmoli nieznakowanego RNA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 40 mM NaCl. Bezpośrednio przed reakcją, RNA poddawano renaturacji w temperaturze 65°C przez 5 minut i inkubację w temperaturze 37°C przez 10 minut. Następnie, dodawano odpowiednią ilość rybonukleazy A (0,5, 1 lub 3 ng), T1 (0,1, 0,3 lub 0,6 U) lub V1 (0,01 lub 0,02 U) i próbki inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Reakcję trawienia zatrzymywano dodając bufor „stop” w stosunku 1:1 i zamrażając mieszaninę na suchym lodzie. Produkty trawienia analizowano w 8% sekwencyjnym żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. W doświadczeniach trawienia, w których użyto tylko nieznakowany RNA identyfikację miejsc cięcia przeprowadzano z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji.

5.4.8.5. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA w kompleksie z białkiem PTB1

W analizie struktury RNA w kompleksie z białkiem PTB1, reakcję mapowania poprzedzało utworzenie kompleksów rybunukleoproteinowych jak to opisano w Rozdziale 5.4.10, za tą różnicą, że stosowano bufor zawierający 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 40 mM NaCl i 5 mM MgCl₂. W kolejnym etapie przeprowadzano modyfikację chemiczną za pomocą NMIA, cięcie jonami ołowiu lub trawienie rybonukleazą A, T1 i V1. RNA odzyskiwano za pomocą ekstrakcji odczynnikiem Tri Reagent.

5.4.8.6. Przewidywanie struktury drugorzędowej RNA *in silico*

Do przewidywania struktury drugorzędowej RNA użyto programu *RNAstructure* w wersji 4,6 lub 5,1. W przypadku wykorzystania w przewidywaniu struktur wyników otrzymanych techniką SHAPE pierwszym etapem była analiza danych doświadczalnych za pomocą oprogramowania *SAFA* (ang. *semi-automated footprinting analysis*) w wersji 1,1, które pozwala na zamianę sygnału radioaktywności na wartości liczbowe [211]. Normalizacja danych została przeprowadzona z użyciem programu *noRNAIize* [212]. Otrzymane, znormalizowane wartości, odpowiadające reaktywności poszczególnych reszt nukleotydowych, wprowadzono jako więzy strukturalne podczas przewidywania struktur drugorzędowych badanych cząsteczek RNA.

5.4.9. Otrzymywanie rekombinantowego białka PTB1

5.4.9.1. Transformacja komórek bakteryjnych wektorem pET28A

Plazmid pET28A, kodujący białko PTB1 wprowadzono do komórek kompetentnych *E. coli* BL21 – DE3 STAR metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie przez 30 minut. Następnie, dodano 10 ng plazmidu pET28A 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 μ l pożywki SOC i hodowano przez 1 godzinę w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem (200 rpm). Zawiesinę stransformowanych komórek bakteryjnych (50 μ l) rozprowadzano na powierzchni szalek z pożywką LB i kanamycyną. Hodowlę prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37 °C.

5.4.9.2. Nadekspresja białka PTB1

Bakterie pochodzące z pojedynczej kolonii zawieszano w 20 ml pożywki LB z kanamycyną i inkubowano do osiągnięcia wczesnej fazy wzrostu logarytmicznego ($OD_{600} = 0,6$) przez około 3–4 godziny w temperaturze 37 °C przy 240 rpm. Następnie, zawiesinę przenoszono do 1000 ml pożywki LB z kanamycyną i rozdzielało na trzy równe objętości. Po osiągnięciu wczesnej fazy wzrostu logarytmicznego (inkubacja 2–3 godziny w temperaturze 37 °C) nadekspresję białka indukowano przez dodanie izopropylotiogalaktozydu (IPTG), do końcowego stężenia 1 mM. Hodowlę kontynuowano przez kolejne 4 godziny w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem 240 rpm. Po zakończeniu hodowli, zawiesinę bakteryjną wirowano 20 minut w temperaturze 4 °C przy 4000 rpm, a osad zamrażano w temperaturze –80 °C, do czasu oczyszczenia białka.

5.4.9.3. Liza komórek bakteryjnych

Osady bakteryjne rozmrażano w lodzie przez 20 minut, po czym rozpuszczono w 20 ml buforu A, wzbogaconego o lizozym do końcowego stężenia 300 μ g/ml i inhibitor proteaz, fluorek fenylometrylosulfonylu (PMSF) do końcowego stężenia 1 mM. Zawiesinę bakteryjną poddawano pięciokrotnej sonikacji, po 15 sekund każda z 1 minutowymi przerwami, po czym inkubowano 1 godzinę w temperaturze 4 °C z delikatnym mieszaniem i powtarzano sonikację. W celu oddzielenia pozostałości komórek bakteryjnych oraz nierozpuszczalnej frakcji białkowej zawiesinę wirowano 1 godzinę w temperaturze 4 °C przy 17000 rpm. Supernatant oddzielano od osadu i poddawano oczyszczeniu.

5.4.9.4. Oczyszczanie rekombinantowego białka PTB1

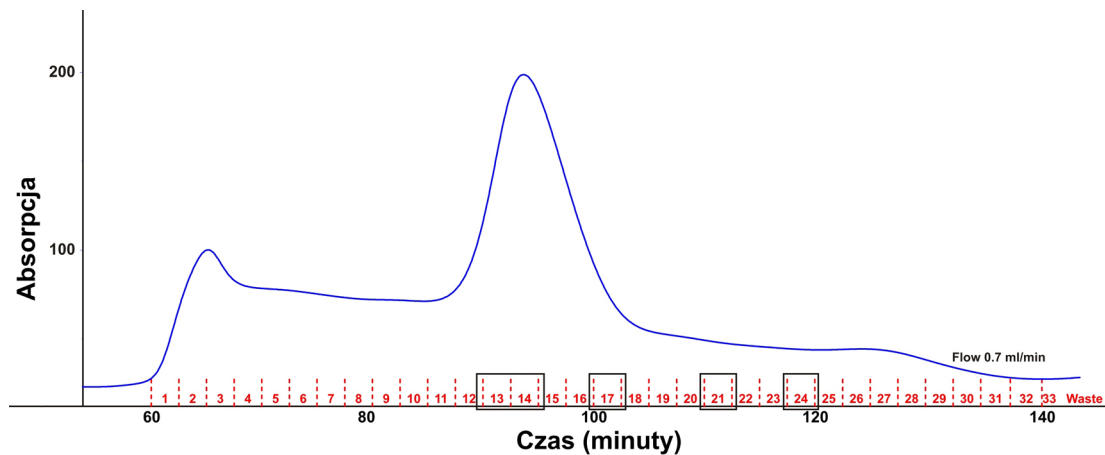
Białko PTB1 oczyszczano dwuetapowo: z wykorzystaniem wiązania do agarozy Ni-NTA, dzięki obecności sześciu reszt histydynowych na końcu aminowym białka PTB1 oraz szybkosprawnej chromatografii cieczowej, FPLC (ang. *fast protein liquid chromatography*).

5.4.9.5. Oczyszczanie na złożu Ni-NTA

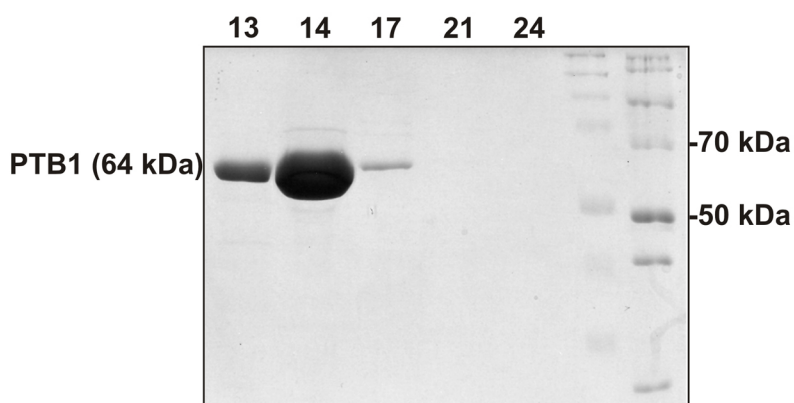
6 ml złoża Ni-NTA umieszczono w kolumnie i przemyto dwukrotnie 50 ml H₂O oraz czterokrotnie 50 ml buforu A z 20 mM imidazolem. Supernatant zawierający białko PTB1 dodano do złoża i kilkakrotnie pipetowano do powstania zawiesiny. Następnie, kolumnę podłączono do pompy próżniowej i usunięto przesącz. Złoże przepłukano czterokrotnie 50 ml buforu A z 20 mM imidazolem w celu usunięcia niespecyficznie związanych białek. Białko PTB1 eluowano ze złoża 10 ml buforu A z 300 mM imidazolem.

5.4.9.6. Oczyszczanie z wykorzystaniem techniki FPLC

Mieszaninę zawierającą białko PTB1 wyluowane ze złoża Ni-NTA przefiltrowano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,22 μm . Na kolumnę wypełnioną złożem Superdex 200 nanoszono 4 ml mieszaniny z białkiem. Rozdział prowadzono w buforze A, przy przepływie 0,7 ml/minutę (Rys. 88). Podczas rozdziału zbierano frakcje o objętości 1 ml. Obecność białka PTB1 w poszczególnych frakcjach identyfikowano za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (Rys. 89). Frakcje zawierające białko PTB1 łączono. Następnie, z wykorzystaniem zestawu filtrów wirówkowych do zagęszczania białek o punkcie odcięcia równym masie cząsteczkowej 30 kDa, wymieniano bufor, w którym prowadzono oczyszczanie, na bufor do przechowywania białka PTB1. Roztwór białka PTB1 dzielono na porcje o objętości 5–30 μl i zamrażano w -80°C .



Rysunek 88. Wykres przedstawiający rozdział białka PTB1 za pomocą techniki FPLC. W ramkę ujęto frakcje, w których sprawdzano obecność białka.



Rysunek 89. Rozdział elektroforetyczny frakcji po oczyszczeniu FPLC, zawierających białko PTB1.

5.4.10. Analiza kompleksów białko PTB1–RNA za pomocą techniki opóźnionej migracji kompleksów w żelu poliakrylamidowym

Przygotowanie RNA

Mieszaninę znakowanego radioizotopowo z końca 5' RNA (30000–100000 c.p.m.) oraz nieznakowanego RNA (1–20 pmoli) zawieszano w buforze PBB pozbawionym chlorku magnezu, denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 90 °C i schładzano do temperatury 4 °C w tempie 0,1 °C/sekundę. Mieszaninę uzupełniano MgCl₂ do końcowego stężenia 5 mM i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37 °C. Następnie, dodawano drożdżowy, nośnikowy tRNA do końcowego stężenia 100 ng/μl.

Przygotowanie białka

Białko rozmrażano w lodzie przez 20 minut. Roztwór białka PTB1 przygotowywano przez rozcieńczenie określonej ilości białka w buforze PBB.

Przygotowane w ten sposób RNA i białko łączono ze sobą i inkubowano przez 10–30 minut w temperaturze 4, 25 lub 37 °C. Następnie, do próbek dodawano 50% glicerol w stosunku 10:1 i nakładano do kieszonek w żelu poliakrylamidowym. Elektroforezę prowadzono w temperaturze 4 °C przy stałym natężeniu prądu 10 mA. Żel przenoszono na bibułę Whatman 3MM i suszono 45 minut w temperaturze 65 °C. Wyniki elektroforezy wizualizowano z wykorzystaniem ekranów odwzorowujących.

5.4.11. Zatrzymywanie kompleksów rybonukleoproteinowych na filtrach

Wszystkie reakcje prowadzono w buforze zawierającym 20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 5% glicerol i 0,1 mM EDTA lub w tym samym buforze, zawierającym wyższe stężenie KCl (100, 150 lub 200 mM). Znakowany radioizotopowo z końca 5' lub 3' RNA o stężeniu 0,4 lub 4 nM poddawano denaturacji w buforze FBA bez chlorku magnezu oraz glicerolu

w temperaturze 65 °C przez 5 minut i powoli schładzano do temperatury pokojowej. Końcowe stężenie RNA w reakcji wynosiło 0,2 lub 2 nM. Następnie, dodawano MgCl₂ i glicerol do końcowego stężenia odpowiednio, 2,5 mM i 5% i próbki inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37 °C. Białko rozmrażano w lodzie przez 20 minut. Roztwór białka PTB1 przygotowywano przez zawieszenie określonej ilości białka w buforze FBA do końcowego stężenia 4 μM. Rozcieńczenia białka PTB1 (1,95 nM–2000 nM) przygotowano przez sekwencyjne, 2-krotne rozcieńczanie buforem FBA.

Tworzenie kompleksów inicjowano przez zmieszanie równych objętości białka i RNA na płytce 96-dółkowej i inkubację 15–30 minut na lodzie lub w temperaturze 25 °C. W kolejnym etapie pobierano 30 μl mieszaniny reakcyjnej i наносono na nasączone buforem FBA membrany, zamontowane w aparacie Minifold-1 dot-blot (górną – membrana nitrocelulozowa Protran BA 85, dolną – membrana Hybond N+). Po filtracji mieszaniny reakcyjnej, na membrany наносono 100 μl buforu FBA w celu usunięcia niespecyficznego związanego białka. Następnie, membrany suszono, a wyniki wizualizowano za pomocą ekranów odwzorowujących. Analizę ilościową prowadzono za pomocą programu *KaleidaGraph* (Synergy) oraz *Origin* (OriginLab).

W badaniach specyficzności oddziaływania białka PTB1 z RNA w mieszaninie reakcyjnej znajdował się dodatkowo 100-krotny nadmiar nośnikowego, drożdżowego tRNA lub zamiast białka PTB1 stosowano surowiczą albuminę wołową w zakresie stężeń 9,76 nM–10000 nM.

5.4.12. Translacja *in vitro*

Wszystkie reakcje translacji *in vitro* prowadzono ściśle według zaleceń producenta. Produkty reakcji analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Przed reakcją, RNA denaturowano 3 minuty w temperaturze 65 °C i przenoszono na lód. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,5–5 pmoli RNA, 17,5 μl lizatu z retikulocytów królika, 20 μM mieszaninę aminokwasów (bez metioniny), 1 μl L-[³⁵S] 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 RNA, do 5 μl mieszaniny reakcyjnej dodawano rybonukleazy A do końcowego stężenia 0,2 mg/ml, po czym inkubowano przez 5 minut w 25 °C. Następnie, dodawano 20 μl roztworu SSB. Bezpośrednio przed elektroforezą, próby denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 90 °C. Z tak przygotowanej mieszaniny do kieszonek w żelu наносono po 5 μl. Natężenie prądu podczas migracji białek w warstwie żelu zagęszczającego wynosiło 15 mA a w warstwie żelu rozdzielającego 30 mA.

W przypadku reakcji translacji *in vitro* z analogiem kapu końcowe stężenie m⁷G(5')ppp(5')G w reakcji wynosiło 5–1000 μl. Przed dodaniem RNA mieszaninę reakcyjną inkubowano w obecności analogu kapu i równomolowych ilości octanu magnezu przez 15 minut w temperaturze 30 °C.

Badając wpływ białka PTB1 na translację *in vitro*, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 100, 200, 500 lub 1000 ng białka. Przed dodaniem RNA mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze 30 °C.

5.4.13. Polimorfizm pojedynczej nici DNA (SSCP)

Materiał genetyczny do analizy SSCP stanowiło 96 prób genomowego DNA izolowanego z krwi obwodowej o stężeniu 100 ng/μl zakupione w *European Collection of Cell Cultures*. Dawcami byli zdefiniowani pod względem wieku i płci, zdrowi Brytyjczycy rasy kaukaskiej (48 kobiet i 48 mężczyzn). Badane DNA namnażano metodą PCR według standardowego protokołu z tą różnicą, że wykorzystywano startery DNA znakowane radioizotopowo na końcu 5' (końcowe stężenie w reakcji wynosiło 1 μM). Po reakcji PCR dodawano roztwór do denaturacji w stosunku 5:1 i próby ogrzewano przez 10 minut w temperaturze 95 °C, po czym przenoszono do temperatury pokojowej. Analizę amplifikowanych fragmentów DNA prowadzono w 5% żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących, w obecności lub braku 10% glicerolu. Do każdej kieszonki żelu, uformowanej za pomocą grzebienia typu „zęby rekina”, nakładano 3 μl mieszaniny reakcyjnej. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 20 W w temperaturze pokojowej, a jako bufor elektroforetyczny stosowano 1xTBE. Po zakończonej elektroforezie żel przenoszono na bibułę Whatman 3MM i suszono 45 minut w temperaturze 65 °C. Wyniki elektroforezy wizualizowano z wykorzystaniem ekranów odwzorowujących.

Tabela 6. Startery stosowane w analizie SSCP.

p53E1	Pf CCTCCCATGTGCTCAAGACTGG Pr CCGAGAGCCCGTGA CT CAGAG
p53E2	Pf GTTGGAAGCGTCTCATGCTGG Pr CTTCCCACAGGTCTCTGCTAGG
p53E2'	Pf GATCCCCACTTTTCCTCTTGC Pr GCCCTTCCAATGGATCCACTC

Literatura

1. Aitken, C.E. i J.R. Lorsch, A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. 19(6): p. 568-76.
2. Hughes, T.A., Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet*, 2006. 22(3): p. 119-22.
3. Kozak, M., Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 2005. 361: p. 13-37.
4. Meijer, H.A. i A.A. Thomas, Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J*, 2002. 367(Pt 1): p. 1-11.
5. Romer, L., C. Klein, A. Dehner, H. Kessler i J. Buchner, p53—a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. 45(39): p. 6440-60.
6. Zheltukhin, A.O. i P.M. Chumakov, Constitutive and induced functions of the p53 gene. *Biochemistry (Mosc)*, 2010. 75(13): p. 1692-721.
7. Seemann, S., D. Maurici, M. Olivier, C.C. de Fromental i P. Hainaut, The tumor suppressor gene TP53: implications for cancer management and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004. 41(5-6): p. 551-83.
8. Joerger, A.C. i A.R. Fersht, Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem*, 2008. 77: p. 557-82.
9. Marcel, V. i P. Hainaut, p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(3): p. 391-406.
10. Toledo, F. i G.M. Wahl, Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(12): p. 909-23.
11. Petitjean, A., E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S.V. Tavtigian, P. Hainaut i M. Olivier, Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*, 2007. 28(6): p. 622-9.
12. Janicke, R.U., V. Graupner, W. Budach i F. Essmann, The do's and don'ts of p53 isoforms. *Biol Chem*, 2009. 390(10): p. 951-63.
13. Meek, D.W. i C.W. Anderson, Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. 1(6): p. a000950.
14. Riley, K.J. i L.J. Maher, 3rd, p53 RNA interactions: new clues in an old mystery. *RNA*, 2007. 13(11): p. 1825-33.
15. Dai, C. i W. Gu, p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med*, 2010. 16(11): p. 528-36.
16. Murray-Zmijewski, F., D.P. Lane i J.C. Bourdon, p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, 2006. 13(6): p. 962-72.

17. Sayan, A.E., J.P. Roperch, B.S. Sayan, M. Rossi, M.J. Pinkoski, R.A. Knight, A.E. Willis i G. Melino, Generation of DeltaTAp73 proteins by translation from a putative internal ribosome entry site. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1095: p. 315-24.
18. Dotsch, V., F. Bernassola, D. Coutandin, E. Candi i G. Melino, p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2(9): p. a004887.
19. Khoury, M.P. i J.C. Bourdon, p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer*, 2011. 2(4): p. 453-65.
20. Ghosh, A., D. Stewart i G. Matlashewski, Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(18): p. 7987-97.
21. Ray, P.S., R. Grover i S. Das, Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep*, 2006. 7(4): p. 404-10.
22. Yang, D.Q., M.J. Halaby i Y. Zhang, 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*, 2006. 25(33): p. 4613-9.
23. Courtois, S., G. Verhaegh, S. North, M.G. Luciani, P. Lassus, U. Hibner, M. Oren i P. Hainaut, DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*, 2002. 21(44): p. 6722-8.
24. Ohki, R., T. Kawase, T. Ohta, H. Ichikawa i Y. Taya, Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci*, 2007. 98(2): p. 189-200.
25. Yin, Y., C.W. Stephen, M.G. Luciani i R. Fahraeus, p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(6): p. 462-7.
26. Lu, H. i A.J. Levine, Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(11): p. 5154-8.
27. Xing, J., H.M. Sheppard, S.I. Corneille i X. Liu, p53 Stimulates TFIID-TFIIA-promoter complex assembly, and p53-T antigen complex inhibits TATA binding protein-TATA interaction. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(11): p. 3652-61.
28. Powell, D.J., R. Hrstka, M. Candeias, K. Bourougaa, B. Vojtesek i R. Fahraeus, Stress-dependent changes in the properties of p53 complexes by the alternative translation product p53/47. *Cell Cycle*, 2008. 7(7): p. 950-9.
29. Bourdon, J.C., K. Fernandes, F. Murray-Zmijewski, G. Liu, A. Diot, D.P. Xirodimas, M.K. Saville i D.P. Lane, p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*, 2005. 19(18): p. 2122-37.
30. Marcel, V., S. Perrier, M. Aoubala, S. Ageorges, M.J. Groves, A. Diot, K. Fernandes, S. Tauro i J.C. Bourdon, Delta160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by Delta133p53 transcript. *FEBS Lett*, 2010. 584(21): p. 4463-8.
31. Marcel, V., M.L. Dichtel-Danjoy, C. Sagne, H. Hafsi, D. Ma, S. Ortiz-Cuaran, M. Olivier, J. Hall, B. Mollereau, P. Hainaut i J.C. Bourdon, Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ*, 2011. 18(12): p. 1815-24.
32. Guimaraes, D.P. i P. Hainaut, TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie*, 2002. 84(1): p. 83-93.
33. Olivier, M., M. Hollstein i P. Hainaut, TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. 2(1): p. a001008.
34. Candeias, M.M., L. Malbert-Colas, D.J. Powell, C. Daskalogianni, M.M. Maslon, N. Naski, K. Bourougaa, F. Calvo i R. Fahraeus, P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(9): p. 1098-105.

35. Goldstein, I., V. Marcel, M. Olivier, M. Oren, V. Rotter i P. Hainaut, Understanding wild-type and mutant p53 activities in human cancer: new landmarks on the way to targeted therapies. *Cancer Gene Ther*, 2011. 18(1): p. 2-11.
36. Goh, A.M., C.R. Coffill i D.P. Lane, The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol*, 2011. 223(2): p. 116-26.
37. Felley-Bosco, E., A. Weston, H.M. Cawley, W.P. Bennett i C.C. Harris, Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am J Hum Genet*, 1993. 53(3): p. 752-9.
38. Matlashewski, G.J., S. Tuck, D. Pim, P. Lamb, J. Schneider i L.V. Crawford, Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(2): p. 961-3.
39. Costa, S., D. Pinto, D. Pereira, H. Rodrigues, J. Cameselle-Teijeiro, R. Medeiros i F. Schmitt, Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 32.
40. Gemignani, F., V. Moreno, S. Landi, N. Moullan, A. Chabrier, S. Gutierrez-Enriquez, J. Hall, E. Guino, M.A. Peinado, G. Capella i F. Canzian, A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*, 2004. 23(10): p. 1954-6.
41. Marcel, V., P.L. Tran, C. Sagne, G. Martel-Planche, L. Vaslin, M.P. Teulade-Fichou, J. Hall, J.L. Mergny, P. Hainaut i E. Van Dyck, G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis*, 2011. 32(3): p. 271-8.
42. Hollstein, M. i P. Hainaut, Massively regulated genes: the example of TP53. *J Pathol*, 2010. 220(2): p. 164-73.
43. Lamb, P. i L. Crawford, Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol*, 1986. 6(5): p. 1379-85.
44. Tuck, S.P. i L. Crawford, Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(5): p. 2163-72.
45. Strudwick, S., L.M. Carastro, T. Stagg i P. Lazarus, Differential transcription-coupled translational inhibition of human p53 expression: a potentially important mechanism of regulating p53 expression in normal versus tumor tissue. *Mol Cancer Res*, 2003. 1(6): p. 463-74.
46. Reisman, D., M. Greenberg i V. Rotter, Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(14): p. 5146-50.
47. Bienz-Tadmor, B., R. Zakut-Houri, S. Libresco, D. Givol i M. Oren, The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J*, 1985. 4(12): p. 3209-13.
48. Douglas, A.G. i M.J. Wood, RNA splicing: disease and therapy. *Brief Funct Genomics*, 2011. 10(3): p. 151-64.
49. Han, J., J. Xiong, D. Wang i X.D. Fu, Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends Cell Biol*, 2011. 21(6): p. 336-43.
50. Venables, J.P. i J. Burn, EASI-enrichment of alternatively spliced isoforms. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(15): p. e103.
51. Matlashewski, G., D. Pim, L. Banks i L. Crawford, Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res*, 1987. 1(1): p. 77-85.
52. Avery-Kiejda, K.A., X.D. Zhang, L.J. Adams, R.J. Scott, B. Vojtesek, D.P. Lane i P. Hersey, Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(6): p. 1659-68.
53. Candeias, M.M., D.J. Powell, E. Roubalova, S. Apcher, K. Bourougaa, B. Vojtesek, H. Bruzzoni-Giovanelli i R. Fahraeus, Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene*, 2006. 25(52): p. 6936-47.

54. Davidson, W.R., C. Kari, Q. Ren, B. Daroczi, A.P. Dicker i U. Rodeck, Differential regulation of p53 function by the N-terminal DeltaNp53 and Delta113p53 isoforms in zebrafish embryos. *BMC Dev Biol*, 2010. 10: p. 102.
55. Huppert, J.L., A. Bugaut, S. Kumari i S. Balasubramanian, G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(19): p. 6260-8.
56. Lazar, V., F. Hazard, F. Bertin, N. Janin, D. Bellet i B. Bressac, Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene*, 1993. 8(6): p. 1703-5.
57. Blaszczyk, L., M. Dutkiewicz i J. Ciesiolka, [Translation of eukaryotic mRNA in a cap-independent mode]. *Postepy Biochem*, 2007. 53(4): p. 400-12.
58. Shatsky, I.N., S.E. Dmitriev, I.M. Terenin i D.E. Andreev, Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol Cells*, 2010. 30(4): p. 285-93.
59. Jackson, R.J., C.U. Hellen i T.V. Pestova, The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(2): p. 113-27.
60. Malys, N. i J.E. McCarthy, Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell Mol Life Sci*, 2011. 68(6): p. 991-1003.
61. Spriggs, K.A., M. Stoneley, M. Bushell i A.E. Willis, Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol Cell*, 2008. 100(1): p. 27-38.
62. Komar, A.A. i M. Hatzoglou, Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle*, 2011. 10(2): p. 229-40.
63. Baird, S.D., M. Turcotte, R.G. Korneluk i M. Holcik, Searching for IRES. *RNA*, 2006. 12(10): p. 1755-85.
64. Rovinski, B., D. Munroe, J. Peacock, M. Mowat, A. Bernstein i S. Benchimol, Deletion of 5'-coding sequences of the cellular p53 gene in mouse erythroleukemia: a novel mechanism of oncogene regulation. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(2): p. 847-53.
65. Lopez-Lastra, M., A. Rivas i M.I. Barria, Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res*, 2005. 38(2-3): p. 121-46.
66. Suzuki, K. i H. Matsubara, Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol*, 2011. 2011: p. 978312.
67. Pyronnet, S. i N. Sonenberg, Cell-cycle-dependent translational control. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. 11(1): p. 13-8.
68. Vilborg, A., M.T. Wilhelm i K.G. Wiman, Regulation of tumor suppressor p53 at the RNA level. *J Mol Med (Berl)*, 2010. 88(7): p. 645-52.
69. Grover, R., A. Sharathchandra, A. Ponnuswamy, D. Khan i S. Das, Effect of mutations on the p53 IRES RNA structure: implications for de-regulation of the synthesis of p53 isoforms. *RNA Biol*, 2011. 8(1): p. 132-42.
70. Hartmann, R.K., A. Bindereif, A. Schon i E. Westhof, *Handbook of RNA Biochemistry*. 2008: WILEY-VCH.
71. Zuker, M., Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(13): p. 3406-15.
72. Christian, K.J., M.A. Lang i F. Raffalli-Mathieu, Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment. *Mol Pharmacol*, 2008. 73(5): p. 1558-67.

73. Mitchell, S.A., K.A. Spriggs, M.J. Coldwell, R.J. Jackson i A.E. Willis, The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol Cell*, 2003. 11(3): p. 757-71.
74. Sawicka, K., M. Bushell, K.A. Spriggs i A.E. Willis, Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans*, 2008. 36(Pt 4): p. 641-7.
75. Schellenberg, M.J., D.B. Ritchie i A.M. MacMillan, Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci*, 2008. 33(6): p. 243-6.
76. Gallego, J., Internal initiation of translation by viral and cellular IRESs—a new avenue for specific inhibition of protein synthesis? *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2002. 5(5): p. 777-84.
77. Fitzgerald, K.D. i B.L. Semler, Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1789(9-10): p. 518-28.
78. Grover, R., P.S. Ray i S. Das, Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell Cycle*, 2008. 7(14): p. 2189-98.
79. Clerte, C. i K.B. Hall, Characterization of multimeric complexes formed by the human PTB1 protein on RNA. *RNA*, 2006. 12(3): p. 457-75.
80. Oscier, D.G., A.C. Gardiner, S.J. Mould, S. Glide, Z.A. Davis, R.E. Ibbotson, M.M. Corcoran, R.M. Chapman, P.W. Thomas, J.A. Copplestone, J.A. Orchard i T.J. Hamblin, Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*, 2002. 100(4): p. 1177-84.
81. Gajjar, M., M.M. Candeias, L. Malbert-Colas, A. Mazars, J. Fujita, V. Olivares-Illana i R. Fahraeus, The p53 mRNA-Mdm2 Interaction Controls Mdm2 Nuclear Trafficking and Is Required for p53 Activation following DNA Damage. *Cancer Cell*, 2012. 21(1): p. 25-35.
82. Haley, B., T. Paunesku, M. Protic i G.E. Woloschak, Response of heterogeneous ribonuclear proteins (hnRNP) to ionising radiation and their involvement in DNA damage repair. *Int J Radiat Biol*, 2009. 85(8): p. 643-55.
83. Takagi, M., M.J. Absalon, K.G. McLure i M.B. Kastan, Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell*, 2005. 123(1): p. 49-63.
84. Chen, J. i M.B. Kastan, 5'-3'-UTR interactions regulate p53 mRNA translation and provide a target for modulating p53 induction after DNA damage. *Genes Dev*, 2010. 24(19): p. 2146-56.
85. Galy, B., L. Creancier, L. Prado-Lourenco, A.C. Prats i H. Prats, p53 directs conformational change and translation initiation blockade of human fibroblast growth factor 2 mRNA. *Oncogene*, 2001. 20(34): p. 4613-20.
86. Miller, S.J., T. Suthiphongchai, G.P. Zambetti i M.E. Ewen, p53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for transforming growth factor beta- and p53-mediated translational inhibition of cdk4. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(22): p. 8420-31.
87. Mosner, J., T. Mummenbrauer, C. Bauer, G. Sczakiel, F. Grosse i W. Deppert, Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J*, 1995. 14(18): p. 4442-9.
88. Lankat-Buttgereit, B. i R. Goke, The tumour suppressor Pcdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell*, 2009. 101(6): p. 309-17.
89. Wedeken, L., P. Singh i K.H. Klempnauer, Tumor suppressor protein Pcdcd4 inhibits translation of p53 mRNA. *J Biol Chem*, 2011. 286(50): p. 42855-62.

90. Mahmoudi, S., S. Henriksson, M. Corcoran, C. Mendez-Vidal, K.G. Wiman i M. Farnebo, Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell*, 2009. 33(4): p. 462-71.
91. Farnebo, M., Wrap53, a novel regulator of p53. *Cell Cycle*, 2009. 8(15): p. 2343-6.
92. Kim, H., S. You, L.K. Foster, J. Farris i D.N. Foster, The rapid destabilization of p53 mRNA in immortal chicken embryo fibroblast cells. *Oncogene*, 2001. 20(37): p. 5118-23.
93. Mokdad-Gargouri, R., K. Belhadj i A. Gargouri, Translational control of human p53 expression in yeast mediated by 5'-UTR-ORF structural interaction. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(5): p. 1222-7.
94. Hasler, J. i K. Strub, Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(19): p. 5491-7.
95. Saraogi, I. i S.O. Shan, Molecular mechanism of co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *Traffic*, 2011. 12(5): p. 535-42.
96. Barreau, C., L. Paillard i H.B. Osborne, AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(22): p. 7138-50.
97. Fu, L., M.D. Minden i S. Benchimol, Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J*, 1996. 15(16): p. 4392-401.
98. Fu, L. i S. Benchimol, Participation of the human p53 3'UTR in translational repression and activation following gamma-irradiation. *EMBO J*, 1997. 16(13): p. 4117-25.
99. Fu, L., W. Ma i S. Benchimol, A translation repressor element resides in the 3' untranslated region of human p53 mRNA. *Oncogene*, 1999. 18(47): p. 6419-24.
100. Brennan, C.M. i J.A. Steitz, HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci*, 2001. 58(2): p. 266-77.
101. Mazan-Mamczarz, K., S. Galban, I. Lopez de Silanes, J.L. Martindale, U. Atasoy, J.D. Keene i M. Gorospe, RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(14): p. 8354-9.
102. Tong, X. i J.C. Pelling, Enhancement of p53 expression in keratinocytes by the bioflavonoid apigenin is associated with RNA-binding protein HuR. *Mol Carcinog*, 2009. 48(2): p. 118-29.
103. Nakamura, H., H. Kawagishi, A. Watanabe, K. Sugimoto, M. Maruyama i M. Sugimoto, Cooperative role of the RNA-binding proteins Hzf and HuR in p53 activation. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(10): p. 1997-2009.
104. Iijima, T., T. Imai, Y. Kimura, A. Bernstein, H.J. Okano, M. Yuzaki i H. Okano, Hzf protein regulates dendritic localization and BDNF-induced translation of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(47): p. 17190-5.
105. Vilborg, A., C. Bersani, M.T. Wilhelm i K.G. Wiman, The p53 target Wig-1: a regulator of mRNA stability and stem cell fate? *Cell Death Differ*, 2011. 18(9): p. 1434-40.
106. Vilborg, A., J.A. Glahder, M.T. Wilhelm, C. Bersani, M. Corcoran, S. Mahmoudi, M. Rosenstierne, D. Grander, M. Farnebo, B. Norrild i K.G. Wiman, The p53 target Wig-1 regulates p53 mRNA stability through an AU-rich element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(37): p. 15756-61.
107. Zhang, J., S.J. Cho, L. Shu, W. Yan, T. Guerrero, M. Kent, K. Skorupski, H. Chen i X. Chen, Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas. *Genes Dev*, 2011. 25(14): p. 1528-43.
108. Zhang, X., A. Virtanen i F.E. Kleiman, To polyadenylate or to deadenylate: that is the question. *Cell Cycle*, 2010. 9(22): p. 4437-49.
109. Mirkin, N., D. Fonseca, S. Mohammed, M.A. Cevher, J.L. Manley i F.E. Kleiman, The 3' processing factor CstF functions in the DNA repair response. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(6): p. 1792-804.

110. Decorsiere, A., A. Cayrel, S. Vagner i S. Millevoi, Essential role for the interaction between hnRNP H/F and a G quadruplex in maintaining p53 pre-mRNA 3'-end processing and function during DNA damage. *Genes Dev*, 2011. 25(3): p. 220-5.
111. Villalba, A., O. Coll i F. Gebauer, Cytoplasmic polyadenylation and translational control. *Curr Opin Genet Dev*, 2011. 21(4): p. 452-7.
112. Glahder, J.A. i B. Norrild, Involvement of hGLD-2 in cytoplasmic polyadenylation of human p53 mRNA. *APMIS*, 2011. 119(11): p. 769-75.
113. Burns, D.M., A. D'Ambrogio, S. Nottrott i J.D. Richter, CPEB and two poly(A) polymerases control miR-122 stability and p53 mRNA translation. *Nature*, 2011. 473(7345): p. 105-8.
114. Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004. 116(2): p. 281-97.
115. Garzon, R., M. Fabbri, A. Cimmino, G.A. Calin i C.M. Croce, MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*, 2006. 12(12): p. 580-7.
116. Hu, W., C.S. Chan, R. Wu, C. Zhang, Y. Sun, J.S. Song, L.H. Tang, A.J. Levine i Z. Feng, Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. *Mol Cell*, 2010. 38(5): p. 689-99.
117. Kumar, M., Z. Lu, A.A. Takwi, W. Chen, N.S. Callander, K.S. Ramos, K.H. Young i Y. Li, Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*, 2011. 30(7): p. 843-53.
118. Le, M.T., C. Teh, N. Shyh-Chang, H. Xie, B. Zhou, V. Korzh, H.F. Lodish i B. Lim, MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*, 2009. 23(7): p. 862-76.
119. Zhang, Y., J.S. Gao, X. Tang, L.D. Tucker, P. Quesenberry, I. Rigoutsos i B. Ramratnam, MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. *FEBS Lett*, 2009. 583(22): p. 3725-30.
120. Ciesiolka, J., D. Michalowski, J. Wrzesinski, J. Krajewski i W.J. Krzyzosiak, Patterns of cleavages induced by lead ions in defined RNA secondary structure motifs. *J Mol Biol*, 1998. 275(2): p. 211-20.
121. McGinnis, J.L., J.A. Dunkle, J.H. Cate i K.M. Weeks, The mechanisms of RNA SHAPE chemistry. *J Am Chem Soc*, 2012. 134(15): p. 6617-24.
122. Wilkinson, K.A., S.M. Vasa, K.E. Deigan, S.A. Mortimer, M.C. Giddings i K.M. Weeks, Influence of nucleotide identity on ribose 2'-hydroxyl reactivity in RNA. *RNA*, 2009. 15(7): p. 1314-21.
123. Reuter, J.S. i D.H. Mathews, RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, 2010. 11: p. 129.
124. Hofacker, I.L., W. Fontana, P.F. Stadler, S. Bonhoeffer, M. Tacker i P. Schuster, Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures. *Monatshefte f. Chemie*, 1994. 125: p. 167-188.
125. Xayaphoummine, A., T. Bucher i H. Isambert, Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(Web Server issue): p. W605-10.
126. Kakavas, V.K., P. Plageras, T.A. Vlachos, A. Papaioannou i V.A. Noulas, PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol Biotechnol*, 2008. 38(2): p. 155-63.
127. Siebert, S. i R. Backofen, MARNA: multiple alignment and consensus structure prediction of RNAs based on sequence structure comparisons. *Bioinformatics*, 2005. 21(16): p. 3352-9.
128. Hermann, T. i D.J. Patel, Stitching together RNA tertiary architectures. *J Mol Biol*, 1999. 294(4): p. 829-49.
129. Pyle, A.M., Metal ions in the structure and function of RNA. *J Biol Inorg Chem*, 2002. 7(7-8): p. 679-90.

130. Popenda, M., M. Szachniuk, M. Blazewicz, S. Wasik, E.K. Burke, J. Blazewicz i R.W. Adamiak, RNA FRABASE 2.0: an advanced web-accessible database with the capacity to search the three-dimensional fragments within RNA structures. *BMC Bioinformatics*, 2010. 11: p. 231.
131. Popenda, M., M. Szachniuk, M. Antczak, K.J. Purzycka, P. Lukasiak, N. Bartol, J. Blazewicz i R.W. Adamiak, Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(14): p. e112.
132. Popenda, L., L. Bielecki, Z. Gdaniec i R.W. Adamiak, Structure and dynamics of adenosine bulged RNA duplex reveals formation of the dinucleotide platform in the C:G-A triple. *ARKIVOC*, 2009: p. 130-144.
133. Sharma, M.R., D.N. Wilson, P.P. Datta, C. Barat, F. Schluenzen, P. Fucini i R.K. Agrawal, Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(49): p. 19315-20.
134. Correll, C.C., B. Freeborn, P.B. Moore i T.A. Steitz, Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell*, 1997. 91(5): p. 705-12.
135. Demeshkina, N., L. Jenner, G. Yusupova i M. Yusupov, Interactions of the ribosome with mRNA and tRNA. *Curr Opin Struct Biol*, 2010. 20(3): p. 325-32.
136. Agirrezabala, X., H.Y. Liao, E. Schreiner, J. Fu, R.F. Ortiz-Meoz, K. Schulten, R. Green i J. Frank, Structural characterization of mRNA-tRNA translocation intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(16): p. 6094-9.
137. Ennifar, E., M. Yusupov, P. Walter, R. Marquet, B. Ehresmann, C. Ehresmann i P. Dumas, The crystal structure of the dimerization initiation site of genomic HIV-1 RNA reveals an extended duplex with two adenine bulges. *Structure*, 1999. 7(11): p. 1439-49.
138. Lilley, D.M., Kinking of DNA and RNA by base bulges. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(16): p. 7140-2.
139. Zhang, Q., N.K. Kim, R.D. Peterson, Z. Wang i J. Feigon, Structurally conserved five nucleotide bulge determines the overall topology of the core domain of human telomerase RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(44): p. 18761-8.
140. Locker, N., L.E. Easton i P.J. Lukavsky, HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *EMBO J*, 2007. 26(3): p. 795-805.
141. Blyn, L.B., K.M. Swiderek, O. Richards, D.C. Stahl, B.L. Semler i E. Ehrenfeld, Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(20): p. 11115-20.
142. Sean, P., J.H. Nguyen i B.L. Semler, Altered interactions between stem-loop IV within the 5' noncoding region of coxsackievirus RNA and poly(rC) binding protein 2: effects on IRES-mediated translation and viral infectivity. *Virology*, 2009. 389(1-2): p. 45-58.
143. Tang, R.S. i D.E. Draper, Bulge loops used to measure the helical twist of RNA in solution. *Biochemistry*, 1990. 29(22): p. 5232-7.
144. Liang, C. i C. Liu, Dynamics of RNA with A6 bulge loop. *Chinese Science Bulletin*, 2002. 47(12): p. 1003-1006.
145. Lukavsky, P.J., I. Kim, G.A. Otto i J.D. Puglisi, Structure of HCV IRES domain II determined by NMR. *Nat Struct Biol*, 2003. 10(12): p. 1033-8.
146. Spahn, C.M., J.S. Kieft, R.A. Grassucci, P.A. Penczek, K. Zhou, J.A. Doudna i J. Frank, Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science*, 2001. 291(5510): p. 1959-62.
147. Masquida, B. i E. Westhof, On the wobble GoU and related pairs. *RNA*, 2000. 6(1): p. 9-15.

148. Ben-Asouli, Y., Y. Banai, Y. Pel-Or, A. Shir i R. Kaempfer, Human interferon-gamma mRNA autoregulates its translation through a pseudoknot that activates the interferon-inducible protein kinase PKR. *Cell*, 2002. 108(2): p. 221-32.
149. Reineke, L.C. i W.C. Merrick, Characterization of the functional role of nucleotides within the URE2 IRES element and the requirements for eIF2A-mediated repression. *RNA*, 2009. 15(12): p. 2264-77.
150. Sobczak, K. i W.J. Krzyzosiak, Structural determinants of BRCA1 translational regulation. *J Biol Chem*, 2002. 277(19): p. 17349-58.
151. Stefanovic, B. i D.A. Brenner, 5' stem-loop of collagen alpha 1(I) mRNA inhibits translation in vitro but is required for triple helical collagen synthesis in vivo. *J Biol Chem*, 2003. 278(2): p. 927-33.
152. Bonnal, S., C. Schaeffer, L. Creancier, S. Clamens, H. Moine, A.C. Prats i S. Vagner, A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J Biol Chem*, 2003. 278(41): p. 39330-6.
153. Fernandez, J., I. Yaman, W.C. Merrick, A. Koromilas, R.C. Wek, R. Sood, J. Hensold i M. Hatzoglou, Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *J Biol Chem*, 2002. 277(3): p. 2050-8.
154. Jopling, C.L., K.A. Spriggs, S.A. Mitchell, M. Stoneley i A.E. Willis, L-Myc protein synthesis is initiated by internal ribosome entry. *RNA*, 2004. 10(2): p. 287-98.
155. Martineau, Y., C. Le Bec, L. Monbrun, V. Allo, I.M. Chiu, O. Danos, H. Moine, H. Prats i A.C. Prats, Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(17): p. 7622-35.
156. Pedersen, S.K., J. Christiansen, T.O. Hansen, M.R. Larsen i F.C. Nielsen, Human insulin-like growth factor II leader 2 mediates internal initiation of translation. *Biochem J*, 2002. 363(Pt 1): p. 37-44.
157. Stoneley, M., F.E. Paulin, J.P. Le Quesne, S.A. Chappell i A.E. Willis, C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, 1998. 16(3): p. 423-8.
158. Bourougaa, K., N. Naski, C. Boularan, C. Mlynarczyk, M.M. Candeias, S. Marullo i R. Fahraeus, Endoplasmic reticulum stress induces G2 cell-cycle arrest via mRNA translation of the p53 isoform p53/47. *Mol Cell*, 2010. 38(1): p. 78-88.
159. Laing, C., D. Wen, J.T. Wang i T. Schlick, Predicting coaxial helical stacking in RNA junctions. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(2): p. 487-98.
160. Plank, T.D. i J.S. Kieft, The structures of nonprotein-coding RNAs that drive internal ribosome entry site function. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012. 3(2): p. 195-212.
161. Kato, Y., K. Sato, K. Asai i T. Akutsu, Rtips: fast and accurate tools for RNA 2D structure prediction using integer programming. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(Web Server issue): p. W29-34.
162. Reeder, J. i R. Giegerich, Design, implementation and evaluation of a practical pseudoknot folding algorithm based on thermodynamics. *BMC Bioinformatics*, 2004. 5: p. 104.
163. Ren, J., B. Rastegari, A. Condon i H.H. Hoos, HotKnots: heuristic prediction of RNA secondary structures including pseudoknots. *RNA*, 2005. 11(10): p. 1494-504.
164. Kozak, M., Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. 83(9): p. 2850-4.

165. Sonenberg, N., eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol*, 2008. 86(2): p. 178-83.
166. Babendure, J.R., J.L. Babendure, J.H. Ding i R.Y. Tsien, Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA*, 2006. 12(5): p. 851-61.
167. Xia, X. i M. Holcik, Strong eukaryotic IRESs have weak secondary structure. *PLoS One*, 2009. 4(1): p. e4136.
168. Kozak, M., Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 1999. 234(2): p. 187-208.
169. Ofir-Rosenfeld, Y., K. Boggs, D. Michael, M.B. Kastan i M. Oren, Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell*, 2008. 32(2): p. 180-9.
170. Kozak, M., Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(21): p. 8301-5.
171. Kolupaeva, V.G., C.U. Hellen i I.N. Shatsky, Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *RNA*, 1996. 2(12): p. 1199-212.
172. Mitchell, S.A., K.A. Spriggs, M. Bushell, J.R. Evans, M. Stoneley, J.P. Le Quesne, R.V. Spriggs i A.E. Willis, Identification of a motif that mediates polypyrimidine tract-binding protein-dependent internal ribosome entry. *Genes Dev*, 2005. 19(13): p. 1556-71.
173. Stockley, P.G., Filter-binding assays. *Methods Mol Biol*, 2009. 543: p. 1-14.
174. Stoneley, M. i A.E. Willis, Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene*, 2004. 23(18): p. 3200-7.
175. Clerte, C. i K.B. Hall, The domains of polypyrimidine tract binding protein have distinct RNA structural preferences. *Biochemistry*, 2009. 48(10): p. 2063-74.
176. Monie, T.P., H. Hernandez, C.V. Robinson, P. Simpson, S. Matthews i S. Curry, The polypyrimidine tract binding protein is a monomer. *RNA*, 2005. 11(12): p. 1803-8.
177. Hahm, B., O.H. Cho, J.E. Kim, Y.K. Kim, J.H. Kim, Y.L. Oh i S.K. Jang, Polypyrimidine tract-binding protein interacts with HnRNP L. *FEBS Lett*, 1998. 425(3): p. 401-6.
178. Rideau, A.P., C. Gooding, P.J. Simpson, T.P. Monie, M. Lorenz, S. Huttelmaier, R.H. Singer, S. Matthews, S. Curry i C.W. Smith, A peptide motif in Raver1 mediates splicing repression by interaction with the PTB RRM2 domain. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. 13(9): p. 839-48.
179. Oberstrass, F.C., S.D. Auweter, M. Erat, Y. Hargous, A. Henning, P. Wenter, L. Reymond, B. Amir-Ahmady, S. Pitsch, D.L. Black i F.H. Allain, Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation. *Science*, 2005. 309(5743): p. 2054-7.
180. Song, Y., E. Tzima, K. Ochs, G. Bassili, H. Trusheim, M. Linder, K.T. Preissner i M. Niepmann, Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA*, 2005. 11(12): p. 1809-24.
181. Conte, M.R., T. Grune, J. Ghuman, G. Kelly, A. Ladas, S. Matthews i S. Curry, Structure of tandem RNA recognition motifs from polypyrimidine tract binding protein reveals novel features of the RRM fold. *EMBO J*, 2000. 19(12): p. 3132-41.
182. Kafasla, P., N. Morgner, T.A. Poyry, S. Curry, C.V. Robinson i R.J. Jackson, Polypyrimidine tract binding protein stabilizes the encephalomyocarditis virus IRES structure via binding multiple sites in a unique orientation. *Mol Cell*, 2009. 34(5): p. 556-68.

183. Kafasla, P., N. Morgner, C.V. Robinson i R.J. Jackson, Polypyrimidine tract-binding protein stimulates the poliovirus IRES by modulating eIF4G binding. *EMBO J*, 2010. 29(21): p. 3710-22.
184. Wagner, E.J. i M.A. Garcia-Blanco, Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(10): p. 3281-8.
185. Pilipenko, E.V., E.G. Viktorova, S.T. Guest, V.I. Agol i R.P. Roos, Cell-specific proteins regulate viral RNA translation and virus-induced disease. *EMBO J*, 2001. 20(23): p. 6899-908.
186. Yu, Y., T.R. Sweeney, P. Kafasla, R.J. Jackson, T.V. Pestova i C.U. Hellen, The mechanism of translation initiation on Aichivirus RNA mediated by a novel type of picornavirus IRES. *EMBO J*, 2011. 30(21): p. 4423-36.
187. Kafasla, P., H. Lin, S. Curry i R.J. Jackson, Activation of picornaviral IRESs by PTB shows differential dependence on each PTB RNA-binding domain. *RNA*, 2011. 17(6): p. 1120-31.
188. Petoukhov, M.V., T.P. Monie, F.H. Allain, S. Matthews, S. Curry i D.I. Svergun, Conformation of polypyrimidine tract binding protein in solution. *Structure*, 2006. 14(6): p. 1021-7.
189. Pichon, X., L.A. Wilson, M. Stoneley, A. Bastide, H.A. King, J. Somers i A.E. Willis, RNA Binding Protein/RNA Element Interactions and the Control of Translation. *Curr Protein Pept Sci*, 2012. 13(4): p. 294-304.
190. Dhar, D., M. Venkataramana, A. Ponnuswamy i S. Das, Role of polypyrimidine tract binding protein in mediating internal initiation of translation of interferon regulatory factor 2 RNA. *PLoS One*, 2009. 4(9): p. e7049.
191. Niepmann, M., Porcine polypyrimidine tract-binding protein stimulates translation initiation at the internal ribosome entry site of foot-and-mouth-disease virus. *FEBS Lett*, 1996. 388(1): p. 39-42.
192. Pickering, B.M., S.A. Mitchell, J.R. Evans i A.E. Willis, Polypyrimidine tract binding protein and poly r(C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(2): p. 639-46.
193. Spriggs, K.A., L.C. Cobbold, S.H. Ridley, M. Coldwell, A. Bottley, M. Bushell, A.E. Willis i K. Siddle, The human insulin receptor mRNA contains a functional internal ribosome entry segment. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(17): p. 5881-93.
194. Verma, B., S. Bhattacharyya i S. Das, Polypyrimidine tract-binding protein interacts with coxsackievirus B3 RNA and influences its translation. *J Gen Virol*, 2010. 91(Pt 5): p. 1245-55.
195. Cornelis, S., S.A. Tinton, B. Schepens, Y. Bruynooghe i R. Beyaert, UNR translation can be driven by an IRES element that is negatively regulated by polypyrimidine tract binding protein. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(10): p. 3095-108.
196. Kim, Y.K., B. Hahm i S.K. Jang, Polypyrimidine tract-binding protein inhibits translation of bip mRNA. *J Mol Biol*, 2000. 304(2): p. 119-33.
197. Ohno, S., M. Shibayama, M. Sato, A. Tokunaga i N. Yoshida, Polypyrimidine tract-binding protein regulates the cell cycle through IRES-dependent translation of CDK11(p58) in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle*, 2011. 10(21): p. 3706-13.
198. Kamath, R.V., D.J. Leary i S. Huang, Nucleocytoplasmic shuttling of polypyrimidine tract-binding protein is uncoupled from RNA export. *Mol Biol Cell*, 2001. 12(12): p. 3808-20.
199. Araujo, P.R., K. Yoon, D. Ko, A.D. Smith, M. Qiao, U. Suresh, S.C. Burns i L.O. Penalva, Before It Gets Started: Regulating Translation at the 5' UTR. *Comp Funct Genomics*, 2012. 2012: p. 475731.
200. Wang, E.T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtkova, L. Zhang, C. Mayr, S.F. Kingsmore, G.P. Schroth i C.B. Burge, Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008. 456(7221): p. 470-6.

-
201. Sachs, M.S. i A.P. Geballe, Downstream control of upstream open reading frames. *Genes Dev*, 2006. 20(8): p. 915-21.
 202. Davuluri, R.V., Y. Suzuki, S. Sugano i M.Q. Zhang, CART classification of human 5' UTR sequences. *Genome Res*, 2000. 10(11): p. 1807-16.
 203. Meijer, H.A. i A.A. Thomas, Ribosomes stalling on uORF1 in the *Xenopus* Cx41 5' UTR inhibit downstream translation initiation. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(12): p. 3174-84.
 204. Miller, P.F. i A.G. Hinnebusch, Sequences that surround the stop codons of upstream open reading frames in GCN4 mRNA determine their distinct functions in translational control. *Genes Dev*, 1989. 3(8): p. 1217-25.
 205. Calkhoven, C.F., C. Muller i A. Leutz, Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev*, 2000. 14(15): p. 1920-32.
 206. Calkhoven, C.F., C. Muller i A. Leutz, Translational control of gene expression and disease. *Trends Mol Med*, 2002. 8(12): p. 577-83.
 207. Chu, E., D. Voeller, D.M. Koeller, J.C. Drake, C.H. Takimoto, G.F. Maley, F. Maley i C.J. Allegra, Identification of an RNA binding site for human thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(2): p. 517-21.
 208. Hentze, M.W., S.W. Caughman, T.A. Rouault, J.G. Barriocanal, A. Dancis, J.B. Harford i R.D. Klausner, Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science*, 1987. 238(4833): p. 1570-3.
 209. D'Erchia A, M., G. Pesole, A. Tullo, C. Saccone i E. Sbisà, Guinea pig p53 mRNA: identification of new elements in coding and untranslated regions and their functional and evolutionary implications. *Genomics*, 1999. 58(1): p. 50-64.
 210. Ennifar, E., P. Walter, B. Ehresmann, C. Ehresmann i P. Dumas, Crystal structures of coaxially stacked kissing complexes of the HIV-1 RNA dimerization initiation site. *Nat Struct Biol*, 2001. 8(12): p. 1064-8.
 211. Das, R., A. Laederach, S.M. Pearlman, D. Herschlag i R.B. Altman, SAFA: semi-automated footprinting analysis software for high-throughput quantification of nucleic acid footprinting experiments. *RNA*, 2005. 11(3): p. 344-54.
 212. Vicens, Q., A.R. Gooding, A. Laederach i T.R. Cech, Local RNA structural changes induced by crystallization are revealed by SHAPE. *RNA*, 2007. 13(4): p. 536-48.