

Poznań, 10 czerwiec 2014

Profesor dr hab. Jadwiga Jaruzelska  
Instytut Genetyki Człowieka PAN  
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
jaruzjad@man.poznan.pl

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**pt.** "Rola wariantów sekwencyjnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w inicjacji translacji oraz inhibicja tego procesu za pomocą oligonukleotydów antysensownych"

**Dla:** Rady Naukowej Instytutu Biochemii Chemii Bioorganicznej PAN

**Doktorantka:** Pani mgr Agnieszka Górską

Rozprawa doktorska Pani Górskiej wpisuje się w jeden z nurtów badawczych zespołu Profesora Jerzego Ciesiołki dotyczący znaczenia sygnałów sekwencyjnych i strukturalnych zawartych w regionie 5'UTR które decydują o losach danego mRNA, wyborze odpowiedniej otwartej ramki odczytu oraz efektywności translacji. Model badań stanowiło wielofunkcyjne białko p53 pełniące rolę stabilizatora genomu i supresora nowotworowego oraz syntetyzowana z tego samego mRNA krótsza od strony końca aminowego izoforma ΔNp53. Zagadnienie to jest ważne biorąc pod uwagę właściwość tworzenia przez izoformę ΔNp53 heterodimeru z białkiem p53 pełnej długości. Dzięki tej właściwości izoforma ΔNp53 działa jako swoisty reduktor stężenia czynnego p53 w komórce i ma w konsekwencji istotny wpływ na cykl komórkowy.

W pierwszej części rozprawy autorka koncentrowała się na identyfikacji oraz badaniu znaczenia sygnałów zawartych w regionie 5'UTR w translacji obu izoform, w tym potwierdzeniu występowania IRES (*internal ribosomal entry site*) oraz na próbie wyjaśnienia funkcjonalnej współzależności tych sygnałów w regulacji inicjacji translacji. Podejście badawcze Pani Górskiej polegało na zastosowaniu serii modelowych reporterowych mRNA zawierających odpowiednie fragmenty regionu 5'UTR, początek sekwencji kodującej p53 oraz ORF lucyferazy. W przygotowaniu sześciu konstrukcji reprezentujących mRNA reporterowe brała pod uwagę alternatywny start transkrypcji (odpowiednio P0 i P1) ponieważ obecność sekwencji pomiędzy promotorami P0 a P1 mogła mieć istotny wpływ na strukturę regionu 5'UTR mRNA p53. Ponadto obecny tylko w niektórych produktach składania mRNA p53 intron 2 wprowadzający potencjalnie dodatkowy sygnał regulacji translacji w regionie

5'UTR powyżej kodonu start AUG2 dla izoformy  $\Delta$ Np53, zostały w grupie modelowych mRNA p53 również uwzględnione. Testy funkcjonalne wykonywane były *in vitro*, w lizatach retikulocytarnych królika oraz w transfekowanych komórkach ludzkich. Liczba różnych analiz zastosowanych w tej części rozprawy oraz uzyskanych danych jest wysoka. Wśród nich dwie grupy danych wydają mi się szczególnie interesujące. Po pierwsze grupa danych pokazująca, że obecność regionu pomiędzy promotorem P0 i P1 prowadzi do znacznego obniżenia wydajności translacji uwarunkowanego drastycznymi zmianami w strukturze regionu terminalnego 5'UTR. Wynik ten ilustruje istotny wpływ wyboru miejsca startu transkrypcji, spośród dostępnych alternatywnych miejsc transkrypcji danego genu, na wydajność translacji kodowanego w nim białka. Po drugie grupa danych pokazująca, że alternatywne składanie mRNA p53 które w dojrzałym transkrypcie zachowuje intron 2 prowadzi w konsekwencji do powstania krótkiej otwartej ramki odczytu utworzonej przez kodon AUG1 dla p53 oraz zawarty w tym intronie kodon STOP. Konsekwencją tego jest osłabienie translacji inicjowanej z kodonu AUG2 izoformy  $\Delta$ Np53. Biorąc pod uwagę, że w tym przypadku kodon AUG1 jest czynny można przypuszczać, że obecność intron 2 powoduje, iż translacja izoformy  $\Delta$ Np53 odbywa się według modelu reinicjacji, która następuje po zakończeniu syntezy krótkiego peptydu z kodonu AUG1. Wynik ten pokazuje, że alternatywne składanie tego samego pre-mRNA może skutkować nie tylko syntezą białek o odmiennej strukturze ale może również w istotny sposób modulować wydajność translacji.

W drugiej części rozprawy Pani Górską postanowiła odpowiedzieć na pytanie, czy pomimo bogatej struktury drugorzędowej terminalnego regionu 5'UTR mRNA, którą szczegółowo scharakteryzowała w pierwszej części rozprawy, możliwe jest modulowanie translacji białka p53 oraz izoformy  $\Delta$ Np53 za pomocą komplementarnych do tego regionu antysensownych oligonukleotydów. W szczególności, czy możliwe jest opracowanie oligonukleotydów antysensownych komplementarnych do regionu 5'UTR, które hamowałyby translację białka p53 lub stymulowały syntezę izoformy  $\Delta$ Np53? Interesujący kontekst tej części badań stanowią doniesienia o oporności komórek linii niedrobnokomórkowego raka płuc na radioterapię. Ma ona najprawdopodobniej związek z zatrzymaniem cyklu komórkowego spowodowanym aktywacją białka p53. Już wcześniej podejmowano próby zwiększenia wrażliwości komórek nowotworowych na naświetlanie poprzez hamowanie ekspresji białka p53 za pomocą oligonukleotydów antysensownych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53. Jednak stosowano w tym celu oligonukleotydy antysensowne komplementarne do regionu kodującego jedynie białko p53 pełnej długości. Pani Górską postanowiła sprawdzić czy możliwe jest modulowanie wydajności translacji

inicjowanej z kodonu AUG1 dla białka p53 oraz z kodonu AUG2 dla białka  $\Delta$ Np53, poprzez działanie chemicznie modyfikowanych komplementarnych do regionu 5'UTR oligonukleotydów antysensownych. Pani Górską zastosowała najpierw biblioteki kombinatoryczne by zidentyfikować miejsca dostępne dla hybrydyzacji krótkich oligomerów DNA składających się z 6-merów DNA, w powiązaniu z RNazą H. Uzyskany rozkład cięć zidentyfikowanych po przeprowadzeniu odwrotnej transkrypcji i analizie w żelu polikaryloamidowym pokazał, że pomimo bogatej struktury drugorzędowej region 5' jest dostępny do hybrydyzacji z krótkimi oligomerami DNA. Na podstawie eksperymentalnych wyników mapowania dostępności oraz analizy *in silico* z zastosowaniem odpowiednich programów, Pani Górską zaprojektowała 10 oligonukleotydów antysensownych i badała ich wpływ na translację reporterowej konstrukcji mRNA w lizacie z króliczych retikulocytów. Największy efekt uzyskała za pomocą dwóch oligomerów nazwanych 1 i 7. Ich obecność wpływała na translację z obu kodonów, AUG1 i AUG2, lecz w odmiennym stopniu a stosunek ilościowy obu białek ulegał modyfikacji. W następnym etapie Pani Górską sprawdzała ten efekt w linii komórek MCF-7 wyprowadzonej z raka piersi. W tym podejściu oligomery 1 i 7a, zastosowała jako pochodne 2'-O-metylo i stwierdziła, że jako takie stanowiły przeszkodę w procesie translacji. Zastosowała również oligomery typu gamper, które indukują cięcia mRNA przez RNazę H. Okazało się, że oba typy oligomerów obniżały poziom białka p53, jednak mechanizmy tego zjawiska były odmienne. W przypadku oligomerów typu gamper dochodziło do obniżenia poziomu mRNA p53 na skutek aktywności RNazy H, podczas gdy zastosowanie oligomerów 2'-O-metylo nie zmieniało poziomu mRNA. W tym drugim przypadku, hamowanie translacji spowodowane było modyfikacją struktury drugorzędowej regionu 5'UTR. Wynik ten wskazuje na istotne znaczenie w tych białek dwóch motywów typu spinki w 5'UTR zarówno w translacji z kodonu AUG1 (p53) jak AUG2 ( $\Delta$ Np53). Niestety w komórkach nie udało się zróżnicować ekspresji obu izoform a jedynie zmienić poziom białka p53. Pomimo to, przeprowadzone badania w komórkach pokazały, że taki typ regulacji sterowanej jest możliwy i to stanowi istotne osiągnięcie tej części rozprawy.

Pracę przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Przykład jednego modelowego mRNA jak w soczewce pokazuje złożoność regulacji translacji w której uczestniczą różne zdarzenia: wybór startu transkrypcji który jest regulowany tkankowo oraz w zależności od stanu fizjologicznego komórki, np. tkanka zdrowa lub tkanka nowotworowa. Wybór ten decyduje o obecności lub braku struktur drugorzędowych w 5'UTR które w istotny sposób wpływają na wydajność procesu translacji. Istotną rolę odgrywa tutaj również alternatywne składanie,

które w tym przypadku generuje odmianę mRNA zawierającą intron 2 wprowadzający kodon stop pomiędzy kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2. Pojawia się w ten sposób nowy typ regulacji wynikający z uORF. Jednak brakuje mi w tej pracy określenia dalszej perspektywy, tzn. czy wyniki uzyskane prowadzą do jakiegoś następnego zagadnienia, które będzie podjęte.

Drobne uwagi krytyczne dotyczą stosowania przez autorkę pojęcia „konserwatywny” zamiast „zakonserwowany” lub „zachowany w ewolucji”. Ten błąd pojawia się kilkakrotnie a znaczenie tych pojęć jest odmienne. Niejednokrotnie zamiast słowa „liczba” pojawia się słowo „ilość”. W pracy autorka zasadniczo unika żargonu jednak „IRES-zależna translacja” zamiast „translacja zależna od IRES” razi. W rysunku 34 brak części B która ma pokazać strukturę.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że wyznaczone szczegółowe cele badawcze zostały osiągnięte. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością warsztatu badawczego. Zastosowała szeroki wachlarz technik, co odzwierciedla profesjonalizm grupy badawczej w dziedzinie regulacji translacji. Metodologia badań została starannie dobrana. Praca napisana jest bardzo jasno i jest zaopatrzona w komentarze wystarczające by podążać za tokiem myślowym autorki. Część wyników uzyskanych w rozprawie Pani Górską opublikowała w renomowanych czasopiśmie naukowych i zaprezentowała na konferencjach. Z powyższych powodów uważam, iż przedstawiona rozprawa całkowicie spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Górskiej do następnych etapów przewodu doktorskiego.

