

Jolanta Lisowiec

**Struktura drugorzędowa i próba regulacji alternatywnego
składania pre-mRNA genu MAPT**

Rozprawa doktorska

Promotor pracy:

Prof. dr hab. Ryszard Kierzek

Pracę wykonano

w Instytucie Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

w Zakładzie Chemii i Biologii

Strukturalnej Kwasów

Nukleinowych

Poznań 2014

*Serdecznie dziękuję
prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi
za zaangażowanie oraz
wszelką pomoc i cenne wskazówki
w trakcie powstawania tej pracy*

SPIS TREŚCI

I. CEL PRACY	7
II. ABSTRACT	9
III. STRESZCZENIE.....	11
IV. CZĘŚĆ LITERATUROWA	14
1. Składanie genów	14
1.1. Konstytutywny splicing	14
1.2. Reakcja transestryfikacji w czasie składania genów	16
1.3. Spliceosom	16
1.4. Alternatywny splicing	19
1.5. Regulacja alternatywnego splicingu	20
1.6. Alternatywny splicing w komórkach nerwowych	24
1.7. Wpływ struktury drugorzędowej na alternatywne składanie genów	25
1.7.1. Wpływ struktury drugorzędowej na identyfikację miejsc splicingowych 5' i 3' oraz miejsca rozgałęzienia.....	27
1.7.2. Wpływ struktury drugorzędowej na modyfikacje alternatywnego splicingu przez elementy regulatorowe działające w układzie <i>cis</i>	28
1.7.3. Wpływ struktury drugorzędowej na modyfikacje alternatywnego splicingu przez oddziaływania dalekiego zasięgu	30
2. Tauopatie.....	32
2.1. Białko <i>tau</i>	33
2.2. Choroby związane z agregatami białka <i>tau</i>	35
3. Ośłupienie czołowo-skroniowe połączone z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17	37
3.1. Objawy, diagnoza, leczenie FTDP-17	37
3.2. Mutacje w genie MAPT.....	39
3.2.1. Mutacje zmieniające alternatywny splicing eksonu 10 znajdujące się w regulatorowej spince	41
3.2.2. Pozostałe mutacje zmieniające alternatywny splicing eksonu 10.....	43
3.3. Regulacja alternatywnego składania eksonu 10 genu MAPT przez czynniki działające w układzie <i>trans</i>	45
V. WYNIKI I DYSKUSJA	50
1. Badanie parametrów termodynamicznych regulatorowej spinki i jej mutantów	50
1.1. Parametry termodynamiczne badanych spinek RNA	53
1.2. Widma dichroizmu kołowego badanych spinek RNA.....	55
1.3. Parametry termodynamiczne badanych spinek z ligandami niskocząsteczkowymi..	56

1.3.1. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-neomycyna	58
1.3.2. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-kanamycyna	60
1.3.3. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-tobramycyna.....	61
1.3.4. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-mitoksantron	62
1.4. Porównanie stałych dysocjacji modelowych spinek RNA i ich kompleksów z badanymi ligandami	65
2. Analiza struktury fragmentu pre-mRNA genu MAPT.....	67
2.1. Analiza struktur fragmentu pre-mRNA genu MAPT przy pomocy programu komputerowego służącego do przewidywania struktury drugorzędowej RNA.....	67
2.2. Otrzymywanie cząsteczek RNA używanych do badań strukturalnych	73
2.3. Wykorzystanie izoenergetycznych macierzy RNA do badania struktury drugorzędowej fragmentów pre-mRNA genu MAPT	74
2.3.1. Przygotowanie izoenergetycznych macierzy dedykowanych 11 cząsteczkom fragmentu pre-mRNA genu MAPT.....	76
2.3.2. Mapowanie mikromacierzowe fragmentów pre-mRNA genu MAPT	76
2.4. Mapowanie chemiczne 11 cząsteczek fragmentu pre-mRNA genu MAPT	80
2.4.1. Mapowanie metodą SHAPE 11 cząsteczek fragmentu pre-mRNA genu MAPT	81
2.4.2. Mapowanie siarczanem dimetylu (DMS) 11 cząsteczek fragmentu pre-mRNA genu MAPT	81
2.5. Struktura drugorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT zaproponowana w oparciu o program <i>RNAstructure</i>	84
2.6. Struktura drugorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT zaproponowana w oparciu o program <i>vsfold5</i>	88
2.7. Udokładnianie struktury drugorzędowej fragmentu pre-mRNA genu MAPT zaproponowanej przez program <i>vsfold5</i>	91
2.8. Struktura trzeciorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT	93
3. Badanie alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT na liniach komórkowych cos-7.....	96
3.1. Ocena ilościowa wpływu badanych mutacji na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT	97
3.2. Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT z zastosowaniem niskocząsteczkowych ligandów	99
3.3. Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT z zastosowaniem oligonukleotydów antysensowych	102
4. Proponowany model regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT	106
4.1. Model regulacji, a stabilność termodynamiczna regulatorowej spinki.....	109

4.2. Model regulacji, a czynniki splicingowe	111
4.3. Model regulacji, a rearanżacja struktury fragmentu pre-mRNA genu MAPT	112
4.4. Model regulacji, a mutacje w FTDP-17	116
VI. PODSUMOWANIE	119
VII. MATERIAŁY I METODY	122
1. Materiały	122
1.1. Odczynniki	122
1.2. Enzymy	123
1.3. Plazmidy	123
1.4. Linia komórkowa	123
1.5. Akcesoria dodatkowe	123
1.6. Izotopy promieniotwórcze	123
1.7. Gotowe zestawy do badań biochemicznych	123
1.8. Szczepy bakteryjne	124
1.9. Wzorce długości kwasów nukleinowych	124
1.10. Oligonukleotydy	124
1.11. Roztwory i bufony	127
1.12. Pożywki	130
1.13. Żele	131
1.14. Ważniejsza aparatura, którą stosowano podczas prowadzenia badań	132
1.15. Ważniejsze programy stosowane podczas prowadzenia badań	132
2. Metody	133
2.1. Synteza chemiczna oligonukleotydów	133
2.2. Odblokowywanie i oczyszczanie modyfikowanych heptamerów zawierających łącznik C6-aminoheksylowy na końcu 5' oraz pseudonukleotyd pirenowy na końcu 3', stosowanych jako dodatkowe sondy na mikromacierzy	133
2.3. Odblokowywanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów	134
2.4. Odblokowywanie i oczyszczanie oligodeoksyrybonukleotydów oraz oligodeoksyrybonukleotydów zawierających nukleotydy z serii LNA oraz 6-FAM na 5' końcu	134
2.5. Pomiar trwałości termodynamicznej z użyciem metody topnienia UV	135
2.6. Pomiar widm dichroizmu kołowego spinek RNA	136
2.7. Znakowanie kwasów rybonukleinowych izotopem ³² P	136
2.8. Elektroforeza DNA w żelach agarozowych produktów reakcji PCR	136
2.9. Elektroforeza DNA w żelach agarozowych produktów reakcji RT-PCR	137

2.10. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących	137
2.11. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących	137
2.12. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego	138
2.13. Strącanie kwasów nukleinowych po elucji z żelu poliakrylamidowego.....	138
2.14. Oczyszczanie kwasów nukleinowych metodą fenol-chloroform.....	138
2.15. Otrzymywanie matryc do transkrypcji <i>in vitro</i>	139
2.16. Selekcja matryc do transkrypcji <i>in vitro</i> w plazmidzie pUC19	140
2.17. Amplifikacja matryc do transkrypcji <i>in vitro</i>	142
2.18. Transkrypcja <i>in vitro</i>	142
2.19. Analiza homogenności RNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących	143
2.20. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA metodą SHAPE	143
2.21. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA siarczanem dimetylu.....	145
2.22. Przygotowanie płytek mikroskopowych.....	145
2.23. Przygotowanie sond do drukowania na mikromacierzy	145
2.24. Drukowanie sond na mikromacierzy	145
2.25. Hybrydyzacja na mikromacierzy	146
2.26. Przygotowanie plazmidów pSPL3b	147
2.27. Rozmrażanie komórek <i>cos-7</i>	148
2.28. Hodowla komórek <i>cos-7</i>	149
2.29. Pasaż komórek <i>cos-7</i> na płytkę 24 dołkową	149
2.30. Transfekcja komórek <i>cos-7</i>	149
2.31. Izolacja całkowitego RNA z komórek <i>cos-7</i>	150
2.32. Analiza alternatywnego splicingu w oparciu o reakcje RT-PCR	151
VIII. BIBLIOGRAFIA	152

I. CEL PRACY

Jednym z ważniejszych mechanizmów regulujących ekspresję genów jest alternatywne ich składanie, w wyniku czego dwa lub więcej białek może powstawać z jednego transkryptu (genu). Zaburzenia w regulacji tego procesu mogą u ludzi prowadzić do poważnych chorób. Jednym z przykładów choroby związanej ze zmianami w alternatywnym składaniu genu jest otępienie czołowo-skroniowe połączone z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17 (FTDP-17). Przyczyną stanu patologicznego w tej chorobie są agregaty białka *tau* kodowanego przez gen MAPT. U chorych na FTDP-17 zidentyfikowano mutacje powodujące powstawanie nieaktywnego białka *tau* lub mutacje zaburzające proces alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT. Mutacje występujące w niekodujących fragmentach genu MAPT, a wpływające na zmianę wzorca alternatywnego splicingu mogą być wykorzystane w badaniach nad mechanizmem regulacji alternatywnego składania genów.

Celem niniejszej pracy była kompleksowa analiza wybranych mutacji we fragmencie pre-mRNA genu MAPT, obejmująca badania termodynamiczne, strukturalne i badania na liniach komórkowych.

W pierwszym etapie badań określono parametry termodynamiczne spinek RNA zawierające wybrane do badań mutacje. Dodatkowo, postanowiono ocenić wpływ niskocząsteczkowych ligandów na stabilność termodynamiczną spinki regulującej alternatywne składanie eksonu 10.

Kolejnym zadaniem było modelowanie struktury drugorzędowej fragmentu pre-mRNA genu MAPT. Wykonano badania strukturalne dla wszystkich wybranych mutacji, aby uzyskać informację, jak wpływają one na lokalną strukturę drugorzędową fragmentu pre-mRNA genu MAPT. Wykorzystano trzy metody eksperymentalne badania struktury drugorzędowej RNA, a mianowicie: mapowanie mikromacierzowe, mapowanie metodą SHAPE i modyfikacje chemiczne z użyciem DMS. W oparciu o wyznaczoną strukturę drugorzędową zaproponowano model struktury trzeciorzędowej badanego fragmentu pre-mRNA genu MAPT.

Dane termodynamiczne i strukturalne wykorzystano do zaprojektowania i przeprowadzenia badań służących poznaniu mechanizmu regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 białka *tau* w liniach komórkowych *cos-7*. W badaniach wykorzystano ligandy niskocząsteczkowe oraz oligonukleotydy antysensowe.

Szczegółowa analiza uzyskanych wyników badań strukturalnych oraz uzyskanych na liniach komórkowych pozwoliła na zaproponowanie modelu regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT.

II. ABSTRACT

Tau protein is a product of MAPT gene and belongs to the microtubule associated protein family. In 1998 the first mutation in MAPT gene was found, and over 40 mutations are uncovered nowadays. MAPT gene mutations can be divided into two types. The first type causes the change in biochemical properties of *tau* protein. The second one disrupts alternative splicing of exon 10. Alternative splicing of exon 10 produces 3R (without exon 10) and 4R (with exon 10) protein isoforms. In healthy brain the ratio of 3R and 4R forms is approximately 1.

Alternative splicing of exon 10 is controlled by *trans*-acting factors and *cis*-acting elements. It is reported that splicing of exon 10 is regulated by two weak, 5' and 3' splice sites and seven *cis*-acting elements: SC35-like enhancer, PPE (*polypurine enhancer*), A/C rich enhancer, ESS (*exonic splicing silencer*), ESE (*exonic splicing enhancer*), ISS (*intronic splicing silencer*) and ISM (*intronic splicing modulator*). However, it is reported that a hairpin containing a fragment of exon 10 and intron 10-11 is the main factor responsible for exon 10 splicing regulation. It is suggested that the changes in stability of the studied hairpins directly affect the interaction of its fragments with U1 snRNP or indirectly affect the binding of *trans*-acting factors. Most of the splicing studies which were already published are focused on the pre-mRNA sequence. However, there are more examples proving that the secondary structure regulates splicing.

Described herein research was focused on the end of exon 10 and beginning of intron 10-11 which forms a hairpin structure. Destabilization of this hairpin is induced by mutation and causes excess or reduction of exon 10, which follows a change in a ratio of 3R/4R *tau* isoforms. The effect of disorder in quantity of 3R and 4R isoforms is a pathological state manifested in FTDP-17 disease. It is supposed that a relaxed form of the hairpin is better available to interact with U1 snRNP.

Thermodynamic studies were performed using the 11 RNA molecules, 25/26-nucleotide long containing a fragment of regulatory hairpin: wild type RNA-WT, five mutants naturally occurring in humans and destabilizing hairpin 11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, one hairpin with stabilizing mutation 19G, two molecules with DD-PAC mutation and with stabilizing mutations, i.e. DDI-17T and DD-10C, two molecules with stabilizing mutations – WTI-17T and WT-10C. The UV melting experiments enabled to obtain the thermodynamic parameters for all mutants. Besides, the additional UV melting experiments with mutants and

stabilizing hairpin molecules: neomycin, kanamycin, tobramycin and mitoxantrone were performed. As expected, the experiments confirmed that the mutation in a non-coding region of intron 10-11 causes significant differences in RNA hairpin stability. Three aminoglycoside antibiotics (neomycin, kanamycin, tobramycin) and mitoxantrone were chosen to change the thermodynamic stability of the tested RNAs. The results have shown that, except one case, the presence of chosen ligands enhance thermodynamic stabilities.

Hybridization on isoenergetic microarray and chemical mapping (SHAPE and DMS) demonstrate that all studied RNA molecules 194/195 long have almost the same secondary structure. The presented data show that mutations 11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, 19G, DD-10C, DDI-17T, WT-10C and WTI-17T do not affect the secondary structure of the 194/195 nucleotide fragment of MAPT pre-mRNA. It seems that the mutations affect only the thermodynamic stability of the regulatory hairpin. The data from this experiment were used for the prediction of secondary structure of MAPT pre-mRNA. Moreover, a model of exon 10 alternative splicing regulation was proposed.

The last part of the research was performed on *cos-7* cell lines and included the impact of antibiotics and antisense oligonucleotides on the regulation of alternative splicing of exon 10 of MAPT gene. Neomycin, kanamycin, tobramycin caused concentration-dependent decrease of 4R *tau* isoform in the case of molecule with 11C, 12U, 13G, DD-PAC and 16U mutations. The antisense oligonucleotides allowed to eliminate the mutation effect by interacting with the regulatory elements of alternative splicing of exon 10.

III. STRESZCZENIE

Białko *tau* należy do rodziny białek zasocjowanych z mikrotubulami. W wyniku transkrypcji genu MAPT (ang. *microtubule associated protein tau*) powstaje pre-mRNA, z którego podczas alternatywnego splicingu powstaje sześć izoform tego białka. U dorosłego człowieka białko *tau* występuje w części aksonalnej neuronów. Główne funkcje tego białka to polimeryzacja i stabilizacja mikrotubul, a co za tym idzie, pełni rolę w morfogenezie, rozszerzaniu aksonalnym i transporcie białek w aksonach. Biologiczna funkcja *tau* jest regulowana głównie przez hiperfosforylację. W stanach patologicznych białko *tau* występuje w całej komórce nerwowej i może tworzyć helikalne włókna PHFs (ang. *paired helical filaments*) oraz neurofibrilarnie sploty NFTs (ang. *neurofibrillary tangles*).

Zespół chorób, w których występują patologiczne formy białka *tau* (PHFs oraz NFTs) nazywamy tauopatiami. Do tych chorób zaliczamy jednostki związane z chorobą Alzheimera AD (ang. *alzheimer disease*) oraz różnego typu otępienia czołowo-skroniowe FTDs (ang. *frontotemporal demetias*). W 1998 roku odkryto pierwsze mutacje w genie MAPT, które są odpowiedzialne za chorobę neurodegeneracyjną, a mianowicie otępienie czołowo-skroniowe połączone z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17, FTDP-17 (ang. *frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17*).

Mutacje genu MAPT mogą mieć dwojaki charakter. Pierwszy typ mutacji, powoduje zmianę właściwości biochemicznych białka. Drugi rodzaj, to mutacje zaburzające proces alternatywnego splicingu. U zdrowego człowieka stosunek izoform 3R/4R białka *tau* w przybliżeniu równy jest jeden. Różnica w ilości domen wiążących się do mikrotubul związana jest z wycięciem (izoforma 3R) lub pozostawieniem (izoforma 4R) eksonu 10 w czasie alternatywnego splicingu.

W regulacji alternatywnego składania eksonu 10 białka *tau* bierze udział wiele czynników splicingowych i elementy działające w układzie *cis*. Z danych literaturowych wiadomo, że miejsca akceptorowe i donorowe eksonu 10 to miejsca słabe, dlatego do przyłączenia składników spliceosomu potrzebują dodatkowych miejsc regulujących. W przypadku eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT można wyróżnić siedem następujących elementów działających w układzie *cis*: wzmacniacz splicingu SC35 (ang. *SC35-like enhancer*), polipurynowy wzmacniacz splicingu PPE (ang. *polypurine enhancer*), wzmacniacz splicingu ACE (ang. *A/C rich enhancer*), eksonowy wyciszacz splicingu ESS (ang. *exonic splicing silencer*), eksonowy wzmacniacz splicingu ESE (ang. *exonic splicing*

enhancer), intronowy wyciszacz splicingu ISS (ang. *intronic splicing silencer*) i intronowy modulator splicingu ISM (ang. *intronic splicing modulator*). Intronowy wyciszacz splicingu ISS przyjmuje formę spinki RNA i zawiera 5' miejsce splicingowe. Wydaje się, że element ten pełni kluczową rolę w regulacji alternatywnego składania eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT. Sugeruje się, że zmiany w stabilności termodynamicznej tego motywu spinkowego w sposób bezpośredni lub pośredni powodują różnice w oddziaływaniu z nim składników spliceosomu.

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono badania dotyczące wpływu wybranych mutacji na alternatywne składanie eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT. Podzielić je można na trzy części: badania termodynamiczne, strukturalne i badania na liniach komórkowych *cos-7*.

Do badań termodynamicznych wykorzystano 11 cząsteczek RNA o długości 25/26 nukleotydów, które obejmowały motyw spinkowy na granicy eksonu 10 i intronu 10-11. W eksperymentach wykorzystano spinkę RNA dla formy typu dzikiego (WT), sześć mutacji występujących w chorobie FTDP-17 (11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U oraz 19G) oraz cztery mutanty skonstruowane sztucznie (DD-10C, DDI-17T, WT-10C i WTI-17T). Pomiary trwałości termodynamicznej metodą topnień UV pozwoliły na uzyskanie parametrów termodynamicznych wszystkich spinek RNA. Wykonano także pomiary ich trwałości termodynamicznej w obecności niskocząsteczkowych ligandów: neomycyny, kanamycyny, tobramycyny i mitoksantronu. Badania potwierdziły znaczący wpływ mutacji na stabilność termodynamiczną spinek RNA. Dodatkowo, stabilność termodynamiczna spinek RNA może być zwiększona przez oddziaływanie z antybiotykami.

Kolejnym etapem badań było określenie struktury drugorzędowej jedenastu 194/195 nukleotydowych fragmentów pre-mRNA genu MAPT. Mapowanie struktury drugorzędowej wykonano trzema metodami: wykorzystując izoenergetyczne macierze RNA, metodę SHAPE i z użyciem siarczanu dimetylu (DMS). Dane eksperymentalne zostały wsparte programami komputerowymi służącymi do przewidywania pofałdowania RNA i pozwoliły na zaproponowanie struktury drugorzędowej badanego fragmentu pre-mRNA. Dodatkowo, na podstawie otrzymanej struktury drugorzędowej udało się wymodelować strukturę trzeciorzędową o optymalnej energii swobodnej.

Ostatnią częścią badań były eksperymenty na liniach komórkowych *cos-7*, które obejmowały badanie wpływu mutacji na alternatywne składanie eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT. Z wyjątkiem jednej mutacji (19G), udało się zauważyć korelacje pomiędzy

stabilnością termodynamiczną regulatorowej spinki ISS, a ilością powstających izoform 3R i 4R białka *tau*. Ponadto, wykorzystano ligandy niskocząsteczkowe (neomycyna, kanamycyna, tobramycyna i mitoksantron) do regulacji procesu splicingu eksonu 10. Wszystkie badane ligandy, oprócz mitoksantronu, powodowały zwiększenie ilości izoformy 4R białka *tau* w przypadku mutacji naturalnie występujących w FTDP-17 i destabilizujących regulatorową spinkę ISS (11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U). Dodatkowo, w eksperymentach na liniach komórkowych badano także wpływ modyfikowanych oligonukleotydów antysensowych, nakierowanych na blokowanie innych niż spinka ISS elementów regulujących splicing eksonu 10. Także w tym przypadku udało się zmienić stosunek ilościowy tworzących się izoform białka *tau*.

Wyniki uzyskane we wszystkich przeprowadzonych badaniach pozwoliły na zaproponowanie nowego modelu regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT. Postuluje on, że po transkrypcji do cząsteczki pre-mRNA przyłączają się czynniki splicingowe powodujące lokalną rearanżację struktury, co uniemożliwia rozpoznanie miejsca akceptorowego eksonu 10. Zmiany w ilości izoform białka *tau* spowodowane mutacjami destabilizującymi spinkę regulatorową wynikają z niemożności wiązania się białka PSF do takiej spinki. Mutacja 19G nie wpływa na stabilność termodynamiczną spinki, ale powoduje stabilizację motywu dwuniciowego powstałego w wyniku lokalnej rearanżacji pre-mRNA. W konsekwencji ilości tworzących się 3R i 4R izoform białka *tau* są odmienne od tych tworzonych w przypadku pre-mRNA typu dzikiego.

IV. CZEŚĆ LITERATUROWA

1. Składanie genów

Splicing, czyli składanie genów jest jednym z procesów posttranskrypcyjnej obróbki prekursorowego mRNA (pre-mRNA). Z cząsteczki RNA, która niesie informacje o budowie białka usuwane są rejony niekodujące, czyli introny. Dojrzała cząsteczka mRNA, składa się z fragmentów kodujących zwanych eksonami. Oprócz składania genów, posttranskrypcyjna obróbka pre-mRNA obejmuje: 1) przyłączanie na końcu 5' pre-mRNA, za pomocą wiązania 5'-5' trifosforanowego, czapeczki (ang. *cap*) zawierającej 7-metyloguanozynę, 2) redagowanie RNA polegające na insercji, delecji lub deaminacji reszt nukleotydowych, 3) poliadenylację sprowadzającą się do przyłączenia na końcu 3' pre-mRNA fragmentu poliadenylowego poli(A), 4) eksport mRNA z jądra do cytoplazmy.

Reakcja wycinania intronów składa się z dwóch reakcji transestryfikacji, o czym będzie mowa w dalszej części tego rozdziału. Za prawidłowy i sprawny splicing odpowiedzialny jest kompleks składania pre-mRNA zwany spliceosomem. U człowieka do poprawnego zajścia wycinania intronów potrzebna jest aktywność ponad 170 białek i małych jądrowych RNA bogatych w urydynę tzw. U snRNA (ang. *small nuclear RNA*) (1, 2).

1.1. Konstytutywny splicing

Pierwszym i być może najważniejszym etapem splicingu jest poprawne rozpoznanie fragmentu, który powinien być wycięty. W intronach znajdują się elementy działające w układzie *cis* (ang. *cis-acting elements*), czyli sekwencje regulujące splicing SREs (ang. *splicing regulatory elements*), sekwencje konserwatywne, niezbędne do przeprowadzenia konstytutywnego składania genów (Rysunek 1). Określenie 5' miejsca splicingowego (ang. *5' splice site, donor site*) zwanego również miejscem donorowym oraz 3' miejsca splicingowego (ang. *3' splice site, acceptor site*) określanego mianem miejsca akceptorowego jest kluczowe dla poprawnego wycięcia intronu. Prawidłowe wycinanie fragmentu niekodującego związane jest z rozpoznanieniem sekwencji donorowych i akceptorowych przez składniki spliceosomu, a także określeniem miejsca cięcia pre-mRNA (3).

Miejsce splicingowe na końcu 5' wycinanego intronu definiowane jest jako sekwencja o długości dziewięciu nukleotydów leżąca na granicy eksonu i intronu. U ssaków sekwencja ta wygląda następująco: 5'YAG/GURAGU3', gdzie Y to nukleotyd pirymidynowy, R to nukleotyd

purynowy, a ukośnik określa granicę ekson-intron (4). Z rejonem tym oddziałuje fragment RNA z U1 snRNP (ang. *U1 small nuclear ribonucleoprotein*) i ze względu na jego komplementarność oraz dostępność dla U1 snRNP możemy wyróżnić mocne i słabe 5' miejsce splicingowe (ang. *strong, weak 5'ss*). Miejsce akceptorowe 3' określają dwa rejony leżące wewnątrz wycinanego intronu. Pierwszym fragmentem jest polipirymidynowy trakt PPT (ang. *polypyrimidine tract*) o różnej długości, znajdujący się pomiędzy miejscem rozgałęzienia BP (ang. *branch point*), a 3' miejscem splicingowym. Samo miejsce akceptorowe na końcu 3' intronu posiada sekwencję NYAG/G. Miejsce to zazwyczaj znajduje się około czterdziestu nukleotydów od miejsca rozgałęzienia (4, 5). Lokalizacja BP określa adenozyne biorącą udział w reakcji transestryfikacji, miejsce to posiada wysoce zdegenerowaną sekwencję 5'YNYURAY3' (6, 7). W genomie ludzkim istnieją także miejsca donorowe i akceptorowe splicingu posiadające inne sekwencje, ale nie stanowią one więcej niż 1,5% wszystkich używanych miejsc splicingowych (8).

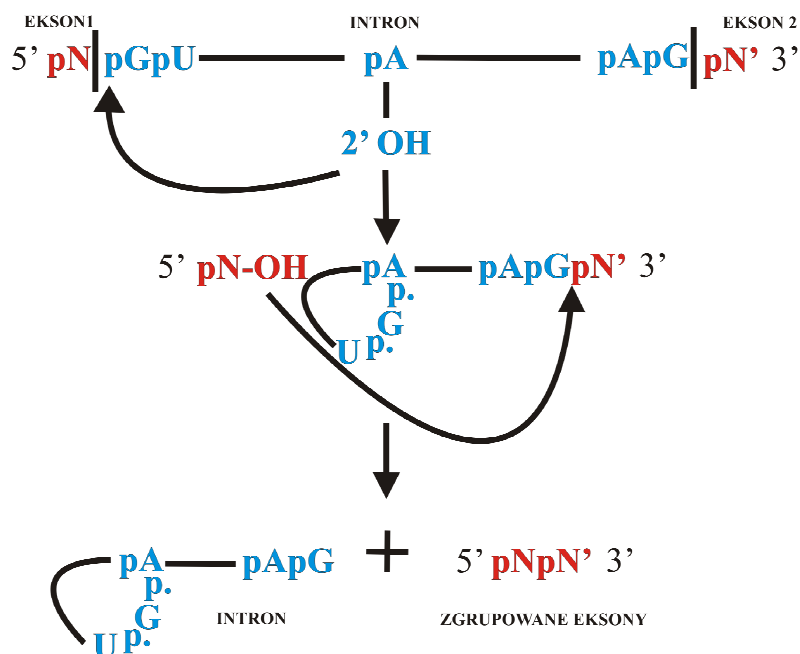


Rysunek 1. Sekwencje konserwatywne regulujące proces splicingu: 5'ss-miejsce splicingowe 5', BP-miejsce rozgałęzienia, PPT-polipirymidynowy trakt, 3'ss-miejsce splicingowe 3'.

U wszystkich organizmów, u których występuje wycinanie intronów z cząsteczki pre-mRNA możemy zaobserwować, że większość komponentów jest sekwencyjnie konserwatywna, niemniej jednak długość intronów i eksonów jest różna (9-11). U ssaków dominują krótkie eksony i długie introny. Średnia długość fragmentu kodującego w pre-mRNA waha się pomiędzy 50-300 nukleotydów, a wielkość intronu to średnio 3400 nukleotydów. U organizmów niższych występują dłuższe eksony niż introny (3, 9-13). Składniki spliceosomu są podobne, a różnice wynikają ze sposobu definiowania fragmentu, który ma ulec wycięciu (3). Kiedy introny są krótkie, spliceosom określa wycinany fragment w oparciu o intron. Odwrotnie jest w przypadku ssaków, gdzie usuwany fragment definiowany jest w odniesieniu do eksonu. Sekwencja miejsc splicingowych, jak i określenie wycinanego fragmentu są kluczowe, ale nie są jedynymi sygnałami dla poprawnego przebiegu reakcji splicingu. W genomie ludzkim częściej niż prawdziwe eksony występują pseudoeksony. Posiadają one poprawne, ale nieużywane miejsca splicingowe (4, 14). O innych sekwencjach regulujących składanie pre-mRNA działających w układzie *cis* będzie mowa w dalszych rozdziałach.

1.2. Reakcja transestryfikacji w czasie składania genów

Pod względem chemicznym proces splicingu składa się z dwóch reakcji transestryfikacji (Rysunek 2). W pierwszym etapie następuje atak nukleofilowy grupy 2'-hydroksylowej adenozy w miejscu rozgałęzienia BP na centrum fosforowe, z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P-O przy atomie O3' ostatniej reszty nukleotydu wchodzącej w skład eksonu, bezpośrednio sąsiadującej z końcem 5' wycinanego intronu. Następnie, uwolniona grupa 3'-hydroksylowa eksonu przeprowadza atak nukleofilowy na centrum fosforowe, z jednoczesnym rozerwaniem wiązania P-O przy atomie O3' reszty nukleotydu z końca 3' intronu. Dzięki tym reakcjom następuje połączenie się eksonów, a intron będący w formie lassa (pętli) jest degradowany (15).

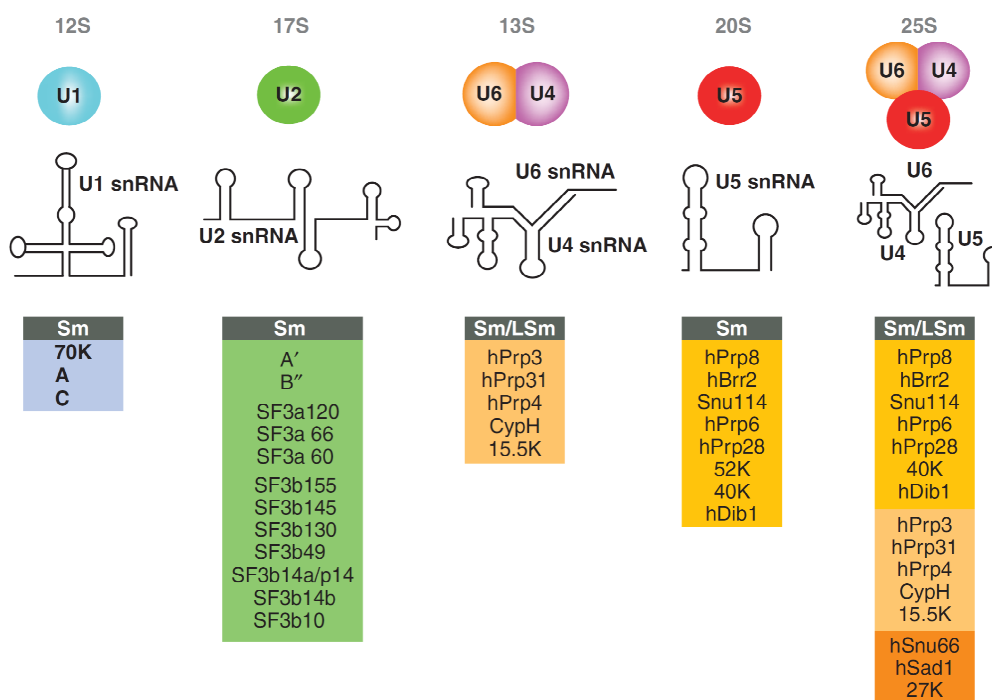


Rysunek 2. Schemat przebiegu dwóch reakcji transestryfikacji zachodzących w czasie splicingu. N = A, G, C lub U.

1.3. Spliceosom

Za prawidłowe i sprawne składanie genów odpowiedzialny jest kompleks składania RNA zwany spliceosomem. W organizmach eukariotycznych, w większości reakcji wycinania intronów bierze udział klasyczny spliceosom typu U2 (ang. *U2-dependent spliceosome*). W skład tego spliceosomu wchodzi cząsteczki snRNA nazwane: U1, U2, U4, U5 oraz U6, które wraz z białkami tworzą małe jądrowe rybonukleoproteiny snRNP (ang. *small nuclear ribonucleoprotein*) (1, 2). Mniej niż 1% splicingu zachodzi przy udziale

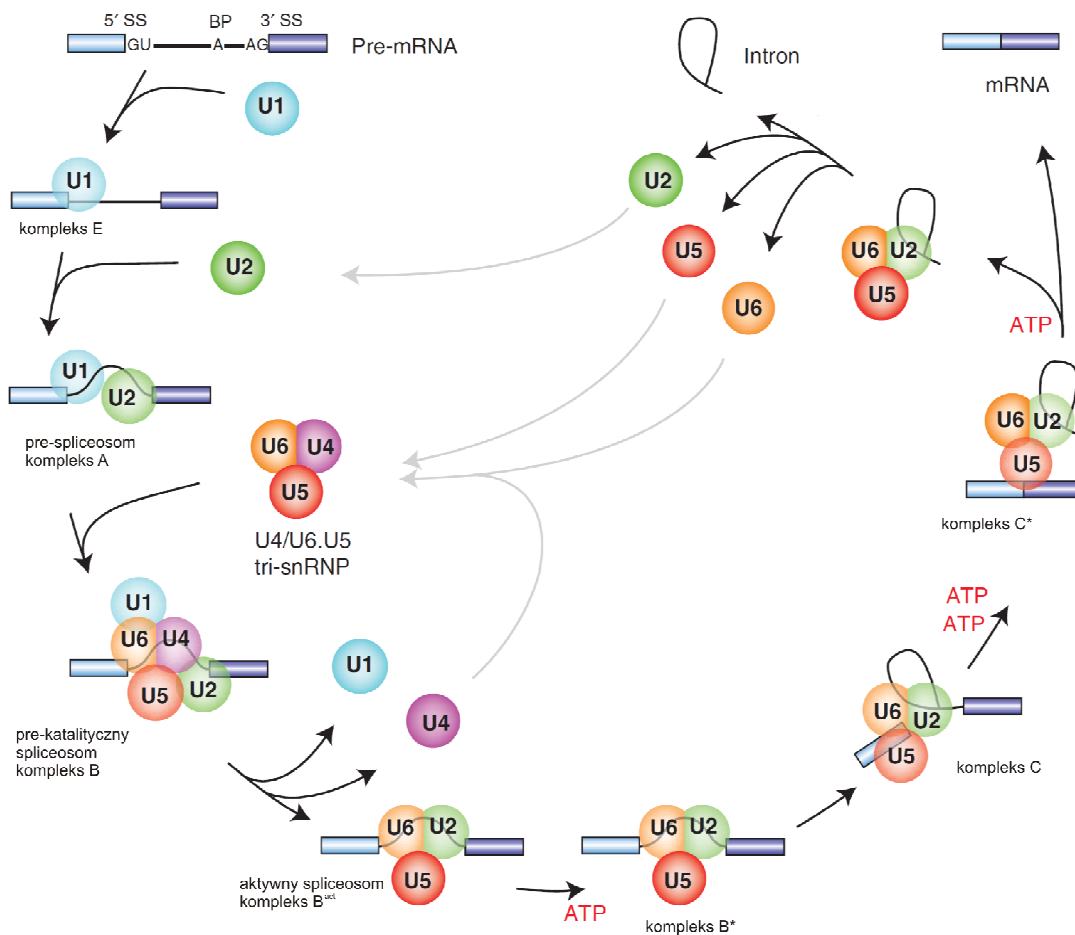
spliceosomu typu U12 (ang. *U12-dependent spliceosome*) i wtedy składnikami spliceosomu są cząsteczki U11, U12, U4_{atac}, U6_{atac} snRNP (16). Cząsteczki U snRNA możemy podzielić na dwie klasy. Pierwsza to grupa Sm (U1, U2, U4, U4_{atac}, U5, U7, U11, U12,) posiadająca miejsce wiązania dla białek Sm. Druga klasa to Lsm (U6, U6_{atac}) oddziałująca z białkami podobnymi do Sm (ang. *like Sm protein*) (16). Oprócz białek tworzących spliceosom i oddziałujących z snRNA istnieje szereg czynników białkowych biorących aktywny udział w składaniu pre-mRNA tzw. czynników splicingowych non-snRNP (17). Skład białkowy poszczególnych cząsteczek U snRNP przedstawiony jest na rysunku 3.



Rysunek 3. Schemat struktury snRNA tworzących spliceosom oraz zestawienie oddziałujących z nimi białek (15).

Splicing odbywa się przy udziale dynamicznego, wieloskładnikowego, rybonukleoproteinowego kompleksu zwanego spliceosomem. Miejsca łączenia się dwóch eksonów przybliżają się do siebie w wyniku zmian w kształcie (strukturze) kompleksu składania pre-mRNA. W większości przypadków reakcji splicingu głównymi elementami spliceosomu są cząsteczki U1 snRNP, U2 snRNP, U4/U6 snRNP, U5 snRNP, U4/U5/U6 snRNP i czynniki splicingowe non-snRNP. Przebieg procesu wycinania intronów z udziałem spliceosomu odbywa się w kilku etapach (Rysunek 4). U człowieka U1 snRNP składa się z 164 nukleotydowego snRNA oraz 3 czynników białkowych, a mianowicie 70K, A i C. Przyłącza się on do pre-mRNA w pierwszym etapie splicingu tworząc pierwszy

splicingowy kompleks E. Do pre-mRNA wraz z cząsteczką U1 snRNP (kompleksu E) przyłącza się U2 snRNP, który zbudowany jest z snRNA o długości 188 nukleotydów i 12 czynników białkowych: A', B'', SF3a120, SF3a66, SF3a60, SF3b155, SF3b145, SF3b130, SF3b49, SF3b14, SF3bp14b oraz SF3b10. W wyniku przyłączenia się tych dwóch cząsteczek snRNP tworzy się kompleks A inaczej zwany pre-spliceosomem. Na tym etapie rozpoznawane jest 5' miejsce splicingowe przez U1 snRNA, miejsce rozgałęzienia BP przez SF1/BBP, polipirymidynowy trakt przez U2AF⁶⁵ oraz 3' miejsce splicingowe przez U2AF³⁵. Jeżeli w sekwencji pre-mRNA występują wzmacniacze splicingu to są one rozpoznawane przez białka SR. W następnej kolejności ma miejsce wiązanie się oddziałujących ze sobą cząsteczek U4/U5/U6 snRNP. Grupa ta składa się z trzech cząsteczek RNA o długości

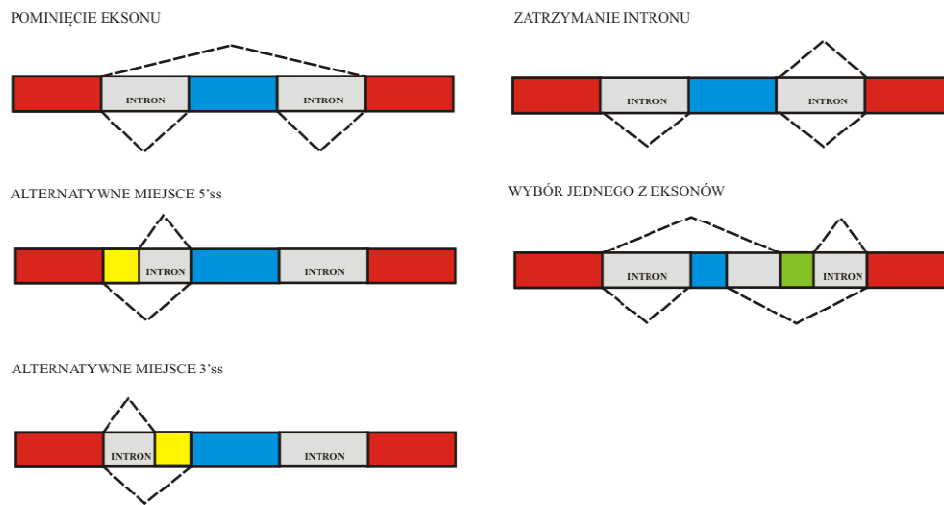


Rysunek 4. Etapy przebiegu procesu wycinania intronów z udziałem spliceosomu (15).

144 nukleotydów (U4 snRNA), 142 nukleotydów (U5 snRNA) i 106 nukleotydów (U6 snRNA) oraz szeregu białek: Prp8, hBrr2, Snu114, hPrp6, hPrp28, 40K, hDib1, hPrp3, hPrp31, hPrp4, CypH, 15.5K, hSnu66, hSad1 i 27K. Tworzy się wtedy kompleks B określany mianem pre-katalitycznego spliceosomu. W tym momencie cząsteczki U1 i U4 snRNP oddysocjują z kompleksu i tworzy się aktywny kompleks spliceosomu B^{act}. Dzięki hydrolizie ATP zachodzą zmiany konformacyjne, czego rezultatem jest zbliżenie się nukleotydów biorących udział w dwóch reakcjach transestryfikacji, powstaje katalitycznie aktywny kompleks B*. Pierwsza reakcja zachodzi w tak zwanym kompleksie C, a druga w kompleksie C*. Następuje połączenie się eksonów i usunięcie intronu. Dojrzałe mRNA opuszcza spliceosom, cząsteczki U2, U5, U6 oddysocjują od intronu i mogą ponownie oddziaływać z cząsteczką pre-mRNA (15).

1.4. Alternatywny splicing

W roku 2001 określono pełną sekwencję genomu ludzkiego, co pozwoliło na oszacowanie liczby genów u człowieka na około 26 tysięcy (18). Za tak małą liczbę genów w stosunku do ilości różnych białek w organizmach odpowiedzialne są procesy związane z dojrzewaniem RNA, w szczególności alternatywny splicing. Jest to proces, w którym dwa lub więcej białek może powstawać z jednego transkryptu (genu), w wyniku usuwania z niego jednego lub kilku eksonów. Istnieje korelacja pomiędzy złożonością organizmu, a liczbą genów ulegających alternatywnemu splicingowi. W czasie dojrzewania pre-mRNA około 95% ludzkich genów ulega alternatywnemu składaniu (19), około 60% u *Drosophila melanogaster* (20) i 25% u *Caenorhabditis elegans* (21). Im więcej w organizmie rodzajów komórek i tkanek tym większy procent genów ulega procesowi alternatywnego splicingu. Alternatywne składanie genów odgrywa znaczącą rolę w różnicowaniu się komórek i w rozwoju organizmu, ponieważ różne izoformy tego samego białka mogą powstawać w różnych tkankach. Najlepszym potwierdzeniem jak alternatywne składanie genu wpływa na różnorodność białek jest przykład genu Dscam u *Drosophila melanogaster*. Na drodze alternatywnego splicingu tego genu może powstać 38 016 różnych izoform mRNA i białek (22). Powstawanie dwóch lub więcej izoform mRNA z jednej cząsteczki pre-mRNA może być wynikiem pięciu głównych schematów alternatywnego splicingu: 1) pominięcie eksonu, 2) zatrzymanie intronu, 3) wybór jednego z eksonów, 4) alternatywne 5' miejsce splicingowe, 5) alternatywne 3' miejsce splicingowe (Rysunek 5).



Rysunek 5. Schemat alternatywnego splicingu pokazujący jak z jednego pre-mRNA mogą powstawać dwa transkrypty.

1.5. Regulacja alternatywnego splicingu

Jak wcześniej wspomniano, konstytutywny splicing opiera się na regionach konserwatywnych działających w układzie *cis* (5'ss, 3'ss, PPT, BP). Najnowsze badania *in silico* pokazują, że 92-95% ludzkich genów może podlegać procesowi alternatywnego splicingu, co za tym idzie, stopień komplementarności 5' miejsca splicingowego do U1 snRNA oraz definicja wycinanego fragmentu nie mogą być jedyną podstawą w identyfikacji usuwanego rejonu (19, 23, 24). W procesach konstytutywnego splicingu, jak i alternatywnego splicingu, bardzo ważnym elementem jest rejon sąsiadujący z miejscem splicingowym, 50 nukleotydów powyżej i 80 nukleotydów poniżej tego miejsca. Znany jest alternatywny mechanizm rozpoznawania miejsc splicingu; dzieje się to dzięki rejonom regulującym splicing SREs (ang. *splicing regulatory elements*), nazywanymi również sekwencjami posiłkowymi (ang. *auxiliary elements*), leżącymi wewnątrz eksonu oraz w przyległych intronach. Możemy wyróżnić cztery główne rodzaje takich rejonów (12):

- ESEs (ang. *exonic splicing enhancers*) eksonowe wzmacniacze splicingu,
- ESSs (ang. *exonic splicing silencers*) eksonowe wyciszacze splicingu,
- ISEs (ang. *intronic splicing enhancers*) intronowe wzmacniacze splicingu,
- ISSs (ang. *intronic splicing silencers*) intronowe wyciszacze splicingu.

Sekwencje regulujące splicing są rozpoznawane przez czynniki splicingowe działające w układzie *trans* (ang. *trans-acting factor*), które łączą się z regulatorowym rejonem i mogą oddziaływać z innymi cząsteczkami, w tym z snRNP. Eksonowe wzmacniacze splicingu ESE definiowane są jako takie, do których przyłączają się białka z rodziny SR, czyli białka bogate w serynę i argininę (ang. *serine/arginine-rich protein family*). Jedną z teorii głosi, że białka SR przyłączają się bezpośrednio do ESE, co wywołuje oddziaływanie z innymi czynnikami splicingowymi i pozwala na rekrutację pierwszych komponentów spliceosomu tj. U1 snRNP oraz U2AF. Inne badania wskazują, że białka SR wiążą się dopiero po utworzeniu pierwszego kompleksu spliceosomu (12, 25-27). Bez względu na mechanizm można powiedzieć, że wzmacniacze splicingu ESE i ISE aktywują konstytutywne, alternatywne, słabe lub mocne miejsca splicingowe przez oddziaływanie z białkami SR lub komponentami spliceosomu, co wzmacnia rozpoznawanie eksonu (12, 28, 29). Na składanie genów mają także wpływ rejony regulatorowe wyciszające splicing, które mogą być zlokalizowane w eksonie lub intronie ESS i ISS (30). Uważa się, że miejsca wyciszenia określa rejon, do którego wiążą się białka PTB (ang. *polypyrimidine tract-binding protein*) inaczej zwane hnRNP I (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*). Oddziałują one z polipirymidynowymi traktami. Białka PTB mogą blokować wiązanie się spliceosomu przez multimeryczne wiązanie się do eksonu, mogą wypętląć ekson lub mogą wpływać na wiązanie się U1 snRNP z 5' miejscem splicingowym (31-34).

Wiele jest poziomów regulacji alternatywnego splicingu, jednak wydaje się, że regulacja przez białka jest najbardziej elastyczną formą i może odpowiadać za tkankowo-specyficzną zmienność w reakcji składania genów. Wpływ czynników białkowych, w różnych tkankach czy komórkach może być regulowany przez stężenie jednego lub wielu czynników splicingowych, przez wpływ na lokalizację komórkową tych regulatorów oraz przez potranslacyjne modyfikacje tych białek (15). Białka biorące udział w wycinaniu intronów z cząsteczki pre-mRNA możemy podzielić na białka splicingowe, które tworzą spliceosom oraz inne białka biorące udział w splicingu, czyli czynniki splicingowe. Do większości rejonów regulujących składanie pre-mRNA przyłączają się czynniki splicingowe będące represorami lub aktywatorami, które mogą wzmacniać lub osłabiać formowanie się kompleksu białkowego spliceosomu. Czynniki te możemy podzielić na trzy główne grupy: 1) białka SR bogate w serynę i argininę, najczęściej wzmacniające rozpoznawanie miejsc splicingowych, 2) białka hnRNP, maskujące miejsca splicingowe, 3) tkankowo-specyficzne czynniki splicingowe (35). Wszystkie wymienione białka posiadają, często w wielu kopiach,

specyficzne domeny wiążące do RNA: motyw rozpoznający RNA, RRM (ang. *RNA-recognition motif*), domenę KH (ang. *K homology domain*) lub domenę palca cynkowego. Wielkość spliceosomu i ilość czynników białkowych biorących udział w tym procesie powoduje, że eksony mniejsze niż 50 nukleotydów mogą być za małe dla pomieszczenia wszystkich białek i mogą być pomijane i wycinane z transkryptu (36).

Procesy, jakim poddawana jest cząsteczka pre-mRNA w jądrze są ze sobą ściśle powiązane. Zaobserwowano sprzężenie transkrypcji z procesem splicingu. Wycinanie intronów może odbywać się równocześnie z syntezą pre-mRNA (37-40). Zaproponowano dwa mechanizmy wpływu transkrypcji na splicing. Pierwsza koncepcja mówi o bezpośrednim oddziaływaniu spliceosomu z polimerazą RNA II lub jej promotorem (41). Druga teoria dotyczy wpływu kinetyki reakcji transkrypcji na alternatywny splicing. Uważa się, że C końcowa domena polimerazy RNA II jest miejscem wiązania się różnych kompleksów białkowych związanych z dojrzewaniem pre-mRNA (42, 43). Ponadto w czasie kotranskrypcyjnego splicingu następuje przestrzenne i czasowe rozdzielanie miejsc splicingowych (37). Pokazano, że U1 snRNP oddziałuje z głównym czynnikiem inicjacji elongacji transkrypcji TFIIF (ang. *transcription factor II human*) (44). Zidentyfikowano również białka SR w kompleksie z polimerazą RNA II. Szybkość elongacji pre-mRNA może wpływać na alternatywny splicing (45-47). Szybka transkrypcja może powodować nierozpoznanie słabych miejsc splicingowych (37).

Pierwszym etapem w dojrzewaniu nowopowstałego transkryptu jest dodanie na końcu 5' czapeczki (kapu), która chroni pre-mRNA przed działaniem 5' egzonukleaz. Pokazano, że transkrypt z kapem powoduje wzrost wydajności splicingu (48). Istnieją dowody na oddziaływanie pomiędzy czynnikami biorącymi udział w poliadenylacji, jak polimeraza poli(A), białko CPSF (ang. *cleavage and polyadenylation specificity factor*) i CFII (ang. *cleavage factor II*) z cząsteczką U2AF⁶⁵ (49-53). Poza tym wykazano, że czynnik splicingowy SRm160 promuje cięcie na końcu 3', a cząsteczka U1 snRNP wykazuje wpływ inhibitorowy na ten proces (54).

Kompleks białkowy EJC (ang. *exon junction complex*) zaangażowany w eksport cząsteczki mRNA z jądra do cytoplazmy zawiera wiele białek związanych z alternatywnym składaniem genów takich jak: SRm160, DEK i RNPS1. W kompleksie tym wykryto również czynnik inicjacji translacji eIF4A3, co pozwala wysnuć wniosek, że czynniki splicingowe mogą

oddziaływać z czynnikami biorącymi udział w translacji i pośrednio wpływać na jej przebieg (55-57).

Splicing powiązany jest z procesami rozpoznawania i degradacji mRNA, określanymi mianem NMD (ang. *nonsense-mediated decay*), które zawierają przedwczesny kodon stop PTC (ang. *premature termination codon*). Składanie genów jest ważne do określenia transkryptów przeznaczonych do degradacji NMD przez znakowanie mRNA z PTC przez czynniki splicingowe SR. Z drugiej strony proces NMD reguluje ekspresję wielu białek SR. Uważa się, że jedna trzecia transkryptów może być regulowana na drodze degradacji cząsteczek mRNA posiadających przedwczesny kodon stop. Proces ten może maskować niektóre mutacje czynników splicingowych (58-62). Również modyfikacje histonów mogą pomagać w rekrutacji czynników białkowych regulujących alternatywne składanie genów (63).

Kolejnym elementem wpływającym na splicing pre-mRNA jest jego struktura drugorzędowa i oddziaływania trzeciorzędowe. Rozpoznanie miejsc splicingowych, elementów regulatorowych działających w układzie *cis* odbywa się na zasadzie oddziaływania tych elementów z czynnikami białkowymi. Struktura drugorzędowa może prowadzić do wyeksponowania lub maskowania regulatorowych elementów (64, 65). Jak już wcześniej wspomniano, pre-mRNA biorą udział w splicingu w czasie transkrypcji (37-40). W komórkach ssaków jest wiele białek z rodziny hnRNP, które oddziałują z cząsteczkami RNA uniemożliwiając im wytworzenie stabilnej struktury. Nasuwają się pytania, czy nowopowstająca cząsteczka pre-mRNA „ma czas” na uformowanie stabilnej struktury i czy czynniki białkowe nie ograniczają tego procesu oraz czy struktura drugorzędowa ma wpływ na proces alternatywnego splicingu? Przyjmuje się, że wpływ na alternatywny proces składania genu ma struktura lokalna poszczególnych fragmentów, a nie struktura globalna, która „nie zdąży” się uformować w czasie transkrypcji (66). Małe cząsteczki mogą naturalnie regulować alternatywny splicing przez wpływ na strukturę drugorzędową pre-mRNA. Pirofosforan tiaminy TPP (ang. *thiamine pyrophosphate*) znany jako ryboprzełącznik, może wiązać się z intronem genu związanego z syntezą TPP, powodując, że to właśnie ten intron nie zostanie wycięty. Pozostawienie fragmentu niekodującego znacznie obniża stabilność powstałego mRNA (67). Także pentamidyna może wiązać się do motywu spinki do włosów pre-mRNA genu TNNT2 (ang. *troponin T type 2*) i powodować redukcję splicingu przez inhibicję wiązania się cząsteczki U2AF⁶⁵ (68). Przykłady te pokazują, że alternatywny splicing może być regulowany na drodze zmian w strukturze drugorzędowej transkryptu.

Podsumowując, regulacja składania pre-mRNA jest wieloetapowa i skomplikowana. Kluczową rolę odrywają miejsca 5' i 3' splicingowe, które pozwalają na zdefiniowanie eksonu. Ponadto, na wycinanie intronów mają wpływ sekwencje regulujące splicing SRE o charakterze konstytutywnym (5'ss, 3'ss, PPT, BP) lub posiłkowym (ESE, ESS, ISE, ISS). Cząsteczka pre-mRNA posiada specyficzną i zdefiniowaną strukturę drugorzędową, co może doprowadzić do wyeksponowania lub maskowania poszczególnych elementów regulatorowych. Konsekwencją występowania w pre-mRNA słabego miejsca splicingowego 5' lub 3' lub zamaskowanych miejsc SRE, może być wystąpienie alternatywnego splicingu. Dodatkowo, wycinanie intronu z pre-mRNA jest ściśle powiązane z różnymi procesami regulującymi dojrzewanie genów i ich ekspresję.

1.6. Alternatywny splicing w komórkach nerwowych

Alternatywny splicing powoduje powstawanie nowych białek o różnych funkcjach. Analiza genomu człowieka pokazała, że tkanka mózgowa ma największą liczbę tkankowo-specyficznych izoform białkowych powstałych w procesie alternatywnego splicingu (69). W tkance nerwowej alternatywne składanie genów odpowiedzialne jest za aktywność białek w synapsach i jest bardzo ważne dla genów związanych z przekazywaniem sygnałów w organizmie takich jak geny kodujące: receptory, białka biorące udział w transdukcji sygnału, czynniki transkrypcyjne i regulatory splicingu (70). Alternatywny splicing może wpływać na funkcję i aktywność receptorów neuronowych. Przykładem jest receptor NMDA R1 (ang. *n-methyl-d-aspartic acid receptor 1*), w którym w zależności od obecności w transkrypcie eksonu C1, powstaje białko zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej lub w cytoplazmie (71). Złożoność i ilość reakcji alternatywnego splicingu w komórkach nerwowych i neuronach ruchowych powoduje, że istnieje szereg chorób neurodegeneracyjnych związanych z zaburzeniami w alternatywnym składaniu genów. Choroby takie jak: stwardnienie zanikowe boczne, ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) (72) i rdzeniowy zanik mięśni, SMA (ang. *spinal muscular atrophy*) (73) spowodowane są przez mutacje w genach czynników splicingowych. Ostępnie czołowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężonym z chromosomem 17, FTDP-17 ujawnia się w wyniku zaburzeń w alternatywnym splicingu białka *tau* (74).

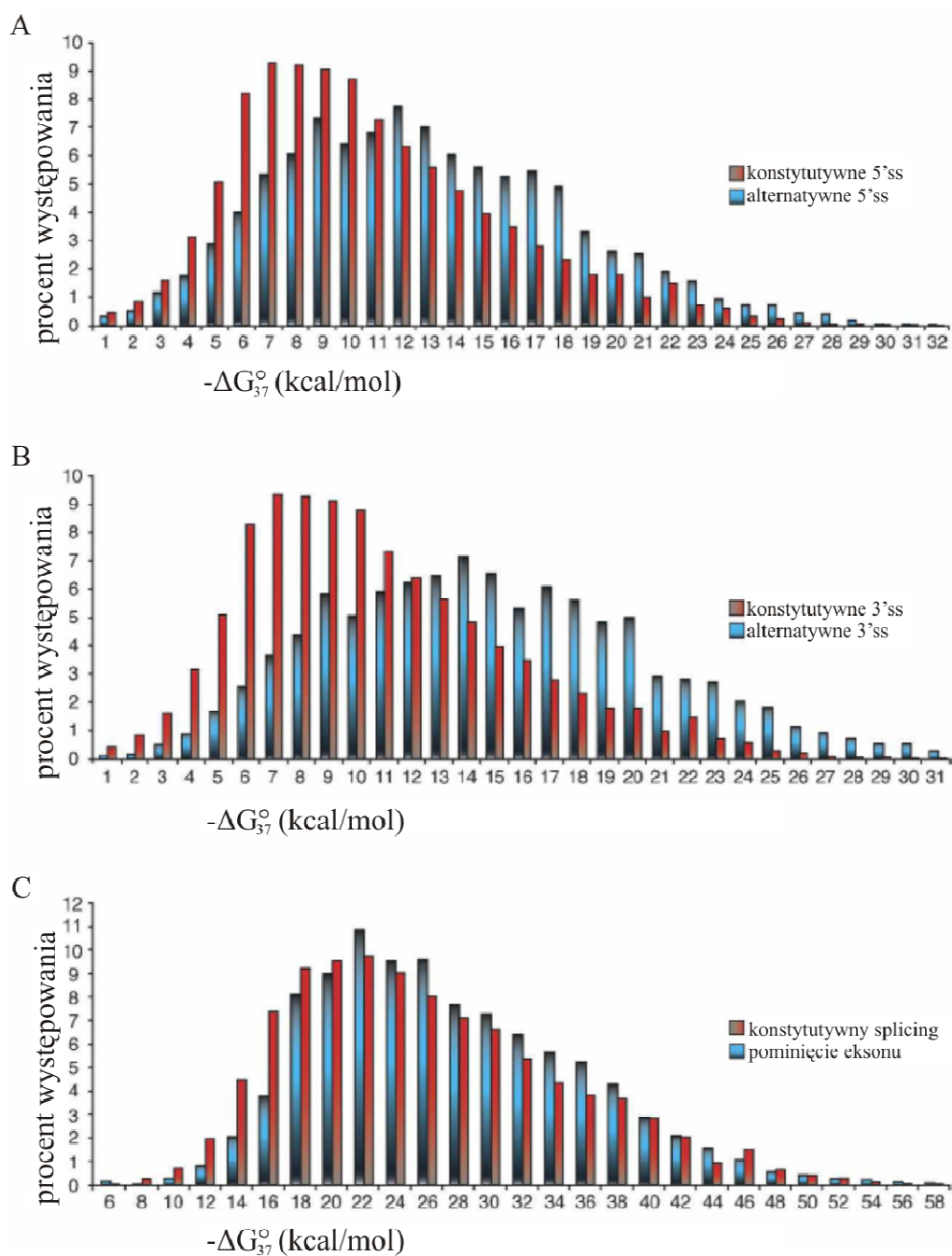
1.7. Wpływ struktury drugorzędowej na alternatywne składanie genów

W licznych procesach zachodzących w komórce struktura drugorzędowa RNA odgrywa istotną rolę we właściwościach funkcjonalnych tej cząsteczki (75). W przypadku pre-mRNA uważa się, że lokalne motywy strukturalne mają wpływ na proces alternatywnego splicingu, w przeciwieństwie na przykład do cząsteczki tRNA, która przyjmuje ściśle zdefiniowaną globalną strukturę. Początkowo sądzono, że białka hnRNP oddziałują z nowo powstałym transkrypcyjnym uniemożliwiając uzyskanie przez pre-mRNA struktury drugorzędowej (76). Jednak do tej pory udokumentowano wiele przykładów mówiących o wpływie struktury drugorzędowej na alternatywne składanie genów (77).

Jak wcześniej wspomniano, kluczowym etapem składania genów jest rozpoznanie 5' i 3' miejsc splicingowych. Selekcja miejsc splicingowych może być regulowana przez strukturę drugorzędową fragmentów biorących udział w splicingu (64, 78). Struktura drugorzędowa może hamować lub aktywować wiązanie się spliceosomu do pre-mRNA. Dodatkowo, regulacje motywów strukturalnych mogą dotyczyć elementów działających w układzie *cis*. Większość czynników splicingowych wiąże się do rejonów jednoniciowych w pre-mRNA o długości 2-10 nukleotydów, znajdujących się najczęściej w rejonach pętli struktur spinkowych. Maskowanie i uwydatnianie takich rejonów jak: ESS, ESE, ISE czy ISS wywiera znaczny wpływ na regulację procesu alternatywnego splicingu. Ponadto, dzięki przyjmowaniu określonych motywów strukturalnych przez pre-mRNA możliwe jest bliskie sąsiedztwo elementów regulujących, działających w układzie *cis*, których umiejscowienie w sekwencji jest od siebie odległe.

Potwierdzeniem wpływu struktury drugorzędowej na alternatywne składanie genów jest korelacja pomiędzy występowaniem alternatywnego splicingu i ustrukturalizowaniem miejsc splicingowych. Modelowanie struktur drugorzędowych 60 nukleotydowych fragmentów obejmujących rejony: (1) podlegające konstytutywnemu splicingowi (13 426 eksonów), (2) zawierające 5' i 3' miejsca alternatywnego splicingu (4 179 eksonów), (3) regulujące zatrzymanie lub ominiecie eksonu (8 385 eksonów) uwidoczniało różnice w strukturze drugorzędowej pomiędzy nimi (Rysunek 6) (65). Miejsca splicingowe, które nie ulegają konstytutywnemu splicingowi posiadają konserwatywne motywy strukturalne. Fragmenty w obrębie alternatywnych miejsc splicingowych posiadają procentowo większą zawartość par G-C, co za tym idzie struktura drugorzędowa tworzona przez te rejony jest stabilniejsza. Korelacja pomiędzy stabilnością motywów strukturalnych, a zdarzeniami w

alternatywnym splicingu nie dotyczy pominięcia lub zatrzymania eksonu. Uważa się, że w tym przypadku większy wpływ na to zdarzenie ma wielkość eksonu niż struktura drugorzędowa.



Rysunek 6. Porównanie energii swobodnej motywów strukturalnych. A-pomiędzy konstytutywnym i alternatywnym miejscem splicingowym 5', B-pomiędzy konstytutywnym, a alternatywnym miejscem splicingowym 3', C-pomiędzy konstytutywnym splicingiem eksonu, a pominięciem eksonu w reakcji składania genów (65).

Na podstawie danych o konserwatywnych motywach strukturalnych, które mogą regulować alternatywny splicing udało się przewidzieć wzór składania genów w czterech typach tkanek u myszy (79).

1.7.1. Wpływ struktury drugorzędowej na identyfikację miejsc splicingowych 5' i 3' oraz miejsca rozgałęzienia

Struktura drugorzędowa wpływa na dostępność miejsca splicingowego w pre-mRNA genu ludzkiego hormonu wzrostu GH1 (ang. *human growth hormone*) (80). Dwie izoformy tego białka produkowane są w przysadce, wariant krótszy i dłuższy, w zależności od wyboru miejsca akceptorowego B lub B'. Pre-mRNA tego genu zawiera strukturę spinki do włosów, która obejmuje miejsce splicingowe i miejsce rozgałęzienia dla izoformy dłuższej. Obecność takiego motywu strukturalnego związana jest ze wzrostem ilości izoformy krótszej białka. Uważa się, że występuje równowaga pomiędzy dwoma formami pre-mRNA genu GH1 z dostępnym miejscem i zamaskowanym miejscem splicingowym. Ponieważ utrudniony jest dostęp do miejsca splicingowego odpowiedzialnego za ekspresję formy dłuższej to powstaje około 10 razy więcej izoformy krótszej ludzkiego hormonu wzrostu. Wykorzystanie miejsca splicingowego powodującego powstanie formy dłuższej jest zależne od stabilności motywu spinkowego. Im mniejsza energia swobodna, tym więcej powstaje izoformy krótszej ludzkiego hormonu wzrostu. Okazało się, że istnieje liniowa zależność pomiędzy wykorzystaniem miejsca splicingowego B', a energią swobodną motywu spinkowego.

Zaobserwowano wpływ struktury drugorzędowej na alternatywne składanie czynnika splicingowego hnRNP A1 (81). W wyniku alternatywnego splicingu eksonu 7B powstają dwie izoformy tego białka, a mianowicie hnRNP A1 i hnRNP A1^B, które różnią się zdolnością do wiązania się do miejsc splicingowych. Fragment 84 nukleotydowy nazwany CE6IO, tworzy bardzo trwały motyw dwuniciowy z miejscem akceptorowym dla eksonu 7B i prowadzi do ominięcia tego eksonu w reakcji składania genów. Powstanie stabilnego dupleksu pomiędzy CE6IO, a rejonem z 5' miejscem splicingowym dla eksonu 7 powoduje zmniejszone oddziaływanie tego miejsca akceptorowego z U1 snRNP.

Alternatywny splicing genu ludzkiej β -tropomiozyny, TPM2 (ang. *β -tropomiosin 2*) jest tkankowo specyficzny. W wyniku tego procesu powstają dwie izoformy białka zawierające ekson 6A lub ekson 6B. Wpływ na alternatywne składanie genu TPM2 ma struktura drugorzędowa fragmentu obejmującego ekson 6B i intron pomiędzy eksonem 6A i

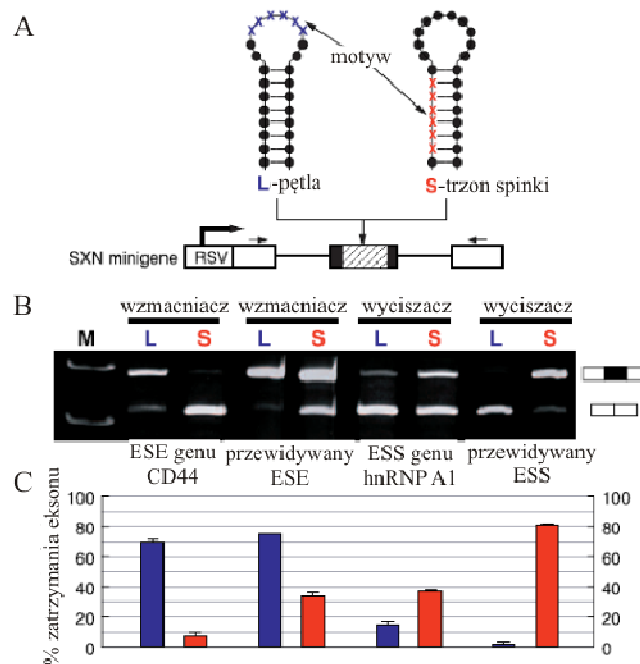
6B (82). Struktura drugorzędowa, jaką przybiera ten rejon wpływa na wiele etapów w procesie składania tego pre-mRNA. Miedzy innymi, zmniejsza stopień rozpoznawania miejsca akceptorowego, redukuje oddziaływanie czynników splicingowych z miejscem rozgałęzienia i innymi elementami regulującymi. Zmiany w sekwencji tego rejonu zmniejszające ustrukturalizowanie, powodują wzrost wydajności splicingu. Zagadką pozostaje fakt, dlaczego taka regulacja występuje tylko w wybranych tkankach.

Kolejnym przykładem wpływu struktury drugorzędowej na identyfikację miejsca splicingowego jest motyw spinki RNA występujący w pre-mRNA białka *tau*. Motyw ten występuje w miejscu akceptorowym eksonu 10. Przypadek ten zostanie szczegółowo omówiony w dalszej części pracy.

1.7.2. Wpływ struktury drugorzędowej na modyfikacje alternatywnego splicingu przez elementy regulatorowe działające w układzie *cis*

Motywy strukturalne występujące w pre-mRNA mogą także regulować rozpoznanie miejsc regulatorowych działających w układzie *cis* (64, 78). Większość białek oddziałuje z rejonami jednoniciowymi, tak więc, aby odpowiednio regulować alternatywny splicing fragmenty regulatorowe powinny znajdować się w jednoniciowych rejonach. Przez modulację struktury drugorzędowej możliwe jest maskowanie lub uwidacznianie sekwencji wyciszających splicing lub sekwencji wzmacniających splicing, co prowadzi do zmian w alternatywnym składaniu genów (Rysunek 7).

We wszystkich przykładach przedstawionych przez Hiller'a widać różnice w alternatywnym splicingu w zależności od tego czy element regulatorowy znajduje się w pętli spinki czy w jej trzonie. W przypadku elementu wzmacniającego splicing ESE w genie CD44 umiejscowienie go w trzonie spinki powoduje wyłączenie powstanie izoformy krótszej, czyli element ten nie był rozpoznany w tym procesie. W elemencie wzmacniającym splicing, który został zaproponowany, widać podobną tendencję, tylko umiejscowienie ESE w trzonie spinki nie powoduje całkowitej eliminacji splicingu. W przypadku elementu wyciszającego splicing w genie hnRNP A1 widać wyraźną różnicę w ilości izoform, gdy element regulacyjny znajduje się w pętli i trzonie spinki. W zaproponowanym elemencie wyciszającym doskonale widać wpływ struktury na regulację splicingu przez elementy działające w układzie *cis*. Umiejscowienie wyciszacza w rejonie dwuniciowym spowodowało prawie całkowite zatrzymanie eksonu podczas alternatywnego składania genów.



Rysunek 7. Wpływ umiejscowienia sekwencji regulatorowych w motywie spinkowym. A-regulujące elementy w pętli spinki lub w trzonie. B-analiza ilościowa powstałych izoform. C-wykres procentowej ilości zachowanego eksonu (64).

Ekson EDA znajduje się w pre-mRNA genu fibronektyny i jest regulowany przez dwa elementy (tzn. ESE i ESS) działające w układzie *cis*. Alternatywny splicing eksonu zależny jest od oddziaływania białek SR z regulującymi elementami, a wiązanie się białek zależne jest od struktury drugorzędowej tych elementów (83, 84).

U ludzi istnieją dwie kopie genu kodującego białko SMN (ang. *survival motor neurons*) (73). Produkty ekspresji tych genów różnią się obecnością lub brakiem eksonu 7, dlatego wyróżniamy białko SMN1 (z eksonem 7) i SMN2 (bez eksonu 7). Różnica w sekwencji obu genów wynika z mutacji punktowej C→T w eksonie 7. Różnica w sekwencji nie powoduje zmiany aminokwasu w białku, ale wpływa na alternatywny splicing eksonu 7. Mutacja powoduje wyeksponowanie elementu ISS w rejonie 3' miejsca splicingowego, co powoduje ominięcie eksonu 7 i powstanie białka SMN2. W tym przypadku mutacja powoduje zmianę w strukturze drugorzędowej, co z kolei wpływa na alternatywny splicing. SMN1 u człowieka pełni funkcję czynnika splicingowego. Przyczyną choroby genetycznej, jaką jest rdzeniowy zanik mięśni, SMA (ang. *spinal muscular atrophy*) jest delecja w genie kodującym SMN1. W konsekwencji białko to nie spełnia swoich funkcji regulatorowych, co prowadzi do

degradacji neuronów ruchowych. Białko SMN2 nie może rekompensować braku aktywnego białka SMN1, ponieważ nie posiada eksonu 7. Zmiana regulacji alternatywnego składania eksonu 7 w genie SMN2 jest jednym z głównych celów w terapii SMA.

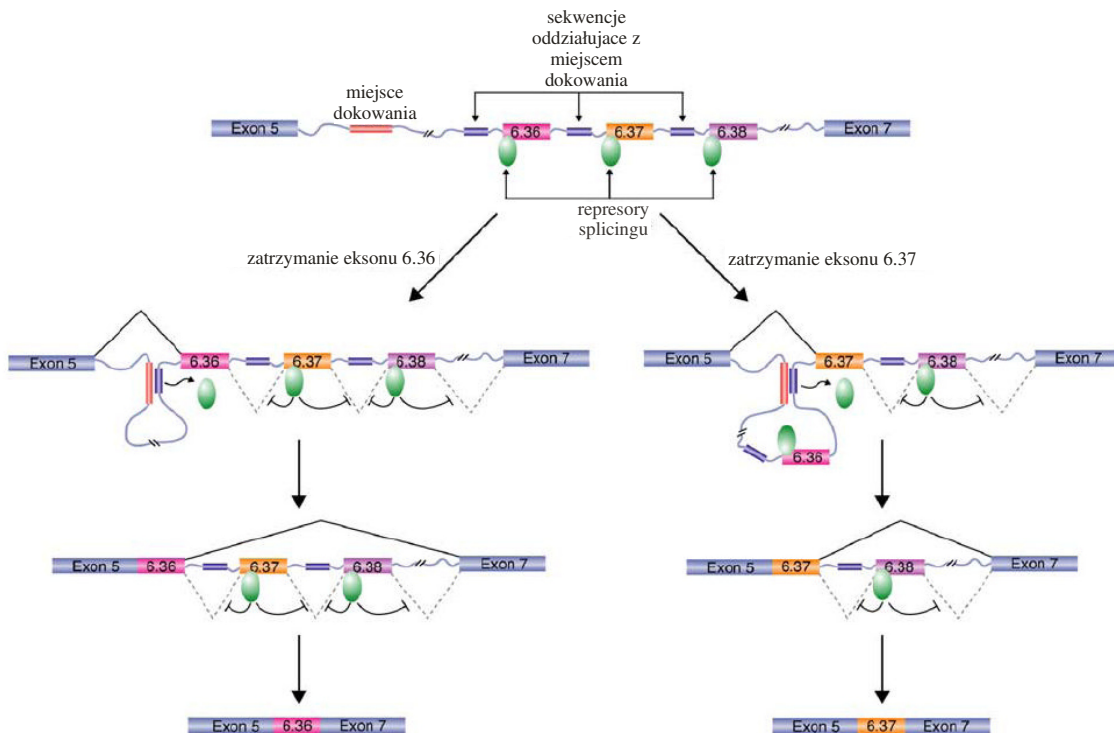
Również mutacja punktowa nie powodująca zmiany w sekwencji aminokwasowej genu kodującego regulator syntezy błonowego kanału chlorkowego CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) w eksonie 12 powoduje redukcję tego eksonu w transkrypcie z 80% do 25%. W tym przypadku zmiana jednego nukleotydu nie powoduje dużych zmian strukturalnych. Mutacja powoduje zwiększenie rejonu jednoniciowego w elemencie wyciszającym splicing ESS i wzrost ustrukturalizowania elementu wzmacniającego ESE (85).

Wpływ struktury drugorzędowej na alternatywny splicing może być wzmacniany przez oddziaływanie czynników splicingowych z motywami strukturalnymi i stabilizację tych struktur. Wiązanie się czynnika białkowego MBNL1 (ang. *muscleblind-like protein*) powoduje alternatywny splicing eksonu 5 w genie cTNT (ang. *cardiac troponin T*) (66). W 3' miejscu splicingowym pre-mRNA tego genu może wystąpić motyw spinkowy uniemożliwiający wiązanie się cząsteczki U2AF⁶⁵, przy czym białko MBNL1 dodatkowo stabilizuje strukturę spinki.

1.7.3. Wpływ struktury drugorzędowej na modyfikacje alternatywnego splicingu przez oddziaływania dalekiego zasięgu

Oprócz lokalnych motywów strukturalnych również oddziaływania dalekiego zasięgu mogą mieć wpływ na alternatywny splicing. Długie introny mogą tworzyć 100-300 nukleotydowe spinki z pętlami wielkości nawet 15 000 nukleotydów, co ułatwia ich wycinanie (65). Najbardziej znanym przykładem regulacji alternatywnego składania genów wynikającej z oddziaływań dalekiego zasięgu jest gen *Dscam* z *Drosophila melanogaster* (86). W wyniku alternatywnego składania tego genu może powstać 38 016 różnych transkryptów przez pominięcie lub zatrzymanie 95 różnych eksonów. Przykładem w jaki sposób regulowany jest splicing tak wielu eksonów jest przypadek wzajemnie wykluczających się eksonów w grupie eksonu 6 genu *Dscam*. Za eksonem 5, który podlega konstytutywnemu splicingowi znajduje się sekwencja dokująca (ang. *docking site*), z którą oddziałują wybrane sekwencje (ang. *selector sequances*) znajdujące się przed eksonami 6.36, 6.37 oraz 6.38. W zależności od tego, z którym fragmentem będzie oddziaływać sekwencja

dokująca, wycinanie różnych eksonów może być zatrzymane (Rysunek 8). Regulacja alternatywnego splicingu w genie *Dcam* jest przykładem jak utworzenie stabilnego motywu dwuniciowego może powodować wypętlenie się części pre-mRNA i przestrzennie zbliżyć rejony oddalone od siebie sekwencyjnie.



Rysunek 8. Regulacja alternatywnego splicingu grupy eksonów 6 w genie *Dcam*. W zależności od tego, z którym rejonem oddziałuje sekwencja dokująca, w transkrypcie znajduje się ekson 6.36 lub 6.37 (65).

Pre-mRNA genu receptora czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor 2*) także ulega alternatywnemu splicingowi powodując powstanie dwóch izoform białka, z eksonem IIIb lub IIIc (87). Ekspresja poszczególnych izoform jest tkankowo-specyficzna. Proces składania genów jest regulowany przez elementy działające w układzie *cis*, które znajdują się w dużej odległości od siebie. W tych rejonach powstaje długi motyw dwuniciowy z motywem pętli wielkości 735 nukleotydów. Taka rearanżacja tego rejonu powoduje, że elementy regulujące znajdują się blisko siebie i mogą wpływać na alternatywny splicing tego pre-mRNA.

Również do prawidłowego wycięcia intronu z genu *rp51b* u *Saccharomyces cerevisiae* potrzebne jest oddziaływanie dwóch krótkich fragmentów, które sekwencyjnie oddzielone są o 200 nukleotydów (88).

Wszystkie opisane przykłady dowodzą, że struktura drugorzędowa wpływa na alternatywne składanie genów i jest częścią kodu (ang. *mRNA splicing code*) pozwalającą na rozszyfrowanie zdarzeń, jakim poddawana jest cząsteczka pre-mRNA. Warto również dodać, że wystarczy polimorfizm jednego nukleotydu, aby zauważyć zmiany w fałdowaniu się mRNA (89), a co za tym idzie, punktowe zmiany w sekwencji mogą prowadzić do dużych zmian w alternatywnym splicingu pre-mRNA.

2. Tauopatie

Neuron jest komórką asymetryczną, składa się z ciała komórki, czyli perikarionu i wypustek cytoplazmatycznych dendrytów i aksonów. Komórka nerwowa może posiadać nawet 10 tysięcy połączeń z innymi komórkami nerwowymi, co wymaga obecności wielu białek biorących udział w przekazywaniu sygnałów w synapsach. Rybosomy zaopatrujące neuron w nowe porcje niezbędnych białek znajdują się tylko w ciele komórki nerwowej (69). Nowopowstałe białka muszą być przetransportowane do wszystkich rejonów komórek nerwowych, w szczególności do aksonów. Za transport aksonalny odpowiedzialne są mikrotubule i białka motoryczne (dyneina, kinezyna, miozyna) (90). Dzięki polimeryzacji α i β tubuliny powstają sztywne struktury rurek-mikrotubule, biorące udział w tworzeniu cytoszkieletu w komórce oraz wyznaczaniu szlaku dla transportu białek. W związku z tym, że komórka nerwowa do pełnienia swojej funkcji potrzebuje dużej ilości różnych białek oraz białka te muszą być przetransportowane na dosyć duże odległości, stan patologiczny w postaci agregatów białek może być bardzo szkodliwy dla neuronów, powodując zapchanie się aksonów i neurodegenerację (91).

Depozyty białkowe, jako czynnik patogenny pojawiają się w wielu chorobach występujących u ludzi. Głównie dotyczą neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym, ale także w neuronach ruchowych. Depozyty białkowe występują w następujących chorobach (92):

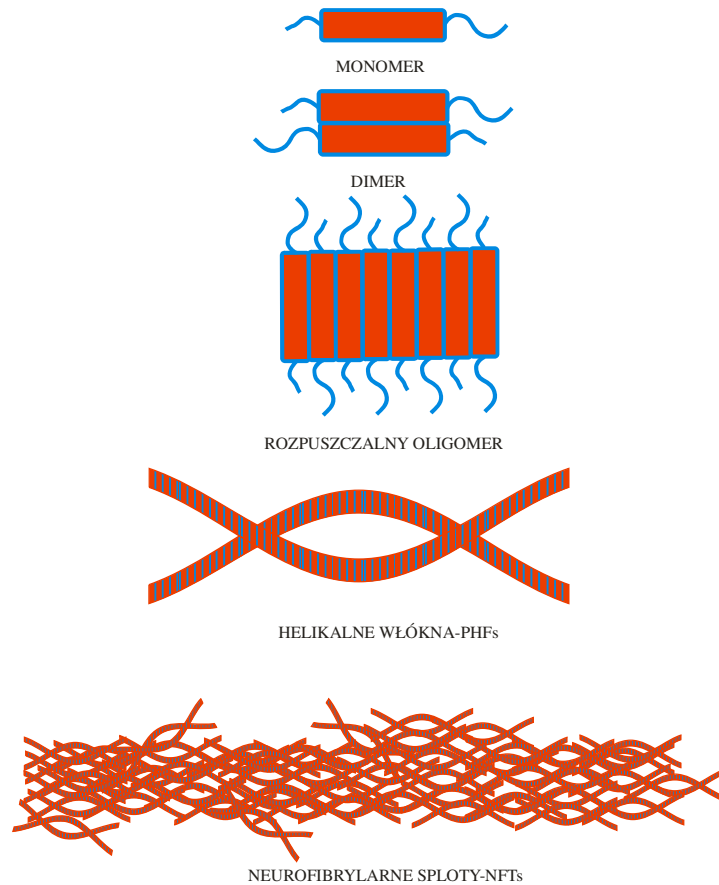
- choroba Alzheimerera, AD (ang. *alzheimer disease*) z depozytami β amyloidu oraz białka *tau*,
- choroba Parkinsona, PD (ang. *parkinson disease*) z agregatami α synukleiny,
- choroba Huntingtona, HD (ang. *huntington disease*) z depozytami huntingtyny,

- stwardnienie zanikowe boczne, ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*), gdzie agregaty tworzy białko TDP-43 (ang. *TAR DNA-binding protein 43*),
- choroba Creutzfeldta-Jakoba, CJD (ang. *creutzfeldt - jakob disease*) z depozytami prionowymi,
- otępienie czołowo-skroniowe FTD (ang. *frontotemporal dementia*) z agregatami białka *tau*.

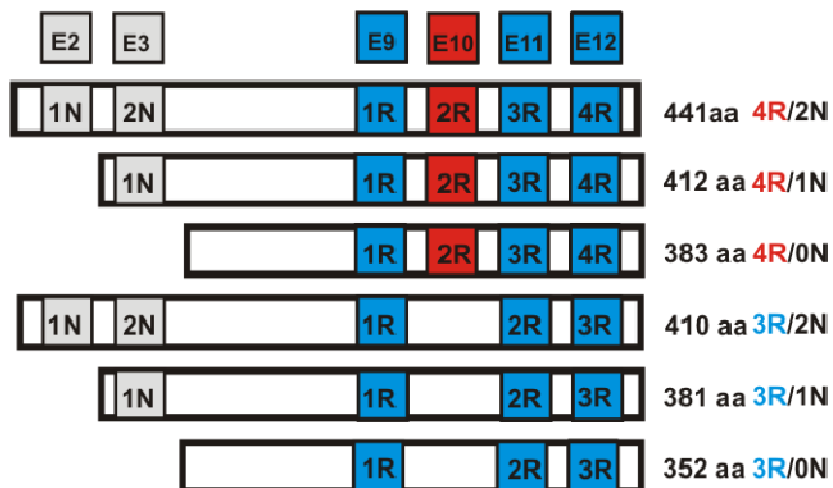
2.1. Białko *tau*

Białko *tau* zostało po raz pierwszy wyizolowane w 1975 roku (93). Należy ono do rodziny białek zasocjowanych z mikrotubulami. W wyniku transkrypcji genu kodującego białko *tau* powstaje pre-mRNA, z którego podczas alternatywnego splicingu powstaje sześć izoform białka. U dorosłego człowieka występuje ono w neuronach w części aksonalnej (94, 95). Główne funkcje tego białka to składanie i stabilizacja mikrotubul, co za tym idzie, pełni rolę w morfogenezie, rozszerzaniu aksonalnym i pośrednio w transporcie czynników białkowych w aksonach (90). Biologiczna funkcja *tau* jest regulowana głównie przez fosforylację (96, 97). W stanach patologicznych białko *tau* występuje w całej komórce nerwowej i może tworzyć nierozpuszczalne agregaty: heliakalne włókna PHFs (ang. *paired helical filaments*) oraz eurofibrilarnie splety NFTs (ang. *neurofibrillary tangles*) (Rysunek 9) (98-100).

Białko *tau* kodowane jest przez gen MAPT (ang. *microtubule-associated protein tau*), u dorosłego człowieka ulega ekspresji głównie w systemie nerwowym (90, 95). Główną funkcją białka *tau* jest stabilizacja i wiązanie się do mikrotubul. Pre-mRNA genu MAPT ulega alternatywnemu splicingowi, co skutkuje powstaniem sześciu różnych izoform białka *tau* (Rysunek 10) (101). Eksony 2, 3, 10 są alternatywnie wycinane w czasie dojrzewania cząsteczki mRNA. Eksony 2 i 3 kodują fragment 29 aminokwasowy na końcu N białka *tau*. Ze względu na obecność eksonów 2 i 3 izoformy białka *tau* można podzielić następująco: 0N (nie zawiera eksonów 2 i 3), 1N (zawiera ekson 3) oraz 2N (zawiera eksony 2 i 3). Ekson 10 koduje jedną z czterech domen wiążących się z mikrotubulami. W wyniku alternatywnego składania eksonu 10 może powstać izoforma 3R (zawiera 3 domeny wiążące się do mikrotubul, bez domeny kodowanej przez ekson 10) oraz izoforma 4R (zawiera wszystkie cztery domeny wiążące się do mikrotubul). Wszystkie izoformy białka *tau* występujące u ludzi to: 4R/2N o długości 441 aminokwasów, 4R/1N o długości 412 aminokwasów, 4R/0N o długości 383 aminokwasów, 3R/2N o długości 410 aminokwasów, 3R/1N o długości 381 aminokwasów oraz 3R/0N o długości 352 aminokwasów (101-103)



Rysunek 9. Rodzaje agregatów białka *tau* występujące w przypadkach neurodegeneracji.



Rysunek 10. Izoformy białka *tau* występujące u zdrowego dorosłego człowieka.

Główna regulacja białka *tau* odbywa się przez fosforylację. *Tau* posiada 30 lub więcej miejsc fosforylacji w każdej lizoformie (96, 97). Modyfikacje te mogą wpływać na przyłączanie się białka *tau* do mikrotubul i stabilizację tych struktur komórkowych. Nadmierna fosforylacja białka jest najprawdopodobniej czynnikiem decydującym o jego agregacji w chorobach neurodegeneracyjnych. Udowodniono, że nierozpuszczalne agregaty *tau* PHFs i NFTs składają się z hiperfosforylowanej formy białka (104). Istnieją dwie teorie tłumaczące patogenne właściwości hiperfosforylowanego białka *tau* (92). Pierwsza mówi o dysfunkcji samego białka, ufosforylowane białko nie może oddziaływać z mikrotubulami, gromadzi się w komórce i dochodzi do powstawania depozytów białkowych. Obumieranie neuronów wynika z niestabilności mikrotubul, a nie jest spowodowane występowaniem agregatów. Druga koncepcja tłumaczy, że to fosforylacja prowadzi do agregacji, a ta sytuacja powoduje zapchanie się neuronów i neurodegenerację. Wydaje się, że drugi pogląd jest bardziej prawdopodobny. U myszy z wyłączonym genem MAPT nie dochodzi do neurodegeneracji, czyli brak białka nie powoduje śmierci komórek nerwowych (105). Zauważono również, że agregaty białka *tau* sprzyjają powstawaniu nowych nierozpuszczalnych form *tau* i rozprzestrzenianie się stanu patologicznego. Po rozpadzie neuronu depozyty białka *tau* znajdują się w przestrzeni międzykomórkowej i mogą być wchłaniane na drodze endocytozy przez następną komórkę nerwową (106-108).

2.2. Choroby związane z agregatami białka *tau*

Wszystkie choroby neurodegeneracyjne, w których występują agregaty białka *tau* nazywamy tauopatiami. Na podstawie obserwacji modelu zwierzęcego można powiedzieć, że patogenezą wywołaną agregatami białka *tau* rozpoczyna się od mikroglejozy i patologii synaps (109). Depozyty białka *tau* wykryto w chorobie Alzheimera (AD), jako agregaty towarzyszące płytkom starczym z β amyloidu. Oprócz AD do tauopatii zaliczamy otępienia czołowe (FTD), do których możemy zaliczyć: otępienie czołowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężonym z chromosomem 17, FTDP-17, chorobę Picka PD (ang. *pick disease*), zwyrodnienie korowo-podstawne, CBD (ang. *corticobasal degeneration*), postępujące porażenie nadjądrowe, PSP (ang. *progressive supranuclear palsy*) oraz encefalopatię bokserką, DP (ang. *dementia pugilistica*) (99, 110, 111).

Można wysnuć przypuszczenie, że agregaty białka *tau* w chorobie Alzheimera i w otępieniach czołowych mają inną genezę. W AD agregaty białka *tau* występują najpierw w

korze śródwęchowej i dopiero później rozprzestrzeniają się do hipokampu i kory mózgowej, są to obszary mózgu odpowiedzialne za uczenie się i pamięć (112-116). Przypadki FTD charakteryzują się depozytami białka *tau* występującymi w płacie czołowym odpowiedzialnym za zachowanie i funkcje wykonawcze, dlatego pierwszymi objawami FTD są irracjonalne decyzje i nieodpowiednie zachowanie (99). U chorych na Alzheimerera nie znaleziono mutacji w genie kodującym białko *tau*, co może wskazywać, że agregaty β amyloidu są inicjatorem agregacji białka *tau* (117). Dodatkowe badania na myszach potwierdziły, że białko *tau* nie wpływa na ekspresję APP (ang. *amyloid precursor protein*) i produkcję β amyloidu, a także nie przyczynia się do formowania jego agregatów (118). Można przypuszczać, że agregaty białka *tau* w chorobie AD występują najprawdopodobniej w wyniku pojawienia się agregatów β amyloidu. Sytuacja ma się zupełnie inaczej, jeżeli chodzi o FTD. Do tej chwili zidentyfikowano 40 mutacji w genie MAPT powodujących powstanie stanu patologicznego i powstanie choroby FTDP-17 (110).

Przez wiele lat analizowano problem depozytów białka *tau* w patogenezie choroby Alzheimerera. Zastanawiano się czy ich występowanie jest swoiste dla tej choroby, czy też jest wynikiem pojawienia się nierozpuszczalnej formy β amyloidu. Jedna z teorii mówi, że pojawienie się agregatów białka *tau* w komórce jest ochroną przeciwko prawdziwym neurotoksycznym czynnikom pojawiającym się w chorej komórce nerwowej. Koncepcja ta ma swoje potwierdzenie w wynikach wskazujących, że obecność β amyloidu nie koreluje dobrze z wystąpieniem neurodegeneracji, lepsza korelacja została uzyskana dla depozytów białka *tau* (119, 120). U chorych na FTDP-17 utrata neuronów i zaburzenia w zachowaniu występują wraz z pojawieniem się rozpuszczalnych oligomerów białka *tau*, znacznie wcześniej niż pojawienie się PHFs i NFTs. Może podobnie, jak w przypadku AD rozpuszczalne formy amyloidu związane są z patogenezą, tak rozpuszczalne formy białka *tau* są sygnałem stanu patologicznego w FTDP-17 (121).

Zaobserwowano degradację dojrzałych form białka *tau* u chorych na AD. Kilka kaspaz związanych jest z cięciem *tau* w miejscu D421 (licząc aminokwasy w izoformie 2N/4R) co prowadzi do powstania białka o 5 kDa krótszego (122). Takie skrócone białko zostało zidentyfikowane w neurofibrylarnych splotach u chorych na Alzheimerera. Sugeruje się, że to płytki β amyloidu występujące u chorych na AD mogą powodować aktywację kaspaz. Z drugiej strony większość neuronów zawierających neurofibrylarne sploty nie zawiera aktywnych enzymów mogących skrócić białko *tau* (123).

W roku 1998 odkryto pierwsze mutacje w genie kodującym białko *tau* i zostały one skorelowane z chorobą FTDP-17 (74, 124, 125). Bardzo ciekawym aspektem mutacji w genie MAPT jest fakt, że różne mutacje mogą prowadzić do różnego fenotypu choroby (126). Niektóre mutacje mogą prowadzić do typowych objawów dla FTDP-17, inne do objawów zgodnych z chorobą Picka, zwyrodnieniem korowo-podstawnym, postępującym porażeniem nadjądrowym lub chorobą Alzheimera. Jeszcze większe zaskoczenie budzi fakt, że różnice w fenotypie mogą występować u chorych posiadających taką samą mutację w genie MAPT. Mutacje mogą powodować powstawanie niefunkcjonalnego białka *tau* lub wpływać na alternatywny splicing eksonu 10, a równowaga pomiędzy izoformami białka *tau* jest ważna w jego patogenezie (99, 110).

Zauważono, że gen MAPT może być skorelowany ze sporadycznym występowaniem choroby Parkinsona, co dziwi, ponieważ w żadnym przypadku PD nie zaobserwowano neurofibrilarnych splotów. Dla kontrastu, w chorobie Alzheimera gen MAPT nie jest wyróżniony jako ten, który jest sprzężony z powyższą chorobą mimo występowania agregatów (127, 128). Przeprowadzono wiele badań polegających na próbie wyeliminowania nierozpuszczalnych form *tau* przez blokowanie kinaz odpowiedzialnych za fosforylację białka *tau*, blokowanie agregacji białka *tau*, stymulowanie komórek do pozbywania się źle sfałdowanych i agregujących białek, wykorzystano przeciwciała anty *tau*, użyto oligonukleotydów antysensowych i stabilizatorów białka *tau* (129-134).

3. Otepienie czołowo-skroniowe połączone z zespołem parkinsonowskim sprzężone z chromosomem 17

3.1. Objawy, diagnoza, leczenie FTDP-17

Otepienie czołowo-skroniowe z zespołem parkinsonowskim sprzężonym z chromosomem 17, FTDP-17, jako osobna jednostka chorobowa została sklasyfikowana na konferencji w Ann Arbor w Michigan w 1996 roku (135). Jest to choroba dziedziczna autosomalna. Charakteryzują ją trzy główne objawy:

- zaburzenia w zachowaniu i osobowości: odhamowanie, apatia, niekontrolowane zachowanie, nadmierna religijność, brak higieny osobistej, alkoholizm, bezpodstawne przyjmowanie leków, werbalna i fizyczna agresja,

- zaburzenia funkcji poznawczych: problemy z mową, niepełna afazja (bezmowa), pogorszenie pamięci, orientacji i funkcji wzrokowo przestrzennych, echolalia (automatyczne powtarzanie słów i zdań), palilalia (gwałtowne powtarzanie słów i zdań), powtarzanie werbalne i wokalne, agresywna demencja i mutyzm (brak lub ograniczenia mówienia przy rozumieniu mowy),
- syndrom parkinsonizm plus: symetryczne spowolnienie ruchowe, niestabilna postawa, sztywność mięśni kończyn, brak spoczynkowego drgania, brak odpowiedzi na leki na PD (lewedopa), nadjądrowe porażenie gałek ocznych, większe lub mniejsze dysfunkcje neuronów ruchowych, mioklonia (zrywania mięśniowe), upośledzenie precyzyjnych ruchów powiek, utrudnienia w połykaniu, upośledzenie mowy (135).

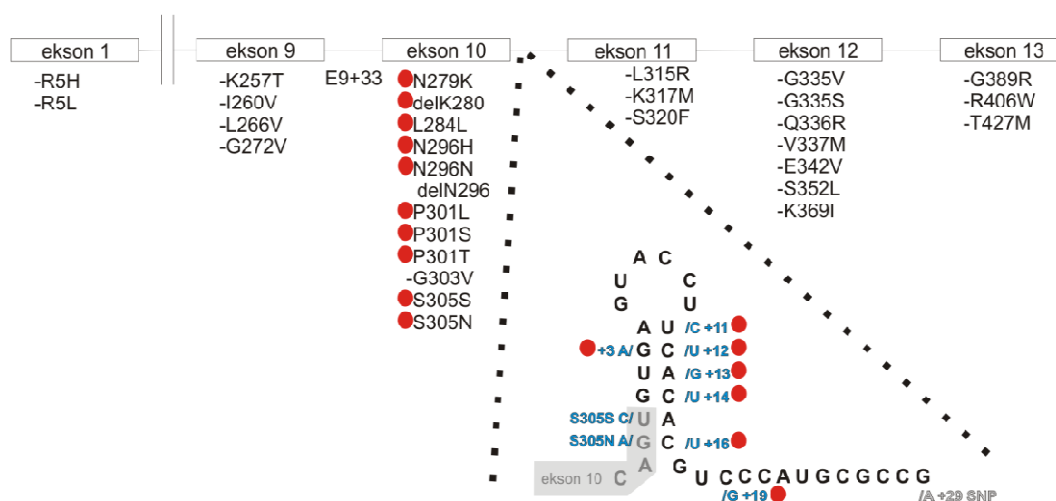
FTDP-17 ze względu na objawy chorobowe możemy podzielić na dwie podgrupy. Pierwsza dotyczy przypadków, dla których początkowe objawy to typowe symptomy otępienne charakterystyczne dla mutacji w rejonie eksonów 1, 9, 11, 12, 13 i 10, powodujących powstawanie niefunkcjonalnego białka *tau*. Drugą podgrupę stanowią chorzy z pierwszymi oznakami FTDP-17 w postaci objawów typowych dla syndromu parkinsonizm plus i dotyczą mutacji zmieniających proces alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT (136). Wywiad lekarski oparty jest o szereg kryteriów, które powinny wystąpić u chorych na FTDP-17. Symptomy choroby powinny wystąpić między 30 a 50 rokiem życia i obejmować: widoczne zmiany w osobowości i zachowaniu oraz czołowo-skroniowe otępienie, syndrom parkinsonizm-plus, pogarszające się trudności w mówieniu, brak poprawy po terapii standardowymi lekami przeciwpadaczkowymi. Ponadto pozytywna historia rodzinna chorób otępiennych także sugeruje FTDP-17 (137).

Do tej pory zidentyfikowano 100 rodzin z FTDP-17 w różnych krajach, takich jak: USA, Wielka Brytania, Japonia, Holandia, Francja, Kanada, Australia, Włochy, Niemcy, Izrael, Irlandia, Hiszpania i Szwecja. Jednak wydaje się, że epidemiologia tej choroby jest znacznie niedoszacowana (138). Sklasyfikowano 40 mutacji, z czego 60% zidentyfikowanych przypadków dotyczyło mutacji P301L, N279K i mutacji 16U w 5' miejscu splicingowym (137). Bardzo ciekawy jest fakt, że objawy choroby FTDP-17 mogą różnić się pomiędzy osobnikami z różnymi mutacjami, ale także zauważono odmienności symptomów pomiędzy chorymi z tej samej rodziny posiadającymi tą samą mutację. Diagnoza choroby obejmuje najpierw dobry wywiad lekarski, zawierający objawy i występowanie rodzinne choroby, następnie badanie występowania w mózgu patologicznych form białka *tau* (wykorzystanie tomografu komputerowego czy rezonansu magnetycznego), a następnie analizę genetyczną. Obecnie nie istnieje prosta i efektywna metoda leczenia FTDP-17. Ogólnie leczenie opiera się na paliatywnej

pomocy skierowanej na poszczególne objawy. Bardzo przydatna jest terapia ruchowa, terapia mowy, stosuje się leki na psychozy oraz antydepresanty. Uważa się, że pacjenci z pierwszymi objawami FTDP-17 mogą żyć od kilku miesięcy do nawet kilku lat, zależnie od rodzaju i nasilenia objawów. Często śmierć pacjenta nie jest wynikiem bezpośrednio otępienia czołowo-skroniowego, ale na przykład urazów w wyniku upadków (137).

3.2. Mutacje w genie MAPT

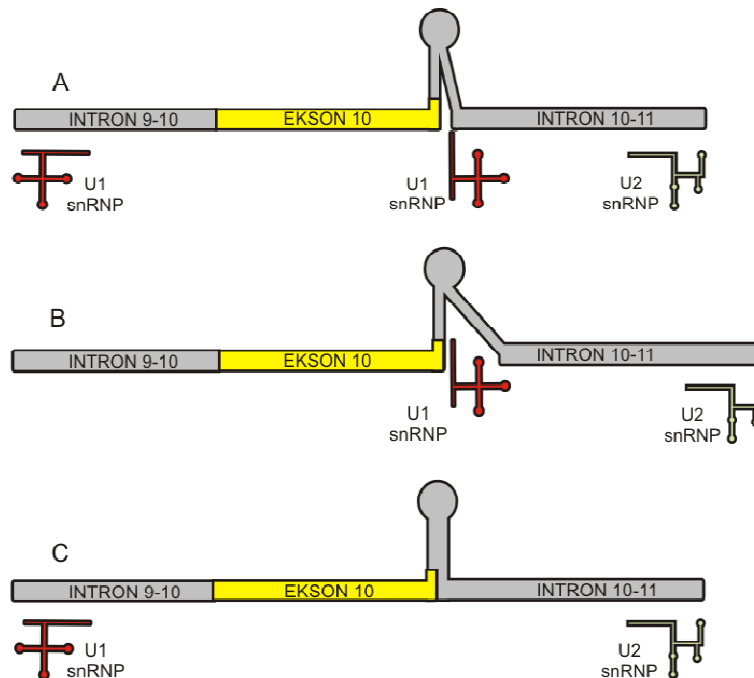
Mutacje w genie MAPT kodującym białko *tau* możemy podzielić na dwie grupy. Pierwsza dotyczy mutacji zmiany sensu (ang. *missense mutation*) powodującej modyfikację aminokwasową w białku *tau*. Zmiany takie powodują powstanie нефункционального białka, niemogącego przyłączyć się do mikrotubul, co prowadzi do agregacji białka *tau*. Drugą grupę stanowią mutacje powodujące zaburzenia w alternatywnym splicingu eksonu 10 genu MAPT. Mutacje te znajdują się głównie w rejonie spinki regulatorowej obejmującej 5' miejsce splicingowe, ale także mogą znajdować się w dalszych rejonach wpływających na alternatywne składanie eksonu 10 genu MAPT (Rysunek 11) (126).



Rysunek 11. Zidentyfikowane mutacje w genie MAPT. Czerwonymi punktami zaznaczono mutacje mające wpływ na alternatywny splicing eksonu 10.

Mutacjami, które wpływają głównie na alternatywne składanie genów są mutacje znajdujące się na granicy 10 i intronu 10-11, czyli w 5' miejscu splicingowym, które jest sekwencyjnie samokomplementarne. Badania NMR wykazały, że fragment ten przyjmuje postać spinki do włosów, co powoduje, że jest słabym miejscem splicingowym (139). Część cząsteczka

biorąca udział w oddziaływaniu z tym rejonem, czyli U1 snRNP ma utrudnioną możliwość wiązania się do tego fragmentu. Jeśli chodzi o formę dziką to miejsce akceptorowe za eksonem 10 jest rozpoznawane tylko w przypadku 50% powstających cząsteczek pre-mRNA genu MAPT (Rysunek 12 A). Dlatego mniej więcej tyle samo powstaje izoformy białka *tau* bez eksonu 10, czyli 3R, jak i izoformy z eksonem 10, czyli 4R. U zdrowego człowieka stosunek izoform 3R do 4R bliski jest jedności. Mutacje 3A (G→A), 11C (U→C), 12U (C→U), 13G (A→G), DD-PAC (C→U), 16U (C→U), 19G (C→G), S305S (U→C) oraz S305N (G→A) w obrębie spinki powodują zmiany w alternatywnym splicingu eksonu 10. Prawie wszystkie mutacje w rejonie regulatorowej spinki skutkują podwyższonym poziomem izoformy 4R (Rysunek 12 B). Mutacja 19G znajdująca się w obrębie spinki regulatorowej, najprawdopodobniej stabilizuje badaną spinkę, nie pozwalając wiązać się cząsteczce U1 snRNP do miejsca splicingowego, co skutkuje powstawaniem w przewodzie izoformy 3R białka *tau* (Rysunek 12 C). Sądzi się, że tylko równowaga pomiędzy izoformą 3R i 4R nie powoduje agregacji białka *tau*. Wszystkie odstępstwa czy to w stronę podwyższonej ilości izoformy 3R czy to 4R powodują powstawanie nierozpuszczalnych filamentów białka *tau* i degradację neuronów (124, 139-145).



Rysunek 12. Alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT. A-forma dzika, cząsteczka U1 snRNP przyłącza się do miejsca 5'ss za eksonem 10 z 50% wydajnością, powstaje tyle samo izoformy 3R i 4R białka *tau*, B-mutacje destabilizujące powodują, że cząsteczka U1 snRNP przyłącza się głównie do 5'ss za eksonem 10 i powstaje w przewodzie izoforma 4R białka *tau*, C-mutacja stabilizująca (19G) może zablokować dostęp do regulatorowej spinki, powstaje głównie izoforma 3R.

Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT odbywa się dzięki obecności siedmiu rejonów regulatorowych SRE działających w układzie *cis*, z którymi może oddziaływać wiele czynników białkowych działających w układzie *trans* (146, 147). Motyw strukturalny spinki do włosów na granicy eksonu 10 i intronu 10-11 ma największy wpływ na alternatywne wycinanie eksonu 10, obejmuje on sekwencję regulatorową, jaką jest intronowy wyciszacz splicingu ISS (ang. *intronic splicing silencer*). Pozostałe mutacje, nieleżące w obrębie wcześniej wymienionej spinki do włosów, a także wpływające na alternatywny splicing, mogą zaburzać oddziaływanie czynników białkowych z innymi regulatorowymi sekwencjami. Oprócz ISS alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT regulują następujące sekwencje: wmacniacz oddziałujący z SC35 (ang. *SC35-like enhancer*), wmacniacz polipurynowy PPE (ang. *polypurine enhancer*), wmacniacz bogaty w A/C ACE (ang. *A/C rich enhancer*), eksonowy wyciszacz splicingu ESS (ang. *exonic splicing silencer*), eksonowy wmacniacz splicingu ESE (ang. *exonic splicing enhancer*), intronowy modulator splicingu ISM (ang. *intronic splicing modulator*) (147, 148). Wydaje się, że mutacje powodujące zmiany w alternatywnym składaniu genu MAPT, a nieleżące bezpośrednio w motywie spinki do włosów, powodują zmiany w oddziaływaniu czynników splicingowych z regulatorowym rejonem. Mutacje P301L, P301T, P301S ulokowane są w obrębie ESE, mutacje N296N i N296H znajdują się w rejonie ESS, mutacje N279K oraz delecja dwóch nukleotydów Δ K280 obecna jest w PPE, mutacja L284L znajduje się pomiędzy dwoma elementami *cis* PPE i ACE. W intronie 10-11 zidentyfikowano polimorfizm jednego nukleotydu +29A, nie ma on jednak wpływu na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT (124, 146, 149-154).

Prawie wszystkie wyżej wymienione mutacje powodują wzrost ilości izoformy 4R w komórkach, czyli wmacniają miejsce splicingowe na końcu eksonu 10. Jedynym wyjątkiem jest podwójna delecja Δ K280, która skutkuje całkowitym brakiem izoformy 4R (153).

3.2.1. Mutacje zmieniające alternatywny splicing eksonu 10 znajdujące się w regulatorowej spince

Poniżej omówiono badania nad mutacjami wywołującymi FTDP-17. I tak:

S305N Rodzina, w której znaleziono mutację S305N wywodziła się z małej izolowanej społeczności japońskiej. Trzech członków rodziny, w dwóch pokoleniach posiadało objawy FTDP-17, a średni wiek pojawienia się pierwszych symptomów wyniósł 35 lat. U chorych obserwowano zmiany w zachowaniu, dezorientację, problemy z mówieniem, atrofię

płata czołowego. Badania histopatologiczne potwierdziły obecność nierozpuszczalnych form białka *tau* w mózgu chorych. Późniejsze badania ujawniły, że mutacja S305N wpływa na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT i powoduje powstawanie w przewodzie izoformy 4R białka *tau* (144).

S305S Mutacja S305S została zidentyfikowana u 55 letniego chorego, który wykazywał upośledzenie funkcji poznawczych. U pozostałych członków rodziny wykazujących objawy chorobowe zostały także przeprowadzone badania genetyczne. Siostra w wieku 48 lat wykazywała objawy postępującego porażenia nadjądrowego PSP (ang. *progressive supranuclear palsy*), matka została umieszczona w szpitalu dla psychicznie chorych. Wyniki badań jednoznacznie stwierdzają, że mutacja ta prowadzi do zmiany w alternatywnym splicingu eksonu 10 genu MAPT i zwiększonej ilości izoformy 4R (143).

3A W 2000 roku Tolnay i współpracownicy zidentyfikowali mutację 3A w intronie 10-11 u 44 letniej kobiety z Wielkiej Brytanii. Osoba ta należała do rodziny SOT 254, z pozytywną historią w stronę choroby FTDP-17. Badania zostały wykonane po śmierci. Eksperymenty innej grupy badawczej potwierdziły wpływ tej mutacji na alternatywny splicing i powstawanie głównie formy 4R białka *tau* (141).

11C U 51 letniego pacjenta z Japonii wykryto intronową mutację 11C. Wykazywał niedorozwój umysłowy, otępienie i parkinsonizm. Na początku zdiagnozowany został, jako chory na PSP. Jego brat, siostra, matka i dziadek także posiadali podobne objawy. Badania wykazały, że nowo znaleziona mutacja powoduje wzrost izoformy 4R u badanego pacjenta (140).

12U Mutację 12U zidentyfikowano u rodziny z Japonii, z dobrze znaną historią choroby. Siedem członków tej rodziny posiadało objawy chorobowe takie jak: parkinsonizm, otępienie, brak kontroli nad zachowaniem, agresja. Średni wiek pojawienia się pierwszych symptomów wyniósł 53 lata. Yasuda i współpracownicy wykonali analizy, które potwierdziły istnienie agregatów białka *tau* w mózgu chorego z mutacją 12U, ponadto udowodnili, że mutacja ta powoduje syntezę prawie wyłącznie izoformy 4R białka *tau* (142).

13G Mutację 13G zaobserwowano u trzech członków rodziny z Wielkiej Brytanii. Pośmiertne badania dwóch osób potwierdziły zmiany w stosunku izoform 3R i 4R. Badania obejmowały dwa pokolenia tej rodziny, a wiek pojawienia się pierwszych objawów wyniósł 65 lat (124).

DD-PAC (14U) W 1994 roku Wilhelmsen i współpracownicy wyodrębnili zespół chorobowy charakteryzujący się brakiem zahamowań, otępieniem, parkinsonizmem i zanikiem mięśni określony mianem DD-PAC (ang. *disinhibitor-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex*). Występowanie tej choroby skorelowali z chromosomem 17q21-22. Hutton i współpracownicy po zidentyfikowaniu mutacji 14U w tej samej rodzinie, mutację tą nazwali DD-PAC i ta nazwa dalej funkcjonuje w literaturze. Zbadano 3 pokolenia rodziny pochodzącej z Irlandii i w przypadku 7 osób potwierdzono agregaty białka *tau* składające się głównie z izoformy 4R. Średni wiek pojawienia się objawów chorobowych w tej rodzinie wyniósł 44 lata (124, 155).

16U Mutację 16U Hutton i współpracownicy zidentyfikowali u czterech rodzin. Pierwsza rodzina z Australii z korzeniami angielskimi liczyła aż 28 członków z objawami FTDP-17 w pięciu pokoleniach. U pięciu osób po śmierci wykonano badania histopatologiczne, które potwierdziły istnienie złogów białka *tau*. Wiek, w którym następowały pierwsze objawy chorobowe w tej rodzinie to 53 lata. Druga rodzina z mutacją 16U pochodziła z USA, trzech członków rodziny w dwóch pokoleniach chorowało na FTDP-17. Średni wiek zachorowania to 40 lat. Ostatnie dwie rodziny z mutacją 16U pochodziły z Wielkiej Brytanii. W pierwszej zdiagnozowano 2 osoby w jednym pokoleniu, a średni wiek zachorowania wyniósł 48 lat. Druga rodzina z Wielkiej Brytanii posiadała 10 członków rodziny z objawami FTDP-17 w trzech pokoleniach, a średni wiek zachorowania wyniósł 51 lat. Analiza tej mutacji przez Hutton'a wykazała, że we wszystkich przypadkach następuje przewaga izoformy 4R (124).

19G Mutacje 19G zidentyfikowano u dwóch 52 letnich osób z różnych rodzin. Jeden z pacjentów posiadał pozytywną historię rodzinną opartą na występowaniu FTDP-17 w czterech pokoleniach. U drugiego pacjenta historia ta nie była wyraźna, ale oboje wykazywali zaburzenia funkcji poznawczych i zmiany w zachowaniu. W odróżnieniu od pozostałych mutacji w spince regulatorowej, mutacja 19G powoduje podwyższenie ilości izoformy 3R w neuronach, w stosunku do izoformy 4R (145).

3.2.2. Pozostałe mutacje zmieniające alternatywny splicing eksonu 10

Poniżej omówiono tego typu mutacje wywołujące FTDP-17. I tak:

N279K Mutacja N279K została zidentyfikowana przez Delisle'a i współpracowników w 1999 roku. Mutacja N279K została znaleziona u chorych wcześniej określanych jako chorych na PPND (ang. *pallido-ponto-nigral degeneration*). Wśród nich 17

posiadało mutację N279K, gdzie wiek pacjentów z pierwszymi objawami wahał się od 32 do 58 lat. Dodatkowo udowodniono, że mutacja ta powoduje przewagę izoformy 4R w agregatach białka *tau* (154).

ΔK280 Mutacja w postaci delecji kodonu 280 została zidentyfikowana u jednego pacjenta wśród 90 chorych na FTDP-17 z Holandii, który nie posiadał pozytywnej historii rodzinnej choroby. Jedynie ojciec wykazywał objawy choroby Parkinsona. Eksperymenty wykazały, że delecja ta powoduje upośledzenie funkcji białka *tau* związanego z oddziaływaniem z mikrotubulami. Dalsze badania wykazały, że w przypadku tej mutacji w mózgu chorego nie ma izoformy 4R (153).

L284L Mutację L284L wykryto u 53 letniego pacjenta, u którego pierwsze objawy takie jak zapominanie ostatniej rozmowy czy wrażenie nieobecności w czasie jazdy samochodem pojawiły się w wieku 49 lat. Tak jak większość mutacji zmieniających alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT, mutacja L284L powoduje powstawanie w przewodzie izoformy 4R białka *tau* (146).

N296H Mutacja N296H została zidentyfikowana w 2001 roku u 62 letniego Japończyka. Posiadał on objawy parkinsonizmu, a jego płat czołowy wykazywał atrofię. Udowodniono, że nierozpuszczalna forma białka *tau*, wyizolowana od chorego z mutacją N296H zawiera zwiększoną ilość izoformy 4R (152).

N296N W 2000 roku znaleziono mutację N296N u pacjenta z rodzinnym występowaniem FTDP-17, aż 10 członków jego rodziny cierpiało na tą chorobę. Pierwsze objawy występowały w wieku 43-59 i obejmowały zmiany osobowości, problemy z pamięcią, otępienie i dysfunkcję płata czołowego. Badania wykazały, że mutacja ta powoduje powstawanie większej ilości izoformy 4R białka *tau* (151).

P301L Mutacja P301L została zidentyfikowana po raz pierwszy przez Hutton'a i współpracowników w 1998 roku u dwóch rodzin. Pierwsza rodzina pochodziła z Holandii, gdzie 49 członków rodziny posiadało objawy FTDP-17. Badania obejmowały pięć pokoleń tej rodziny i średni wiek pojawienia się pierwszych symptomów choroby wyniósł 50 lat. Drugą była rodzina z USA, gdzie chorobę stwierdzono u 3 członków, w dwóch pokoleniach. Średni wiek chorych z początkowymi objawami choroby wyniósł 45-50 lat. W

obu przypadkach badania *post mortem* agregatów białka *tau* wykazały, że zawierają one w przewadze ilościowej izoformę 4R (124).

P301S Mutacja P301S została zaobserwowana przez Sperfeld'a i współpracowników u pacjenta z pozytywnym wywiadem medycznym co do rodzinnego występowania FTDP-17. Pierwsze symptomy choroby pojawiły się już w 25 roku życia i przez pierwszy okres choroba postępowała powoli i objawiała się zespołem czołowym z otępieniem, brakiem zahamowań, problemami z mówieniem i euforią. W późniejszym stadium występowały typowe objawy parkinsonizmu. Co ciekawe, fenotyp choroby w przypadku tej rodziny znacznie się różnił między sobą, często w późniejszym stadium występowała epilepsja. Pierwsze objawy FTDP-17 w tej rodzinie występowały dosyć wcześnie w wieku 28-34 lat. W tym samym roku ukazała się praca pokazująca, że mutacja P301S wpływa na alternatywny splicing eksonu 10 i powoduje zwiększenie izoformy 4R w komórkach nerwowych (150).

P301T U pacjenta mającego problemy z chodzeniem, mówieniem, zmianami w zachowaniu, cierpiącego na apatię zidentyfikowano mutację w genie MAPT P301T. Analiza historii rodziny wykazała, że czterech członków posiadało podobne objawy. Badania obrazowe mózgu pacjenta wykazały atrofię płata czołowo-skroniowego. Wpływ tej mutacji na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT udowodniono w późniejszych badaniach (149).

3.3. Regulacja alternatywnego składania eksonu 10 genu MAPT przez czynniki działające w układzie *trans*

Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 białka *tau* jest procesem złożonym. Miejsce akceptorowe i donorowe są miejscami słabymi i niewystarczającymi do zajęcia konstytutywnego splicingu. Dodatkowo, regulacja wycinania intronu 10-11 oparta jest na kilku elementach działających w układzie *cis*, do których mogą wiązać się elementy działające w układzie *trans*, czyli czynniki splicingowe. Jak już wspomniano wcześniej, u ludzi potrzebne jest ponad 170 białek, aby mogło dojść do powstania aktywnego spliceosomu. Trzeba zaznaczyć, że rekrutacja czynników splicingowych jest różna w konstytutywnym splicingu i alternatywnym splicingu oraz różnice te są tkankowo specyficzne (156).

Jak do tej pory nie przeprowadzono kompleksowych badań pozwalających na określenie wszystkich czynników białkowych biorących udział w alternatywnym składaniu

eksonu 10 genu MAPT. Doniesienia literaturowe dotyczą zazwyczaj pojedynczych białek i ich wpływu na alternatywny splicing eksonu 10 białka *tau*. Kilka z nich jest omówionych poniżej.

Czynnik splicingowy PSF (ang. *polypyrimidine tract binding protein associated splicing factor*) bierze udział w regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 białka *tau* (157). Białko to wiąże się specyficznie do intronu za eksonem 10 białka *tau*. PSF najprawdopodobniej oddziałuje z motywem spinkowym ISS i chroni 5' miejsce splicingowe przed wiązaniem się cząsteczki U1 snRNP. Nadekspresja tego białka powoduje wzrost ilości izoformy 3R, ponadto hamowanie splicingu jest zależne od stężenia PSF. Poza tym, wyłączenie ekspresji tego czynnika splicingowego skutkowało wzrostem izoformy 4R. Co ciekawe, białko PSF nie oddziałuje ze spinką posiadającą mutacje DD-PAC (wpływ innych mutacji nie był badany). Najprawdopodobniej kluczowym elementem wiązania się tego czynnika splicingowego jest stabilność termodynamiczna spinki. PSF wiąże się do stabilnej spinki typu WT i dodatkowo ją stabilizuje. Białko PSF ulega ekspresji w tkance nerwowej w tych samych częściach mózgu człowieka, gdzie występują agregaty białka *tau* w chorobie FTDP-17.

Helikaza p68 bierze udział w wielu procesach odbywających się w komórce takich jak: aktywacja transkrypcji, składanie pre-mRNA, biogeneza rRNA, mikroRNA i rybosomów (158). Reguluje również składanie eksonu 10 białka *tau* (159). Nadekspresja aktywnej helikazy p68 przyczyniła się do wzrostu izoformy 4R, czyli białko to promuje wiązanie się U1 snRNP do miejsca akceptorowego. Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 białka *tau* przez helikazę p68 odbywa się przez udział w aktywnym rozplataniu fragmentu dwuniciowego spinki zależne od hydrolizy ATP. Zmutowana helikaza p68 bez aktywności ATPazy wiąże się do rejonu spinki ISS, lecz powoduje obniżenie ilości izoformy 4R. Co za tym idzie, nie następuje rozplecenie trzonu spinki i cząsteczka U1 snRNP nie może oddziaływać z 5' miejscem splicingowym. Tak jak w przypadku białka PSF, helikaza p68 nie oddziałuje ze spinką posiadającą mutacje DD-PAC (wpływ innych mutacji nie był badany). Wpływ helikazy p68 na splicing eksonu 10 jest zależny od oddziaływań tego białka z RBM4 (ang. *RNA binding motif protein 4*). Wyłączenie ekspresji tego intronowego aktywatora splicingu skutkowało brakiem widocznego wpływu helikazy p68 na alternatywny splicing eksonu 10 białka *tau*. Białko RBM4 najprawdopodobniej wiąże się do elementu regulującego znajdującego się 100 nukleotydów poniżej eksonu 10.

Zidentyfikowano specyficzny aktywator splicingu Tra2 β , który bierze udział w regulacji alternatywnego składowania eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT (160). Oddziałuje on ze wzmacniaczem polipurynowym zlokalizowanym w eksonie 10. Mutacje w sekwencji elementu regulatorowego działającego w układzie *cis* PPE mogą zaburzać lub promować wiązanie się Tra2 β do tego rejonu, tym samym wpływają na redukcję lub wzrost ilości izoformy 4R białka *tau*.

Białko SC35 wiąże się do rejonu wzmacniającego splicing eksonu 10, co skutkuje powstawaniem zwiększonej ilości izoformy 4R (161). Białko to posiada dwie domeny wiążące się do RNA i obie biorą udział w oddziaływaniu z rejonem regulującym alternatywne składowanie pre-mRNA genu MAPT (162, 163). Aktywność SC35 regulowana jest przez fosforylację z udziałem białka Dyrk1A (161). Oddziaływanie SC35 z Dyrk1A powoduje zmniejszenie zdolności wiązania się SC35 do regulatorowego rejonu i w konsekwencji powstaje więcej izoformy 3R białka *tau*.

Także białko SRp75 może regulować alternatywny splicing eksonu 10 białka *tau*. Wiąże się ono do bliżej nieokreślonego rejonu w intronie 10-11 i powoduje hamowanie splicingu i tym samym powstaje więcej izoformy 3R (164). Dwa białka, a mianowicie hnRNPG i hnRNP2, oddziałują z SRp75, przy czym hnRNPG wzmacnia aktywność SRp75 i hamuje splicing, a hnRNP2 aktywuje splicing.

Kolejnym białkiem biorącym udział w składaniu eksonu 10 białka *tau* jest białko 9G8. Nadekspresja tego czynnika splicingowego skutkuje powstaniem większej ilości izoformy 3R, czyli białko to hamuje splicing eksonu 10 (165). Rejon, z którym oddziałuje to białko nie jest znany, wiadomo za to, że jego aktywność jest regulowana przez fosforylację z udziałem białka Dyrk1A.

Pierwsze badania nad regulacją splicingu eksonu 10 białka *tau* przez SFRS7 wykazywały, że powoduje zahamowanie składowania genów (166). Kolejne eksperymenty z użyciem komórek glejowych przeczą wcześniejszym doniesieniom (167). Nadekspresja białka STOX1A, które indukuje ekspresję SFRS7 powoduje wzrost splicingu i pojawienie się większej ilości izoformy 4R białka *tau*.

Czynnik splicingowy SRp20 hamuje alternatywne składowanie eksonu 10 białka *tau* w formie dzikiej pre-mRNA genu MAPT, jak również w przypadku mutacji występujących w chorobie FTDP-17 takich jak: N279K i S305N (168). Mechanizm działania tego białka nie jest poznany, prawdopodobnie wiąże się do sekwencji regulatorowych lub oddziaływać z innym czynnikiem białkowym.

Wang zaproponował trzy białka, które mogą wiązać się do eksonowego wyciszacza splicingu ESS. Sugeruje, że SRp55, SRp30c oraz hnRNPG prawdopodobnie oddziałują z regulatorowym elementem ESS eksonu 10 genu MAPT, co skutkuje hamowaniem wycinania tego eksonu i powstaniem w większej ilości izoformy 3R (169).

Czynniki splicingowe biorące udział w składaniu pre-mRNA genu MAPT są regulowane przez fosforylację. Nadekspresja ubikwitynowanego białka CLK-2 (ang. *cdc2-like kinase 2*) obniża ilość syntetyzowanej izoformy 4R (170). Przypuszcza się, że białko to reguluje aktywność czynników splicingowych z grupy białek SR. Natomiast hamowanie aktywności kinazowej GSK-3 β w neuronowych liniach komórkowych powoduje wzrost splicingu eksonu 10 (171).

U pacjentów z mutacjami powodującymi wzrost ilości izoformy 4R białka *tau* wykryto mniejszą ilość cząsteczki miR-132 i zwiększoną ilość białka PTBP2 (ang. *polypyrimidyne tract binding protein 2*) (172). Nadekspresja miR-132 lub wyłączenie ekspresji PTBP2 skutkuje powstaniem podobnego stosunku izoform 3R/4R jaki występuje u zdrowych ludzi. Sugeruje to, że miR-132 oddziałuje z PTBP2 i hamuje jego aktywność promującą splicing eksonu 10 białka *tau*.

Wpływ wszystkich, opisanych wyżej, czynników działających w układzie *trans* na alternatywne składanie eksonu 10 genu MAPT został przedstawiony w tabeli 1.

Tabela 1. Białka biorące udział w regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT.

Nazwa białka	Wpływ na splicing	Mechanizm działania
PSF	↓	Stabilizacja spinki ISS
helikaza p68	↑	Destabilizacja ISS
RBM4	↑	Rekrutacja helikazy p68
Tra2 β	↑	Wiązanie się z PPE
SC35	↑	Wiązanie się ze wzmacniaczem SC35
Dyrk1A	↑↓	Fosforylacja SC35 i 9G8
SRp75	↓	Wiązanie się do intronu 10-11
hnRNPG	↓	Oddziaływanie z SRp75, wiązanie się do ESS
hnRNP2	↑	Oddziaływanie z SRp75
9G8	↓	Nieznany
SFRS7	↑↓	Nieznany
STOX1A	↑	Aktywacja ekspresji SFRS7

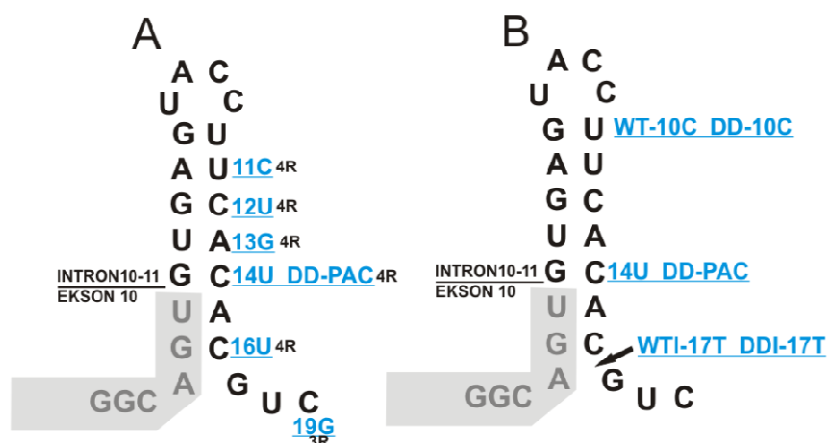
SRp20	↑	Nieznany
SRp55	↓	Wiązanie się do ESS
SRp30c	↓	Wiązanie się do ESS
CLK-2	↓	Fosforylacja białek SR
GSK-3 β	↓	Fosforylacja SC35
PTBP2	↓	Wiązanie do polipirymidynowych traktów
miR-132	↑	Oddziaływanie z PTBP2

Podsumowując, w części literaturowej opisano proces splicingu pre-mRNA oraz jego uwarunkowania. Ponadto przedstawiono choroby związane z agregatami białka *tau* skupiając się na otepieniuczołowo-skroniowym z zespołem parkinsonowskim sprzężonym z chromosomem 17 (FTDP-17). W szczególności przedstawiono: 1) proces konstytutywnego składania genów, 2) schemat reakcji transestryfikacji w trakcie splicingu, 3) rejony decydujące o konstytutywnym splicingu, 4) budowę i składniki spliceosomu, 5) regulację alternatywnego splicingu, 6) procesy komórkowe sprzężone ze składaniem pre-mRNA, 7) alternatywny splicing w komórkach nerwowych, 8) przykłady wpływu struktury drugorzędowej na alternatywny splicing, 9) choroby związane z agregatami białka *tau*, 10) depozyty białka *tau* jako czynnik powodujący neurodegenerację, 11) objawy, diagnozę i leczenie FTDP-17, 12) mutacje w genie MAPT, 13) czynniki splicingowe regulujące alternatywny splicing eksonu 10 białka *tau*.

V. WYNIKI I DYSKUSJA

1. *Badanie parametrów termodynamicznych regulatorowej spinki i jej mutantów*

Do badania wpływu mutacji na stabilność termodynamiczną modelowych spinek regulatorowych RNA wykorzystano jedenaście oligorybonukleotydów o długości 25 i 26 nukleotydów. Modelowe spinki RNA zawierały fragment eksonu 10 (6 nukleotydów) i intronu 10-11 (19 i 20 nukleotydów) z cząsteczki pre-mRNA genu MAPT. Z wcześniejszych doniesień wiadomo, że region ten przyjmuje strukturę spinki do włosów i zaangażowany jest w regulację alternatywnego splicingu eksonu 10 białka *tau* (139). W eksperymentach topień UV wykorzystano jedenaście cząsteczek RNA, w tym spinkę odpowiadającą formie typu dzikiego 5'GGCAGUGUGAGUACCUUCACACGUC, sześć cząsteczek RNA z mutacjami występującymi w chorobie FTDP-17, a także dodatkowe 4 cząsteczki RNA z mutacjami zaproponowanymi przez Donahue i współpracowników (Rysunek 13) (100). Parametry termodynamiczne zostały przedstawione w tabeli 2.



Rysunek 13. Modelowe spinki RNA z zaznaczonymi mutacjami. A-mutacje występujące w chorobie FTDP-17. B-dodatkowe mutacje zaproponowane przez Donahue i współpracowników (100). Symbole 3R i 4R oznaczają przewagę izoformy białka *tau*, która powstaje w wyniku pojawienia się mutacji.

Tabela 2. Parametry trwałości termodynamicznej modelowych spinek i ich kompleksów z antybiotykami

Nazwa	Sekwencja RNA	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	$-\Delta S^\circ$ (eu)	$-\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	T_M (°C)	$-\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	$-\Delta\Delta G^\circ_{37}$ (kcal/mol)	ΔT_M (°C)
WT	GGCAGUGUGAGUACCUUCACACGUC	69,2±2,1	202,4±6,0	6,39±0,26	68,6	0	0	0
	+ neomycyna ^c	75,5±5,3	213,7±15,9	9,16±0,46	79,9		-2,77	-11,3
	+ kanamycyna	65,2±4,3	187,7±13,6	7,00±0,32	74,3		-0,61	-5,7
	+ tobramycyna ^c	65,8±4,7	192,5±14,1	6,10±0,38	69,7		+0,29	-1,1
	+ mitoksantron ^c	68,6±3,8	197,3±12,2	7,35±0,33	74,3		-0,96	-5,7
11C	GGCAGUGUGAGUACCUCCACACGUC	54,4±3,9	161,7±11,4	4,23±0,35	63,2	2,16	0	0
	+ neomycyna	78,0±4,8	224,8±14,6	8,26±0,51	73,8		-4,03	-10,6
	+ kanamycyna	62,4±2,8	180,5±8,1	6,46±0,28	73,4		-2,23	-10,2
	+ tobramycyna	56,6±7,4	168,2±23,2	4,41±0,28	63,2		-0,18	0
	+ mitoksantron	65,4±5,4	188,4±17,3	6,96±0,55	71,5		-2,73	-8,3
12U	GGCAGUGUGAGUACCUUACACGUC	53,0±2,2	162,8±6,8	2,54±0,14	52,6	3,85	0	0
	+ neomycyna	57,9±5,1	169,8±15,3	5,28±0,38	68,1		-2,74	-15,5
	+ kanamycyna	58,7±8,6	176,5±27,1	3,94±0,33	59,3		-1,40	-6,7
	+ tobramycyna	52,7±3,2	160,2±9,7	3,00±0,25	55,7		-0,46	-3,1
	+ mitoksantron	52,4±3,5	155,4±11,0	4,16±0,41	63,7		-1,62	-11,1
13G	GGCAGUGUGAGUACCUUCGACACGUC	63,1±3,7	188,2±10,7	4,27±0,38	62,0	2,12	0	0
	+ neomycyna	78,1±4,7	225,7±14,7	8,13±0,37	73,0		-3,86	-11,0
	+ kanamycyna	71,6±9,2	209,9±28,7	6,55±0,31	68,2		-2,28	-6,2
	+ tobramycyna	60,8±3,1	181,5±8,4	4,56±0,48	62,1		-0,29	-0,1
	+ mitoksantron	70,4±5,1	206,1±16,2	6,45±0,40	69,9		-2,18	-7,9
DD-PAC	GGCAGUGUGAGUACCUUCAACGUC	58,7±4,3	179,3±13,3	3,10±0,14	54,3	3,29	0	0
	+ neomycyna	66,9±4,7	200,7±14,8	4,73±0,60	60,5		-1,63	-6,2
	+ kanamycyna	59,7±5,7	178,9±17,7	4,24±0,43	60,7		-1,14	-6,4
	+ tobramycyna	61,6±5,9	186,8±17,7	3,65±0,44	56,5		-0,55	-2,2
	+ mitoksantron	73,4±16,2	215,4±52,3	6,44±0,24	61,8		-3,34	-7,5
16U	GGCAGUGUGAGUACCUUCACAUGUC	56,1±2,9	169,5±8,8	3,57±0,21	58,1	2,82	0	0
	+ neomycyna	63,9±4,6	185,1±14,6	6,46±0,19	71,9		-2,89	-13,8
	+ kanamycyna	56,6±4,3	166,9±14,0	4,84±0,30	66,0		-1,27	-7,9
	+ tobramycyna	55,0±3,3	165,6±10,0	3,61±0,23	58,8		-0,04	-0,7
	+ mitoksantron	65,7±7,2	194,5±22,5	5,33±0,37	64,4		-1,76	-6,4

19G	<u>GGCAGUGUGAGU</u> <u>ACCUUCACACG</u> G	64,3±3,2	188,2±9,5	5,93±0,27	68,5	0,46	0	0
	+ neomycyna	97,4±0,5	276,0±2,2	11,83±0,41	79,8		-5,90	-11,3
	+ kanamycyna	64,4±3,9	183,9±10,9	7,39±0,51	77,2		-1,46	-8,7
	+ tobramycyna	67,0±2,4	195,8±7,1	6,28±0,26	69,1		-0,35	-0,6
	+ mitoksantron	71,2±3,8	205,5±11,1	7,48±0,36	73,4		-1,55	-4,9
WT-10C	<u>GGCAGUGUGAGU</u> <u>ACC</u> C <u>UCACACG</u> U C	64,1±1,6	184,6±4,7	6,84±0,20	74,0	-0,45	0	0
	+ neomycyna	79,7±8,7	228,1±24,6	8,95±1,20	76,2		-2,11	-2,2
	+ kanamycyna	75,3±6,2	214,8±18,7	8,67±0,66	77,4		-1,83	-3,4
	+ tobramycyna	70,4±4,4	202,5±12,9	7,57±0,40	74,4		-0,73	-0,4
	+ mitoksantron	71,1±1,7	203,0±4,8	8,18±0,38	77,3		-1,34	-3,3
WTI-17T	<u>GGCAGUGUGAGU</u> <u>ACCUUCACAC</u> U G U C	77,0±2,0	220,9±6,5	8,52±0,24	75,6	-2,13	0	0
	+ neomycyna	91,3±3,3	260,7±10,3	10,40±0,75	76,9		-1,88	-1,3
	+ kanamycyna	83,5±4,9	236,8±15,5	10,03±0,80	79,4		-1,51	-3,8
	+ tobramycyna	88,2±6,0	252,8±17,6	9,79±0,58	75,7		-1,27	-0,1
	+ mitoksantron	88,8±4,0	253,9±11,8	10,03±0,42	76,5		-1,51	-0,9
DD-10C	<u>GGCAGUGUGAGU</u> <u>ACC</u> C <u>UCA</u> U A C G U C	49,6±4,4	148,8±13,3	3,44±0,29	60,1	2,95	0	0
	+ neomycyna	68,0±2,8	202,2±8,4	5,29±0,40	63,1		-1,85	-3,0
	+ kanamycyna	53,5±6,2	157,6±18,5	4,58±0,61	66,0		-1,14	-5,9
	+ tobramycyna	60,8±1,5	182,1±4,5	4,30±0,26	60,6		-0,86	-0,5
	+ mitoksantron	63,0±2,3	188,7±7,2	4,51±0,25	60,9		-1,07	-0,8
DDI-17T	<u>GGCAGUGUGAGU</u> <u>ACCUUCA</u> U A C G U C	69,5±6,6	206,4±19,7	5,51±0,40	63,7	0,88	0	0
	+ neomycyna	82,8±4,9	243,0±14,1	7,43±0,68	67,6		-1,92	-3,9
	+ kanamycyna	74,3±5,9	216,8±18,9	7,09±0,66	69,5		-1,58	-5,8
	+ tobramycyna	75,4±3,8	223,4±11,4	6,17±0,27	64,6		-0,66	-0,9
	+ mitoksantron	92,1±4,2	269,5±13,8	8,47±0,31	68,8		-2,96	-5,1

Bufor do topnień: 100 mM NaCl, 20 mM kakodylan sodu, 0,5 mM Na₂EDTA, pH 7,0. Stosunek molowy RNA i antybiotyków był następujący: neomycyna 1:10, kanamycyna 1:350, tobramycyna 1:50, mitoksantron 1:1. Fragment eksonu 10 zaznaczono podkreśleniem, kursywą zaznaczono pętle w spinie RNA, na czerwono zaznaczono mutacje.

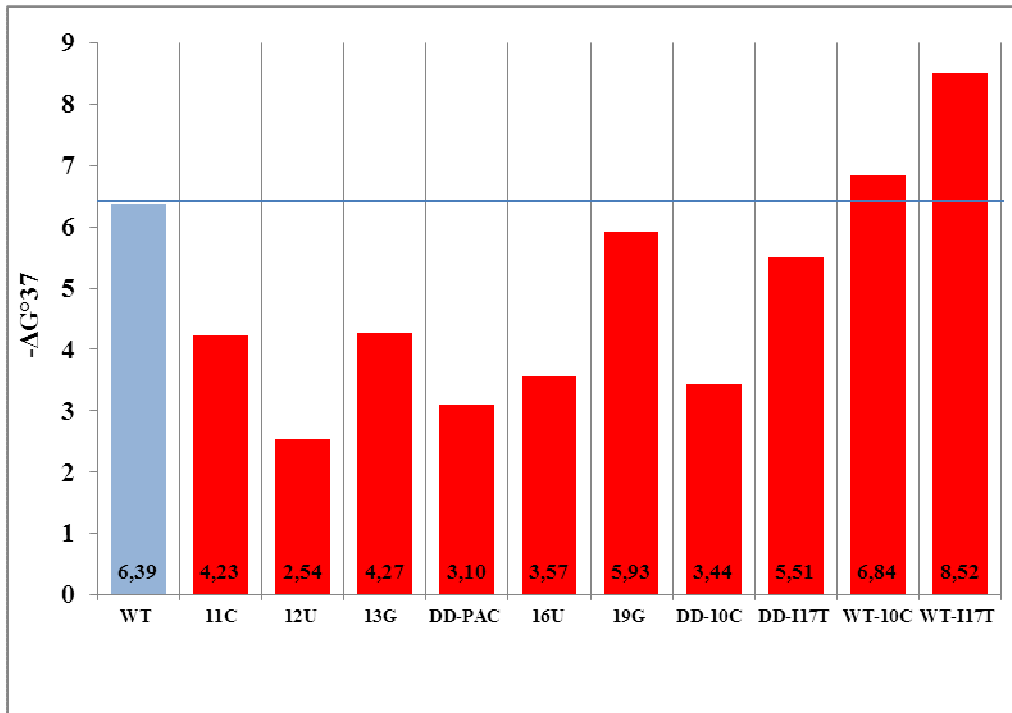
1.1. Parametry termodynamiczne badanych spinek RNA

Badania termodynamiczne pokazały, że wszystkie badane oligonukleotydy oraz ich kompleksy ze związkami niskocząsteczkowymi tworzą wyłącznie strukturę spinki, o czym świadczy fakt, że temperatury topnienia dla różnych ich stężeń były takie same. Taka zależność obserwowana jest dla topnień struktur jednocząsteczkowych (jakim są spinki), w przeciwieństwie do topnień struktur dwucząsteczkowych (jakimi są duplekisy), dla których temperatury topnienia rosną liniowo wraz ze wzrostem stężenia oligonukleotydów.

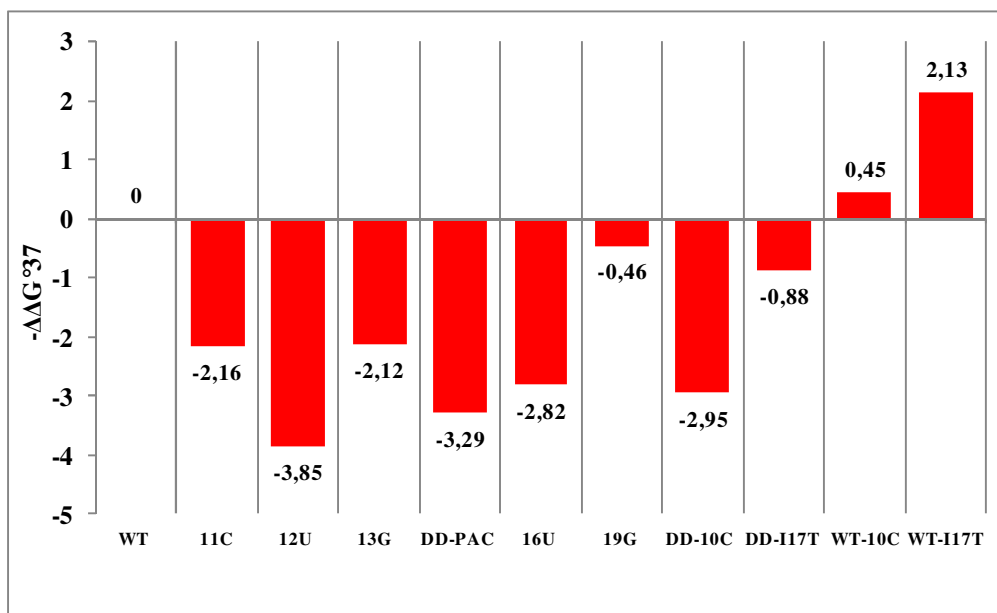
Tak jak się spodziewano, badania termodynamiczne modelowych spinek z mutacjami w niekodującym rejonie intronu 10-11 genu MAPT wykazały znaczące różnice w ich stabilności. W porównaniu ze spinką RNA występującą w formie dzikiej osiem mutacji powodowało obniżenie stabilności termodynamicznej spinki. Destabilizacja wynosiła: 2,16 kcal/mol (11C), 3,85 kcal/mol (12U), 2,12 kcal/mol (13G), 3,29 kcal/mol (DD-PAC), 2,82 kcal/mol (16U), 0,46 kcal/mol (19G), 2,95 kcal/mol (DD-10C) oraz 0,88 kcal/mol (DD-10C). W przypadku mutantów WT-10C oraz WTI-17T zaobserwowano podwyższenie stabilności termodynamicznej odpowiednio o 0,45 i 2,13 kcal/mol (Tabela 2, Rysunek 14).

Z danych literaturowych wiadomo, że mutacja 19G funkcjonuje, jako ta, która skutkuje powstaniem w przewodzie izoformy 3R, co mogłoby wskazywać, że powinna ona zwiększać stabilność termodynamiczną modelowej spinki (145). Niestety, przeprowadzone badania nie potwierdziły tej hipotezy. Z termodynamicznego punktu widzenia bardzo ciekawym przypadkiem jest mutant DD-10C zawierający dwie mutacje. Pierwsza mutacja to DD-PAC naturalnie występująca w chorobie FTDP-17 oraz druga mutacja 10C. Porównanie stabilności termodynamicznej spinki WT z DD-10C ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ} = 2,95$ kcal/mol) oraz DD-PAC ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ} = 3,29$ kcal/mol) i WT-10C ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ} = -0,45$ kcal/mol) pokazuje, że efekty termodynamiczne są addytywne. Mutant DD-17T także posiada dwie mutacje; oprócz mutacji DD-PAC posiada insercję U w pozycji 17. Porównanie stabilności termodynamicznej WT i DD-117T ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ} = 0,88$ kcal/mol) oraz WTI-17T ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ} = -2,13$ kcal/mol) i DD-PAC ($\Delta\Delta G_{37}^{\circ} = 3,29$ kcal/mol) także potwierdza fakt, że zmiany termodynamiczne spowodowane mutacjami mają charakter addytywny. Termodynamiczne zmiany dotyczące pojedynczych mutantów oraz addytywny charakter zmian stabilności termodynamicznej w przypadku podwójnych mutantów w modelowych spinkach pokazują, że stabilność badanych spinek jest zgodna z zasadami termodynamicznymi dotyczącymi kwasów nukleinowych.

A



B



Rysunek 14. A-energia swobodna modelowych spinek RNA, B-różnica w stabilności termodynamicznej pomiędzy cząsteczkami RNA z mutacjami, a forma dziką.

Obserwowany efekt destabilizacyjny spowodowany zamianą pary G-C na G-U (mutacje: 12U, DD-PAC, 16U) wahał się w granicach 2,8-3,9 kcal/mol i był zależny od miejsca występowania w spince, orientacji i par sąsiadujących. Co ciekawe, zastąpienie pary zamykającej spinkę G-U parą G-C (WT-10C) powodowało wzrost stabilności

termodynamicznej tylko o 0,5 kcal/mol. Wskazuje to, że para G-U jest ważna w innym aspekcie niż jedynie stabilność termodynamiczna (173, 174). Sparowanie wybrzuszonej adenozyiny w pozycji 3 (mutant WTI-17T) powoduje wzrost stabilności termodynamicznej o 2,1 kcal/mol, co jest spodziewane przy powstaniu dwóch wiązań wodorowych dla pary A-U. Wynik ten sugeruje, że w mutantach z wybrzuszoną adenozyną, nukleotyd ten nie bierze udziału w żadnych silnych wiązaniach wodorowych z innym fragmentem modelowej spinki (175, 176).

1.2. Widma dichroizmu kołowego badanych spinek RNA

Badania trwałości termodynamicznej spinek RNA wykazały znaczący wpływ mutacji na ich stabilność. Ponadto, wykonano widma dichroizmu kołowego CD (ang. *circular dichroism*) w celu uzyskania dodatkowych informacji o strukturze badanych spinek RNA. Otrzymane widma CD pokazują, że zmiany strukturalne wywołane obecnością różnych mutacji w badanych spinkach RNA nie są znaczące (Rysunek 15).

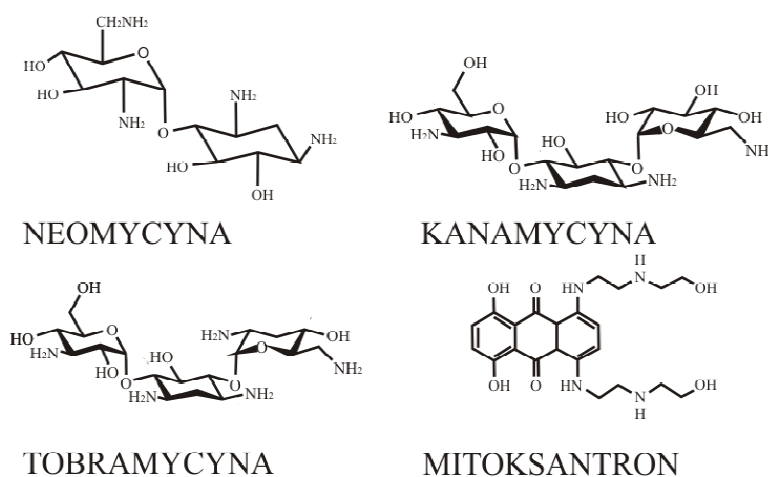
Na widmach CD spinek RNA pokazanych na rysunku 15 widać dwa pozytywne sygnały: intensywny przy długości fali ~260 nm i umiarkowany przy ~280 nm. Ponadto, we wszystkich widmach CD pojawiają się również dwa negatywne sygnały: pierwszy, o słabej intensywności, występujący przy długości fali ~230 nm oraz drugi, intensywny przy ~210 nm. Generalnie, negatywne sygnały obserwowane przy długościach fali ~210 nm i ~230 nm oraz pozytywny przy ~260 nm są charakterystyczne dla struktur helikalnych o geometrii A-RNA (w tym przypadku trzonów badanych spinek RNA), natomiast o występowaniu struktury spinki może świadczyć obecność swoistego, pozytywnego sygnału przy długości fali około 285 nm (177). Dane literaturowe dotyczące widm CD dupleksów i spinek w serii DNA wskazują, że pojawienie się pozytywnego sygnału przy długości fali około 285 nm, oprócz innego pozytywnego przy długości fali wynoszącej około 260 nm, świadczy o tworzeniu struktury spinki. Jakkolwiek trudno jest znaleźć podobne metodyczne analizy widm CD dla spinek i dupleksów w serii RNA.

Względna intensywność sygnałów przy ~260 i ~280 nm zmienia się w pewnym zakresie dla spinek z różnymi mutacjami, a ich maksyma przesuwają się o około 3-5 nm, zależnie od rodzaju spinki, co najprawdopodobniej związane jest z obecnością w badanych mutantach również innych oddziaływań niż wyłącznie kanoniczne typu Watson'a-Crick'a. Pomiedzy obydwoima sygnałami obserwuje się rodzaj przegięcia przesuwającego się także o kilka nm zależnie od modyfikacji (mutacji) spinki RNA. W tym momencie trudno wyjaśnić w

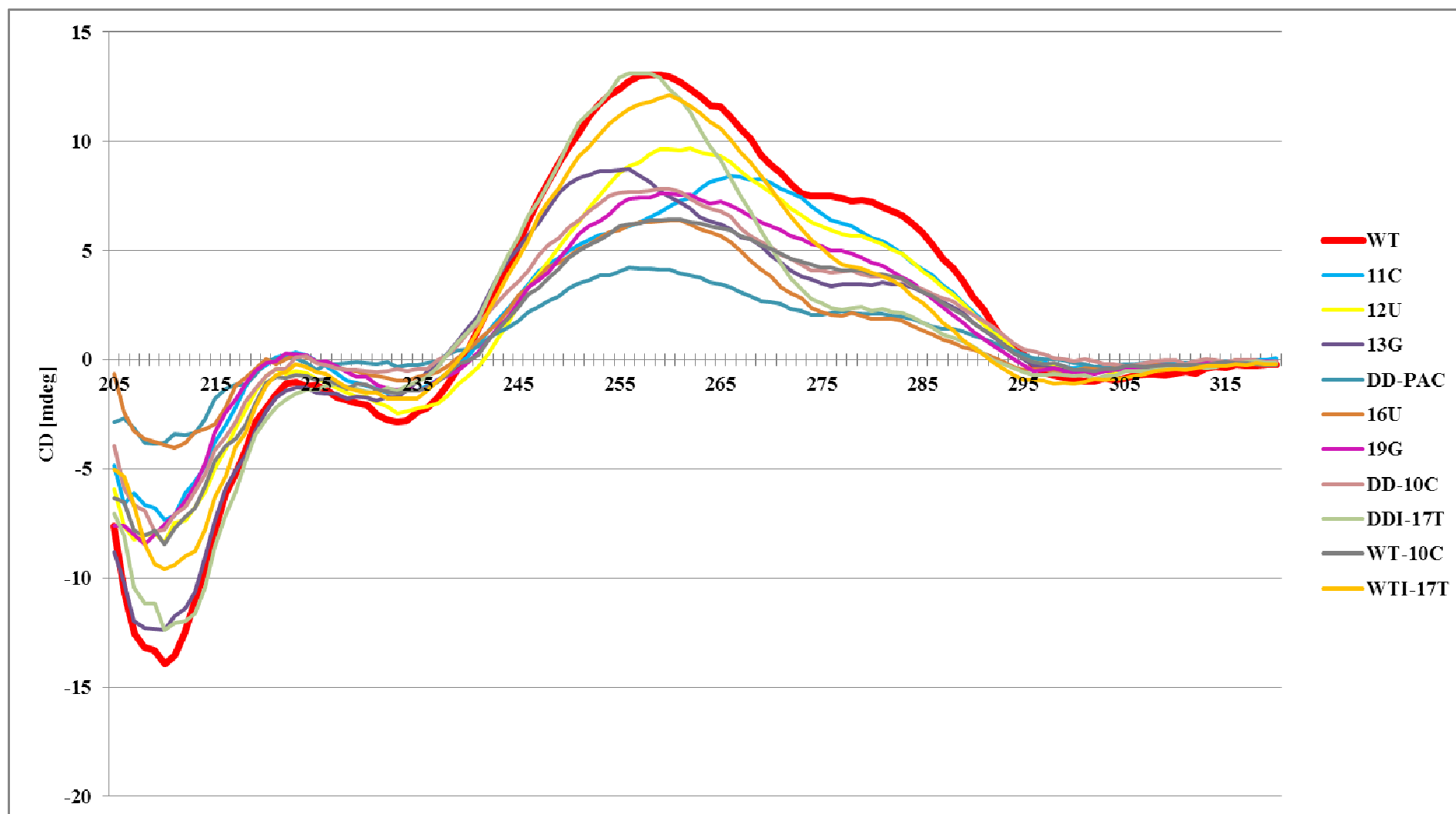
sposób jednoznaczny niewielkie różnice w obserwowanych widmach CD, ale widać, że wszystkie one tworzą podobną strukturę, a badane mutacje nie wpływają znacząco na zmianę geometrii helisy A-RNA jaką przyjmują trzony badanych spinek. Ponadto, widma CD dobrze korelują z wynikami topnień UV, które również wykazują obecność podobnych struktur, jakkolwiek ich trwałość termodynamiczna zmienia się w pewnym zakresie zależnie od rodzaju mutacji

1.3. Parametry termodynamiczne badanych spinek z ligandami niskocząsteczkowymi

Dane literaturowe pokazują, że do spinki regulującej splicing eksonu 10 genu MAPT mogą wiązać się ligandy niskocząsteczkowe (178, 179). Wykonano serię badań termodynamicznych wszystkich jedenastu modelowych spinek z wybranymi ligandami niskocząsteczkowymi, aby określić ich wpływ na stabilność kompleksów modelowych RNA. Wybrano trzy antybiotyki aminoglikozydowe: neomycynę, kanamycynę, tobramycynę oraz antybiotyk z grupy antracenodionów jakim jest mitoksantron (Rysunek 16) (178-180).



Rysunek 16. Antybiotyki użyte w badaniach stabilności modelowych spinek RNA.



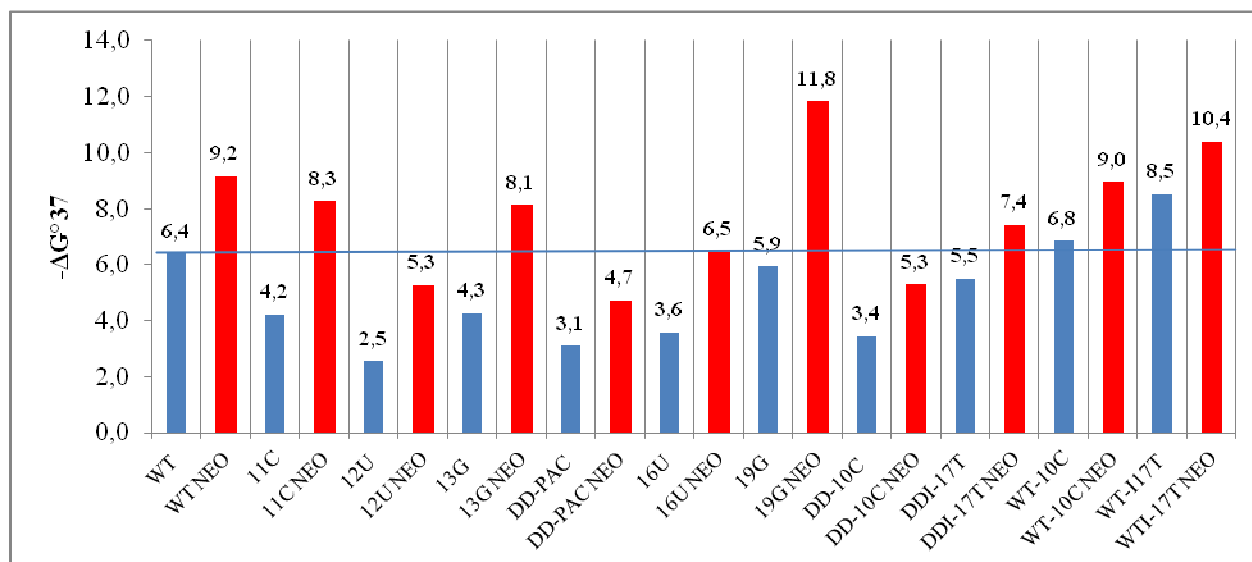
Rysunek 15. Widma dichroizmu kołowego jedenastu spinek RNA.

Wyniki przeprowadzonych badań jednoznacznie wskazują, że niskocząsteczkowe ligandy wpływają na stabilność termodynamiczną badanych spinek RNA. W przypadku trzech antybiotyków nastąpiła znaczna stabilizacja modelowych spinek. Zmiana stabilizacji termodynamicznej zależała od natury ligandu i rodzaju mutacji, jaką zawiera badana spinka. Eksperymenty topnień UV zostały tak zaprojektowane, aby do 90% spinki przyłączony był antybiotyk. W przypadku mitoksantronu stosunek molowy RNA-ligand wyniósł 1:1 ze względu na to, że wyższe stężenie antybiotyku powodowało błędy w monitorowaniu procesu topnienia przy 260 nm.

Poniżej został omówiony wpływ wszystkich badanych niskocząsteczkowych ligandów na trwałość termodynamiczną 11 modelowych spinek regulatorowych

1.3.1. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-neomycyna

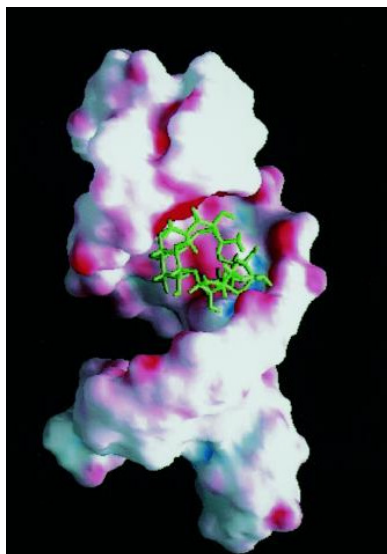
Wyniki topnień UV modelowych spinek z neomycyną pokazują, że antybiotyk ten wzmacnia stabilność termodynamiczną ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) w granicach 1,6-5,9 kcal/mol (Tabela 2, Rysunek 17). Uważa się, że stabilność regulatorowej spinki powinna być podobna do tej, jaka występuje u formy dzikiej, aby nie doszło do stanu patologicznego i choroby FTDP-17. Z danych literaturowych wynika, że przewaga izoformy 4R białka *tau*, ale także przewaga ilościowa izoformy 3R prowadzą do powstania nierozpuszczalnych agregatów białka *tau* (124). Wyniki topnień UV wszystkich jedenastu mutantów z neomycyną wskazują, że najlepsze wyniki udało się uzyskać dla cząsteczki 16U. Energia swobodna kompleksu tej spinki z neomycyną wyniosła -6,46 kcal/mol i jest to trwałość porównywalna ze stabilnością spinki typu dzikiego (WT). Różnica w stabilności termodynamicznej ($\Delta\Delta G^{\circ}_{37}$) pomiędzy kompleksem 16U/neomycyna, a WT wyniosła tylko 0,07 kcal/mol. W 7 z 11 przypadków neomycyna powodowała wzrost stabilności termodynamicznej na poziomie wyższym niż stabilność formy dzikiej (Tabela 2, Rysunek 17).



Rysunek 17. Zestawienie energii swobodnej spinek RNA i ich kompleksów z neomycyną.

Szczegółowe badania struktury spinki regulującej alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT formy dzikiej z neomycyną zostały przeprowadzone przez Varani'ego i współpracowników (179). Z badań tych wynika, że cząsteczka neomycyny wiąże się do motywu spinki w jej dużej bruździe, w pozycji apikalnej pętli (Rysunek 18). Badania grupy Varani'ego wykazały również, że terminalna para G-U najprawdopodobniej jest częścią pętli, a nie trzonu spinki RNA. Porównanie stabilności termodynamicznej mutantu DD-PAC ($\Delta G^{\circ}_{37} = -3,10$ kcal/mol) zawierającego terminalną parę G-U z cząsteczką DD-10C ($\Delta G^{\circ}_{37} = -3,44$ kcal/mol) z terminalną parą G-C wskazuje na istnienie słabych wiązań wodorowych terminalnych nukleotydów w spince ($\Delta \Delta G^{\circ}_{37} = 0,34$ kcal/mol). Porównanie cząsteczki WT ($\Delta G^{\circ}_{37} = -6,39$ kcal/mol) z mutantem WT-10C ($\Delta G^{\circ}_{37} = -6,84$ kcal/mol) pokazuje, że substytucja terminalnej pary G-U na G-C powoduje wzrost stabilności jedynie o 0,45 kcal/mol. Wyniki stabilności termodynamicznej kompleksów neomycyny z cząsteczką WT RNA oraz z mutantami są zbieżne z obserwacjami grupy Varani'ego (179). Wiązanie się neomycyny do WT powoduje wzrost stabilności termodynamicznej o 2,8 kcal/mol, w przypadku cząsteczki WT-10C (zawiera terminalną parę G-C zamiast G-U) wzrost stabilności wyniósł 2,1 kcal/mol. Mutanty DD-PAC, DD-10C, DD-177T, WT-10C, WT-177T i 16U są stabilizowane przez neomycynę w podobnym stopniu jak cząsteczka WT, to znaczy o 1,6-2,9 kcal/mol. Cząsteczki z mutacjami w trzonie spinki w rejonie zaangażowanym w oddziaływanie z neomycyną (11C, 12U, 13G) są stabilizowane przez neomycynę o 2,7-4,0 kcal/mol. Bardzo ciekawym przypadkiem jest cząsteczka 19G, gdzie zmiana nukleotydu występuje w pozycji 3' terminalnej. W tym przypadku wzrost stabilizacji termodynamicznej pod wpływem neomycyny wyniósł 5,9 kcal/mol, co jest prawdopodobnie

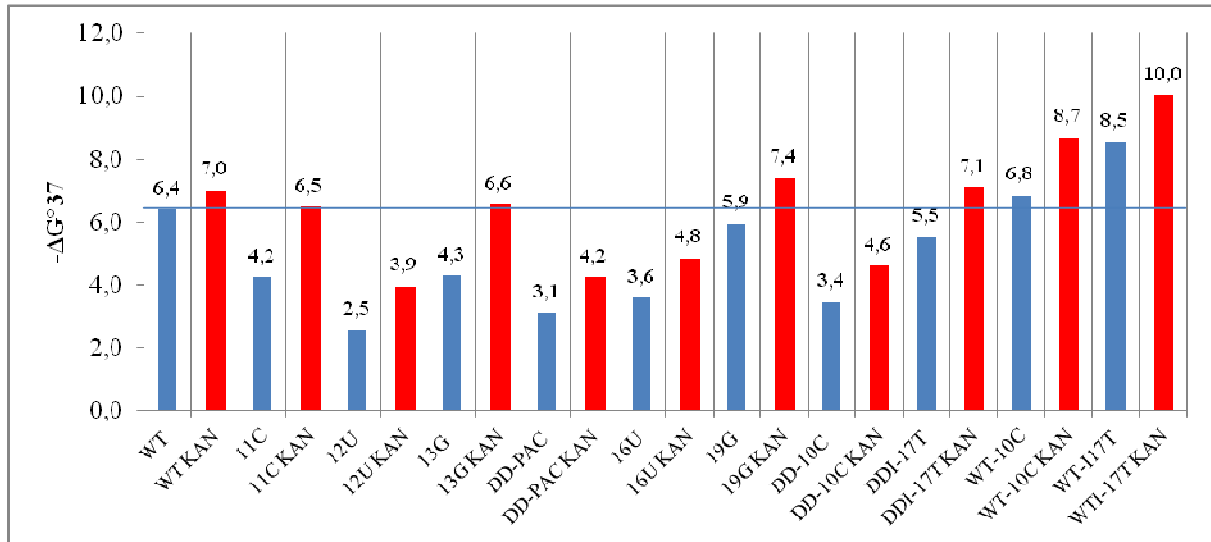
sumą wpływu dwóch cząsteczek neomycyny wiążących się do tej spinki. Pierwsza neomycyna wiąże się w pozycji apikalnej (stabilizacja o 2,8 kcal/mol), a druga prawdopodobnie w rejonie terminalnym (stabilizacja o 3,1 kcal/mol).



Rysunek 18. Struktura trzeciorzędowa regulatorowej spinki eksonu 10 białka *tau* w kompleksie z neomycyną (179).

1.3.2. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-kanamycyna

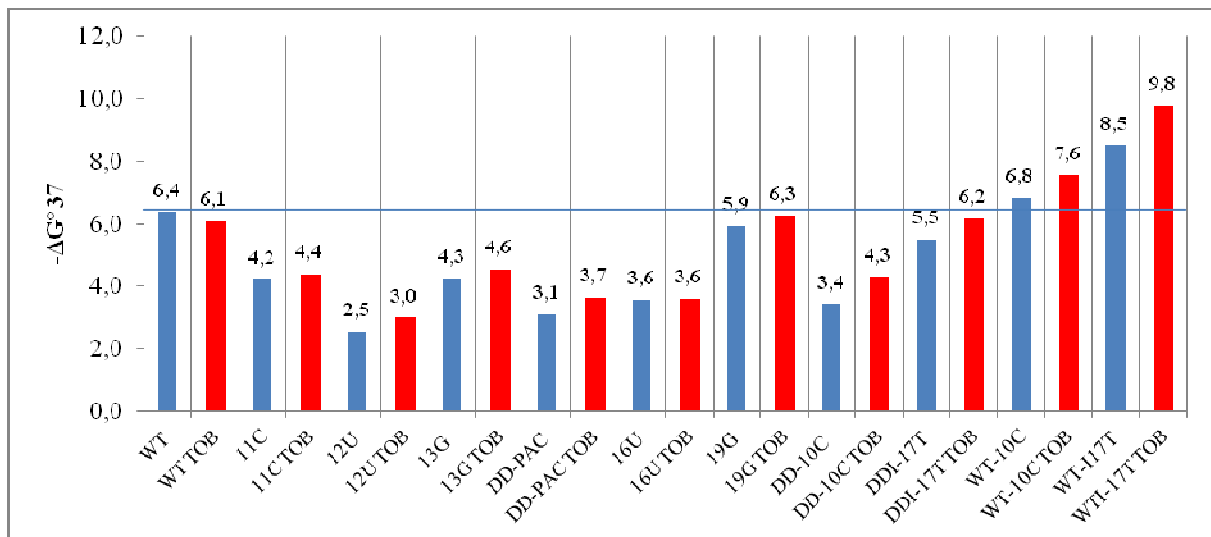
Drugim badanym antybiotykiem była kanamycyna. Także w tym przypadku stabilność termodynamiczna badanych spinek wzrosła w zakresie 0,6-2,3 kcal/mol (Tabela 2, Rysunek 19). Dane uzyskane z topnień UV wykazały, że kanamycyna może powodować wzrost stabilności termodynamicznej badanych mutantów do poziomu porównywalnego ze stabilnością spinki formy dzikiej. Energia swobodna kompleksu 11C/kanamycyna wyniosła -6,46 kcal/mol i różniła się tylko o 0,07 kcal/mol od formy dzikiej. Podobna sytuacja ma miejsce dla kompleksu 13G/kanamycyna. Energia swobodna tego kompleksu wyniosła -6,55 kcal/mol i była różna, w porównaniu z energią swobodną formy dzikiej, o 0,16 kcal/mol.



Rysunek 19. Zestawienie energii swobodnej spinek RNA i ich kompleksów z kanamycyną.

1.3.3. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-tobramycyna

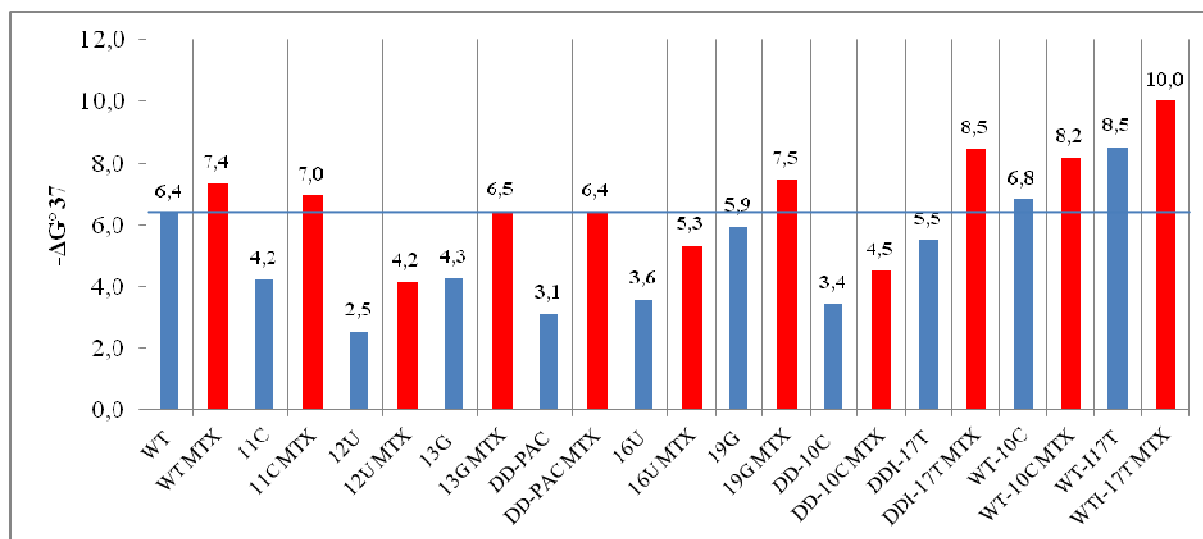
Tobramycyna okazała się antybiotykiem, który w najmniejszym stopniu wpływał na stabilność modelowych spinek RNA. Oprócz cząsteczki WT, tobramycyna powodowała wzrost stabilności termodynamicznej, jednak efekt był raczej mały, w zakresie 0-1,3 kcal/mol (Tabela 2, Rysunek 20). Kompleks tobramycyny z cząsteczkami 19G i DDI-17T wzmacniał stabilność termodynamiczną badanych spinek do poziomu porównywalnego do stabilności formy dzikiej. Z drugiej strony mutacje w tych dwóch cząsteczkach nie powodowały dużej różnicy w stabilności pomiędzy nimi i formą WT (19G $\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0,46$, DDI-17T $\Delta\Delta G^{\circ}_{37} = 0,88$ kcal/mol).



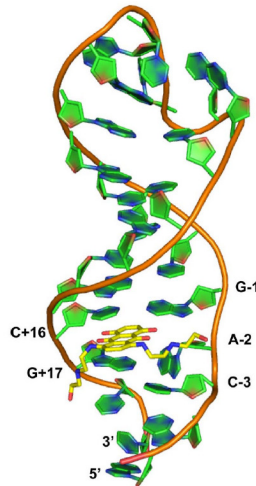
Rysunek 20. Zestawienie energii swobodnej spinek RNA i ich kompleksów z tobramycyną.

1.3.4. Parametry termodynamiczne kompleksu RNA-mitoksantron

Ostatnim ligandem niskocząsteczkowym używanym w eksperymentach UV był mitoksantron, oryginalnie używany w chemioterapii w leczeniu różnych typów nowotworów. Udowodniono, że cząsteczka ta może oddziaływać z motywem regulatorowej spinki eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT (178). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że mitoksantron wzmacnia stabilność wszystkich jedenastu spinek RNA w zakresie 1,0-3,3 kcal/mol (Tabela 2, Rysunek 21). Termodynamiczna stabilność kompleksów mitoksantronu z mutantami 13G oraz DD-PAC jest porównywalna ze stabilnością spinki formy dzikiej. Zheng i współpracownicy określili za pomocą spektroskopii NMR strukturę kompleksu WT/mitoksantron (178) (Rysunek 22). Zaobserwowali oni, że cząsteczka mitoksantronu interkaluje do trzonu spinki RNA w rejonie wybrzuszonej adenozy. Kompleks WT/mitoksantron jest o 1,0 kcal/mol bardziej stabilny niż sama cząsteczka formy dzikiej. Dla większości mutantów oddziaływanie z mitoksantronem powoduje wzrost stabilności termodynamicznej w zakresie 0,7-1,8 kcal/mol. Z niewyjaśnionych powodów, w przypadku cząsteczek DD-PAC, 11C i 13G wzrost stabilności wyniósł odpowiednio 3,3 kcal/mol, 2,7 kcal/mol oraz 2,2 kcal/mol. Sugeruje to, że w przypadku powyższych mutacji w spince RNA, mitoksantron może wiązać się w sposób odmienny lub więcej niż jedna cząsteczka mitoksantronu może wiązać się do tych spinek.



Rysunek 21. Zestawienie energii swobodnej spinek RNA i ich kompleksów z mitoksantronem.



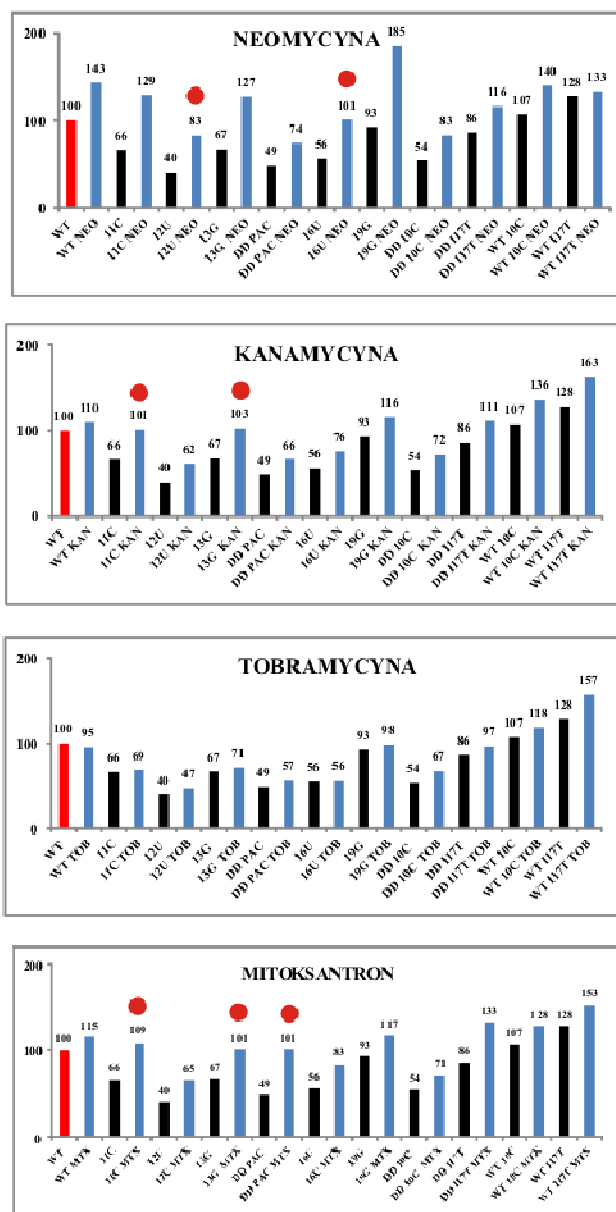
Rysunek 22. Struktura trzeciorzędowa regulatorowej spinki eksonu 10 białka *tau* w kompleksie z mitoksantronem (178).

Podsumowując, analiza stabilności termodynamicznej ligandów niskocząsteczkowych z modelowymi RNA wykazała, że: 1) kompleksy spinek wraz z antybiotykami są bardziej stabilne niż same cząsteczki RNA, 2) efekty termodynamiczne są zależne od natury ligandu i wzmacniają stabilność w szeregu: neomycyna > mitoksantron > kanamycyna > tobramycyna, 3) wzrost stabilności termodynamicznej jest zależny od rodzaju mutacji w cząsteczce RNA, 4) każdy badany ligand niskocząsteczkowy w sposób indywidualny wpływa na stabilność termodynamiczną zmutowanych fragmentów pre-mRNA genu MAPT.

Wyniki topnień UV pokazują, że ligandy niskocząsteczkowe oddziałują z modelowymi spinkami RNA, powodując w prawie wszystkich przypadkach wzrost ich trwałości. Jednak stabilność kompleksu RNA/antybiotyk powinna być jak najbardziej zbliżona do stabilności formy dzikiej, aby wywołać oczekiwany wpływ na stabilność termodynamiczną zmutowanej spinki RNA. W takim przypadku można spodziewać się, że spinka będzie spełniać prawidłowo swoje funkcje w alternatywnym składaniu eksonu 10 genu MAPT prowadząc do powstania równych ilości izoform 3R i 4R białka *tau*. Wyniki stabilności termodynamicznej wszystkich cząsteczek, z badanymi antybiotykami zostały porównane do formy dzikiej, dla której wartość energii swobodnej została przyjęta jako 100% (Rysunek 23).

Najbardziej interesujące wydają się być wyniki dla cząsteczek z mutacjami naturalnie występującymi w chorobie FTDP-17 i powodującymi destabilizację badanej spinki, takie jak: 11C, 12U, 13G, DD-PAC oraz 16U (124, 140, 142). W przypadku neomycyny najlepszy efekt stabilizacyjny został uzyskany dla cząsteczki 16U. Warto również wspomnieć, że neomycyna spowodowała największą stabilizację mutantu 12U (dla tego mutantu obserwowana jest

największa jej destabilizacja w stosunku do formy dzikiej). Kanamycyna pozwoliła na uzyskanie stabilności zmutowanej spinki na poziomie porównywalnym do trwałości formy dzikiej dla dwóch cząsteczek 11C i 13G. W przypadku tobramycyny, żadna spinka RNA z mutacją destabilizującą, związaną z FTDP-17 nie spowodowała zwiększenia stabilności do poziomu porównywalnego z formą dziką spinki RNA. Za to mitoksantron okazał się wyjątkowo dobrym stabilizatorem, którego kompleksy z 11C, 13G oraz DD-PAC posiadają zbliżoną stabilność termodynamiczną do cząsteczki WT.



Rysunek 23. Porównanie wyników topnień UV różnych mutantów spinki RNA do energii swobodnej cząsteczki WT RNA (ΔG_{37}° WT = 100%). Czerwone kropki oznaczają najlepsze wartości stabilizacji, tzn. zbliżające trwałość kompleksu spinka RNA/ligand niskocząsteczkowy do stabilności formy dzikiej.

1.4. Porównanie stałych dysocjacji modelowych spinek RNA i ich kompleksów z badanymi ligandami

Z zależności stałej dysocjacji oraz energii swobodnej wyrażonej wzorem $K=e^{-(\Delta G^\circ/RT)}$ wyliczono dla cząsteczki formy dzikiej i wszystkich badanych mutantów ich stałe wiązania się z neomycyną, kanamycyną, tobramycyną oraz mitoksantronem (Tabela 3). Najbardziej znaczący jest wzrost stałej dysocjacji, w porównaniu do formy dzikiej, w następujących kompleksach spinka RNA/ligand: WT/neomycyna, 11C/neomycyna, 13G/neomycyna, 19G/neomycyna, WT-10C/neomycyna, WT-10C/kanamycyna, WT-10C/mitoksantron, WTI-17T/wszystkie antybiotyki oraz DDI-17T/mitoksantron. Porównując stałe dysocjacji możemy wskazać także kompleksy RNA/ligand, których wartości są zbliżone do formy dzikiej i są to: 11C/kanamycyna, 13G/kanamycyna, 13G/mitoksantron, DD-PAC/mitoksantron, 16U/neomycyna, 19G/tobramycyna oraz DDI-17T/tobramycyna.

Zestawienie wpływu poszczególnych antybiotyków na trwałość termodynamiczną wszystkich modelowych spinek RNA zostało pokazane w tabeli 2. W przypadku cząsteczki WT, w kompleksie z neomycyną stała dysocjacji wzrosła aż o 90 razy. Także w przypadku mutantów 11C, 12U, 13G, 16U, 19G, WT-10C, WTI-17T oraz DD-10C neomycyna okazała się najlepszym stabilizatorem spinek RNA, powodując wzrost stałej dysocjacji odpowiednio 694, 85, 527, 109, 14449, 31, 21 oraz 20 razy. W dwóch przypadkach mitoksantron okazał się być najlepszym stabilizatorem. Zmiana stałej dysocjacji w cząsteczce DD-PAC pod wpływem oddziaływań z mitoksantronem wyniosła 226 razy, a dla cząsteczki DDI-17T 122 razy.

Tabela 3. Stałe dysocjacji dla wszystkich modelowych spinek RNA oraz ich kompleksów z antybiotykami. Porównanie wszystkich wartości stałej dysocjacji do wartości Kd formy typu dzikiego.

Spinka RNA	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	Kd $\times 10^{-5}$	Kd/Kd- WT	Kd /Kd spinki RNA
WT	6,39	0,32	1,00	1,00
+ neomycyna	9,16	28,73	89,74	89,74
+ kanamycyna	7,00	0,86	2,69	2,69
+ tobramycyna	6,10	0,20	0,62	0,62
+ mitoksantron	7,35	1,52	4,75	4,75
11C	4,23	0,01	0,03	1,00
+ neomycyna	8,26	6,66	20,82	694,04
+ kanamycyna	6,46	0,36	1,12	37,35
+ tobramycyna	4,41	0,01	0,04	1,34
+ mitoksantron	6,96	0,81	2,52	84,10
12U	2,54	0,01	0,01	1,00
+ neomycyna	5,28	0,05	0,16	85,48
+ kanamycyna	3,94	0,01	0,02	9,71
+ tobramycyna	3,00	0,01	0,00	2,11
+ mitoksantron	4,16	0,01	0,03	13,87
13G	4,27	0,01	0,03	1,00
+ neomycyna	8,13	5,40	16,86	526,65
+ kanamycyna	6,55	0,41	1,30	40,51
+ tobramycyna	4,56	0,02	0,05	1,60
+ mitoksantron	6,45	0,35	1,10	34,44

Spinka RNA	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	Kd $\times 10^{-5}$	Kd/Kd- WT	Kd /Kd spinki RNA
DD-PAC	3,10	0,01	0,01	1,00
+ neomycyna	4,73	0,02	0,07	14,10
+ kanamycyna	4,24	0,01	0,03	6,36
+ tobramycyna	3,65	0,01	0,01	2,44
+ mitoksantron	6,44	0,35	1,08	226,41
16U	3,57	0,01	0,01	1,00
+ neomycyna	6,46	0,36	1,12	109,05
+ kanamycyna	4,84	0,03	0,08	7,86
+ tobramycyna	3,61	0,01	0,01	1,07
+ mitoksantron	5,33	0,06	0,18	17,41
19G	5,93	0,15	0,47	1,00
+ neomycyna	11,83	2191,97	6847,23	14449,12
+ kanamycyna	7,39	1,62	5,07	10,70
+ tobramycyna	6,28	0,27	0,84	1,77
+ mitoksantron	7,48	1,88	5,87	12,38
WT-10C	6,84	0,66	2,08	1,00
+ neomycyna	8,95	20,43	63,82	30,74
+ kanamycyna	8,67	12,97	40,51	19,51
+ tobramycyna	7,57	2,17	6,79	3,27
+ mitoksantron	8,18	5,85	18,28	8,81

Spinka RNA	$-\Delta G^{\circ}_{37}$ (kcal/mol)	Kd $\times 10^{-5}$	Kd/Kd- WT	Kd /Kd spinki RNA
WT-117T	8,52	10,16	31,75	1,00
+ neomycyna	10,40	215,08	671,86	21,16
+ kanamycyna	10,03	117,96	368,48	11,60
+ tobramycyna	9,79	79,89	249,57	7,86
+ mitoksantron	10,03	117,96	368,48	11,60
DD-10C	3,44	0,00	0,01	1,00
+ neomycyna	5,29	0,05	0,17	20,15
+ kanamycyna	4,58	0,02	0,05	6,36
+ tobramycyna	4,30	0,01	0,03	4,04
+ mitoksantron	4,51	0,02	0,05	5,68
DD-117T	5,51	0,08	0,24	1,00
+ neomycyna	7,43	1,73	5,41	22,58
+ kanamycyna	7,09	1,00	3,12	13,00
+ tobramycyna	6,17	0,22	0,70	2,92
+ mitoksantron	8,47	9,37	29,28	122,17

2. Analiza struktury fragmentu pre-mRNA genu MAPT

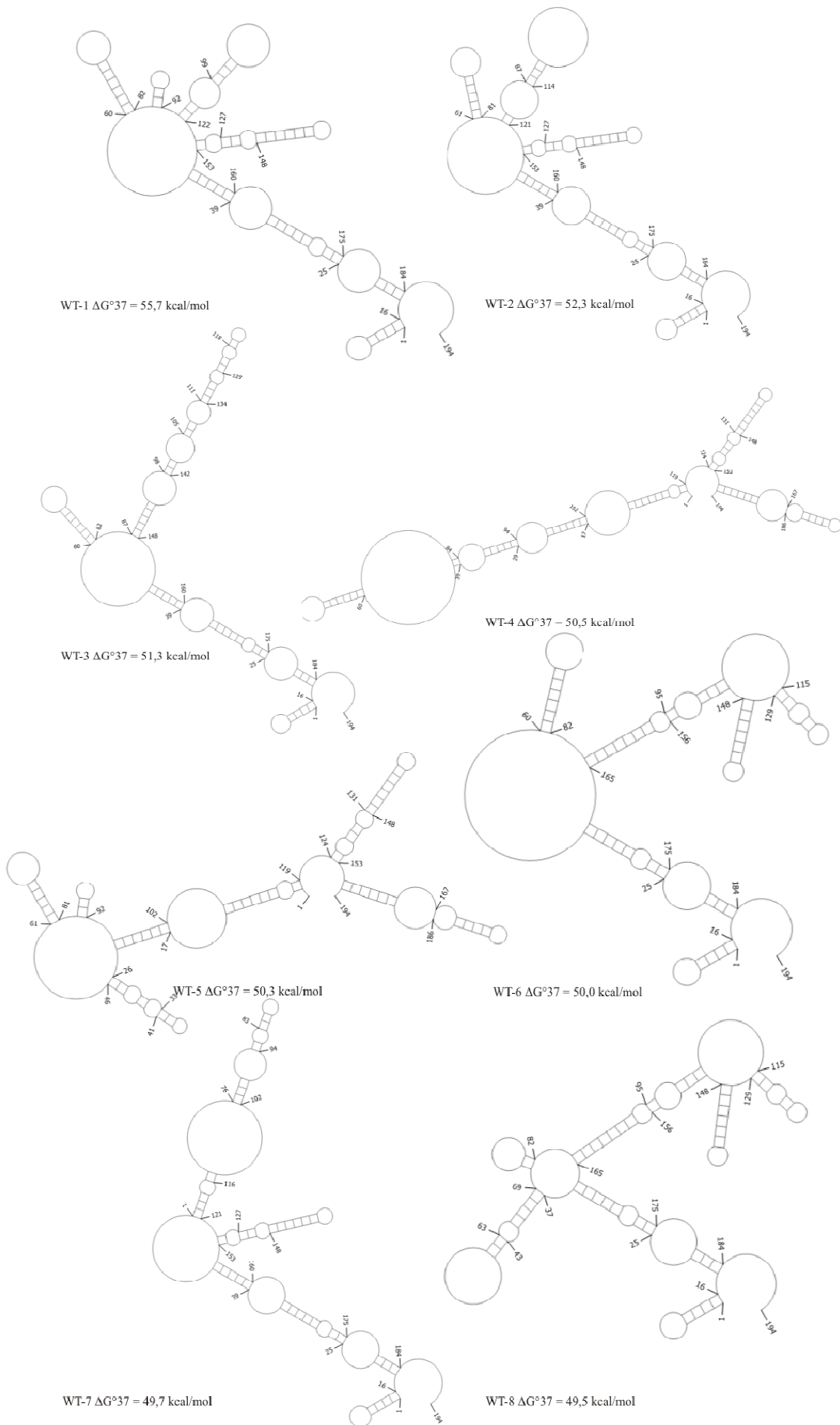
Jednym z głównych celów pracy doktorskiej było określenie struktury drugorzędowej fragmentu pre-mRNA genu MAPT. W badaniach wykorzystano rejon pre-mRNA zawierający spinę do włosów, która jest głównym regulatorem alternatywnego splicingu eksonu 10 białka *tau*. Badania strukturalne przeprowadzono na fragmentach 194- lub 195-nukleotydowych (długość zależała od rodzaju mutacji w badanym RNA) i zawierających wszystkie mutacje w rejonie modelowej spinki, które wykorzystano w badaniach trwałości termodynamicznej. Z uwagi na kotranskrypcyjny charakter splicingu wydaje się, że wybrany fragment jest wystarczający do badania struktury pre-mRNA. Poza tym, zawiera wszystkie elementy regulujące alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT. Wybrany fragment pre-mRNA zawierał 194 nukleotydy dla formy dzikiej oraz wariantów posiadających mutacje 11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, 19G, DD-10C, WT-10 oraz 195 nukleotydy w przypadku cząsteczek DDI-17 i WTI-17T. Modelowy pre-mRNA genu MAPT wybrany do badań strukturalnych zawierał 39 nukleotydów fragmentu intronu 9-10, cały 93 nukleotydowy fragment eksonu 10 oraz 63/64 nukleotydowy fragment intronu 10-11.

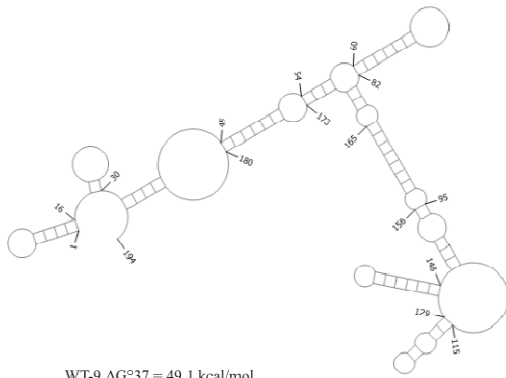
2.1. Analiza struktur fragmentu pre-mRNA genu MAPT przy pomocy programu komputerowego służącego do przewidywania struktury drugorzędowej RNA

Przed przystąpieniem do badań strukturalnych wykonano modelowanie struktury drugorzędowej za pomocą programu *RNAstructure 5.6*. Program ten przewiduje struktury drugorzędowe RNA na podstawie parametrów termodynamicznych modelu najbliższego sąsiedztwa (181). Uzyskano 26 różnych struktur drugorzędowych przy założeniu, że różnica w energii swobodnej wynosi do 20%, a parametr mówiący o możliwym przesunięciu nukleotydów w cząsteczce wynosi 5 (window size = 5) (Rysunek 24). Energia swobodna uzyskanych struktur wahała się od -55,7 do -44,6 kcal/mol. Program *RNAstructure* pozwala także na określenie prawdopodobieństwa wystąpienia określonych par zasad w wygenerowanych strukturach. Najbardziej interesującym fragmentem jest oczywiście rejon występowania regulatorowej spinki, co w przypadku modelowej cząsteczki RNA obejmuje fragment około od 127 do 151 nukleotydu. Analiza 26 wygenerowanych struktur drugorzędowych pozwoliła ustalić, że regulatorowa spinka przybiera w nich 3 warianty strukturalne. Pierwsza struktura to pełna spinka, w której prawdopodobieństwo wystąpienia zdefiniowanych par nukleotydów w dolnej części spinki wynosi 60-70%, a w jej górnym fragmencie 90-100% (rysunek 25 A). Oddziaływanie terminalnej pary G-U określono w

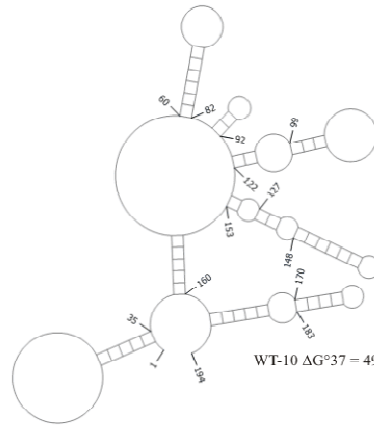
spince regulatorowej na 50-60%. Taka sytuacja występuje w strukturach oznaczonych jako: WT-1, WT-2, WT-4, WT-5, WT-7, WT-10, WT-16, WT-17, WT-19. Drugi wariant tego fragmentu to występowanie krótkiej spinki, w której prawdopodobieństwo parowania się zdefiniowanych par zasad wynosi 90-100% (rysunek 25 B). Taka sytuacja miała miejsce w strukturach: WT-6, WT-8, WT-9, WT-11, WT-13, WT-15, WT-20, WT-22, WT-23, WT-24, WT-25, WT-26. W przypadku pozostałych struktur wygenerowanych przez *RNAstructure* (WT-3, WT-12, WT-14, WT-18, WT-21) interesujący fragment nie tworzył motywu spinki do włosów, ale prawdopodobieństwo wystąpienia takich par zasad wynosiło poniżej 50% (rysunek 25 C).

Analiza strukturalna wybranego fragmentu w programie *RNAstructure* dodatkowo przekonuje, że fragment 194/195 nukleotydowy pre-mRNA genu MAPT jest optymalny do zaplanowanych badań strukturalnych i funkcjonalnych. Z wcześniejszych badań wiadomo, że główny element regulujący alternatywny splicing eksonu 10 białka *tau* przybiera strukturę spinki do włosów (139). Z badań *in silico* wynika, że rejon regulatorowy w wybranym fragmencie z prawdopodobieństwem 95-100% przybiera motyw spinki do włosów.

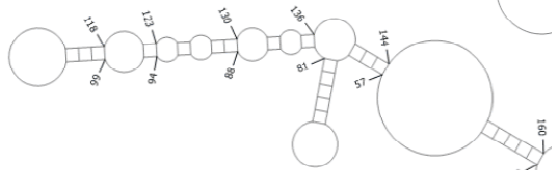




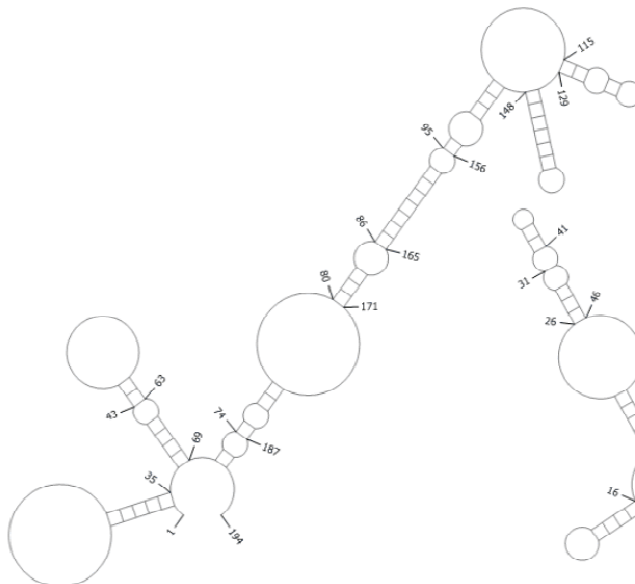
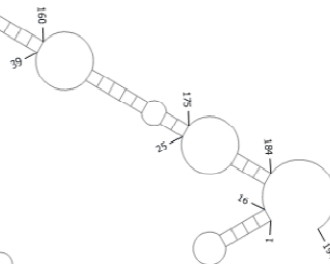
WT-9 $\Delta G^{37} = 49,1$ kcal/mol



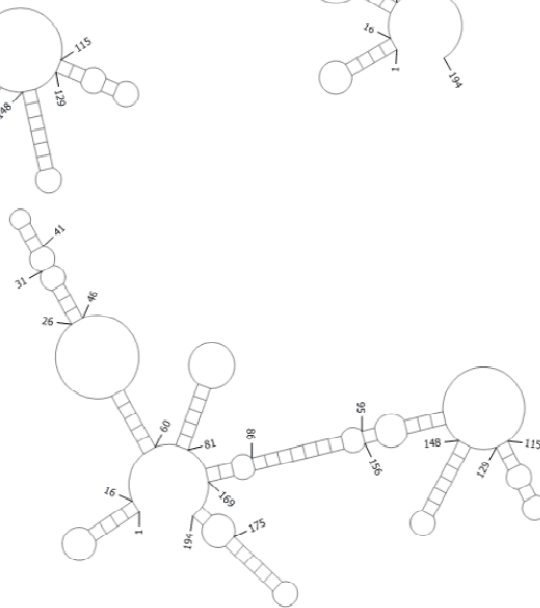
WT-10 $\Delta G^{37} = 49,0$ kcal/mol



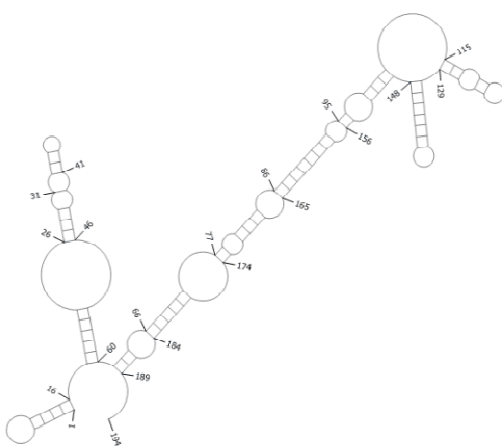
WT-12 $\Delta G^{37} = 48,0$ kcal/mol



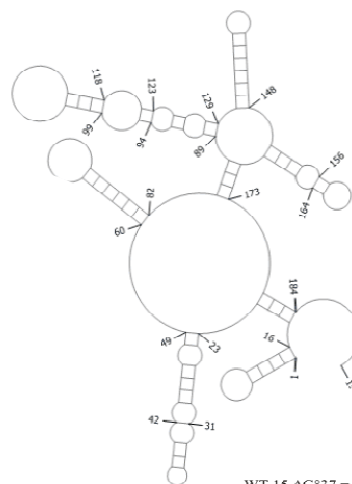
WT-11 $\Delta G^{37} = 48,1$ kcal/mol



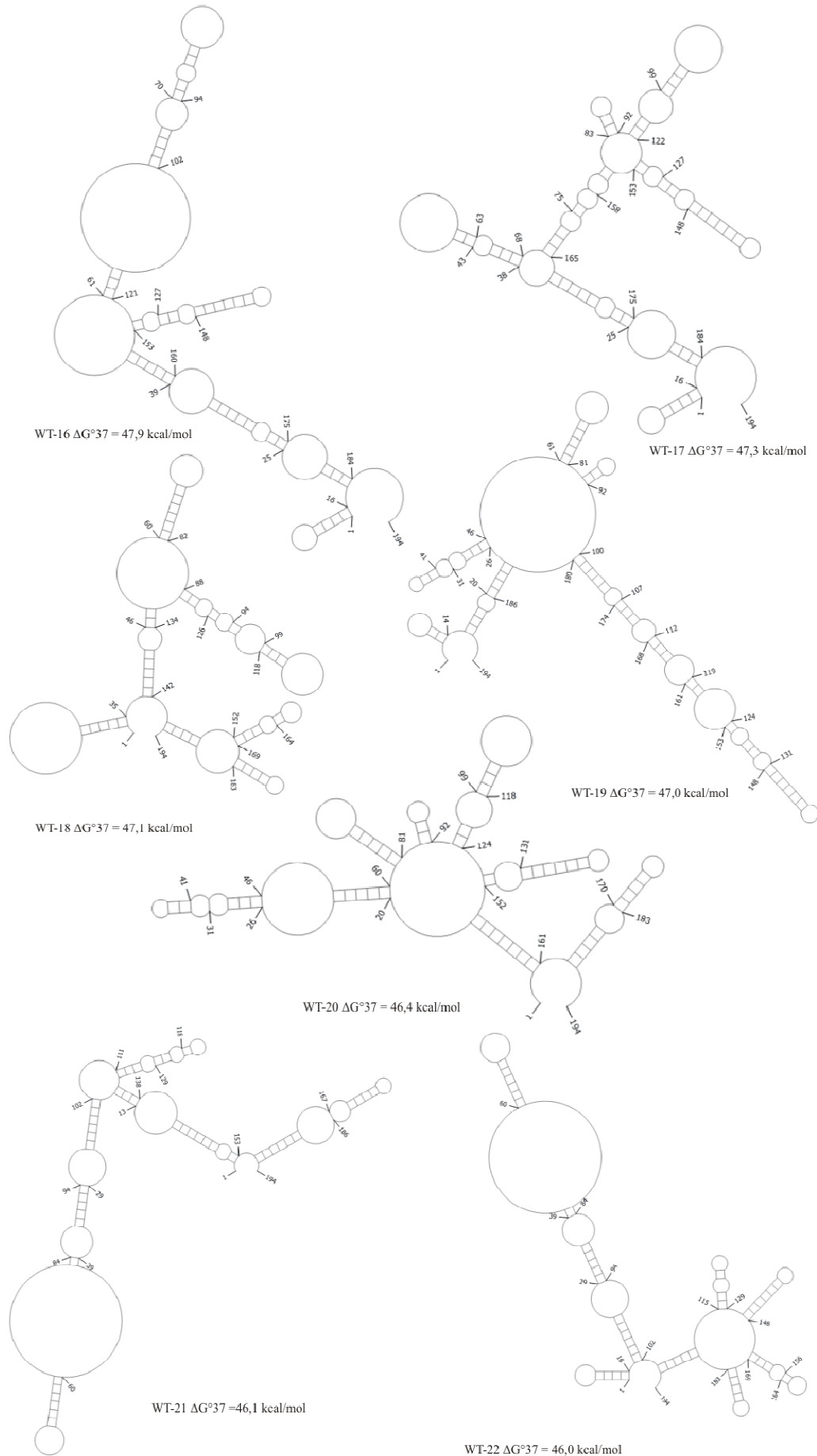
WT-13 $\Delta G^{37} = 47,9$ kcal/mol

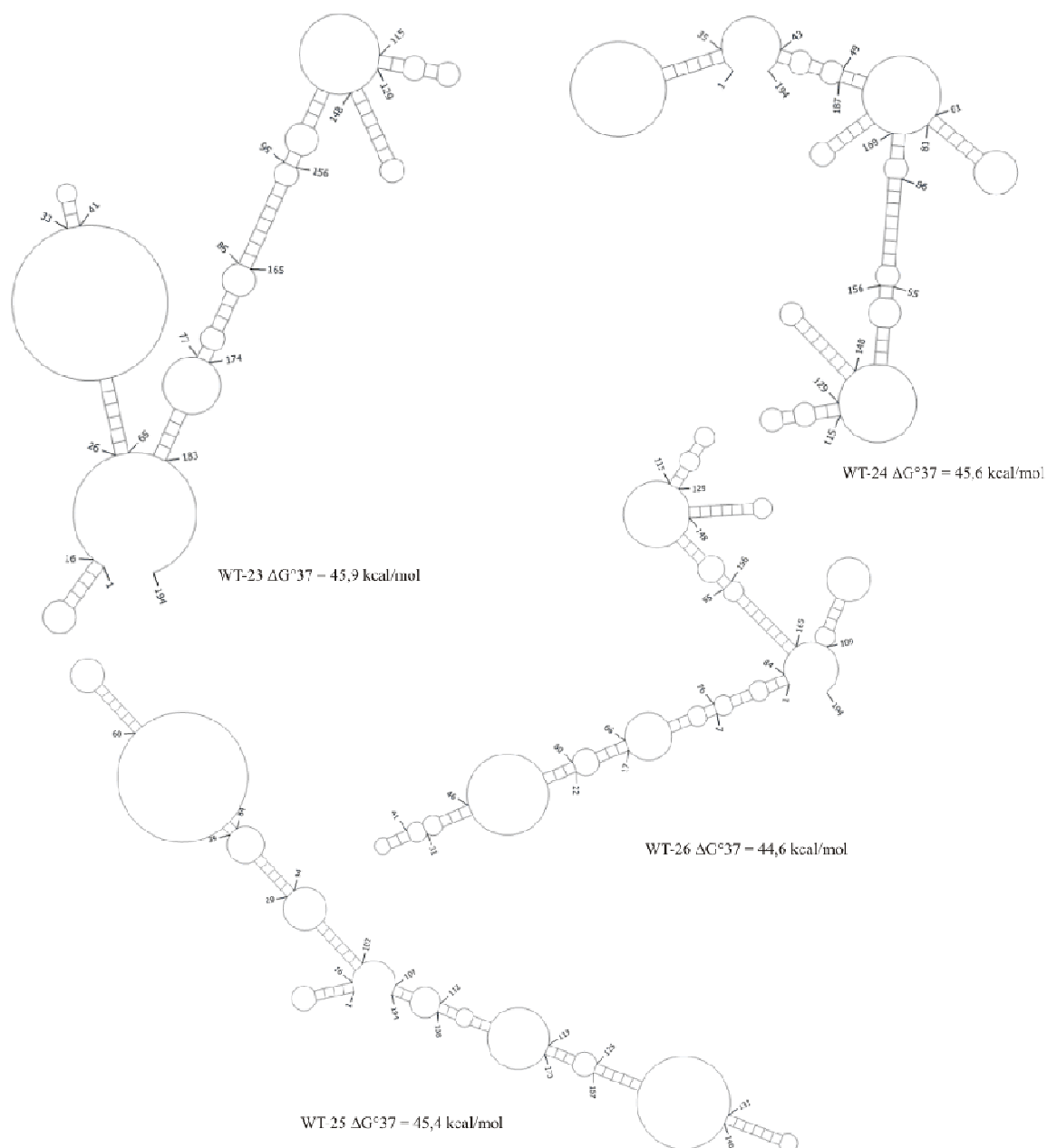


WT-14 $\Delta G^{37} = 47,9$ kcal/mol

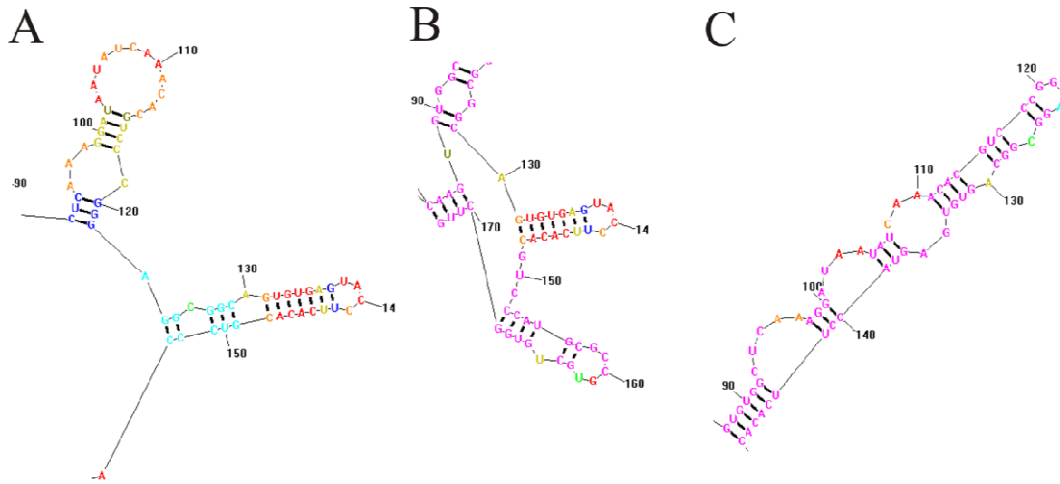


WT-15 $\Delta G^{37} = 47,9$ kcal/mol





Rysunek 24. Wygenerowane przez program *RNAstructure* 26 struktur drugorzędowych 194-nukleotyduowego fragmentu pre-mRNA genu *MAPT* występującego w przypadku formy typu dzikiego.



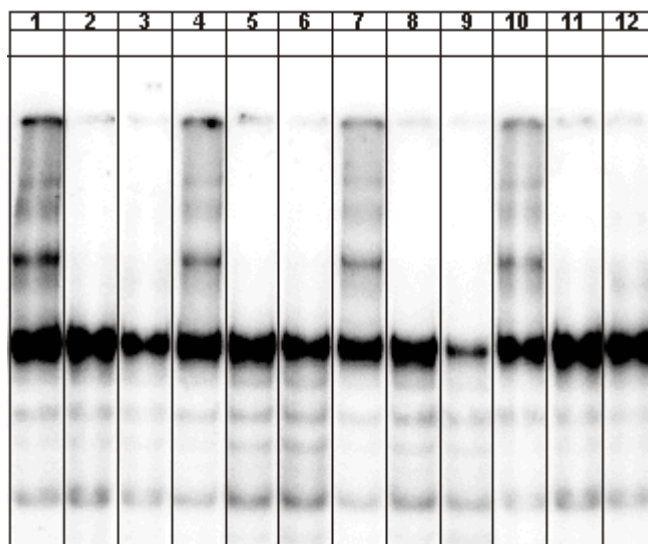
Rysunek 25. Przewidziane struktury drugorzędowe fragmentu regulującego alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT, wśród 26 struktur wymodelowanych przez program *RNAstructure*. Kolory oznaczają następujące prawdopodobieństwo tworzenia się par nukleotydowych: czerwony >99%, pomarańczowy 95-99%, żółtozielony 90-95%, oliwkowy 80-90%, zielony 70-80%, niebieski 60-70%, granatowy 50-60%, różowy <50%.

2.2. Otrzymywanie cząsteczek RNA używanych do badań strukturalnych

Wszystkie 11 cząsteczek RNA o długości 194/195 nukleotydów otrzymano w reakcji transkrypcji *in vitro*. Matryce DNA uzyskano w szeregu reakcji PCR. Niestety, uzyskane w ten sposób matryce nie wykazywały homogenności. Selekcja cząsteczek o odpowiedniej sekwencji wymagała wklonowania fragmentów do plazmidu pUC19 i wybraniu odpowiednich klonów. Uzyskane matryce posiadały dodatkowo na końcu 5' promotor dla polimerazy T7 RNA. Amplifikacja matryc DNA odbywała się w oparciu o standardową reakcję PCR z użyciem dwóch starterów. W wyniku problemów z radioaktywnym znakowaniem cząsteczek RNA na obu końcach zdecydowano się na znakowanie cząsteczek RNA w czasie transkrypcji z użyciem [$\alpha^{32}\text{P}$]ATP. Uzyskane RNA oczyszczano metodą elektroforezy w warunkach denaturujących.

Przebadano warunki denaturacji i renaturacji badanych cząsteczek RNA w różnych buforach, aby określić ich homogenność strukturalną. Profile migracji badanych cząsteczek RNA w niedenaturujących żelach poliakrylamidowych w 4°C pokazane są na rysunku 26.

Analiza fałdowania się modelowego dla formy dzikiej pre-mRNA w różnych warunkach denaturacji i renaturacji pokazała, że cząsteczka posiada jedną, główną strukturę. Jakkolwiek dla uzyskania w pełni homogennej strukturalnie RNA wymagana jest denaturacja i renaturacja cząsteczki przed każdym prowadzonym eksperymentem.



Rysunek 26. Rozdział w warunkach natywnych na żelu poliakrylamidowym modelowej cząsteczki WT pre-mRNA w różnych buforach i warunkach fałdowania: (1) 1 M NaCl, 4 mM MgCl₂, bez denaturacji, (2) 1 M NaCl, 4 mM MgCl₂, denaturacja 3 min. w 95°C, chłodzenie na lodzie, (3) 1 M NaCl, 4 mM MgCl₂, denaturacja 3 min. w 95°C powolne schładzanie w temperaturze pokojowej, (4) 200 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, bez denaturacji, (5) 200 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, denaturacja 3 min. w 95°C, chłodzenie na lodzie, (6) 200 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, denaturacja 3 min. w 95°C, powolne schładzanie w temperaturze pokojowej, (7) 100 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, bez denaturacji, (8) 100 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, denaturacja 3 min. w 95°C, chłodzenie na lodzie, (9) 100 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, denaturacja 3 min. w 95°C powolne schładzanie w temperaturze pokojowej, (10) 100 mM NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA, bez denaturacji, (11) 100 mM NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA, denaturacja 3 min. w 95°C, chłodzenie na lodzie, (12) 100 mM NaCl, 0,5 mM Na₂EDTA, denaturacja 3 min. w 95°C, powolne schładzanie w temperaturze pokojowej.

2.3. Wykorzystanie izoenergetycznych macierzy RNA do badania struktury drugorzędowej fragmentów pre-mRNA genu MAPT

Wykorzystanie izoenergetycznych mikromacierzy RNA, jako metody badania struktury drugorzędowej RNA oraz oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA zostało opracowane w naszym laboratorium. Idea tej metody polega na oddziaływaniu krótkich 5-7 nukleotydowych sond hybrydacyjnych z jednoniciowymi fragmentami badanej cząsteczki RNA z utworzeniem dupleksu hybrydacyjnego. Jednak, aby możliwa była jego detekcja na macierzy, energia swobodna dupleksów hybrydacyjnych musi być korzystniejsza niż -6 kcal/mol. Do stworzenia sond oligonukleotydowych o wartości energii swobodnej dupleksów hybrydacyjnych niezależnej od sekwencji (sond izoenergetycznych) użyto modyfikowanych oligonukleotydów. Podstawą każdej sondy były 2'-O-metylowane nukleotydy. Do dodatkowej stabilizacji zostały wykorzystane nukleotydy LNA (*ang. locked nucleic acid*), 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozyd oraz LNA-2,6-diaminopurynorybozyd. Dzięki zastosowaniu modyfikowanych nukleotydów wymagana energia swobodna została uzyskana dla dupleksów hybrydacyjnych o długości

5- czy 6- nukleotydów. Niektóre sondy zawierają na końcu 3' dodatkową guanozynę w serii LNA, aby wzmocnić trwałość termodynamiczną dupleksów hybrydizacyjnych. W bibliotece znajduje się 855 sond oligonukleotydowych, co stanowiło 83,4% wszystkich możliwych pentamerów (182).

Izoenergetyczne macierze RNA zostały z powodzeniem użyte do badania struktury wielu cząsteczek RNA. Wykonano mapowanie macierzowe dla cząsteczki o regulatorowej funkcji R2Bm 5'RNA (R2 *Bombyx mori* 5'RNA). Wyniki tych eksperymentów były zgodne z wynikami z mapowań chemicznych i pozwoliły na zaproponowanie struktury drugorzędowej tego RNA. Ponadto zaproponowano struktury kolejnych cząsteczek R2 5'RNA dla organizmów blisko spokrewnionych z *Bombyx mori* (183, 184). Macierze izoenergetyczne zostały również użyte do badań nad cząsteczkami tRNA^{Phe} z *Sacharomyces cerevisiae*. Mapowanie izoenergetyczne pozwoliło na dostrzeżenie różnic w fałdowaniu się cząsteczek tRNA z modyfikowanymi nukleotydami. Ponadto, badano strukturę tRNA^{Met} inicjatorowego i elongacyjnego i obserwowano różnice w ich wiązaniu się z mikromacierzami izoenergetycznymi (185, 186). Omawiana metoda badania struktury drugorzędowej została także wykorzystana do badania struktury dwóch bakteryjnych cząsteczek regulatorowych RNA DsrA oraz OxyS. Ponadto, wykonano mapowania macierzowe kompleksów RNA-białko dla cząsteczek DsrA RNA-Hfq oraz OxyS RNA-Hfq. Wyniki pozwoliły na wyznaczenie struktury drugorzędowej RNA w takich kompleksach oraz na określenie miejsc wiązania się białka do cząsteczki RNA. Z tych samych badań wynika, że macierze izoenergetyczne RNA są dobrym narzędziem do badania oddziaływań RNA-RNA (187).

Spinka regulatorowa na granicy eksonu 10 i intronu 10-11 pełni główną funkcję w regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT. Jednak wiadomo, że nie jest jedynym rejonem wpływającym na ten proces. W sąsiedztwie motywu spinki do włosów znaleziono inne elementy działające w układzie *cis* i mające wpływ na alternatywne składanie genu MAPT (146, 147).

Do tej pory nie jest znana struktura drugorzędowa rejonu przylegającego do spinki regulatorowej. Jak dotychczas badano jedynie strukturę samej spinki stosując metodę wysokorozdzielczego NMR (139). Oprócz sekwencji formy dzikiej, jako modelowe cząsteczki wybrano RNA z mutacjami, które bezpośrednio nie wpływają na wiązanie się cząsteczki U1 snRNP do 5' miejsca splicingowego. Badania termodynamiczne pokazują, że mutacje w obrębie spinki regulatorowej nie zmieniają motywu strukturalnego, jedynie

stabilność spinki RNA jest różna. Nasuwa się pytanie czy badane mutacje zmieniają strukturę drugorzędową fragmentu sąsiadującego z regulatorową spinką? Warto również poznać strukturę innych regulujących elementów. Czy badane mutacje wpływają na ich strukturę?

2.3.1. Przygotowanie izoenergetycznych macierzy dedykowanych 11 cząsteczkom fragmentu pre-mRNA genu MAPT

Pierwszym etapem przygotowania izoenergetycznych macierzy RNA była selekcja odpowiednich sond spośród biblioteki znajdującej się w naszym laboratorium. Pomocny okazał się program *RNAstructure*, który dzięki funkcji *'OligoWalk'* pozwolił na selekcję 188 pentamerów charakterystycznych dla sekwencji formy dzikiej i dodatkowych 13 pentamerów obejmujących fragmenty z mutacjami. W przypadku 9 sond posiadały one dwa miejsca wiązania, a 3 sondy wiązały się do trzech miejsc w badanej cząsteczce. Ze względu na niską stabilność dupleksów hybrydacyjnych 32 sondy specyficzne dla badanej cząsteczki nie były dostępne w bibliotece. Pokrycie fragmentu pre-mRNA genu MAPT przez sondy z biblioteki wynosiło 79,6%, dlatego postanowiono dołączyć do macierzy dodatkowe sondy heptamerowe (188). Sekwencje wybranych sond oligonukleotydowych oraz metody drukowania omówione zostały w rozdziale MATERIAŁY I METODY.

2.3.2. Mapowanie mikromacierzowe fragmentów pre-mRNA genu MAPT

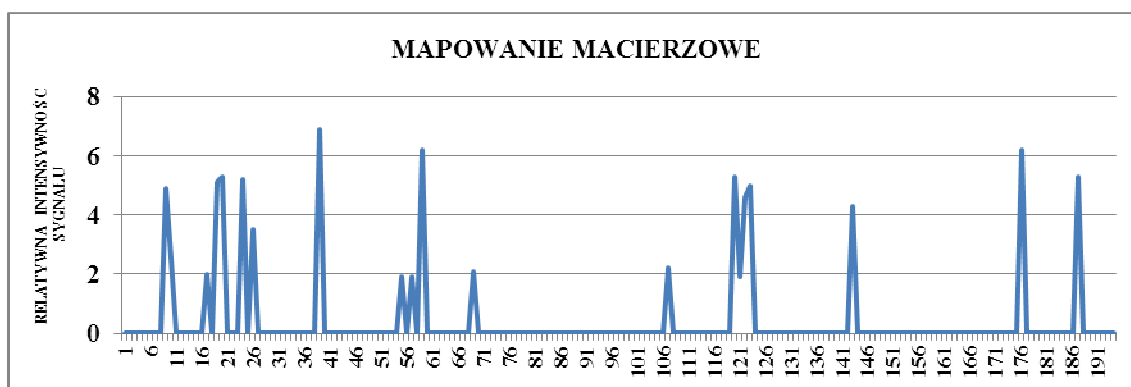
Cząsteczki RNA WT, 11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, 19G, DD-10C, DDI-17T, WT-10C oraz WTI-17T były znakowane radioaktywnie w czasie transkrypcji, a następnie oczyszczane na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Do hybrydyzacji wykorzystywane były trzy bufony hybrydacyjne: (1) 1 M NaCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, (2) 200 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, (3) 100 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Przy czym przed każdym eksperymentem macierzowym cząsteczki były denaturowane i renaturowane. Czas hybrydyzacji na izoenergetycznych macierzach wynosił 18 godzin, a temperatury hybrydyzacji to 4°C i 22°C.

Ilościowe opracowanie wyników hybrydyzacji było możliwe dzięki programowi *Array Gauge 2.1*. Chcąc porównywać wyniki mapowań macierzowych między sobą, wyniki hybrydyzacji były normalizowane. Sygnały hybrydacyjne sklasyfikowano, jako mocne (wartość pomiędzy 1-3) oraz średnie (wartość pomiędzy 3-9), reszta została odrzucona. Na

podstawie przeprowadzonych hybrydyzacji można stwierdzić, że użycie różnych buforów hybrydyzacyjnych i różnej temperatury nie wpływa znacząco na profil hybrydyzacji, dlatego wyniki mapowania mikromacierzowego każdej cząsteczki to średnia z intensywności sygnału w różnych buforach i temperaturach. Zestawienie wszystkich wyników z mapowania mikromacierzowego znajduje się w Tabeli 4.

Mapowanie mikromacierzowe wykazało, że wszystkie 11 badanych cząsteczek RNA ma bardzo podobny profil hybrydyzacyjny. Niestety, pojawiły się problemy z analizą danych. Uzyskano 48 sygnałów hybrydyzacyjnych, jednak 28 z nich posiadało alternatywne miejsce wiązania się sondy z energią swobodną niższą niż $-5,0$ kcal/mol. Do analizy struktury drugorzędowej badanego fragmentu wykorzystano jedynie te sygnały hybrydyzacyjne, dla których była pewność, że nie posiadają innych (alternatywnych) miejsc wiązania się do badanego RNA.

Dane uzyskane z mapowania mikromacierzowego pozwoliły na zaproponowanie rejonów jednoniciowych w następujących rejonach cząsteczki RNA: od 7 do 12 nukleotydu (sonda 71, 530), od 15 do 28 nukleotydu (sonda 569, 164, 41, S-1, 129), od 37 do 41 nukleotydu (sonda 96), od 53 do 61 nukleotydu (sonda S-6, S-7, 638), od 67 do 71 nukleotydu (sonda 451), od 105 do 109 nukleotydu (sonda 909), od 118 do 125 nukleotydu (sonda 347, 855, 470, 374), od 141 do 145 nukleotydu (sonda 899), od 174 do 179 nukleotydu (sonda S-13) oraz od 185 do 189 nukleotydu (sonda 328) (Tabela 4, Rysunek 27). Dane te były pomocne w opracowaniu struktury drugorzędowej, jednak niewystarczające. Chcąc uzyskać pełniejsze dane strukturalne przeprowadzono także mapowania chemiczne metodą SHAPE i DMS.



Rysunek 27. Wyniki mapowania macierzowego.

Tabela 4. Zestawienie wyników mapowania mikromacierzowego wszystkich modelowych cząsteczek pre-mRNA genu MAPT.

Nazwa sondy	sekwencja modyfikowanej sondy od 5' do 3'	ΔG°_{37} w 100mM NaCl	Pozycja w cząsteczce RNA	WT	11C	12U	13G	DD-PAC	16U	19G	DD-10C	DDI-17T	WT-10C	WTI-17T	Alternatywne miejsce wiązania	ΔG°_{37} w 100mM NaCl
594	G C c D C	-7,89	5	1,9	7,2	3,6	4,1	2,1	5,8	3,4	4,2	6,2	3,9	3,9	91	-7.89
															168	-7.89
															188	-7.89
71	d C d C g	-7,81	9	3,6	3,8	3,8	3,8	3,7	7,9	8,0	3,2	8,9	3,9	3,2		
530	G d C d C g	-11,04	10	2,0	2,4	2,7	2,9	1,9	2,5	2,7	2,4	2,8	2,4	2,7		
185	d G u G d g	-8,56	13	4,1	7,5	3,8	3,9	6,4	0	3	3	0	0	0	145	-9.37
569	G d U G d g	-11,39	17	2,8	2,5	1,6	1,1	1,5	2,5	2,1	2,0	1,8	1,7	2,2		
164	D g G d U g	-12,06	19	4,1	6,2	5,3	5,3	3,6	3,9	6,2	5,6	6,2	4,7	5,2		
41	d D g G d g	-9,09	20	4,7	6,4	7,3	6,3	3,7	7,0	5,3	3,8	4,5	3,5	6,1		
S-1	G d A d A d A P	-8,64	24	4,6	5,4	3,3	5,5	3,6	4,1	5,5	7,3	8,2	4,5	4,8		
129	d G d D d g	-11,10	26	3,1	2,5	2,7	2,7	3,0	5,1	3,0	4,0	4,3	3,7	4,9		
149	A g C c D g	-12,63	30	2,6	5,9	4,4	4,1	1,9	7,6	4,3	5,1	8,4	4,8	7,3	92	-9.11
															169	-9.11
96	d C c U u g	-6,42	39	6,0	6,2	8,4	7,4	3,6	4,6	8,1	7,3	8,9	7,1	8,2		
280	C d C c U g	-8,14	40	6,9	4,7	8,0	8,1	4,5	4,6	4,8	3,7	5,5	4,0	4,9	89	-8.14
															133	-11.60
															189	-5.90
S-2	A U U d U c U P	-8,15	47	2,5	1,7	2,0	2,1	2,5	2,8	2,3	2,7	1,4	2,6	1,4		
S-6	U c U u A u U P	-8,17	55	2,0	1,3	2,0	1,1	1,0	2,4	2,6	1,7	2,8	2,8	1,7		
S--	A U u C u U A P	-6,59	57	1,8	2,6	1,5	1,4	2,6	2,2	1,7	1,1	2,7	2,0	1,4		
638	g C u U c g	-7,69	59	3,0	6,3	5,0	4,0	8,0	3,4	7,6	8,7	6,8	8,8	6,7		
451	C u D d G g	-10,09	69	1,6	1,7	2,7	2,2	2,9	1,8	1,5	1,1	2,4	2,5	2,6		
625	G c U d D g	-11,32	70	7,1	5,0	5,6	5,7	3,9	7,4	3,2	6,7	8,6	6,8	5,2	5	-6.19
															91	-6.19
															168	-6.19
72	d C d C u g	-6,26	88	3,5	7,1	8,3	8,9	1,5	1,4	19,8	5,1	11,1	4,7	16,1	190	-6.26
274	C d C d C g	-7,03	89	1,6	6,5	2,4	1,9	1,4	5,8	3,5	3,3	4,7	2,9	6,0	133	-7.03
															163	-7.03
															191	-7.03
325	C C d C D g	-6,66	90	3,5	6,1	2,8	2,9	3,5	2,6	7,0	2,3	6,5	2,0	7,1	167	-10.20
594	G C c D C	-7,89	91	1,9	8,4	3,6	2,5	2,1	5,8	3,4	4,2	6,2	3,9	4,5	5	-7.89
															168	-7.89
															188	-7.89
149	A g C c D g	-9,11	92	2,6	5,9	4,1	4,1	1,9	7,6	8,0	5,1	6,8	4,8	7,7	30	-12.6
															169	-9.11

S-9	UdUUdUCP	-8,46	103	7,4	8,7	8,9	10,5	8,4	4,0	2,6	3,6	11,6	3,2	19,5	47	-6.37
909	uGdUdg	-8,65	107	2,0	1,7	2,8	2,6	2,0	2,0	1,8	2,8	2,0	2,2	1,9		
S-12	ACGUGUU P	-7,33	113	5,6	3,2	4,9	4,7	3,7	3,1	7,9	5,6	6,5	6,2	9,0	145	-6.39
347	CCcGG	-9,09	120	5,4	5,0	5,5	7,4	4,7	6,1	5,8	5,5	3,8	5,0	4,1		
855	uCcCg	-9,61	121	1,9	2,0	1,7	2,7	2,0	2,1	1,6	2,0	1,7	1,8	1,5		
470	CUcCc	-9,16	122	3,8	3,4	7,5	8,9	3,2	1,5	1,8	4,4	3,3	4,0	8,7		
374	CcUcC	-9,51	123	8,1	3,5	4,9	4,2	6,2	4,4	4,7	3,4	4,8	5,8	5,0		
122	DcUgCg	-8,77	130	5,8	6,7	3,3	3,3	3,4	3,3	4,0	5,3	4,9	5,0	5,2	188	-8.77
274	CdCdCg	-7,03	133	3,5	6,5	6,9	8,3	1,5	6,8	3,5	3,3	4,7	2,9	6,0	89	-7.03
															163	-7.03
															191	-7.03
837	uCdCd g	-8,72	134	1,6	2,9	2,4	2,1	1,4	1,4	2,0	2,1	1,8	1,8	2,2	90	-7.22
															167	-10.90
															192	-7.22
466	CUcDc g	-11,30	135	2,1	1,6	2,0	1,4	1,8	2,7	5,2	6,5	6,8	5,8	4,5	188	-8.09
899	uGdDg g	-9,17	143	5,5	6,5	4,4	4,5	3,1	1,9	2,5	2,8	8,2	2,4	5,1		
953	uGuGd g	-11,60	145	15,9	4,1	5,6	5,7	6,3	7,4	3,7	5,0	3,4	4,3	4,0		
146	AgCdCg	-11,48	163	5,1	6,1	4,7	4,3	4,9	3,4	6,9	8,0	7,2	7,7	6,2	89	-5.37
															133	-5.37
															191	-5.37
275	CdCdGg	-7,48	166	3,6	8,9	3,3	2,9	3,8	5,4	3,9	3,7	6,6	3,3	6,0	89	-5.08
															133	-5.08
															191	-5.08
325	CCdCDg	-10,18	167	3,5	5,9	2,8	2,9	3,5	2,6	7,0	2,3	2,6	2,0	7,1	90	-6.66
594	GCcDC	-7,89	168	1,9	8,0	3,6	1,8	2,1	5,8	3,4	4,2	6,2	3,9	6,0	5	-7.89
															91	-7.89
															188	-7.89
149	AgCcDg	-10,61	169	2,6	6,2	1,4	3,8	1,9	7,6	2,2	5,1	3,6	4,8	6,4	30	-12.60
															92	-9.11
S-13	AuAdUuCP	-9,29	176	8,9	4,9	3,5	8,7	6,0	6,7	6,4	3,9	3,9	7,7	7,5		
328	CCdCu gP	-6,70	187	5,6	2,2	6,6	5,2	4,1	4,1	6,2	8,9	2,9	8,6	4,1		
82	DcCdCg	-8,09	188	1,1	4,3	2,0	2,3	1,1	2,5	5,0	1,2	6,8	3,7	2,8	91	-7.89
															135	-8.09
															168	-7.89
277	CdCcAg	-7,85	189	3,2	8,8	5,3	5,4	2,3	3,8	7,8	2,3	4,6	2,0	6,3	30	-5.93
72	dCdCc	-6,26	190	2,8	4,5	4,9	5,2	2,8	3,0	4,2	8,8	9,0	8,4	6,9	88	-6.26
274	CdCdCg	-7,03	191	1,6	6,5	2,4	2,0	1,4	5,8	3,5	3,3	4,7	2,9	6,0	89	-7.03
															133	-7.03
															163	-7.03
837	uCdCd g	-7,22	192	3,5	2,9	5,3	6,9	4,5	5,2	4,0	2,1	3,3	1,8	3,5	90	-7.22
															134	-8.72
															167	-10.9

Duże litery oznaczają reszty nukleotydowe typu LNA, małe litery oznaczają reszty 2'-O-metylo-RNA, literą D oraz d oznaczono 2,6-diaminopurynoribozyd odpowiednio w serii LNA i 2'-O-metylo-RNA

2.4. Mapowanie chemiczne 11 cząsteczek fragmentu pre-mRNA genu MAPT

Mapowanie chemiczne polega na modyfikowaniu określonych miejsc we fragmentach jednoniciowych RNA. Dwie metody mapowania chemicznego zostały użyte do udokładnienia struktury drugorzędowych fragmentów pre-mRNA genu MAPT, a mianowicie metoda SHAPE oraz modyfikacja z użyciem DMS.

Siarczan dimetylu (DMS) jest odczynnikiem, który używany jest w mapowaniu chemicznym od wielu lat. W 1980 roku został wykorzystany po raz pierwszy w badaniach nad strukturą drugorzędową RNA (189). DMS metyluje N1 w adenozyne, N3 w cytydynie oraz N7 w guanozyne, przy czym modyfikacja guanozyny nie jest identyfikowana. Do tej pory DMS z powodzeniem został użyty do mapowań rybosomalnych cząsteczek RNA, intronów grupy I i II oraz RNazy P (190-193). W przypadku mapowania DMS na reaktywność ma wpływ nie tylko dostępność zasad heterocyklicznych, ale także lokalne oddziaływania elektrostatyczne (194).

Coraz większą popularność w badaniach nad strukturą drugorzędową RNA zyskuje metoda SHAPE zaproponowana przez Weeks'a. Wykorzystuje ona NMIA (ang. *N-methylisatoic anhydride*) lub 1M7 (ang. *1-methyl-7-nitroisatoic anhydride*) do acylacji grupy 2'-hydroksylowej reszt nukleotydowych rybozy występujących w rejonie jednoniciowym RNA. Wysokoprzepustowa metoda SHAPE pozwoliła na zmapowanie całej cząsteczki HIV-1 (195-197).

Obie metody pozwalają na uzyskanie wyników mapowań z rozdzielczością jednego nukleotydu. Miejsce modyfikacji jest analizowane dzięki przeprowadzeniu reakcji z odwrotną transkryptazą z zastosowaniem startera DNA. W miejscu, gdzie występuje modyfikowany nukleotyd następuje przerwanie syntezy DNA. W mapowaniach chemicznych 11 fragmentów pre-mRNA genu MAPT zastosowano starter DNA znakowany na końcu 5' fluoresceiną, co pozwoliło na analizę powstałych fragmentów za pomocą elektroforezy kapilarnej. Udowodniono, że w reakcji wydłużania startera (ang. *primer extention*) przez odwrotną transkryptazę możliwe jest użycie startera DNA z nukleotydami w serii LNA (198). Pozwoliło to na skrócenie startera w celu uwidocznienia jak największej liczby modyfikacji bez zmiany warunków reakcji. Dane uzyskane z rozdziału metodą elektroforezy kapilarnej były analizowane w programie *Peak Scanner*, następnie normalizowane. W obu przypadkach mapowania chemicznego wartości wyników pomiędzy 0,3-0,7 uznawano za reaktywność średnią, a wartości powyżej 0,7 za reaktywność mocną.

2.4.1. Mapowanie metodą SHAPE 11 cząsteczek fragmentu pre-mRNA genu MAPT

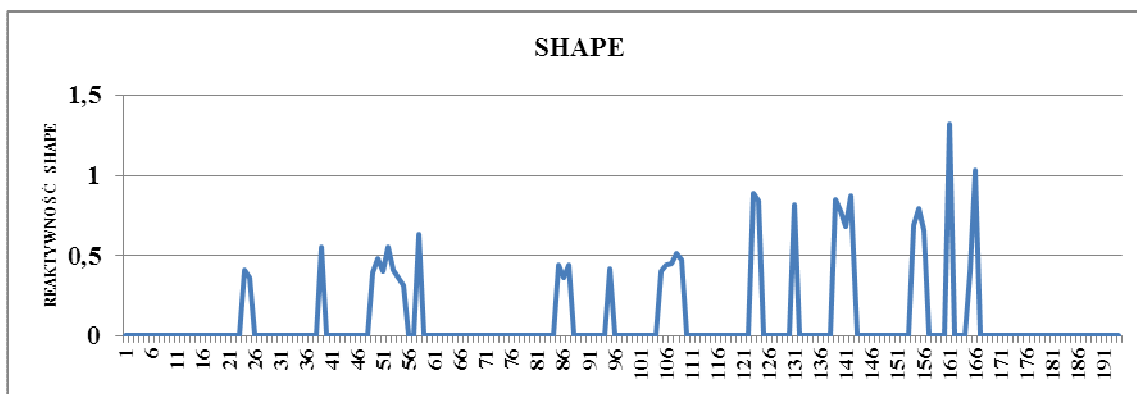
Podobnie, jak w przypadku mapowania izoenergetycznymi macierzami RNA, po wykonaniu mapowań chemicznych metodą SHAPE nie zauważono znaczących różnic między wszystkimi jedenastoma cząsteczkami RNA (Tabela 5). Zdecydowano, że wyniki mapowań, które będą uwzględniane w przewidywaniu struktury drugorzędowej pre-mRNA genu MAPT, będą wartościami średnimi wszystkich badanych cząsteczek RNA. Reaktywność SHAPE na poziomie średnim i wysokim wykazywały nukleotydy: 24-25, 39, 49-55, 58, 85-87, 95, 105-109, 123-124, 131, 139-142, 154-156, 161 i 165-166 (Rysunek 28). Jedynie niewielkie różnice pomiędzy badanymi cząsteczkami RNA możemy zauważyć w przypadku nukleotydów: 49, 54, 55, 86, 95, 109 i 156.

2.4.2. Mapowanie siarczanem dimetylu (DMS) 11 cząsteczek fragmentu pre-mRNA genu MAPT

Mapowanie chemiczne pozwoliło na określenie nukleotydów o średniej i wysokiej reaktywności z DMS (Tabela 6). Reaktywne okazały się nukleotydy w pozycji: 37, 55, 56, 58, 85, 86, 95, 104, 106, 108, 109, 123, 130, 139, 140, 141, 152 i 153 (Rysunek 29). Uzyskane wyniki dobrze korelują z danymi uzyskanymi z mapowania macierzowego i metodą SHAPE. Analizowane cząsteczki RNA wykazują charakterystyczny wzór mapowania. Jedynie w przypadku nukleotydów 85 i 109 widać różnice w reaktywności DMS. Tak jak w przypadku wcześniejszych mapowań, do analizy struktury drugorzędowej brano pod uwagę średnie wartości reaktywności DMS dla wszystkich badanych cząsteczek RNA.

Tabela 5. Zestawienie wyników mapowania chemicznego metodą SHAPE modelowych RNA.

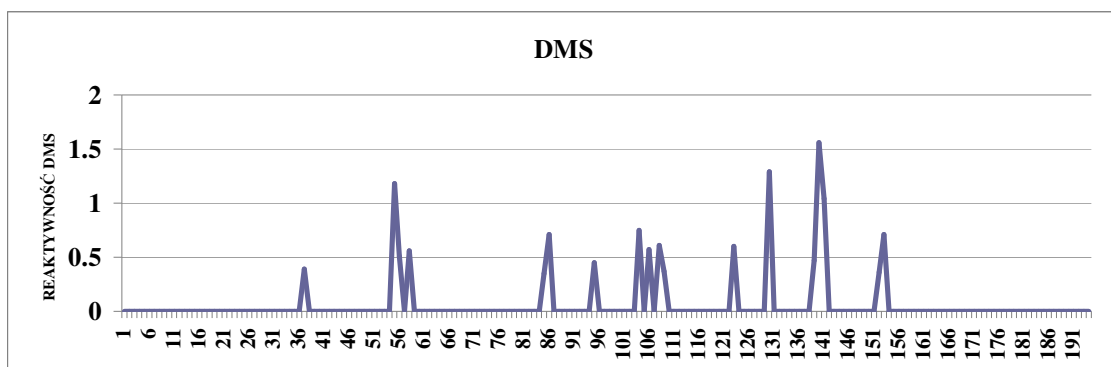
modyfikowany nukleotyd	WT RNA	11C RNA	12U RNA	13G RNA	DD-PAC RNA	16U RNA	19G RNA	WT-10C RNA	WTI-17T RNA	DD-10C RNA	DDI-17T RNA	średnia reaktywność		
24	0,40	0,42	0,40	0,44	0,33	0,42	0,37	0,45	0,63	0,40	0,30	0,41		
25	0,31	0,41	0,36	0,37	0,46	0,37	0,34	0,36	0,31	0,32	0,36	0,36		
39	0,54	0,63	0,67	0,48	0,60	0,43	0,44	0,63	0,58	0,56	0,48	0,55		
49	0,46	0,30	0,37	0,34	0,38	0	0,53	0,56	0,60	0,40	0,35	0,39		
50	0,45	0,55	0,52	0,44	0,31	0,57	0,36	0,59	0,71	0,37	0,40	0,48		
51	0,36	0,31	0,54	0,30	0,50	0,39	0,40	0,47	0,49	0,31	0,38	0,40		
52	0,46	0,50	1,11	0,55	0,65	0,38	0,49	0,50	0,67	0,29	0,38	0,55		
53	0,43	0,40	0,61	0,36	0,41	0,31	0,39	0,39	0,54	0,30	0,35	0,41		
54	0,36	0,41	0,56	0	0,49	0	0,43	0,45	0,52	0,32	0,46	0,36		
55	0,31	0,39	0	0	0,47	0,32	0,35	0,37	0,49	0,33	0,41	0,31		
58	0,55	0,35	0,88	0,68	0,54	0,63	0,63	0,80	0,95	0,31	0,64	0,63		
85	0,40	0,73	0,33	0,35	0,57	0,61	0,54	0,47	0,39	0	0,47	0,44		
86	0,32	0,35	0,38	0,35	0	0,58	0,48	0,35	0,42	0,37	0,38	0,36		
87	0,50	0,37	0,35	0,34	0,40	0,39	0,84	0,42	0,34	0,47	0,42	0,44		
95	0,31	0,65	0,48	0,30	0,47	0,34	0,31	0,36	0,42	0	0,83	0,42		
105	0,33	0,37	0,38	0,34	0,56	0,33	0,34	0,89	0,40	0,35	0,33	0,40		
106	0,35	0,32	0,58	0,42	0,30	0,44	0,38	0,31	0,39	0,49	0,82	0,44		
107	0,61	0,37	0,41	0,30	0,41	0,35	0,50	0,39	0,51	0,40	0,69	0,45		
108	0,35	0,48	0,34	0,81	0,40	0,40	0,49	0,72	0,48	0,45	0,70	0,51		
109	0,48	0,53	0,32	0,31	1,37	0,32	0,36	0,37	0	0,56	0,48	0,47		
123	1,29	0,96	0,70	0,54	0,87	0,79	0,52	1,10	1,00	0,89	1,16	0,89		
124	0,97	0,88	0,87	0,52	0,71	0,63	0,80	0,96	0,93	1,04	0,91	0,84		
131	1,18	1,24	0,76	0,89	0,95	0,47	0,48	0,87	0,58	0,92	0,71	0,82		
139	0,89	1,26	1,28	0,70	0,70	0,85	1,01	0,84	0,57	0,69	0,59	0,85		
140	0,95	0,36	0,88	0,47	0,68	0,98	1,21	0,83	0,81	0,92	0,45	0,78		
141	0,67	0,40	0,31	1,21	0,41	0,37	1,06	0,45	0,89	0,73	0,93	0,68		
142	0,82	1,40	0,61	0,73	0,76	0,85	0,97	1,68	0,58	0,58	0,57	0,87		
154	0,46	0,73	1,76	0,49	0,60	0,82	0,47	0,45	155	0,36	0,89	155	0,56	0,69
155	1,27	0,98	0,31	0,50	0,52	1,48	1,15	1,10	156	0,32	0,65	156	0,44	0,79
156	1,19	0	0,40	0	0,35	0	1,51	1,17	157	1,00	0,64	157	0,97	0,66
161	0,94	1,30	2,32	0,81	2,54	2,11	0,96	0,96	162	1,10	0,95	162	0,57	1,32
165	0,54	0,43	0,31	0,37	0,43	0,37	0,33	0	166	0,43	0,51	166	0,30	0,40
166	0,81	0,90	1,30	1,07	0,45	0,95	0,72	2,41	167	0,96	0,74	167	1,01	1,03



Rysunek 28. Wyniki mapowania chemicznego metodą SHAPE.

Tabela 6. Zestawienie wyników mapowania chemicznego z użyciem DMS modelowych RNA.

modyfikowany nukleotyd	WT RNA	11C RNA	12U RNA	13G RNA	DD-PAC RNA	16U RNA	19G RNA	WT-10C RNA	WTI-17T RNA	DD-10C RNA	DDI-17T RNA	średnia reaktywność		
37	0,38	0,40	0,36	0,34	0,44	0,49	0,32	0,34	0,38	0,37	0,50	0,39		
55	1,35	1,00	1,01	0,79	0,49	1,33	1,30	0,99	1,45	1,42	1,87	1,18		
56	0,33	0,33	0,42	0,53	0,39	1,38	0,60	0,49	0,37	0,30	0,52	0,51		
58	0,79	0,48	0,32	0,71	0,55	0,56	0,42	0,45	0,39	1,00	0,59	0,56		
85	0,45	0,58	0	0,60	0,43	0	0	0,59	0,66	0,57	0	0,35		
86	0,80	0,74	0,52	0,73	0,78	0,59	0,50	0,50	0,87	0,80	1,09	0,71		
95	0,35	0,38	0,42	0,40	0,50	0,42	0,41	0,49	0,58	0,49	0,47	0,45		
104	0,78	0,72	0,72	0,77	0,70	0,77	0,91	0,72	0,79	0,75	0,75	0,75		
106	0,59	0,48	0,36	0,39	0,41	0,37	0,40	0,86	1,00	0,49	0,88	0,57		
108	0,87	0,74	0,88	0,51	0,39	0,69	0,54	0,46	0,51	0,46	0,67	0,61		
109	0,51	0,43	0	0,39	0	0,49	0	0,54	0,65	0,42	0,63	0,37		
123	0,60	0,70	0,46	0,60	0,50	0,74	0,59	0,40	0,63	0,52	0,80	0,60		
130	1,08	0,60	3,01	1,59	1,47	0,93	0,93	1,74	0,90	0,97	1,01	1,29		
139	0,67	0,57	0,34	0,39	0,47	0,64	0,41	0,36	0,70	0,30	0,32	0,47		
140	1,23	1,33	1,69	1,75	2,75	0,97	1,71	0,87	1,68	1,40	1,80	1,56		
141	0,97	1,21	1,10	1,17	0,66	0,73	1,30	1,16	0,99	1,06	1,17	1,04		
152	0,51	0,42	0,33	0,40	0,44	0,41	0,32	0,68	153	0	0,43	153	0	0,36
153	0,95	0,94	0,62	0,49	0,54	0,78	0,69	0,85	154	0,57	0,83	154	0,54	0,71



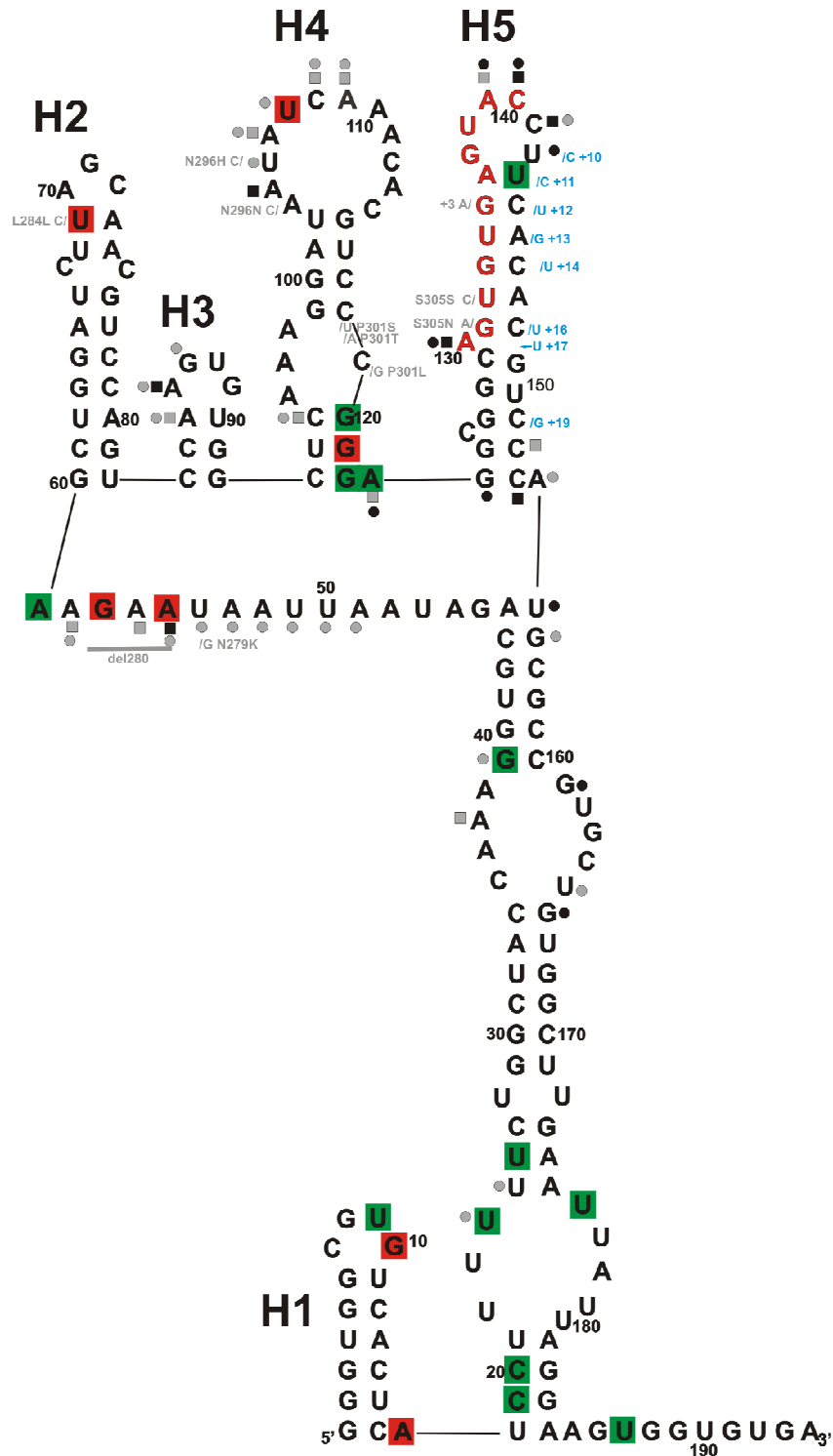
Rysunek 29. Wyniki mapowania chemicznego z użyciem siarczanu dimetylu.

2.5. Struktura drugorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT zaproponowana w oparciu o program *RNAstructure*

Dane eksperymentalne uzyskane z mapowania mikromacierzowego oraz mapowań chemicznych zostały wprowadzone do programu przewidującego struktury drugorzędowe *RNAstructure* 5.6. W programie tym wykorzystano funkcję 'Maximum Expected Accuracy', która pozwala na uzyskanie jednej struktury z najwyższym prawdopodobieństwem wystąpienia par nukleotydów. Do programu wprowadzono dane dla wszystkich badanych cząsteczek RNA oraz wyniki uśrednione z poszczególnych mapowań. Zaproponowane struktury dla modelowych RNA WT, 11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, 19G, WT-10C, WTI-17T, DD-10C, DDI-17T nie różniły się między sobą. Ponadto, struktura z uśrednionych wyników mapowań była taka sama, a mutacje nie zmieniły struktury drugorzędowej modelowych RNA. Ze względu na podobieństwo strukturalne w dalszej części rozprawy posługiwano się uśrednionymi wynikami mapowań (Rysunek 30).

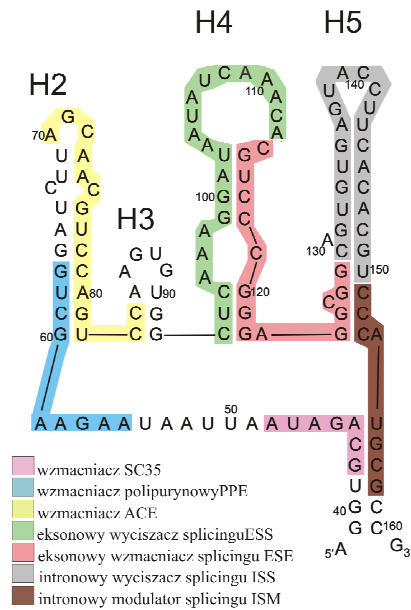
W strukturze drugorzędowej zaproponowanej przez program *RNAstructure* końce 5' i 3' znajdują się blisko siebie. Strukturę tworzy pięć motywów spinek do włosów, jedna na końcu 5' i cztery w rejonie od 60 do 153 nukleotydu. Ponadto możemy wyróżnić długi odcinek dwuniciowy z wieloma niesparowaniami, który tworzą nukleotydy 18-44 oraz 155-184. W rejonie 45-59 został zaproponowany odcinek jednoniciowy.

Po wnikliwej analizie struktury drugorzędowej RNA, zaproponowanej przez *RNAstructure*, wiele argumentów przemawiało za tym, że wygenerowana struktura nie jest optymalna. Pierwszym, jaki nasuwa się po analizie tej struktury to kilka fragmentów dwuniciowych, które posiadają sygnały mapowań. Wiele sygnałów z mapowania



Rysunek 30. Struktura drugorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT zaproponowana przez program *RNAstructure* z naniesionymi mapowaniami: czerwony kwadrat-silny sygnał hybrydyzacji do macierzy, zielony kwadrat-średni sygnał hybrydyzacji do macierzy, czarny okrąg-wysoka reaktywność SHAPE, szary okrąg-średnia reaktywność SHAPE, czarny kwadrat-wysoka reaktywność DMS, szary kwadrat-średnia reaktywność DMS. Czcionką czerwoną zaznaczono miejsce, z którym oddziałuje U1 snRNA. Mutacje wykorzystane w badaniach zaznaczone są na niebiesko, pozostałe na szaro.

mikromacierzowego zostało odrzuconych przez obecność alternatywnych miejsc wiązania. Do analizy wykorzystano te sygnały hybrydyzacyjne, co do których była 100% pewność, że odpowiadają jednemu miejscu wiązania w badanej cząsteczce. Warto także dodać, że wyniki mapowania mikromacierzami pokazują tylko środkowy nukleotyd, z którym wiąże się sonda hybrydyzacyjna, a nie cały fragment jej oddziaływania. Dlatego dziwi fakt, że nukleotydy z sygnałami hybrydyzacyjnymi 19, 20, 120, 121, 122 w zaproponowanej strukturze znajdują się w rejonach dwuniciowych (Rysunek 30). Drugi argument dotyczy umiejscowienia ważnych funkcjonalnie elementów w proponowanej strukturze drugorzędowej modelowych RNA. W części teoretycznej przedstawiono wszystkie rejony w obrębie eksonu 10, które biorą udział w regulacji alternatywnego splicingu tego eksonu (146, 147). Główna regulacja jest możliwa dzięki motywowi spinki do włosów w rejonie 5' miejsca splicingowego. Rejon ten tworzy intronowy wyciszacz splicingu (ISS). Ponadto, ekson 10 posiada dodatkowych 6 elementów regulujących: wmacniacz oddziałujący z SC35, wmacniacz polipurynowy (PPE), wmacniacz bogaty w A/C (ACE), eksonowy wyciszacz splicingu (ESS), eksonowy wmacniacz splicingu (ESE) oraz intronowy modulator splicingu (ISM). D'Souza i współpracownicy wyznaczyli eksperymentalnie te rejony (146, 147). Zaprojektowali 17 mutantów, które posiadały delecje 3 nukleotydowe lub 9 nukleotydowe kolejnych fragmentów w eksonie 10 lub intronie 10-11 genu MAPT. Wszystkie zmutowane cząsteczki były wykorzystane do badań na liniach komórkowych w celu ustalenia stosunku transkryptów zawierających ekson 10 (4R) i pozbawionych tego eksonu (3R). Analiza stosunku izoformy 3R do 4R pozwoliła wyznaczyć elementy odpowiedzialne za regulację alternatywnego splicingu eksonu 10. Warto jednak wspomnieć, że badania te opierały się na założeniu, że poszczególne delecje wpływają jedynie na wiązanie się czynników białkowych. Zmiany struktury drugorzędowej pre-mRNA genu MAPT nie były w tych badaniach brane pod uwagę. Rejony biorące udział w alternatywnym splicingu eksonu 10 zostały naniesione na strukturę drugorzędową zaproponowaną przez program *RNAstructure* (Rysunek 31).



Rysunek 31. Fragment pre-mRNA genu MAPT z zaznaczonymi elementami regulującymi alternatywne składanie eksonu 10 białka *tau*.

Intronowy wyciszacz splicingu ISS, czyli główny element regulujący alternatywny splicing eksonu 10 obejmuje cały region spinki do włosów. Struktura tego motywu jest potwierdzona badaniami strukturalnymi przy pomocy NMR (139). W tym przypadku możemy powiedzieć, że to motyw strukturalny pełni tę regulacyjną funkcję. Wyznaczony element regulujący całkowicie zawiera się w motywie spinki do włosów. Analogicznie rozważając można sądzić, że kolejne elementy funkcjonalne regulujące alternatywny splicing pre-mRNA genu MAPT także powinny tworzyć odrębne motywy strukturalne w badanej cząsteczce. W przypadku zaproponowanej przez program *RNAstructure* struktury drugorzędowej nie zauważamy takiego rozdziału (Rysunek 31). Elementy SC35 i PPE częściowo znajdują się w rejonie dwuniciowym i jednoniciowym. Element ACE obejmuje niepełną spinkę H2 oraz część H3. Najbardziej zadziwiające jest umiejscowienie dwóch elementów ESS i ESE na tej samej spince H4, ponieważ jeden z tych elementów wzmacnia, a drugi obniża splicing eksonu 10. Także intronowy modulator splicingu umiejscowiony jest w dwóch motywach strukturalnych.

Brak różnic w mapowaniu mikromacierzowym i chemicznym wszystkich jedenastu modelowych cząsteczek RNA było zaskoczeniem, szczególnie dotyczy to mutanta 19G. Z danych literaturowych wynika, że mutacja ta powoduje powstawanie głównie izoformy 3R (143). Wszystkie pozostałe mutacje w obrębie regulatorowej spinki powodują zwiększoną

ilość izoformy 4R białka *tau*, przez obniżenie stabilności termodynamicznej regulatorowej spinki (74, 124, 125). Analogicznie sądząc, mutacja 19G powinna stabilizować badaną spinę i ograniczyć wiązanie się cząsteczki U1 snRNA do tego miejsca. Badanie termodynamiczne modelowej spinki z mutacją 19G nie potwierdziło tego założenia. Mogło być to wynikiem umiejscowienia tej mutacji w spinie (na samym końcu 3') lub zmiany w strukturze blokującej 5' miejsce splicingowe. Zaproponowana struktura w żaden sposób nie tłumaczy wpływu tej mutacji na alternatywny splicing. Zamiana C na G w pozycji 151 powoduje wypętlenie się C zamiast G, co nie powinno mieć znaczącego wpływu na stabilność spinki.

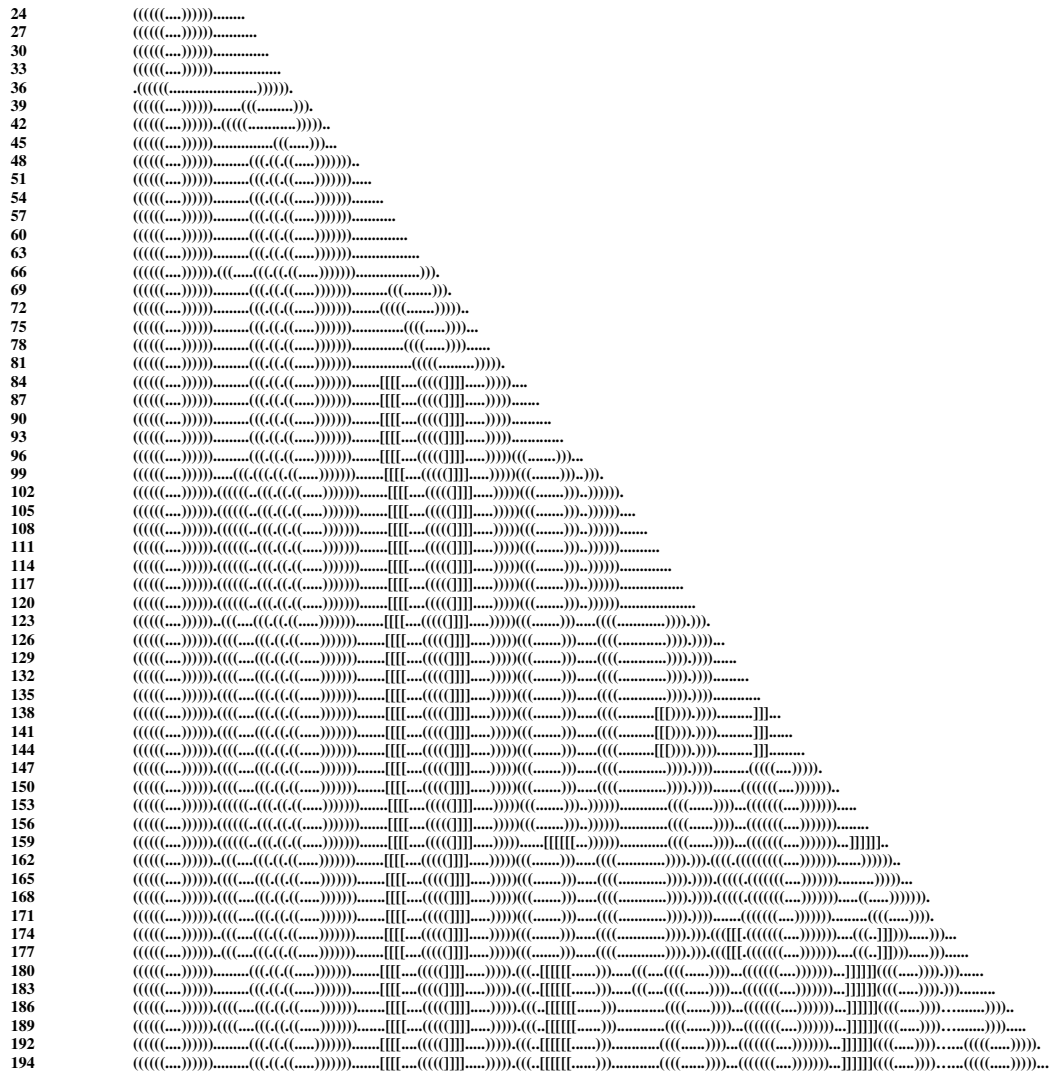
Wszystkie wyżej wymienione wątpliwości pozwoliły przypuszczać, że badany fragment może mieć inną strukturę niż ta zaproponowana przez program *RNAstructure*.

2.6. Struktura drugorzędowa fragmentu pre-mRNA genu *MAPT* zaproponowana w oparciu o program *vsfold5*

Ze względu na pewne wątpliwości co do struktury drugorzędowej modelowych RNA wygenerowanej przez program *RNAstructure*, wykonano modelowanie struktury w różnych programach do przewidywania struktury drugorzędowej RNA, z naciskiem na te programy, które pozwalają na przewidywanie pseudowęzłów. Między innymi wykorzystano *RNAmetaserver* opracowany na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, który pozwala na jednoczesne modelowanie struktury w 20 programach do przewidywania struktury drugorzędowej: *Afold*, *CentroidFold*, *ContextFold*, *Contrafold*, *DotKnot*, *Fold*, *HotKnots*, *IPknot*, *MaxExpect*, *McQFold*, *PknotsRG*, *ProbKnot*, *RNASLOpt*, *RNAfold*, *RNAshapes*, *RNAsubopt*, *RNAwolf*, *Sfold*, *UNAFold*, *Meta-prediction*. Z uwagi na to, że większość z tych programów nie pozwala na wprowadzenie danych z mapowań macierzowych i chemicznych, szukano takiego modelu struktury drugorzędowej, który będzie zgodny z uzyskanymi danymi eksperymentalnymi.

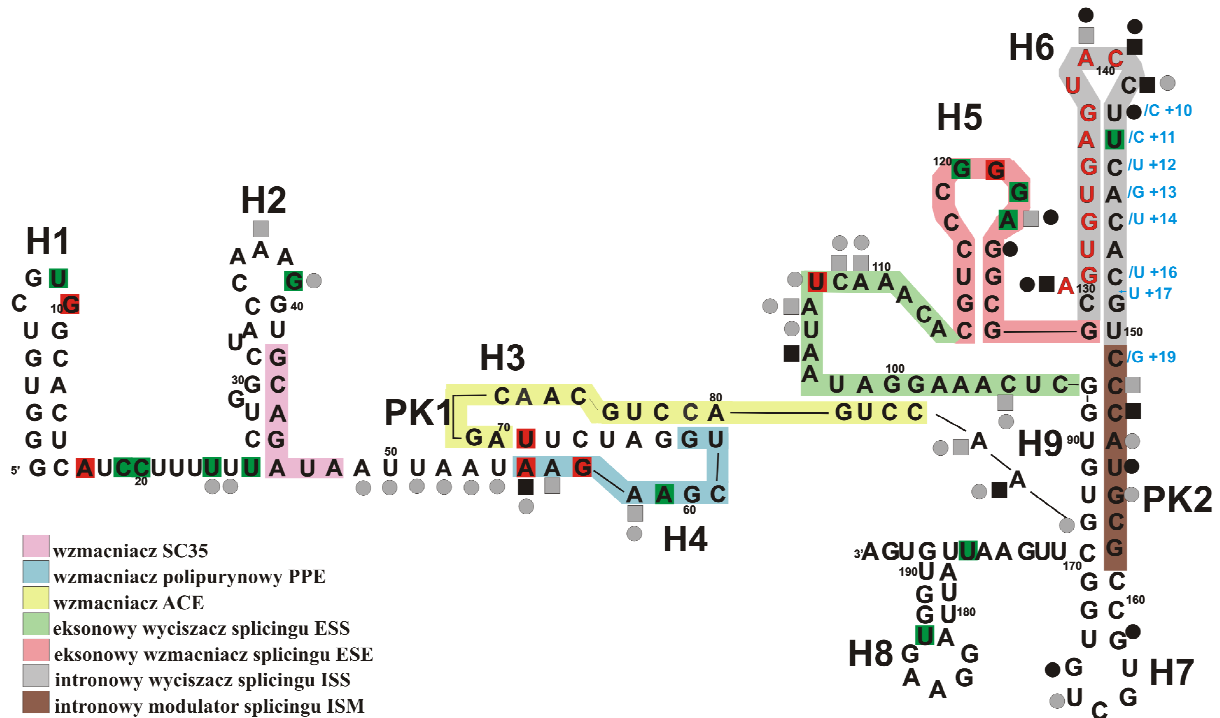
Interesujące dane zostały uzyskane z wykorzystaniem programu *vsfold5*. Jest to program do przewidywania struktury drugorzędowej wraz z pseudowęzłami. Został stworzony przez japońskich naukowców z *The High Technology Research Center Chiba Institute of Technology* (www.rna.it-chiba.ac.jp). Po wprowadzeniu sekwencji do programu *vsfold5* uzyskano serie danych o przewidywanych strukturach drugorzędowych. Program wyznacza najkrótszy fragment od końca 5', który tworzy trwały motyw strukturalny,

następnie dodaje kolejno trzy nukleotydy i przewiduje strukturę drugorzędową każdego takiego fragmentu (Rysunek 32).



Rysunek 32. Uzyskane struktury drugorzędowe wymodelowane przez program *vsfold5*. Liczby oznaczają długość analizowanego fragmentu pre-mRNA genu MAPT.

Analiza wszystkich uzyskanych danych pozwala na zaproponowanie kolejnych etapów fałdowania się badanej cząsteczki. Zważywszy na fakt, że proces alternatywnego splicingu zachodzi w czasie transkrypcji, składniki spliceosomu oraz czynniki splicingowe mogą oddziaływać z pre-mRNA natychmiast po pojawieniu się transkrypty (37-40). Dlatego wydaje się, że analiza danych z programu *vsfold5* pozwala na uwidocznienie struktury, jaka może pojawić się w czasie syntezy pre-mRNA. Struktura drugorzędowa dla pełnego fragmentu pre-mRNA, zaproponowana przez program *vsfold5* została przedstawiona na rysunku 33.



Rysunek 33. Struktura drugorzędowa fragmentu pre-mRNA genu *MAPT* zaproponowana przez program *vsfold5* z naniesionymi mapowaniami oraz z zaznaczonymi elementami regulującymi alternatywne składanie eksonu 10 białka *tau*. Czerwony kwadrat-silny sygnał hybrydyzacji do macierzy, zielony kwadrat-średni sygnał hybrydyzacji do macierzy, czarny okrąg-wysoka reaktywność SHAPE, szary okrąg-średnia reaktywność SHAPE, czarny kwadrat-wysoka reaktywność DMS, szary kwadrat-średnia reaktywność DMS. Czerwoną czcionką zaznaczono miejsce, z którym oddziałuje U1 snRNA. Mutacje wykorzystane w badaniach zaznaczone są na niebiesko.

Program *vsfold5* zaproponował całkowicie inną strukturę niż wymodelowana przez program *RNAstructure*. Końce 5' i 3' nie znajdują się blisko siebie. Główną strukturę tworzy dziewięć motywów spinek do włosów, z czego spinki H3 i H4 tworzą pseudowęzeł w rejonie od 53 do 80 nukleotydu. Drugi zaproponowany pseudowęzeł tworzy spinka H9 w rejonie 53-87 oraz fragment jednoniciowy 152-158. Warto również zauważyć, że spinka, do której wiąże się cząsteczka U1 snRNP znajduje się w jednej linii z fragmentem jednoniciowym tworzącym pseudowęzeł i spinkę H7.

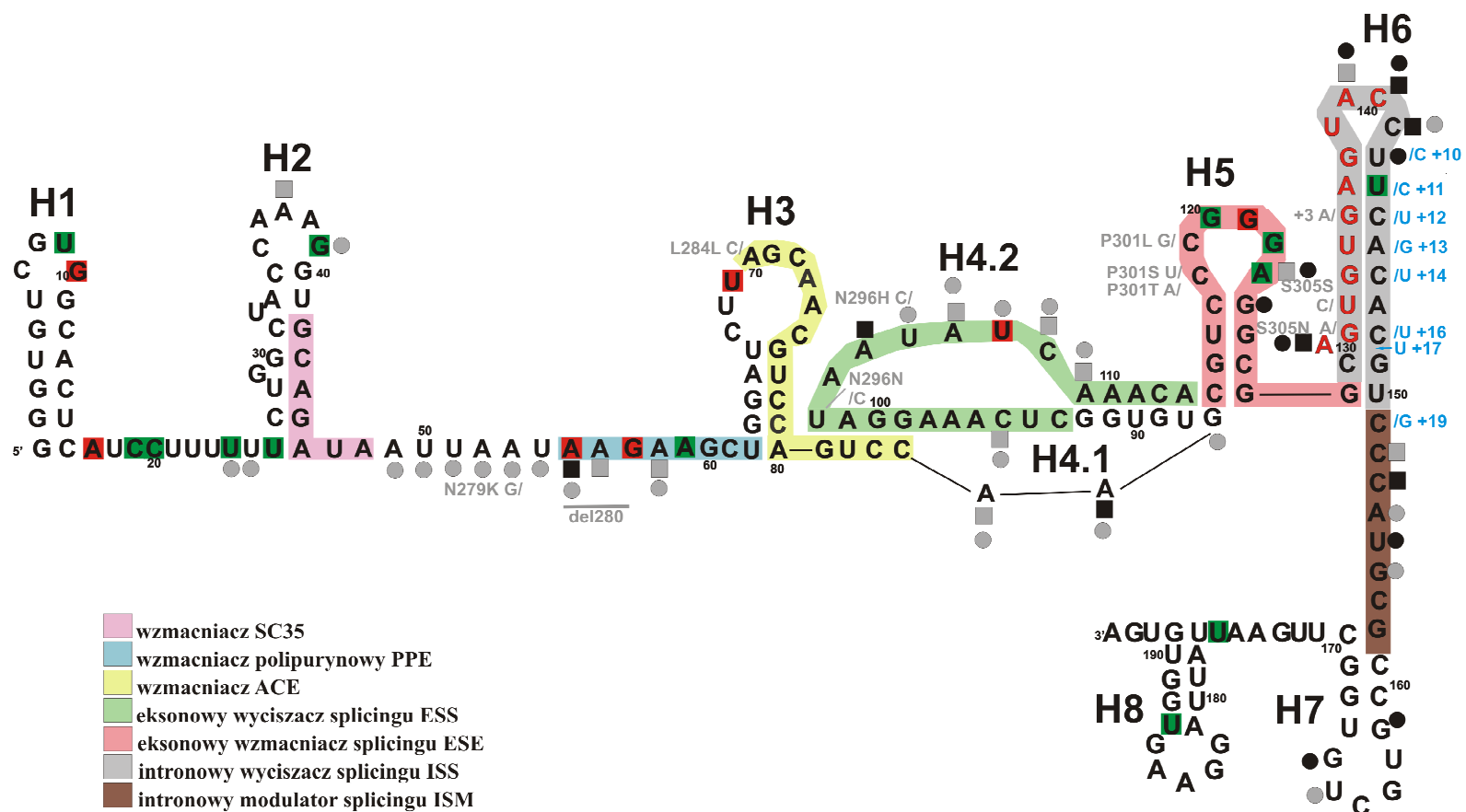
Naniesione sygnały ze wszystkich mapowań obrazują, że struktura jest zgodna z danymi eksperymentalnymi, poza dwoma wyjątkami. Silne mapowania w rejonie od 49 do 57 nukleotydu sugerują motyw jednoniciowy w tym miejscu. Silne sygnały mapowania chemicznego znajdują się również w rejonie 152-156, co także wskazuje na jednoniciowy charakter tego miejsca. Analiza wszystkich fragmentów regulujących alternatywny splicing

eksonu 10 genu MAPT pokazała, że w zaproponowanej strukturze obejmują one wyodrębnione motywy strukturalne.

2.7. Udokładnianie struktury drugorzędowej fragmentu pre-mRNA genu MAPT zaproponowanej przez program vsfold5.

Dzięki uprzejmości profesora Davida Mathews'a oraz jego doktoranta, Stanislava Bellaousov'a (*Department of Biochemistry and Biophysics, University of Rochester, USA*), dane uzyskane z mapowania metodą SHAPE zostały wprowadzone do nowego programu *Shapeknots*, który niebawem będzie dostępny w pakiecie *RNAstructure*. Program ten pozwala na wyszukanie możliwych pseudowęzłów w cząsteczce RNA zgodne z wynikami mapowania SHAPE. Analiza w programie *Shapeknots* ujawniła możliwość powstania pseudowęzła pomiędzy rejonami 87-92 oraz 109-114 (Rysunek 34).

Ostateczna wersja struktury fragmentu pre-mRNA genu MAPT, zaproponowana na podstawie programów *vsfold5* i *Shapeknots*, jest zgodna z danymi ekperymentalnymi mapowań macierzowych i chemicznych. Oddalenie przestrzenne końca 5' i 3' wydaje się być poprawne, biorąc pod uwagę fakt, że fałdowanie badanej cząsteczki następuje równocześnie z powstawaniem transkryptu (37-40). Zaproponowana struktura drugorzędowa składa się z dziewięciu motywów spinek do włosów, przy czym spinki H4.1 i H4.2 oddziałują ze sobą tworząc motyw pseudowęzła. W cząsteczce RNA możemy wyróżnić cztery rejony jednoniciowe, pierwszy od 17 do 25 nukleotydu, drugi od 47 do 61 nukleotydu, trzeci od 103 do 108 nukleotydu oraz czwarty od 152 do 157 nukleotydu. Wszystkie wymienione fragmenty jednoniciowe posiadają wyraźne sygnały mapowań macierzowych lub chemicznych



Rysunek 34. Model struktury drugorzędowej fragmentu pre-mRNA genu *MAPT* z naniesionymi mapowaniami chemicznymi i mikromacierzowymi oraz z zaznaczonymi elementami regulującymi alternatywne składanie eksonu 10 białka *tau*. Czerwony kwadrat-silny sygnał hybrydyzacji do macierzy, zielony kwadrat-średni sygnał hybrydyzacji do macierzy, czarny okrąg-wysoka reaktywność SHAPE, szary okrąg-średnia reaktywność SHAPE, czarny kwadrat-wysoka reaktywność DMS, szary kwadrat-średnia reaktywność DMS. Fragment zaznaczony na czerwono to miejsce, z którym oddziałuje U1 snRNA. Mutacje wykorzystane w badaniach zaznaczone są na niebiesko, pozostałe na szaro.

Pseudowęzeł obejmujący rejon od 81 do 114 nukleotydu także ma potwierdzenie w uzyskanych danych eksperymentalnych. Rejony dwuniciowe tworzące ten motyw strukturalny, a mianowicie (81-84)-(99-104) oraz (87-92)-(109-114), oprócz jednego przypadku (chodzi o A111, która tworzy terminalną parę z G92; z różnych badań wiadomo, że niekanoniczne pary, zwłaszcza w pozycjach terminanych zachowują się inaczej niż kanoniczne pary w pozycjach wewnętrznych fragmentów helikalnych (199, 200)), nie posiadają sygnałów mapowań. Za to nukleotydy nie tworzące par zasad, występujące we fragmentach jednoniciowych pseudowęzła, posiadają liczne miejsca modyfikacji chemicznych i jedno miejsce wiązania się sondy macierzowej. Tylko w przypadku spinki H3 dziwi fakt braku mapowań chemicznych w rejonie pętli. Możemy także zauważyć wyodrębnienie strukturalne poszczególnych elementów regulujących alternatywne składanie eksonu 10 genu MAPT. Warto również zauważyć, że mutacje znajdujące się w elementach regulatorowych, a nie obejmujące spinki H6 znajdują się w rejonach jednoniciowych. Można wysnuć przypuszczenie, że mutacje te mogą zmieniać powinnowactwo czynników splicingowych do tych elementów.

2.8. Struktura trzeciorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT

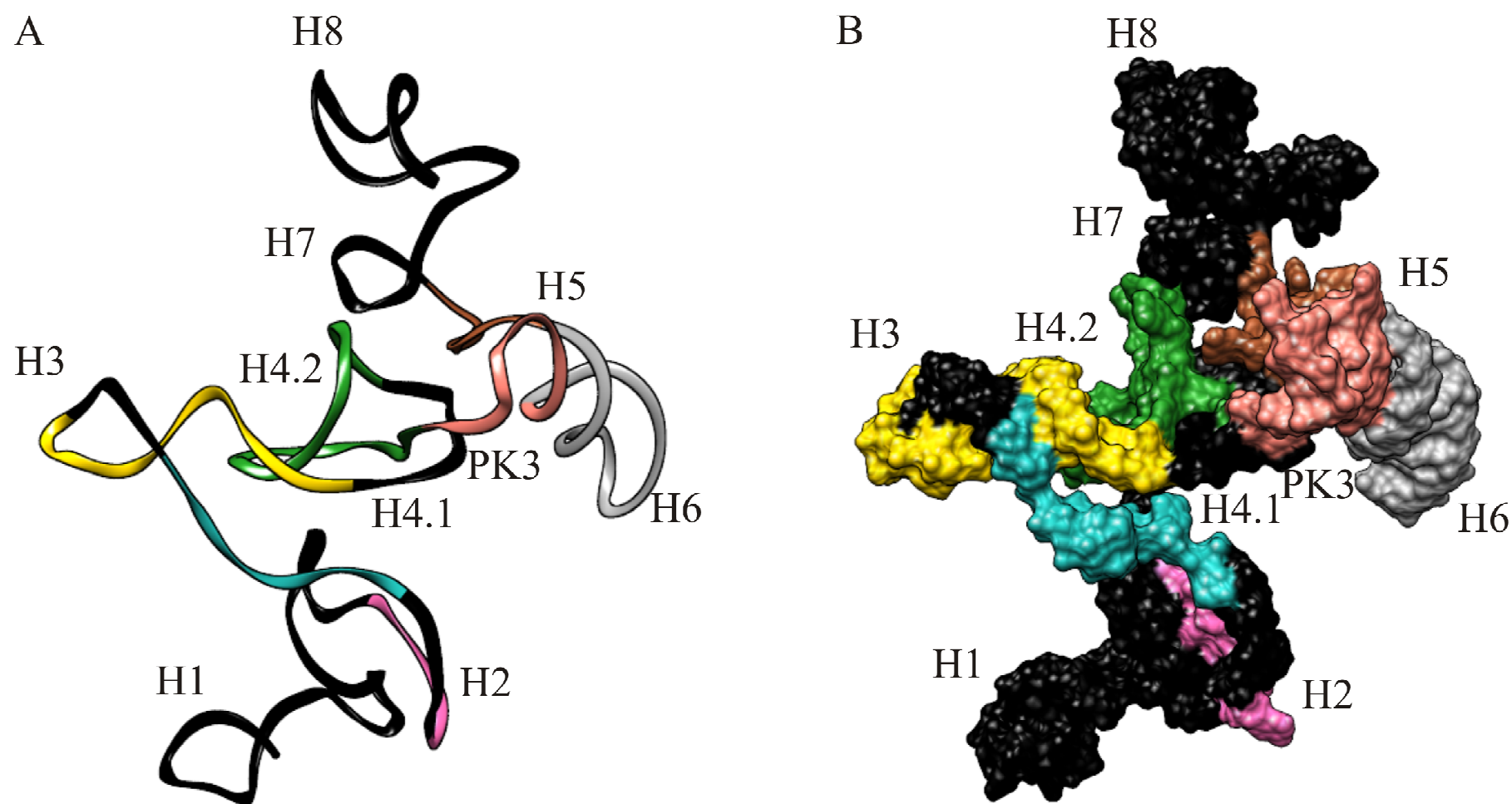
Struktura drugorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT pokazana na rysunku 34 jest zgodna z wynikami eksperymentalnymi mapowania izoenergetycznymi macierzami RNA oraz z mapowaniami chemicznymi (SHAPE i DMS). Modelowanie tej struktury drugorzędowej było możliwe dzięki zastosowaniu dwóch programów do przewidywania struktury drugorzędowej RNA, a mianowicie *vsfold5* i *Shapeknots*. Do sprawdzenia poprawności struktury drugorzędowej oraz dla uzyskania dodatkowych informacji o strukturze przeprowadzono modelowanie struktury trzeciorzędowej fragmentu pre-mRNA genu MAPT.

Program *RNAComposer* pozwala na w pełni automatyczne przewidywanie struktur trzeciorzędowych cząsteczek RNA o długości do 500 nukleotydów (201). Zasada działania tego programu polega na znalezieniu poszczególnych motywów strukturalnych w cząsteczce RNA, którą modeluje. Następnie, program porównuje wybrane motywy z homologicznymi strukturami dostępnymi w bazie danych oraz składa i dopasowuje strukturalnie całą badaną cząsteczkę RNA. Oznacza to, że wygenerowana struktura trzeciorzędowa oparta jest o

homologiczne motywy strukturalne RNA, których struktura została potwierdzona metodami krystalograficznymi lub za pomocą spektroskopii NMR.

Struktura trzeciorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT wygenerowana przez program *RNAComposer* została przedstawiona na rysunku 35. Całkowita energia uzyskanej struktury trzeciorzędowej ma wartość ujemną (rzędu -3500 kcal/mol) i jest optymalna dla tej długości cząsteczki RNA (201). Wygenerowana przez program *RNAComposer* struktura trzeciorzędowa, oparta o homologiczne struktury RNA występujące w bazie danych, świadczy o tym, że zaproponowana struktura drugorzędowa 194 nukleotydowego fragmentu pre-mRNA genu MAPT nie posiada drugorzędowych motywów strukturalnych, które uniemożliwiłyby cząsteczce uzyskanie optymalnej struktury trzeciorzędowej.

Oba modele trzeciorzędowe (wstążkowy i powierzchniowy) pokazują strukturę tego fragmentu RNA, jako strukturę zwartą w pewnych rejonach (takich, jak rejon otaczający spinkę regulatorową, pseudowęzeł PK3 oraz fragment od końca 5'), które połączone są jednoniciowymi regionami. Można także zauważyć rodzaj liniowego ułożenia się spinki regulatorowej H6, intronowego modulatora splicingu (ISM) oraz spinki H7. Zaproponowany model struktury trzeciorzędowej badanego fragmentu pre-mRNA pozwala po raz pierwszy dostrzec potencjalne miejsce dodatkowych oddziaływań trzeciorzędowych. Chodzi o możliwość oddziaływań rejonów 120-122 (5'GGG3') i 151-152 (5'CCC3'). Pierwszy fragment jest częścią pętli spinki H5 (eksonowy wzmacniacz splicingu, ESE), a drugi częścią intronowego modulatora splicingu (ISM) i graniczy bezpośrednio z trzonem spinki regulatorowej H6 (intronowy wyciszacz splicingu, ISS). Co prawda mapowanie mikromacierzowe wykazało wiązanie się sond oligonukleotydowych do rejonu 120-122, a mapowanie chemiczne dało sygnał dla C151 i C152, jakkolwiek, może dochodzić do oddziaływań między tymi rejonami przez inne niż kanoniczne parowanie G-C typu Watson'a-Crick'a lub przez oddziaływania innych grup funkcyjnych oraz przez wiązanie się kationów metali dwuwartościowych. Mogłoby to świadczyć o tym, że „jednoniciowość” intronowego modulatora splicingu (ISM) jest strukturalnie „chroniona” na etapach poprzedzających alternatywny splicing ze względu na jego ważną funkcję w regulacji tego procesu.



Rysunek 35. Struktura trzeciorzędowa 194 nukleotydowego fragmentu pre-mRNA genu MAPT wymodelowana przez program *RNAComposer* na podstawie eksperymentalnie określonej struktury drugorzędowej (A-model wstążkowy, B-model powierzchniowy). Kolorami zaznaczono elementy regulujące, działające w układzie *cis*: różowy-wzmacniacz SC35, niebieski-wzmacniacz polipurynowy PPE, żółty-wzmacniacz ACE, zielony-eksonowy wyciszacz splicingu ESES, łososiowy-eksonowy wzmacniacz splicingu ESE, szary-intronowy wyciszacz splicingu ISS, brązowy-intronowy modulator splicingu ISM.

Podsumowując, dwa programy do przewidywania struktur drugorzędowych pozwoliły na uzyskanie optymalnej struktury drugorzędowej pre-mRNA genu MAPT, zgodnej ze wszystkimi danymi eksperymentalnymi. Poza tym zaproponowana struktura drugorzędowa pozwalała na uzyskanie struktury trzeciorzędowej o optymalnej energii swobodnej.

3. Badanie alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT na liniach komórkowych cos-7

Technika *exon-trapping* na początku wykorzystywana była do identyfikacji eksonów w genomach u różnych organizmów (202). Polega ona na izolacji całkowitego RNA z komórek lub tkanek, następnie wykonuje się reakcję odwrotnej transkrypcji, a uzyskane cDNA liguje się do specjalnych wektorów umożliwiających zachodzenie procesu splicingu w liniach komórkowych.

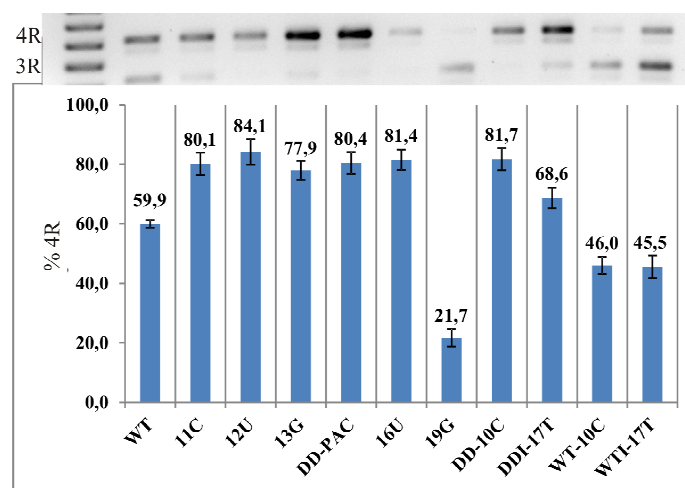
Jednym z popularnych wektorów *exon trapping* opartych na plazmidach jest pSPL3 i zmodyfikowana wersja pSPL3b (203, 204). Konstrukcja tych plazmidów opiera się na obecności dwóch eksonów, pomiędzy którymi znajduje się intron. Miejsce wielokrotnego klonowania MCS (ang. *multi cloning site*) znajduje się w rejonie intronu. W plazmidach typu pSPL3 eksony 1 i 2 to chimeryczne eksony β globuliny króliczej z odpowiednio 5' i 3' miejscem splicingowym *Tat* z transkryptu ludzkiego wirusa HIV. Pomiedzy tymi eksonami znajduje się intron *Tat* ludzkiego wirusa HIV. Ekspresje takiego konstruktu reguluje promotor SV40 (ang. *simian virus 40*). Za eksonem 2 znajduje się także sekwencja sygnałna poli(A) z tego wirusa. Elementy wirusowe są mocnymi sygnałami dla wszystkich cząsteczek biorących udział w składaniu genów.

Do oceny ilości poszczególnych wariantów powstałych w wyniku alternatywnego splicingu stosuje się trzy główne techniki: (i) hybrydyzację typu *northern* (ang. *northern blotting*), (ii) analizę ochrony przed rybonukleazami (ang. *RNAse protection assay*) oraz (iii) analizę opartą na reakcji PCR (ang. *polymerase chain reaction*). Dwie pierwsze metody obarczone są niestety wieloma mankamentami, z których główne to: brak czułości, długi czas eksperymentu i trudności w detekcji małych ilości transkryptu. Natomiast metoda RT-PCR (ang. *reverse transcription and polymerase chain reaction*) jest bardzo uniwersalna i czuła. Za pomocą dwóch starterów pozwala ona na łatwą analizę produktów powstałych w wyniku alternatywnego splicingu. Metoda RT-PCR wraz z rozdziałem produktów na żelu agarozowym z bromkiem etydydy jest szeroko stosowaną techniką do oceny ilościowej transkryptów powstałych w wyniku alternatywnego składania genów (205, 206).

3.1. Ocena ilościowa wpływu badanych mutacji na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT

Wszystkie jedenaście fragmentów pre-mRNA genu MAPT stosowanych w analizie struktury drugorzędowej RNA zostało wklonowanych do plazmidu pSPL3b. Obecność mutacji w rejonie regulatorowej spinki 11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, 19G, DD-10C, DDI-17T, WT-10C oraz WTI-17T została potwierdzona przez sekwencjonowanie. Tak przygotowane konstrukty posłużyły do transfekcji linii komórkowej *cos-7*. Po 24 godzinach izolowano całkowite RNA i wykonano reakcję odwrotnej transkrypcji. Następnie przeprowadzono reakcję PCR ze starterami wiążącymi się do konstytutywnych eksonów w plazmidzie pSPL3b i rozdzielano produkty na 2% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny. Do analizy ilościowej wykorzystano program *Mutli Gauge V3.0*.

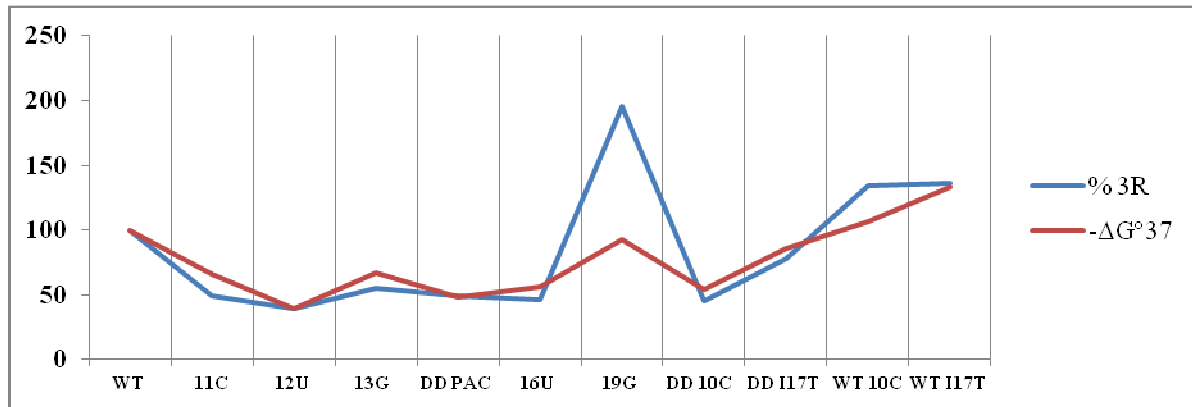
Analiza *exon-trapping* pozwoliła uwidocznić zmiany w ilości izoformy 3R i 4R białka tau spowodowanej obecnością mutacji w regulatorowej spince (Rysunek 36).



Rysunek 36. Analiza ilościowa izoform 3R i 4R białka tau.

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi i danymi uzyskanymi w eksperymentach topnień UV. Mutacje, które powodują wzrost procentowy izoformy 4R to 11C ($\Delta\%4R=20,2\%$), 12U ($\Delta\%4R=24,2\%$), 13G ($\Delta\%4R=18\%$), DD-PAC ($\Delta\%4R=20,5\%$), 16U ($\Delta\%4R=21,5\%$), DD-10C ($\Delta\%4R=21,8\%$) oraz DDI-17T ($\Delta\%4R=8,7\%$). Mutacje, które powodowały obniżenie ilości izoformy 4R w stosunku do formy dzikiej to 19G ($\Delta\%4R=38,2\%$), WT-10C ($\Delta\%4R=13,9\%$) oraz WTI-17T ($\Delta\%4R=14,4\%$). Eksperymenty na liniach komórkowych *cos-7* udowodniły, że badany fragment fałduje się w sposób poprawny i

jest wystarczający do prawidłowego składania eksonu 10 białka *tau*. Dane o procentowym stosunku izoformy 3R i 4R porównano z danymi pochodzącymi z topnień UV. Wartości danych porównano do wartości dla formy dzikiej, gdzie WT ΔG°_{37} i WT %3R = 100% (Rysunek 37).



Rysunek 37. Porównanie danych z topnień UV spinki regulatorowej w danym mutancie oraz eksperymentów na liniach komórkowych *cos-7* mających na celu określenie ilości izoformy 3R białka *tau*.

Z przedstawionego wykresu doskonale widać zależność pomiędzy stabilnością regulatorowej spinki, a ilością powstających izoform białka *tau*. Obniżenie stabilności termodynamicznej regulatorowej spinki prowadzi do zmniejszenia ilości izoformy 3R białka *tau*, czyli 5' miejsce splicingowe za eksonem 10 jest bardziej dostępne dla cząsteczki U1 snRNP. Mechanizm zwiększonej dostępności miejsca akceptorowego może mieć charakter bezpośredni, co oznacza, że stabilność spinki wpływa na wiązanie się cząsteczki U1 snRNP lub zmienia powinowactwo czynników splicingowych do tego miejsca. Jedynym wynikiem porównania energii swobodnej i ilości procentowej 3R, który różni się od pozostałych jest mutant 19G. Widać brak zależności pomiędzy stabilnością spinki, a ilością izoformy 3R. Energia swobodna cząsteczki 19G porównywalna jest z tą dla formy dzikiej, natomiast widać wyraźną blokadę 5' miejsca splicingowego, przez co w przewodzie jest izoforma 3R. Mutacja 19G nie wpływa na stabilność motywu spinki do włosów, ale powoduje zwiększenie ilości izoformy 3R białka *tau*. Analiza tak wielu mutantów pozwoliła stwierdzić, że wykorzystanie 5' miejsca splicingowego jest zależne od stabilności termodynamicznej motywu (spinki RNA), w jakim znajduje się to miejsce. Posłużenie się mutantami sztucznymi, niewystępującymi w chorobie FTDP-17, czyli mutantami DD-10C, DDI-17T, WT-10C oraz WTI-17T ostatecznie udowodniło, że zmiany sekwencyjne w obrębie spinki nie mają wpływu na regulację alternatywnego składania eksonu 10 genu *MAPT*. Przykładem tego

jest cząsteczka z mutacją DDI-17T, która zawiera destabilizującą mutację DD-PAC oraz stabilizującą insercję U w pozycji 17. Energia swobodna tej cząsteczki była porównywalna do formy dzikiej, także wynik ilościowy izoform 3R i 4R jest podobny do cząsteczki WT.

3.2. Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT z zastosowaniem niskocząsteczkowych ligandów

Do badań nad wpływem niskocząsteczkowych ligandów na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT wybrano te same antybiotyki, które zostały użyte w eksperymentach topnień UV. Komórki *cos-7* transfekowano plazmidem pSPL3b zawierającym inserty z sekwencją formy dzikiej i mutantami destabilizującymi występującymi w chorobie FTDP-17, czyli mutacjami: 11C, 12U, 13G, DD-PAC oraz 16U. Po transfekcji w medium hodowlanym znajdowały się tylko badane antybiotyki w różnych stężeniach, a mianowicie: 50 μ M, 0,1 mM, 0,5 mM, 5 mM oraz 10 mM. Po 24 godzinach izolowano całkowite RNA i przeprowadzano analizę za pomocą RT-PCR. Produkty rozdzielano na 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny, a analizę ilościową wykonano przy pomocy programu *Mutli Gauge V3.0*. Niestety, w przypadku zastosowania mitoksantronu we wszystkich badanych cząsteczkach nie uzyskano żadnych produktów w analizie RT-PCR. Związek ten nie wpływał na wzrost komórek; wydaje się, że mógł inhibować proces transfekcji. Dlatego wyniki przedstawione poniżej obejmują trzy antybiotyki neomycynę, kanamycynę oraz tobramycynę (Tabela 7).

W każdym zaobserwowanym przypadku wybrane antybiotyki wpływały na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT. Widać, że wraz ze wzrostem stężenia niskocząsteczkowego ligandu obniża się ilość izoformy 4R białka *tau*. Jest to kolejny dowód na to, że regulacja alternatywnego składania eksonu 10 białka *tau* opiera się o stabilność termodynamiczną regulatorowej spinki. Warto dodać, że w przypadku cząsteczki WT również można zaobserwować różnice w stosunku izoform 3R i 4R.

W przypadku cząsteczki z mutacją 11C zmiana ilości izoformy 4R wywołana obecnością neomycyny wahała się od 4,8 do 12,8 %, kanamycyny od 1,6 do 8,0 %, tobramycyny od 8,7 do 20,5 %. W tym przypadku najlepszym antybiotykiem okazała się tobramycyna, gdzie w przypadku stężenia 5 mM i 10 mM różnica w ilości izoformy 4R w stosunku do formy dzikiej różniła się tylko o 1,3% i 0,3%.

Tabela 7. Analiza w liniach komórkowych *cos-7* ilości izoformy 4R białka *tau* indukowanych antybiotykami.

Nazwa	% 4R	$\Delta\%4R$	%4R -WT %4R	Nazwa	% 4R	$\Delta\%4R$	%4R -WT %4R
11C	80,1 ± 3,8	0,0	20,2	DD-PAC	80,4 ± 3,7	0,0	20,5
NEO 0,005 mM	75,3 ± 2,2	4,8	15,4	NEO 0,005 mM	79,5 ± 4,3	0,9	19,6
NEO 0,1 mM	72,9 ± 3,7	7,1	13,0	NEO 0,1 mM	72,6 ± 2,8	7,8	12,7
NEO 0,5 mM	70,2 ± 3,0	9,9	10,3	NEO 0,5 mM	71,1 ± 2,1	9,3	11,2
NEO 5 mM	70,3 ± 2,5	9,8	10,4	NEO 5 mM	70,3 ± 4,6	10,1	10,4
NEO 10 mM	67,2 ± 1,9	12,8	7,3	NEO 10 mM	65,3 ± 2,0	15,1	5,4
KAN 0,005mM	78,5 ± 1,6	1,6	18,6	KAN 0,005mM	70,8 ± 2,6	9,6	10,9
KAN 0,1mM	77,1 ± 2,1	2,9	17,2	KAN 0,1mM	64,8 ± 3,5	15,6	4,9
KAN 0,5mM	72,1 ± 3,1	8,0	12,2	KAN 0,5mM	63,7 ± 3,4	16,7	3,8
KAN 5mM	72,6 ± 1,0	7,4	12,7	KAN 5mM	63,7 ± 0,5	16,7	3,8
KAN 10mM	72,0 ± 2,7	8,0	12,1	KAN 10mM	61,6 ± 2,0	18,8	1,7
TOB 0,005 mM	71,3 ± 3,2	8,7	11,4	TOB 0,005 mM	76,3 ± 1,9	4,2	16,4
TOB 0,1 mM	68,8 ± 3,4	11,3	8,9	TOB 0,1 mM	72,1 ± 3,6	8,3	12,2
TOB 0,5 mM	68,8 ± 2,2	11,3	8,9	TOB 0,5 mM	70,6 ± 3,5	9,9	10,7
TOB 5 mM	61,2 ± 2,8	18,9	1,3	TOB 5 mM	65,9 ± 3,8	14,5	6,0
TOB 10 mM	59,6 ± 3,2	20,5	-0,3	TOB 10 mM	59,8 ± 2,9	20,6	-0,1
12U	84,1 ± 4,3	0,0	24,2	16U	81,4 ± 3,4	0,0	21,5
NEO 0,005 mM	84,2 ± 3,1	-0,1	24,3	NEO 0,005 mM	76,3 ± 2,0	5,1	16,4
NEO 0,1 mM	69,6 ± 5,4	14,5	9,7	NEO 0,1 mM	65,8 ± 3,7	15,6	5,9
NEO 0,5 mM	67,5 ± 5,2	16,6	7,6	NEO 0,5 mM	64,2 ± 1,9	17,3	4,3
NEO 5 mM	63,8 ± 4,2	20,3	3,9	NEO 5 mM	63,0 ± 3,0	18,5	3,1
NEO 10 mM	62,4 ± 2,1	21,7	2,5	NEO 10 mM	58,5 ± 3,4	22,9	-1,4
KAN 0,005mM	84,3 ± 2,4	-0,2	24,4	KAN 0,005mM	81,0 ± 2,1	0,5	21,0
KAN 0,1mM	66,3 ± 1,0	17,9	6,4	KAN 0,1mM	77,8 ± 1,7	3,7	17,9
KAN 0,5mM	65,8 ± 3,9	18,3	5,9	KAN 0,5mM	76,6 ± 1,9	4,9	16,7
KAN 5mM	64,0 ± 0,9	20,1	4,1	KAN 5mM	76,3 ± 3,0	5,2	16,4
KAN 10mM	60,1 ± 1,7	24,0	0,2	KAN 10mM	74,3 ± 1,8	7,2	14,4
TOB 0,005 mM	79,9 ± 3,2	4,2	20,0	TOB 0,005 mM	77,8 ± 1,5	3,6	17,9
TOB 0,1 mM	66,1 ± 2,1	18,0	6,2	TOB 0,1 mM	77,2 ± 2,7	4,2	17,3
TOB 0,5 mM	64,8 ± 2,4	19,3	4,9	TOB 0,5 mM	68,4 ± 2,6	13,0	8,5
TOB 5 mM	56,1 ± 1,0	28,0	-3,8	TOB 5 mM	61,6 ± 1,5	19,9	1,7
TOB 10 mM	55,5 ± 2,3	28,6	-4,4	TOB 10 mM	58,4 ± 1,9	23,1	-1,5
13G	77,9 ± 3,2	0,0	18,0	WT	59,9 ± 1,3	0,0	0,0
NEO 0,005 mM	76,3 ± 3,1	1,6	16,4	NEO 0,005 mM	59,6 ± 2,5	0,3	-0,3
NEO 0,1 mM	72,8 ± 5,1	5,1	12,9	NEO 0,1 mM	58,5 ± 1,7	1,4	-1,4
NEO 0,5 mM	68,7 ± 2,8	9,2	8,8	NEO 0,5 mM	49,5 ± 1,6	10,5	-10,5
NEO 5 mM	67,5 ± 3,2	10,4	7,6	NEO 5 mM	48,5 ± 2,6	11,5	-11,5
NEO 10 mM	59,4 ± 4,9	18,5	-0,5	NEO 10 mM	43,9 ± 2,4	16,0	-16,0
KAN 0,005 mM	76,3 ± 3,0	1,6	16,4	KAN 0,005 mM	58,6 ± 3,4	1,3	-1,3
KAN 0,1 mM	74,0 ± 2,8	4,0	14,1	KAN 0,1 mM	52,4 ± 3,9	7,5	-7,5
KAN 0,5 mM	73,3 ± 2,2	4,6	13,4	KAN 0,5 mM	51,5 ± 2,1	8,4	-8,4
KAN 5 mM	72,6 ± 2,7	5,3	12,7	KAN 5 mM	51,0 ± 2,2	8,9	-8,9
KAN 10 mM	68,3 ± 3,2	9,6	8,4	KAN 10 mM	48,3 ± 2,3	11,6	-11,6
TOB 0,005 mM	71,3 ± 3,1	6,6	11,4	TOB 0,005 mM	56,4 ± 2,4	3,5	-3,5
TOB 0,1 mM	65,3 ± 3,0	12,7	5,4	TOB 0,1 mM	54,6 ± 2,7	5,3	-5,3
TOB 0,5 mM	65,3 ± 2,3	12,6	5,4	TOB 0,5 mM	54,1 ± 2,5	5,8	-5,8
TOB 5 mM	57,1 ± 3,8	20,8	-2,8	TOB 5 mM	31,5 ± 2,9	28,4	-28,4
TOB 10 mM	53,1 ± 2,1	24,9	-6,9	TOB 10 mM	29,5 ± 2,6	30,4	-30,4

Wszystkie antybiotyki od stężenia 0,1 mM wyraźnie zmniejszały ilość izoformy 4R w przypadku cząsteczki z mutacją 12U. Różnica w ilości izoformy 4R wywołana obecnością neomycyny wyniosła -0,1-21,7%, kanamycyny -0,2-24,0% i tobramycyny 4,2-28,6%. Największą zmianę ilości 4R możemy zaobserwować przy 10 mM tobramycynie, jednak różnica w stosunku do formy dzikiej wynosi 4,4%. Kanamycyna w stężeniu 10 mM skutkowała zmianą ilości izoform 3R i 4R do zbliżonego poziomu, co w przypadku WT ($\Delta\%4R=0,2\%$).

Dla cząsteczki z mutacją 13G różnica w ilości izoformy 4R wyniosła w przypadku neomycyny 1,6-18,5%, kanamycyny 1,6-9,6% oraz tobramycyny 6,6-24,9%. Optymalny efekt stabilizacyjny został uzyskany dla neomycyny o stężeniu 10 mM ($\Delta\%4R=0,5\%$).

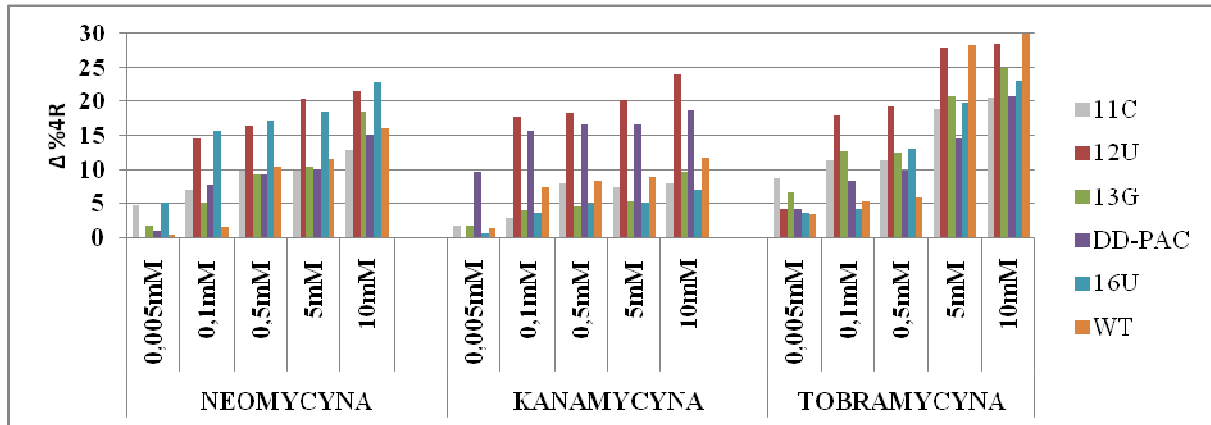
W przypadku mutacji DD-PAC wzrost transkryptów z eksonem 10 został zmniejszony dzięki neomycynie w granicach 0,9-15,1%, kanamycynie 9,6-18,8% i tobramycynie 4,2-20,6%. Najbardziej zbliżona ilość izoformy 4R w stosunku do formy dzikiej uzyskano w przypadku 10 mM tobramycyny ($\Delta\%4R=0,1\%$).

Ostatnią cząsteczką z mutacją destabilizującą była cząsteczka 16U. Zmniejszenie ilości izoformy 4R w przypadku 16U wyniosło dla neomycyny 5,1-22,9%, dla kanamycyny 0,5-7,2% oraz dla tobramycyny 3,6-23,0%. Zbliżony do formy dzikiej stosunek izoform 3R/4R został zaobserwowany w przypadku 10 mM neomycyny ($\Delta\%4R=1,4\%$) oraz 5 mM i 10 mM tobramycyny ($\Delta\%4R=1,7\%$ i $1,5\%$).

Zastosowane w eksperymentach antybiotyki wpływały także na alternatywny splicing cząsteczki z sekwencją dla formy dzikiej. W tym przypadku także możemy zaobserwować zmniejszenie się ilości izoformy 4R dla neomycyny 0,3-16%, dla kanamycyny 1,3-11,6% oraz dla tobramycyny 3,5-30,4%.

Badania na liniach komórkowych *cos-7* pokazały, że ligandy niskocząsteczkowe mogą regulować alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT. Poziom stabilizacji motywu spinkowego jest zależny od stężenia antybiotyku i rośnie wraz z jego ilością. Największą zmianę ilości izoformy 4R uzyskano w eksperymentach z tobramycyną, co dziwi, ponieważ antybiotyk ten w eksperymentach topnień UV najmniej stabilizował badaną spinę. Analiza wpływu poszczególnych antybiotyków na wszystkie badane cząsteczki ujawniła, że ligandy niskocząsteczkowe preferencyjnie stabilizowały poszczególne mutanty (Rysunek 38). W przypadku neomycyny widać wyraźny większy spadek ilości izoformy 4R białka *tau* dla

cząsteczek 12U i 16U. Kanamycyna najbardziej wpływała na ilość izoform białka *tau* w przypadku cząsteczek 12U i DD-PAC. Natomiast największą redukcję transkryptu z eksonem 10 w eksperymentach z tobramycyną zaobserwowano dla cząsteczek 12U i WT.



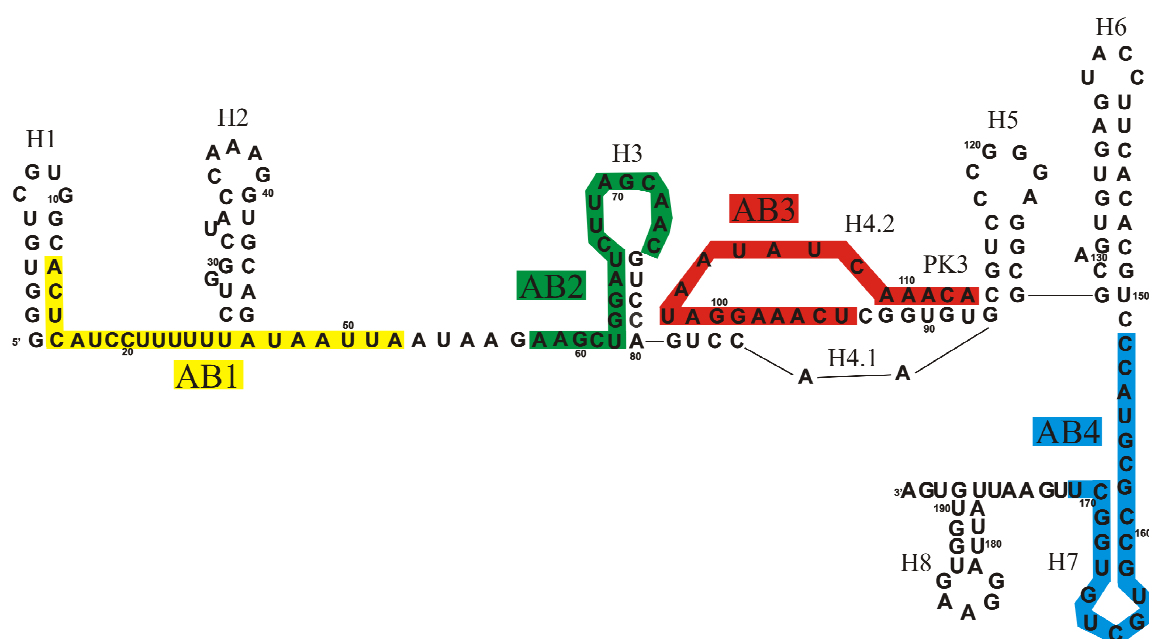
Rysunek 38. Wpływ niskocząsteczkowych ligandów na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT.

3.3. Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT z zastosowaniem oligonukleotydów antysensowych

Badania na liniach komórkowych *cos-7* z zastosowaniem niskocząsteczkowych ligandów udowodniły, że możliwa jest regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 przez wzrost stabilności regulatorowej spinki. W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić czy efekt wywołany mutacjami 11C, 12U, 13G, DD-PAC oraz 16U można zniwelować przez oddziaływanie z pozostałymi elementami regulującymi splicing eksonu 10 białka tau.

Oligonukleotydy antysensowe ASO (ang. *antisense oligonucleotide*) są powszechnie stosowanym narzędziem w biologii molekularnej. W badaniach nad alternatywnym splicingiem mogą być wykorzystywane do badania elementów regulatorowych wpływających na splicing. Szacuje się, że około 15-50% mutacji powodujących choroby u ludzi prowadzi do zmian w alternatywnym splicingu (207). Wykonano szereg badań nad takimi chorobami wykorzystując oligonukleotydy antysensowe. ASO mogą być użyte do niwelowania dodatkowych miejsc splicingowych powstałych w wyniku mutacji. Dodatkowo prowadzone są badania nad zastosowaniem ASO do przywrócenia poprawnej ramki odczytu w zmutowanym transkrypcie lub wyłączeniem danego genu przez zmianę ramki odczytu (208-211).

Do regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 wybrano cztery oligonukleotydy antysensowe, które wiązały się do różnych rejonów badanego fragmentu pre-mRNA, jak zaznaczono to na rysunku 39. ASO były wprowadzane do komórek *cos-7* razem z odpowiednim plazmidem pSPL3b i po 24 godzinach wykonano izolację całkowitego RNA. Reakcja RT-PCR wraz z rozdzieleniem produktów na 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny pozwoliła na ocenę ilościową izoformy 3R i 4R za pomocą programu *Mutli Gauge V3.0*. Antysensowe oligonukleotydy zostały wprowadzone do komórek w jednym stężeniu wynoszącym 20 pmol na dołek w płytce 24 dołkowej. Uzyskane wyniki przedstawione są w tabeli 8.



Rysunek 39. Rejony we fragmencie pre-mRNA genu MAPT, z którymi oddziałują oligonukleotydy antysensowe AB1, AB2, AB3 oraz AB4.

Regulacja alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT za pomocą oligonukleotydów antysensowych pozwoliła na redukcję ilości izoformy 4R, chociaż różnica wahała się w przedziale od -5,3 do 19%. W przypadku cząsteczki z mutacją 13G zastosowanie antysensu AB1 spowodowało zwiększoną ilość izoformy 4R. Dla cząsteczki 11C najlepszy efekt regulacyjny zaobserwowano w przypadku antysensów AB2, AB3, AB4, dla których spadek 4R wyniósł odpowiednio 11,9%, 13,0%, 12,6%. Dla mutantu 12U obserwowano podobny rezultat, przy czym oligonukleotyd AB3 spowodował największy spadek ilości izoformy 4R, o 19%.

Tabela 8. Analiza w liniach komórkowych *cos-7* ilości izoformy 4R białka *tau* z antysensowymi oligonukleotydami.

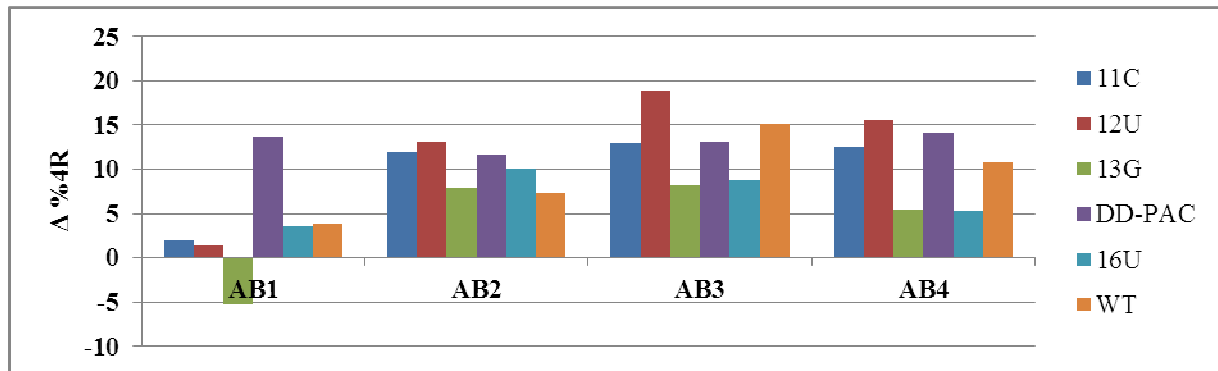
Nazwa	%4R	$\Delta\%$ 4R	$\Delta\%$ 4R - WT $\Delta\%$ 4R	Nazwa	%4R	$\Delta\%$ 4R	$\Delta\%$ 4R - WT $\Delta\%$ 4R
11C	80,1 ± 3,8	0,0	20,2	DD-PAC	80,4 ± 3,7	0,0	20,5
AB1	78,2 ± 1,7	1,9	18,3	AB1	66,7 ± 0,8	13,7	6,8
AB2	68,2 ± 4,8	11,9	8,3	AB2	68,8 ± 6,8	11,7	8,9
AB3	67,1 ± 5,2	13,0	7,2	AB3	67,3 ± 7,7	13,1	7,4
AB4	67,5 ± 2,3	12,6	7,6	AB4	66,3 ± 1,2	14,2	6,4
12U	84,1 ± 4,3	0,0	24,2	16U	81,5 ± 3,4	0,0	21,5
AB1	82,8 ± 2,1	1,3	22,9	AB1	77,9 ± 3,7	3,5	18,0
AB2	71,0 ± 1,2	13,1	11,1	AB2	71,4 ± 1,1	10,0	11,5
AB3	65,2 ± 1,4	19,0	5,3	AB3	72,7 ± 1,4	8,7	12,8
AB4	68,6 ± 5,4	15,5	8,7	AB4	76,2 ± 2,5	5,3	16,3
13G	78,0 ± 3,2	0,0	18,0	WT	59,9 ± 1,3	0,0	0,0
AB1	83,3 ± 1,4	-5,3	23,4	AB1	56,1 ± 1,4	3,8	-3,8
AB2	70,0 ± 1,0	7,9	10,1	AB2	52,6 ± 2,5	7,3	-7,3
AB3	69,8 ± 4,2	8,2	9,9	AB3	44,7 ± 5,3	15,2	-15,2
AB4	72,5 ± 2,1	5,4	12,6	AB4	49,2 ± 0,6	10,7	-10,7

Najmniejszy efekt regulacyjny zaobserwowano w przypadku cząsteczki z mutacją 13G, gdzie największą redukcję izoformy 4R, wynoszącą 8,2% zaobserwowano dla AB3. Podobny efekt regulacyjny dla wszystkich antysensów możemy zaobserwować dla cząsteczki z mutacją DD-PAC. Skutki mutacji 16U zostały zniwelowane najlepiej przez AB2, redukując ilość izoformy 4R o 10%. Oligonukleotydy antysensowe wpłynęły również na alternatywny splicing eksonu 10 z sekwencją dla formy dzikiej powodując spadek izoformy 4R o 3,8% dla AB1, 7,3% dla AB2, 15,2% dla AB3 oraz 10,7% dla AB4.

Analiza wpływu poszczególnych antysensów na badane cząsteczki pokazała, że najslabiej działającym oligonukleotydem antysensowym był AB1 (Rysunek 40). Poza cząsteczką DD-PAC słabo wpływał na ilość izoformy 4R, a w przypadku cząsteczki 13G spowodował wzrost 4R. Tak jak w przypadku antybiotyków, poziom regulacji z zastosowaniem oligonukleotydów był zależny od występującej mutacji.

Różnice w alternatywnym splicingu eksonu 10 genu MAPT wywołane ligandami niskocząsteczkowymi są rezultatem zmian w stabilności termodynamicznej regulatorowej spinki. Neomycyna, kanamycyna, tobramycyna oddziałują z dużą bruzdą przez oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami aminowymi antybiotyku, a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi w spince RNA (179). Mitoksantron interkaluje pomiędzy nukleotydy tworzące trzon badanej spinki (178). Ligandy

niskocząsteczkowe niwelują efekt destabilizacyjny wywołany przez mutacje, ale nie zmieniają struktury drugorzędowej badanego fragmentu pre-mRNA genu MAPT.



Rysunek 40. Wpływ oligonukleotydów antysensowych na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT.

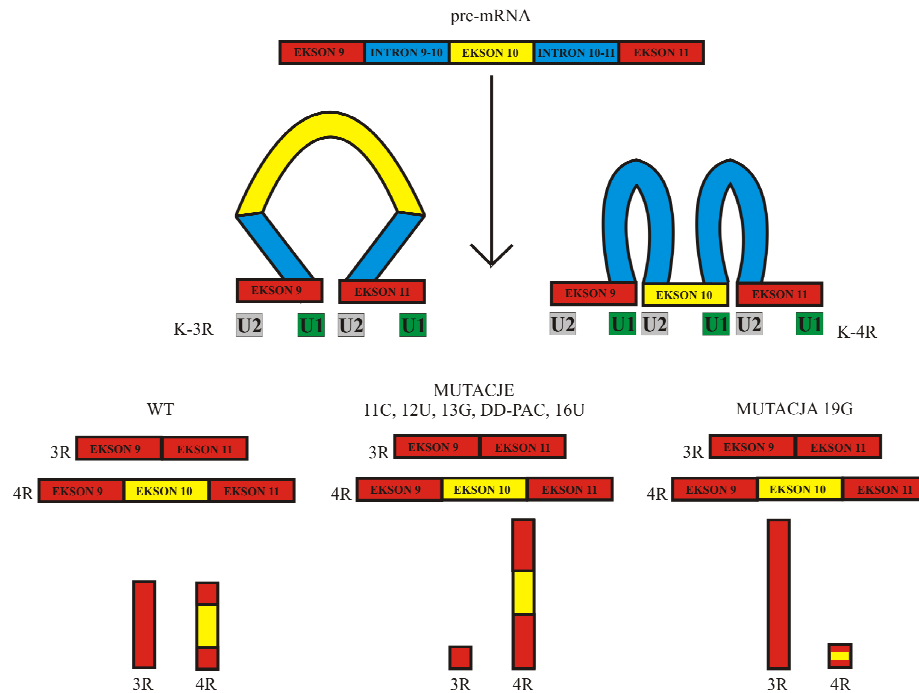
Oligonukleotydy antysensowe były skierowane na cztery różne rejony regulujące alternatywny splicing eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT. Wyciszanie splicingu eksonu 10 nie powinno być całkowite, ponieważ występowanie u ludzi tylko izoformy 3R prowadzi także do stanu patologicznego, dlatego postanowiono, że regulatorowa spinka nie będzie celem dla oligonukleotydów antysensowych. Pierwszy ASO AB1 oddziaływał z fragmentem zawierającym wzmacniacz SC35. Ze wszystkich oligonukleotydów antysensowych najgorzej regulował alternatywne składanie eksonu 10; wyjątek stanowi cząsteczka DD-PAC. Drugi ASO AB2 wiązał się do dwóch wzmacniaczy splicingu PPE i ACE. Widać porównywalne wartości zmiany ilości izoformy 4R dla wszystkich badanych mutantów. AB2 przez wiązanie się do motywu spinkowego mógł zmienić jego strukturę drugorzędową i utrudniać rozpoznanie tych rejonów przez czynniki białkowe. Oligonukleotyd AB4 oddziaływał z fragmentem ISM, która jest wzmacniaczem splicingu dla motywu spinkowego. ASO AB4 także zmieniał alternatywny splicing eksonu 10, lecz zmiany te były zależne od badanego RNA. Oprócz rejonu ISM oligonukleotyd AB4 oddziaływał ze spinką H7 i prawdopodobnie zaburzał jej strukturę. Najciekawszym przypadkiem jest oligonukleotyd antysensowy AB3, który został zaprojektowany jako kontrola do wzmocnienia splicingu eksonu 10. Oddziaływał on z eksonowym wyciszaczem ESS i w ten sposób powinien blokować wiązanie się do tego rejonu czynników białkowych. W konsekwencji powinien wzmacniać alternatywne składanie eksonu 10 genu MAPT i prowadzić do powstawania większej ilości izoformy 4R. Uzyskane wyniki nie potwierdzają jednak tej hipotezy. Tak jak wcześniej opisane ASO, AB3 także powodował zmniejszenie ilości izoformy 4R w komórkach *cos-7*.

4. Proponowany model regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT

Wyniki przedstawione w powyższej rozprawie doktorskiej pozwoliły na zaproponowanie nowego modelu regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT. Model ten opiera się na własnych badaniach termodynamicznych, strukturalnych oraz biologicznych prowadzonych na liniach komórkowych z udziałem fragmentu pre-mRNA genu MAPT. Dodatkowo, model poparty jest wieloma doniesieniami literaturowymi dotyczącymi różnych czynników determinujących przebieg alternatywnego splicingu pre-mRNA genu MAPT.

Alternatywne składanie genu polega na tworzeniu się dwóch lub więcej izoform białka z jednego pre-mRNA. Często powstawanie różnych izoform białka ma charakter tkankowo specyficzny (70). W przypadku izoform 3R i 4R białka *tau*, obie syntetyzowane są równocześnie w tkance nerwowej. Kluczowym aspektem w opisywanym przypadku jest ilość tworzących się izoform białka *tau*, co sugeruje, że składniki spliceosomu i czynniki regulujące proces splicingu oddziałują z pre-mRNA w sposób dynamiczny. Musi istnieć pewna dynamiczna równowaga pomiędzy kompleksem utworzonym przez czynniki regulujące splicing, które rozpoznały alternatywne miejsca splicingowe, a kompleksem, który pominął to miejsce. Taka sytuacja musi mieć miejsce w pre-mRNA genu MAPT, w którym zaburzenie tej dynamicznej równowagi prowadzi do zmiany ilości izoform 3R i 4R białka *tau*, co determinuje rozwój FTDP-17. Dla ułatwienia dalszej dyskusji powstające kompleksy można nazwać K-3R i K-4R i oznacza to, że pierwszy z nich prowadzi do powstania jedynie izoformy 3R białka *tau*, a drugi izoformy 4R. Ten sam kompleks nie może tworzyć się równocześnie (Rysunek 41).

W zależności od tego, którego z kompleksów w komórce powstanie więcej, skutkuje to zwiększeniem ilości izoformy 3R lub 4R. Należy przypuszczać, że równoczesne tworzenie się kompleksów K-3R i K-4R ma charakter dynamiczny. Oddziaływanie tych kompleksów z pre-mRNA i ich dynamiczna równowaga może być kontrolowana termodynamicznie lub kinetycznie.



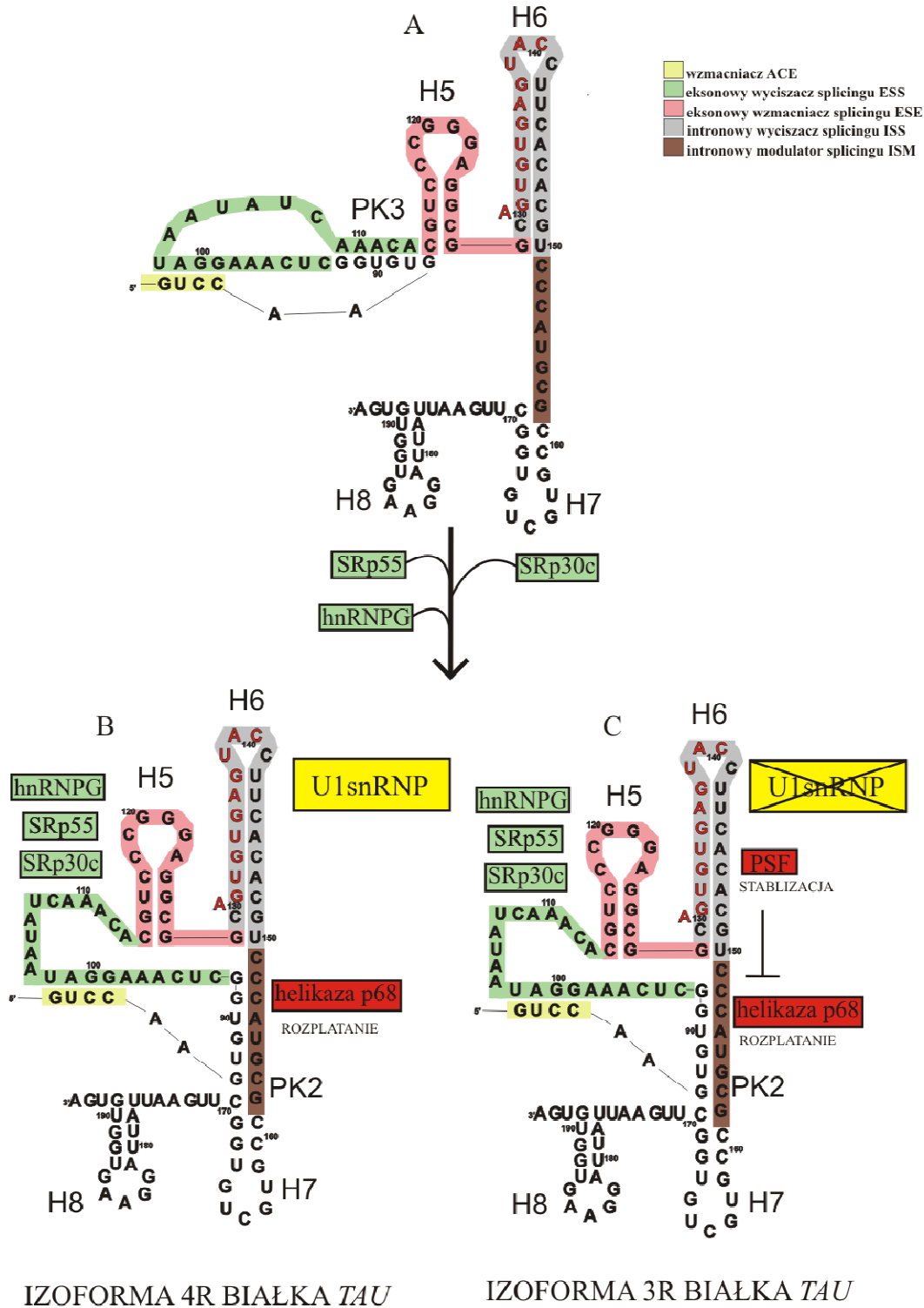
Rysunek 41. Schemat alternatywnego składania eksonu 10 białka genu MAPT w przypadku formy dzikiej (WT), mutacji destabilizujących regulatorową spinę (11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U) oraz mutacji 19G.

O równowadze obu kompleksów decyduje struktura i sekwencja fragmentów obejmujących miejsca splicingowe oraz elementów regulujących splicing działających w układzie *cis*, co determinuje oddziaływanie tych rejonów ze składnikami spliceosomu i z czynnikami splicingowymi. Informacje na temat czynników splicingowych mających wpływ na alternatywne składanie eksonu 10 białka *tau*, zostały przedstawione w części literaturowej. Dotychczasowa wiedza o strukturze drugorzędowej pre-mRNA genu MAPT w rejonie eksonu 10 ograniczała się głównie do spinki zawierającej 5; miejsce splicingowe. W przedstawionej pracy doktorskiej po raz pierwszy określono strukturę drugorzędową 194/195 nukleotydowego fragmentu formy dzikiej i 10 mutantów pre-mRNA genu MAPT. Znajomość struktury drugorzędowej tego fragmentu, wyniki badań własnych dotyczące regulacji alternatywnego splicingu, wyniki badań opublikowane przez inne grupy badawcze oraz ogólna wiedza o procesie regulacji alternatywnego splicingu innych pre-mRNA pozwoliła na zaproponowanie hipotetycznego modelu regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT.

Model regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 opiera się o strukturę drugorzędową 194/195 nukleotydowego fragmentu przedstawioną na rysunku 34. Jak

wspomniano wcześniej, jego struktura drugorzędowa osadza się na wynikach mapowań chemicznych oraz mikromacierzowych i została wsparta programami *vsfold5* i *Shap knots*. Badany fragment pre-mRNA genu MAPT w czasie transkrypcji przybiera zaproponowaną strukturę drugorzędową (Rysunek 34). Na rysunku 42-A przedstawiony jest fragment zaproponowanej struktury obejmujący rejon z 5' miejscem splicingowym. Postuluje się, że do eksonowego wyciszacza splicingu (ESS) przyłączają się cząsteczki SRp55, SRp30c oraz hnRNPG (jedna lub kilka) (169), co powoduje rearanżację struktury pseudowęzła PK3 i utworzenie się pseudowęzła PK2. W wyniku takiej rearanżacji rejon intronowego modulatora splicingu (ISM) przybiera formę dwuniciową. Aby cząsteczka U1 snRNP mogła przyłączyć się do 5' miejsca splicingowego musi przyłączyć się białko, które rozplecie spinę. W zaproponowanym modelu do fragmentu ISM przyłącza się helikaza p68 (159), a do regulatorowej spinki czynnik splicingowy PSF (157), który stabilizuje regulatorową spinę ISS. Gdy do pre-mRNA genu MAPT przyłączy się tylko helikaza p68 to rozplata ona fragment dwuniciowy i cząsteczka U1 snRNP oddziałuje z 5' miejscem splicingowym, dochodzi do wycinania intronu 10-11 i powstaje izoforma 4R białka *tau* (Rysunek 42-B). Natomiast przyłączenie się białka PSF do regulatorowej spinki ISS powoduje stabilizację struktury spinkowej i mimo obecności helikazy p68 nie dochodzi do rozplecenia spinki regulatorowej i wiązania się U1 snRNP do miejsca akceptorowego i powstaje izoforma 3R białka *tau* (Rysunek 42-C). Model ten zakłada, że dla formy dzikiej kontrolowane kinetycznie lub termodynamicznie wiązanie się białka PSF do spinki regulatorowej ISS reguluje równowagę kompleksów K-3R i K-4R. Obecność mutacji w obrębie spinki regulatorowej ISS wpływa na oddziaływanie białka PSF ze spinką regulatorową (poprzez osłabienie trwałości termodynamicznej takiego kompleksu lub powolniejsze jego powstawanie), co zmienia równowagę pomiędzy kompleksami K-3R i K-4R. W następstwie tego powstają różne ilości izoform 3R i 4R białka *tau*.

Poniżej zestawione zostały różne aspekty badań własnych oraz opublikowanych przez inne grupy badawcze, które wspierają zaproponowany model regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 pre-mRNA genu MAPT.



Rysunek 42. Zaproponowany model regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 białka tau.

4.1. Model regulacji, a stabilność termodynamiczna regulatorowej spinki

Badania stabilności termodynamicznej regulatorowej spinki RNA formy dzikiej i wariantów z mutacjami wykazały, że obecność mutacji nie powoduje rearanżacji struktury

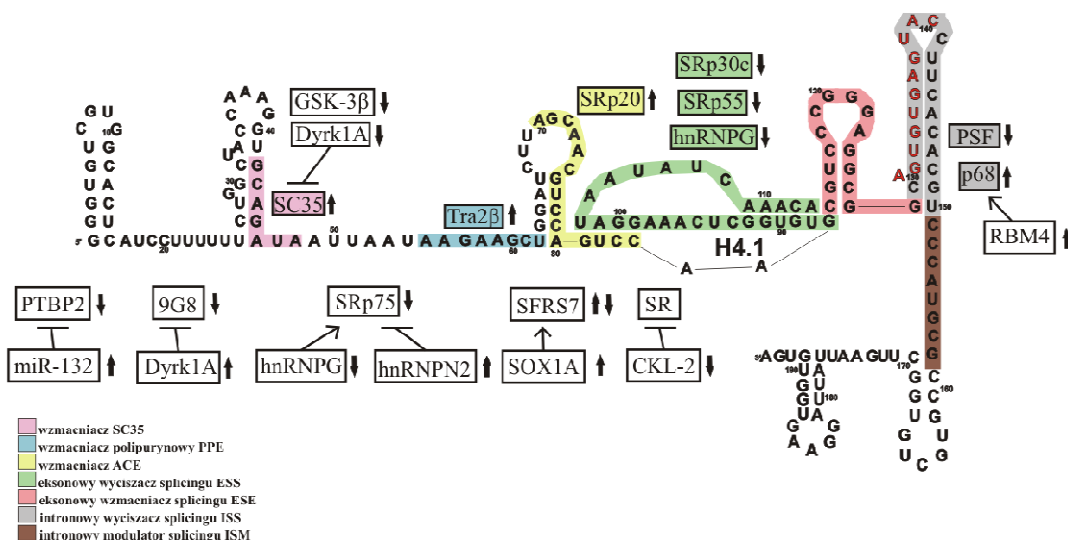
spinki. W każdym badanym przypadku 25/26 nukleotydowy fragment pre-mRNA genu MAPT wykazywał strukturę spinki do włosów. Prawie we wszystkich przypadkach naturalnie występujących w chorobie FTDP-17 mutacji nastąpiła destabilizacja spinki regulatorowej (dotyczy to mutacji 11C, 12U, 13G, DD-PAC oraz 16U). Spinka RNA zawierająca mutacje 19G posiadała zbliżoną stabilność termodynamiczną do formy dzikiej. Dodatkowo, mutacje niewystępujące naturalnie u ludzi wykazywały różny wpływ na stabilność termodynamiczną motywu spinkowego. Zamiana U→C w pozycji 10 nie wpływała znacząco na stabilność termodynamiczną spinki (dotyczy to mutacji WT-10C i DD-10C), natomiast insercja U w pozycji 17 intronu stabilizowała badaną spinkę (chodzi o mutacje WTI-17T i DDI-17T). Badania struktury drugorzędowej fragmentu 194/195 nukleotydowego potwierdziły brak zmian strukturalnych wynikających z obecności w spince regulatorowej mutacji. Wszystkie mutacje, oprócz mutacji 19G, umiejscowione są w trzonie regulatorowej spinki. Przeprowadzone w trakcie realizacji pracy doktorskiej badania na liniach komórkowych *cos-7* wykazały zależność pomiędzy stabilnością regulatorowej spinki, a stosunkiem izoformy 3R i 4R białka *tau*. Sztuczne mutacje definitywnie pokazały, że regulacja alternatywnego składania eksonu 10 genu MAPT jest zależna od stabilności termodynamicznej spinki. Można się było spodziewać, że zmiana sekwencji w spince zaburzy oddziaływanie z czynnikami białkowymi regulującymi alternatywny splicing, jednak w przypadku cząsteczki DDI-17T zawierającej dwie mutacje zarówno stabilność termodynamiczna, jak i stosunek izoform 3R i 4R były zbliżone do tych obserwowanych dla formy dzikiej. Następnym dowodem na wpływ stabilności na alternatywne składanie genu białka *tau* są wyniki eksperymentów na liniach komórkowych z zastosowaniem ligandów niskocząsteczkowych. Eksperymenty topnień UV wykazały zdolność wiązania się neomycyny, kanamycyny, tobramycyny i mitoksantronu do badanej spinki i jej stabilizację termodynamiczną. Wydaje się, że badane antybiotyki także wiążą się do spinki w eksperymentach *in vivo* (*in vitro* udowodniono to metodami spektroskopii NMR (139)), powodując stabilizację motywu spinkowego i zwiększając ilość izoformy 3R w przypadku mutacji destabilizujących, jak i w przypadku formy dzikiej.

W zaproponowanym modelu przebiegu procesu splicingu do regulatorowej spinki może przyłączyć się białko PSF, które stabilizuje spinkę regulatorową i uniemożliwia wiązanie się U1 snRNA. Wykazano, że stabilność regulatorowej spinki ma wpływ na wiązanie się do niej białka PSF (brak wiązania się PSF do spinki z mutacją DD-PAC, inne mutacje nie były badane) (157). W zaproponowanym modelu do przyłączenia się do

regulatorowej spinki białka PSF konieczna jest termodynamicznie trwała spinka, która po przyłączeniu PSF dodatkowo się stabilizuje.

4.2. Model regulacji, a czynniki splicingowe

Opisane w części literaturowej cząsteczki regulujące proces alternatywnego składania eksonu 10 genu *MAPT* zostały naniesione na zaproponowaną strukturę drugorzędową (Rysunek 43). W niektórych przypadkach znane jest dokładne miejsce oddziaływania czynnika splicingowego z pre-mRNA genu *MAPT* i dotyczy to białek: SC35, Tra2 β , SRp20, SRp30c, SRp55, hnRNPG, PSF oraz helikazy p68 (157, 159-161, 168, 169). W pozostałych przypadkach wiadomo, jak dane białko lub cząsteczka miRNA wpływa na alternatywny splicing eksonu 10 białka *tau*, lecz dokładne miejsce oddziaływania z pre-mRNA genu *MAPT* jak dotąd nie jest poznane (159, 161, 164, 165, 167, 170-172). Wyniki badań własnych na liniach komórkowych *cos-7* z zastosowaniem oligonukleotydów antysensowych pokazują, że do prawidłowego składania genu w badanym pre-mRNA konieczna jest obecność wszystkich regulatorowych elementów działających w układzie *cis*. Wiązanie się antysensowych oligonukleotydów do poszczególnych rejonów regulatorowych w każdym badanym przypadku powodowało wzrost ilości izoformy 3R, co oznacza, że U1 snRNP wiązało się gorzej do miejsca akceptorowego w ISS.



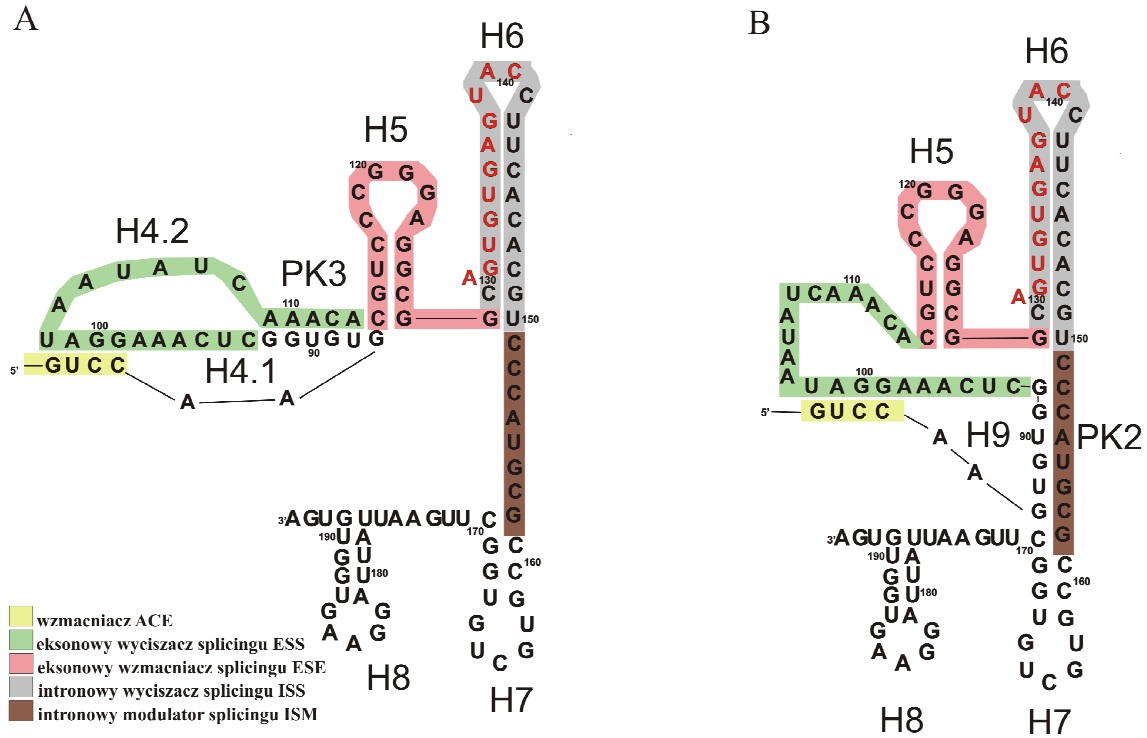
Rysunek 43. Cząsteczki regulujące alternatywne składanie eksonu 10 białka *tau* naniesione na zaproponowaną strukturę drugorzędową. Strzałka w górę oznacza wzmacnianie splicingu, strzałka w dół oznacza hamowanie splicingu.

W zaproponowanym modelu regulacji splicingu rejony, które odpowiedzialne są za powstawanie dwóch izoform 3R i 4R to eksonowy wyciszacz splicingu ESS, intronowy wyciszacz splicingu ISS oraz intronowy modulator splicingu ISM. Fragment ESS powoduje obniżenie splicingu przez tworzenie motywu dwuniciowego z intronowym modulatorem splicingu (ISM). Z danych literaturowych wynika, że fragment 151-158 obejmujący ISM jest wzmacniaczem splicingu, ale tylko wtedy, gdy występuje razem z regulatorową spinką będącą intronowym wyciszaczem splicingu (ISS) (147). Delecja samego ISM (Δ 19-22 CCCA, Δ 23-26 UGCG) powodowała znaczne obniżenie ilości izoformy 4R białka *tau*, co może wskazywać na kluczową rolę tego fragmentu w rekrutacji czynników białkowych pozwalających na zajście splicingu. Za to delecja fragmentu inhibitorowej spinki wraz z fragmentem ISM (Δ 12-24 CACACGUCCCAUG) spowodowała powstawanie zwiększonej ilości izoformy 4R białka *tau*. W takim przypadku prawdopodobnie miejsce splicingowe jest łatwo dostępne dla cząsteczki U1 snRNP i wzmacniająca składanie genów sekwencja ISM nie jest wymagana. W literaturze możemy znaleźć informacje, że w alternatywnym składaniu genu *MAPT* bierze udział helikaza p68. Na początku uważano, że jej główną funkcją jest rozplatanie dupleksu utworzonego przez rejon z 5' miejscem splicingowym i U1 snRNP (212). Badania wskazują, że helikaza p68 prawdopodobnie bierze czynny udział w wiązaniu się U1 snRNP do 5' miejsca splicingowego (159). Kar i współpracownicy zaproponowali spinkę ISS, jako miejsce wiązania się helikazy p68. Jednak wydaje się bardziej prawdopodobne wiązanie się tego białka do fragmentu ISM. W zaproponowanym modelu fragment ten przybiera formę dwuniciową, co powoła na wiązanie się helikazy (Rysunek 42). Poza tym gdyby helikaza wiązała się tylko do spinki ISS usunięcie ISM nie mogłoby mieć hamującego wpływu na alternatywne składanie eksonu 10 (147). Ta sama grupa badawcza zaproponowała białko PSF, jako czynnik splicingowy regulujący alternatywne składanie eksonu 10 genu *MAPT* (157). Udowodnili wiązanie się tego białka w rejonie spinki ISS i stabilizację tego motywu strukturalnego. W zaproponowanym modelu białko to stabilizuje ISS, przez co helikaza p68 nie jest w stanie rozpleść spinki regulatorowej na tyle skutecznie, aby U1 snRNP mogła oddziaływać z miejscem akceptorowym.

4.3. Model regulacji, a rearanżacja struktury fragmentu pre-mRNA genu *MAPT*

W strukturze drugorzędowej fragmentu 194/195 nukleotydowego pre-mRNA genu *MAPT* program *vsfold5* przewiduje utworzenie dwóch pseudowęzłów, a mianowicie PK1 i PK2 (Rysunek 33). Jeden ze zidentyfikowanych pseudowęzłów (PK2) znajdował się w

rejonie (87-92)-(152-157) (Rysunek 44, struktura B), natomiast program *Shapelnknots* zaproponował oddziaływanie fragmentu 87-92 z rejonem 109-157 z utworzeniem pseudowęzła PK3 (Rysunek 44, struktura A).

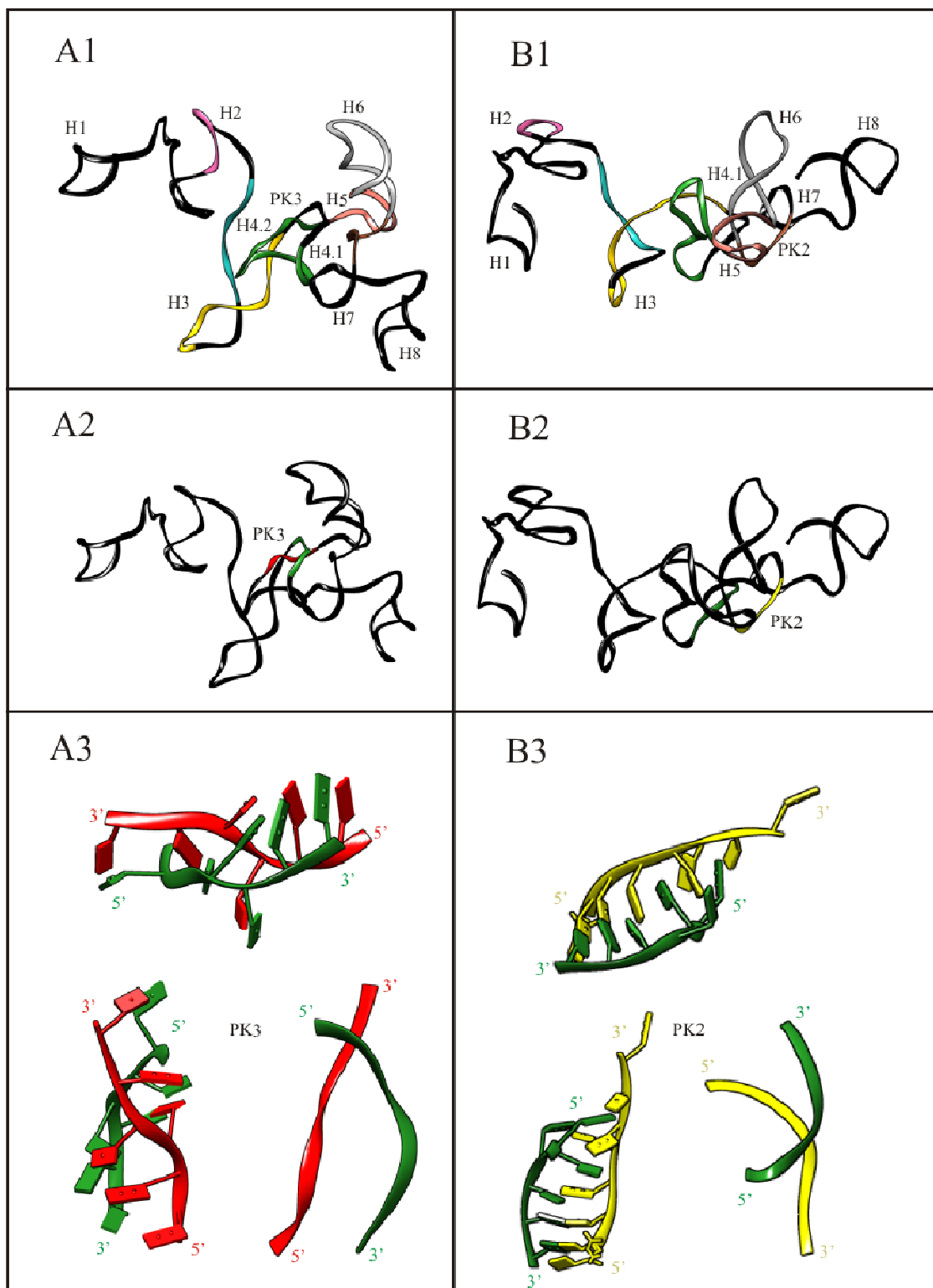


Rysunek 44. A-struktura drugorzędowa fragmentu 81-194 zaproponowana przez program *Shapelnknots*, B-struktura drugorzędowa fragmentu 81-194 zaproponowana przez program *vsfold5*.

Rejon od 93 do 113 nukleotydu jest zdefiniowany, jako eksonowy wyciszczacz splicingu (ESS) eksonu 10. W zaproponowanym modelu postuluje się, że do tego rejonu wiążą się białka (SRp55, SRp30c oraz hnRNPG), powodujące lokalną rearanżację struktury, która utrudnia dostępność 5' miejsca splicingowego w spince regulatorowej. Potwierdzają to badania D'Souza i współpracowników, którzy zdefiniowali funkcję rejonu ESS na podstawie szeregu delecji i mutacji ($\Delta E14$ TCAAAGGAT, $\Delta E15$ AATATCAAA, mut14a AAA→GCT, mut15a AA→GT, mut15b AAA→GCT) (146). We wszystkich badanych przypadkach zauważyli wzrost ilości eksonu 10 w transkrypcji. Zmiany, które wprowadzili w rejon ESS mogą powodować brak oddziaływania tego rejonu z czynnikami białkowymi (SRp55, SRp30c oraz hnRNPG) i w konsekwencji brak rearanżacji pseudowęzła PK3 w pseudowęzle PK2. Większość czynników splicingowych wiąże się do rejonów jednoniciowych RNA (64). Bez rearanżacji PK3 w PK2 fragment ISM pozostaje jednoniciowy i mogą z tym rejonem oddziaływać aktywatory splicingu powodując zwiększenie ilości izoformy 4R. Rearanżacja

PK3 w PK2 sprawia, że staje się on rejonem dwuniciowym, przez co wiązanie się do niego aktywatorów splicingu jest zmienione. Model rearanżacji tego fragmentu potwierdzają badania na liniach komórkowych z użyciem oligonukleotydu antysensowego AB3 (szczegóły oddziaływań antysensowych oligonukleotydów zostały opisane w rozdziale 3.3 i zilustrowane na rysunku 39). Został on wybrany w badaniach, jako oligonukleotyd kontrolny i zakładano, że powinien wzmacniać splicing przez zablokowanie miejsca ESS przed możliwością wiązania się do niego czynników białkowych hamujących składanie eksonu 10. Jednak wyniki jednoznacznie pokazują, że obecność oligonukleotydu antysensowego AB3 powoduje zmniejszony poziom wiązania się U1 snRNP do 5' miejsca splicingowego. Można przypuszczać, że cząsteczka AB3 wiążąc się do ESS powoduje także rearanżację struktury, podobnie jak w przypadku białek SRp55, SRp30c oraz hnRNPG. Hipoteza ta wyjaśniałaby zaistniałą sytuację i prowadziłaby do wniosku, że brak dostępu ESS dla inhibitorów splicingu także powoduje zmniejszenie splicingu. Należy zauważyć, że helisa 87-92/152-157 (5'GUGUGG3'/5'CCAGCG3'), która jest częścią pseudowęzła PK2 może oddziaływać z jednej strony z helikalnym trzonem spinki H6, a z drugiej strony z trzonem spinki H5 pre-mRNA genu MAPT. Powoduje to powstanie oddziaływań współosiowych (ang. *coaxial stacking*). Co prawda, od strony spinki H5 obie helisy oddziela niesparowana C151, która może jednak przyjąć ułożenie typu *bulge-out* i tym samym wzmocnić stabilność helisy 87-92/152-157 z trzonem spinki H5. Badania modelowe przeprowadzone przez grupę Turner'a wykazały, że w zależności od sekwencji i aranżacji terminalnych par oddziałujących współosiowo fragmentów helikalnych wzmacniają one ich stabilność termodynamiczną (energię swobodną) o 1-2 kcal/mol dla każdego tego typu oddziaływania (213-215). Znaczy to, że trwałość termodynamiczna fragmentu helikalnego 87-92/152-157 może być wyższa o 2-4 kcal/mol w porównaniu do izolowanego dupleksu 5'GUGUGG3'/5'CCAGCG3'. Taka zmiana może mieć duży wpływ na wiązanie się do tego regionu helikazy p68 oraz wpływać na zdolność rozplatania tego regionu.

Dodatkowo, porównano także dwie struktury trzeciorzędowe fragmentu pre-mRNA genu MAPT, które zostały wymodelowane przez program *RNAComposer* na podstawie struktury drugorzędowej określonej dla fragmentu pre-mRNA genu MAPT (Rysunek 45-A) oraz struktury z rearanżacją pseudowęzła PK3 w pseudowęzle PK2 (Rysunek 45-B). W zaproponowanej w niniejszej pracy doktorskiej strukturze drugorzędowej pseudowęzła PK3 spinają fragmenty 87-92 (kolor zielony rysunek 45-A2) oraz



Rysunek 45. Struktura trzeciorzędowa fragmentu pre-mRNA genu MAPT obrazująca reorganizację jego oddziaływań. A1-struktura z pseudowęzłem PK3, B1-struktura po zaproponowanej reorganizacji zawierająca pseudowęzeł PK2, A2-lokalizacja pseudowęzła PK3 w odniesieniu do całej struktury, B2-lokalizacja pseudowęzła PK2 w odniesieniu do całej struktury, A3-struktura pseudowęzła PK3, B3-struktura pseudowęzła PK2. W sektorach A3 i B3 pokazane są różne ułożenia oddziałujących dwuniciowo fragmentów odpowiednio pseudowęzłów PK3 i PK2. Kolorem zielonym zaznaczono fragment 87-92, kolorem czerwonym 109-114, kolorem żółtym 152-158.

109-114 (kolor czerwony rysunek 45-A2), natomiast w strukturze po rearanżacji w tworzenie pseudowęzła PK2 zaangażowane są fragmenty 87-92 (kolor zielony rysunek 45-B2) i 152-158 (kolor żółty rysunek 45-B2). Dokładna struktura fragmentów pseudowęzłów PK3 i PK2 została przedstawiona na rysunku 45 A3 i B3. W oparciu o przedstawione struktury trzeciorzędowe, można stwierdzić, że zaproponowana lokalna rearanżacja nie zmienia drastycznie struktury globalnej fragmentu pre-mRNA genu MAPT. Można zauważyć zmianę położenia spinki H5 w stosunku do regulatorowej spinki H6. Ciekawym aspektem wydaje się także zmiana położenia spinek H7 i H8 w stosunku do regulatorowej spinki H6. Przybliżenie się tych dwóch motywów strukturalnych do spinki ISS może utrudniać oddziaływanie tego fragmentu z U1 snRNP i innymi czynnikami splicingowymi.

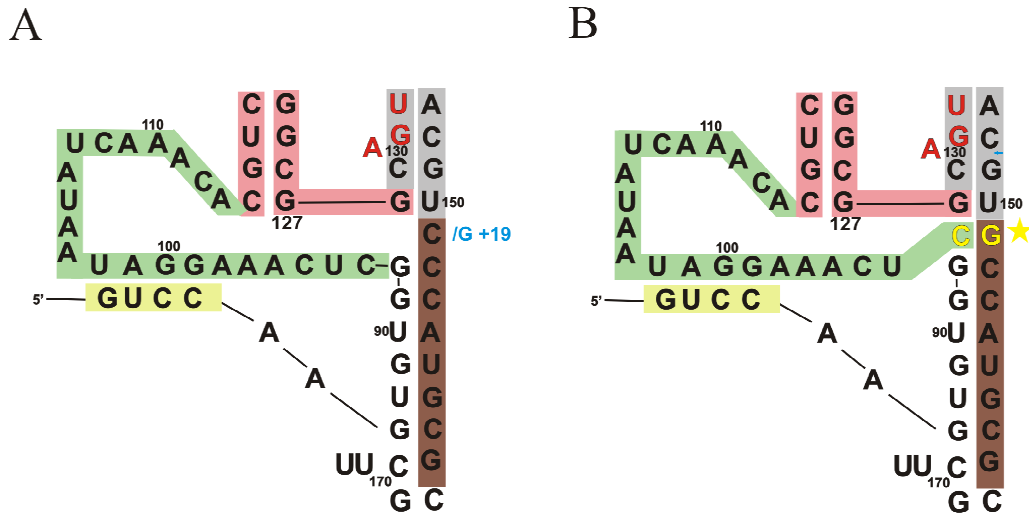
Jak należało się spodziewać dla struktury przedstawiającej pofałdowanie prawie 200 nukleotydowego RNA jest ona bardzo złożona (Rysunek 45). Składa się z szeregu motywów strukturalnych, z których część może oddziaływać z sąsiadującymi rejonami (dotyczy to zwłaszcza tej części, w której zachodzi proces splicingu czyli okolic spinki H6), ale są też rejony, w których motywy strukturalne raczej nie oddziałują ze sobą (5' koniec modelowego pre-mRNA).

4.4. Model regulacji, a mutacje w FTDP-17

U zdrowego człowieka stosunek izoformy 3R i 4R jest w przybliżeniu równy jeden (216). W wyniku mutacji destabilizujących (11C, 12U, 13G, DD-PAC oraz 16U) znajdujących się w regulatorowej spinie zmienia się ten stosunek na rzecz zwiększonej ilości izoformy 4R (74, 124, 125). Odwrotna sytuacja występuje, gdy w spinie RNA pojawia się mutacja 19G (Rysunek 46) (145). Zaproponowana rearanżacja struktury i wiązanie się białka PSF oraz helikazy p68 wyjaśnia mechanizm regulacji alternatywnego splicingu. Badania nad białkiem PSF wykazały, że nie wiąże się ono do regulatorowej spinki zawierającej mutację DD-PAC (badano jedynie formę dziką i DD-PAC) (157). Najprawdopodobniej wiązanie PSF jest zależne od stabilności termodynamicznej regulatorowej spinki. Białko PSF może oddziaływać ze stabilną spinką i dodatkowo wzmacniać jej strukturę. Taka właściwość białka PSF może tłumaczyć powstawanie w większej ilości izoformy 4R w przypadku mutacji 11C, 12U, 13G, DD-PAC oraz 16U. Obecność takich mutacji w obrębie spinki regulatorowej powoduje brak wiązania się do niej białka PSF i rozplatanie dupleksu przez helikazę p68 nie jest hamowane. Z drugiej strony, zauważono także brak wiązania się helikazy p68 do

fragmentu pre-mRNA genu MAPT z mutacją DD-PAC (159). Autorzy pracy sugerują, że helikaza p68 jest kluczowym czynnikiem białkowym wzmacniającym splicing eksonu 10, jednak w przypadku mutacji DD-PAC powodującej zwiększone składanie eksonu 10 nie zaobserwowano wiązania się helikazy p68 do tak zmutowanej spinki regulatorowej (rejon ISS). Badania na liniach komórkowych *cos-7* z zastosowaniem antysensowych oligonukleotydów pokazały, że negatywny efekt wywołany mutacjami destabilizującymi można zamaskować przez oddziaływanie z elementami działającymi w układzie *cis*, co świadczy o udziale tych elementów w rekrutacji czynników białkowych wiążących się do regulatorowej spinki.

Zaproponowany model wyjaśnia także wpływ mutacji 19G na alternatywny splicing eksonu 10. Zamiana C na G (jak to ma miejsce w przypadku mutacji 19G) w pozycji 151 stabilizuje pseudowęzeł PK2, przez powstanie dodatkowej pary G(151)-C(93) pomiędzy ISM a fragmentem 87-92. W takim przypadku helikaza p68 musi rozpleść stabilniejszy motyw strukturalny (helisa 87-93/151-157 posiada dodatkową parę G-C w stosunku do 87-92/152-157), co jest trudniejsze i 5' miejsce splicingowe nie jest rozpoznawane przez U1 snRNP (Rysunek 46). Proponując strukturę fragmentu pre-mRNA genu MAPT rozpatrywano możliwość parowania się C127 i G151 (Rysunek 34). W przypadku mutacji 19G zmiana G151 na C151 zaburzałaby parowanie się C127 i G151, co powinno prowadzić do tworzenia się w przewodzie izoformy 4R, a przeprowadzone badania prowadzą do odwrotnych obserwacji. Badania opisane w przedstawiionej rozprawie doktorskiej pokazują, że w przypadku mutacji 19G brak jest korelacji pomiędzy stabilnością spinki regulatorowej, a ilością izoform 3R i 4R białka *tau* (tworzy się w przewodzie izoforma 3R), co sugeruje inny mechanizm regulacji alternatywnego splicingu.



Rysunek 46. Model wpływu mutacji 19G na alternatywne składanie eksonu 10 genu MAPT. A-struktura odpowiedniego fragmentu w cząsteczce RNA formy dzikiej, B-proponowana struktura tego samego fragmentu w cząsteczce RNA z mutacją 19G.

Podsumowując, zaproponowany model alternatywnego składania eksonu 10 genu MAPT bardzo dobrze wpasowuje się w wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej, a także poparty jest wieloma doniesieniami literaturowymi. Składanie eksonu 10 białka *tau* jest zależne od wszystkich elementów regulatorowych działających w układzie *cis*, jednak wydaje się, że kluczową rolę odgrywa stabilność termodynamiczna spinki regulatorowej w rejonie elementu intronowego wyciszającego splicing. Struktura drugorzędowa tego fragmentu pre-mRNA, a także stabilność motywów strukturalnych wpływają w sposób dynamiczny na oddziaływanie RNA z białkami regulującymi proces alternatywnego splicing.

VI. PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy doktorskiej była kompleksowa analiza mutacji występujących w spince RNA regulującej alternatywne składowanie eksonu 10 białka *tau*. Wykonane badania możemy podzielić na trzy części: (1) badania termodynamiczne, (2) strukturalne i (3) badania na liniach komórkowych *cos-7*.

Uzyskane wyniki można podsumować w następujących punktach:

1. Przeprowadzone badania topień UV 25/26 nukleotydowych spinek RNA wykazały znaczący wpływ badanych mutacji (11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, DD-10C, DDI-17T, WT-10C oraz WTI-17T) na ich stabilizację termodynamiczną. Mutacje, które powodują zwiększoną ilość izoformy 4R białka *tau* powodowały obniżenie stabilności motywu spinkowego. Mutacja 19G, zwiększająca ilość izoformy 3R białka *tau*, nie powodowała zwiększonej stabilności spinki regulatorowej w stosunku do spinki RNA typu dzikiego, dlatego wpływ tej mutacji na alternatywny splicing eksonu 10 genu MAPT ma odmienny charakter.
2. Widma dichroizmu kołowego wszystkich badanych spinek RNA nie wykazały znaczących zmian strukturalnych pomiędzy cząsteczkami zawierającymi poszczególne mutacje, a formą dziką.
3. Wykazano, że ligandy niskocząsteczkowe, takie jak: neomycyna, kanamycyna, tobramycyna i mitoksantron wiążą się do badanych spinek RNA wpływając na ich stabilność termodynamiczną. Neomycyna, kanamycyna i mitoksantron znacząco stabilizowały cząsteczki RNA, a efekt stabilizacyjny był zależny od rodzaju antybiotyku i mutacji w spince RNA. W niektórych przypadkach stabilizacja za pomocą antybiotyków spinek RNA z mutacjami powodowała, że energia swobodna takiego kompleksu była porównywalna do cząsteczki WT.
4. Wyniki mapowania izoenergetycznymi macierzami RNA oraz mapowania chemicznego (SHAPE i DMS) pozwoliły stwierdzić, że wszystkie badane mutacje nie wpływają znacząco na strukturę drugorzędową badanego fragmentu pre-mRNA genu MAPT.
5. Programy komputerowe do przewidywania struktury drugorzędowej cząsteczek RNA, wsparte eksperymentalnymi wynikami ich mapowania pozwoliły na zaproponowanie nowej struktury drugorzędowej badanego fragmentu pre-mRNA genu MAPT. Model ten jest zgodny z danymi eksperymentalnymi i pozwala przedstawić wszystkie

elementy regulujące alternatywne składanie eksonu 10 białka *tau* w poszczególnych motywach strukturalnych.

6. Zaproponowana struktura drugorzędowa pozwoliła na wymodelowanie struktury trzeciorzędowej o optymalnej energii swobodnej.
7. Przedstawiono również model regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT; na tej podstawie wyjaśniono mechanizm oddziaływania mutacji 19G.
8. Po raz pierwszy wykazano, że 194/195 nukleotydowy fragment pre-mRNA jest wystarczający do poprawnego procesu alternatywnego splicingu eksonu 10 białka *tau* w liniach komórkowych *cos-7*. Analiza RT-PCR ilości transkryptów z eksonem 10 i bez pozwoliła na skorelowanie energii swobodnej badanych spinek z ilością izoformy 3R i 4R.
9. Wykazano możliwość regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 na liniach komórkowych. Neomycyna, kanamycyna i tobramycyna obniżały ilość izoformy 4R w przypadku cząsteczek z mutacjami destabilizującymi, czyli takimi jak: 11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U. Ponadto, zmieniały one profil alternatywnego składania eksonu 10 w przypadku formy dzikiej. Zaobserwowano również zależność pomiędzy stężeniem antybiotyków, a spadkiem ilości izoformy 4R.
10. Oligonukleotydy antysensowe pozwoliły na regulację alternatywnego splicingu eksonu 10 przez oddziaływanie tych cząsteczek z elementami regulującymi, występującymi w pre-mRNA genu MAPT. Zmiany w alternatywnym składaniu eksonu 10 białka *tau* mogą być eliminowane przez maskowanie miejsc wiązania się czynników białkowych lub przez zaburzanie motywów strukturalnych elementów regulujących ten proces.

Podsumowując, uzyskane dane pozwoliły na poszerzenie wiedzy na temat regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT. Motyw spinkowy na granicy eksonu 10 i intronu 10-11 pełni główną funkcję regulacyjną w tym procesie. Większość mutacji w chorobie FTDP-17 występujących w motywie spinkowym powoduje obniżenie stabilności termodynamicznej spinki, co za tym idzie zmienia się stosunek izoformy 3R do 4R białka *tau*. Analiza na liniach komórkowych *cos-7* potwierdziła zależność pomiędzy stabilnością termodynamiczną, a ilością powstających izoform 3R i 4R białka *tau*. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że zmiany w alternatywnym splicingu mogą nie tylko być wynikiem zmian w sekwencji i w strukturze drugorzędowej pre-mRNA, ale również różnice w stabilności poszczególnych motywów, które mają wpływ na ten proces. Analiza struktury

pozwołała na zaproponowanie nowego modelu regulującego alternatywny splicing eksonu 10, polegającego na występowaniu rearanżacji struktury w wyniku przyłączenia się czynników białkowych do eksonowego wyciszacza splicingu.

W niniejszej rozprawie doktorskiej uzyskano po raz pierwszy pełne parametry termodynamiczne spinek RNA z wybranymi mutacjami, dodatkowo zbadano wpływ niskocząsteczkowych ligandów na stabilność badanych spinek. Po raz pierwszy określono również strukturę drugorzędową fragmentu sąsiadującego z regulatorowym motywem spinkowym. Ponadto, wykazano zdolność antybiotyków i oligonukleotydów antysensowych do regulacji alternatywnego splicingu eksonu 10 genu MAPT. Na koniec zaproponowano zupełnie nowy model regulacji alternatywnego składania eksonu 10 białka *tau*.

VII. MATERIAŁY I METODY

1. *Materiały*

1.1. **Odczynniki**

Kakodylan sodu, glukoza, borowodorek sodu, błękit bromofenolowy, cyjanol ksylenowy, glicerol, chlorek amonu, ampicylina, nadsiarczan amonu (APS), bromek etydyny, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED), siarczan dimetylu (DMS), wodorotlenek sodu, roztwór antybiotyków 100x stężony (Antibiotic Antimycotic Solution), roztwór witamin 100x stężony (MEM Vitamin Solution), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), tobramycyna, D-glukoza, borowodorek sodu, kwas 2-[4-(2-hydroksyetyleno)-1piperazylo]etanosulfonowy (HEPES), metyloamina, fluorowodorek trietyloamonowy (TEA·3HF), octan amonu-**Sigma-Aldrich**

Sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego (Na₂EDTA), chlorek magnezu, chlorek sodu, dodecylosiarczan sodu (SDS), chlorek potasu, sulfotlenek dimetylu (DMSO), octan sodu, diwodorofosforan potasu, wodorofosforan sodu, tri(hydroksymetylo)aminometan (Tris), nadjodan sodu-**Fluka**

Pepton, wyciąg drożdżowy, agar, akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid-**Serva**

Roztwory 5'-trifosforanów deoksyrybonukleozydów (dATP, dCTP, dGTG, dNTP) glikogen- **Thermo Scientific**

Roztwory 5'-triosforanów dideoksyrybonukleozydów (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)-**Roche**

Izopropylotiogalaktozyd (IPTG), glicyna, kwas borowy, PBS 10x stężony, neomycyna, kanamycyna, mocznik, fenol, chloroform/alkohol izoamylowy (24:1 v/v), agaroza-**Bioshop**

NMIA-**Molecular Probes**

Kwas octowy, metanol, n-propanol, n-butanol, kwas solny, etanol-**Polskie Odczynniki**

Chemiczne

Izopropanol-**Chempur**

Amoniak (32%)-**Merck**

Trizol, Lipofectamine 2000-**Invitrogen**

Bydłęca surowica płodowa FBS, OptiMEM-**Gibco BRL**

Mitoksantron-**Abcam**

1.2. Enzymy

Polimeraza DNA Taq (5U/μl), Ligaza DNA T4-**Thermo Scientific**

Polimeraza DNA Taq (5U/μl)-**EURx**

RNazaA, trypsyna stężona 10x-**Sigma-Aldrich**

Enzymy restrykcyjne EcoRI i PstI-**Promega**

DNaza I (2U/μl)-**Ambion**

1.3. Plazmidy

Plazmid pUC19-**Thermo Scientific**

Plazmid pSPL3b-udostępniony dzięki uprzejmości prof. Lynch'a z The Dublin Neurological Institute

1.4. Linia komórkowa

Linie komórkowe *cos-7* udostępnione dzięki uprzejmości dr Pauliny Jackowiak, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

1.5. Akcesoria dodatkowe

Silanizowane płytki mikroskopowe, komory hybrydizacyjne 9 x 0,8 mm
-**Sigma-Aldrich**

Płytki do drukowania mikromacierzy 384 dołkowe-**Perkin Elmer**

Płytki silikażelowe 60 F₂₅₄ 0,25 mm (20x20 cm)-**Merck**

Kolumny zawierające silanizowane podłoże Sep-pak-**Waters**

Plastiki do hodowli linii komórkowej-**Greiner Bio-One**

Illustra NAP-25 columns-**GE Healthcare Life Sciences**

1.6. Izotopy promieniotwórcze

[α ³²P] ATP 5000 Ci/mmol-**Hertman Analitic**

1.7. Gotowe zestawy do badań biochemicznych

Zestaw do transkrypcji *in vitro* T7-MEGAscriptTM-**Ambion**

Zestawy do oczyszczania DNA: QIAquick PCR Purification Kit-**Qiagen**

Zestaw do odwrotnej transkrypcji SuperScript III-**Invitrogen**

Zestaw do odwrotnej transkrypcji iScriptTM Reverse Transcription Supermix-**Biorad**

1.8. Szczepy bakteryjne

Escherichia coli szczep DH5 α -**Gibco BRL**

1.9. Wzorce długości kwasów nukleinowych

DirectLoadTM Wide Range DNA Marker-**Sigma-Aldrich**

GeneRulerTM DNA Ladder Mix-**Thermo Scientific**

PerfectPlusTM 50-500 bp DNA ladder-**EURx**

1.10. Oligonukleotydy

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
WT	25	GGCAGUGUGAGUACCUUCACACGUC
11C	25	GGCAGUGUGAGUACCU <u>C</u> CACACGUC
12U	25	GGCAGUGUGAGUACCUU <u>U</u> ACACGUC
13G	25	GGCAGUGUGAGUACCUUC <u>G</u> CACGUC
DD-PAC	25	GGCAGUGUGAGUACCUUCA <u>U</u> ACGUC
16U	25	GGCAGUGUGAGUACCUUCACA <u>U</u> GUC
19G	25	GGCAGUGUGAGUACCUUCACACG <u>U</u> G
DD-10C	25	GGCAGUGUGAGUACCC <u>C</u> UCA <u>U</u> ACGUC
DDI-17T	26	GGCAGUGUGAGUACCUUCA <u>U</u> AC <u>U</u> GUC
WT-10C	25	GGCAGUGUGAGUACCC <u>C</u> UCACACGUC
WTI-17T	26	GGCAGUGUGAGUACCUUCACAC <u>U</u> GUC

Podkreśleniem oznaczono odpowiednie mutacje

Oligodeoksyrybonukleotydy użyte jako startery w reakcjach PCR w celu otrzymania matryc do transkrypcji *in vitro*, jako startery w reakcjach sekwencjonowania oraz jako startery w reakcji RT-PCR:

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
maptA	65	CAAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGC AACGTCCAGTC CAAGTGTGGCTCAAAG
maptB-WT	69	GTGTGAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-11C	69	GTGTGGAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-12U	69	GTGTAAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-13G	69	GTGCGAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-DD-P AC	69	GTATGAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-16U	69	ATGTGAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-19G	72	CACGTGTGAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACG TGTTTGTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-DD-1 0C	69	GTATGAGGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-DDI- 17T	70	AGTATGAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTG TTTGTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-WT-1 0C	69	GTGTGAGGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTGT TTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptB-WTI- 17T	70	AGTGTGAAGGTACTCACACTGCCGCCTCCCGGGACGTG TTTGTGATATTATCCTTTGAGCCACACTTGGACT
maptC	50	TCAAGCCACAGCACGGCGCATGGGACGTGTGAAGGTA CTCACACTGCCGC
maptD	55	GTCACATCCTTTTTTCTGGCTACCAAAGGTGCAGATA ATTAATAAGAAGCTGG
maptE	49	TAATACGACTCACTATAGGGTGGCGTGTCACTCATCCT TTTTTCTGGCT
maptF	46	TCACACCACTTCCTAATAATTCAAGCCACAGCACGGCG CATGGGAC
maptE-EcoRI	34	GCGGAATTCTAATACGACTCACTATACTATAGGG
maptE-PstI	31	GCGCTGCAGTCACACCACTTCCTAATAATTC
maptG	24	GCGGAATTCGGGTGGCGTGTCACT
PCR-1	24	TAATACGACTCACTATAGGGAGGC
PCR-2	24	TCACACCACTTCCTAATAACAAGC
SEK-pSPL3b	25	TCCTTGGAATGTTGATGATCTGTAG
SEK-pUC19	22	TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTA
SD6	19	TCTGAGTCACCTGGACAAC
SA2	24	ATCTCAGTGGTGGTATTTGTGAGC

Starter DNA-LNA:

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
PE-LNA	13	F-TCACACCACTTCC

Kolorzem czerwonym zapisano reszty nukleotydowe typu LNA, F oznacza fluoresceinę.

Sondy użyte w eksperymentach mapowania mikromacierzowego, wybrane z 855 dostępnych w bibliotece sond izoenergetycznych, zawierające łącznik C6-aminoheksylowy na końcu 5':

nr sondy	sekwencja	nr sondy	sekwencja	nr sondy	sekwencja	nr sondy	sekwencja
278	CDCCC	223	DUCUGG	909	UGDUDG	666	GGCGC
326	CCDCC	504	CUUCUG	444	CGUGUG	423	CGGCG
594	GCCDC	638	GCUUCG	111	DCGUGG	106	DCGGC
405	CGCCA	160	DGCUUG	674	GGGDC	283	CDCGGG
102	ACGCC	296	CDGCUG	425	CGGGA	583	GCDCG
282	CDCGCG	330	CCDGC	363	CCGGG	146	AGDCG
71	DCDCG	851	UCCDGG	347	CCCGG	293	CDGCAG
530	GDCDCG	213	DUCCDG	855	UCCCG	74	DCDGC
901	UGDCDG	566	GDUCCG	470	CUCCC	275	CDCDGG
738	GUGDCG	142	DGDUCG	374	CCUCC	38	DDGCC
185	DGUGDG	36	DDGDUG	606	GCCUC	266	CDDGCG
559	GDGUGG	777	UDDGDG	408	CGCCU	835	UCDDGG
908	UGDGUG	451	CUDDGG	358	CCGCC	369	CCUDDG
227	DUGDGG	625	GCUDDG	602	GCCGC	861	UCCUDG
569	GDUGDG	925	UGCUDG	919	UGCCG	984	UUCCUG
655	GGDUGG	1000	UUGCUG	486	CUGCCG	502	CUUCCG
164	DGGDUG	762	GUUGC	122	DCUGC	126	DCUUCG
41	DDGGDG	447	CGUUGG	287	CDCUGG	328	CCDCUG
11	DDDGGG	112	DCGUUG	837	UCDCDG	82	DCCDCG
3	DDDDGG	540	GDCGUG	466	CUCDCG	277	CDCCAG
513	GDDDDG	647	GGDCG	117	DCUCDG	70	DCDCC
129	DGDDDG	930	UGGDCG	798	UDCUCG	685	GGGUAG
289	CDGDDG	489	CUGGDG	712	GUDCUG	172	AGGGUG
329	CCDGDG	123	DCUGGG	690	GGUDCG	555	GAGGG
595	GCCDG	543	GDCUGG	173	AGGUAG	907	UGDGGG
149	AGCCDG	648	GGACUG	44	DDGGUG	739	GUGDGG
806	UDGCC	1001	UUGGDG	523	GDAGGG	78	DCDUCG
714	GUDGCG	507	CUUGGG	899	UGDDGG	825	UDUGDG
691	GGUDGG	72	DCDCUG	737	GUGDDG	719	GUDUGG
941	UGGUDG	274	CDCDCG	953	UGUGDG	188	DGUGUG
1004	UUGGUG	325	CCDCDG	751	GUGUGG	180	DGUDUG
96	DCCUUG	550	GDGCC	937	UGGGAG	303	CDGUGG
280	CDCCUG	906	UGDGCG	235	AUGGGG	109	DCGUDG
582	GCDCC	995	UUGDGG	315	CDUGGG	301	CDGUDG

914	UGCDCG	864	UCCUUG	591	GCDUGG	76	DCDGUG
485	CUGCDG	216	DUCCUG	404	CGCDUG	531	GDCDGG
890	UCUGCG	822	UDUCCG	613	GCGCA	645	GGDCDG

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-*O*-metylowane a niebieskim dodatkową resztę LNA-G. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

Dodatkowe sondy heptamerowe, zawierające łącznik C6-aminoheksylowy na końcu 5':

nazwa	sekwencja	nazwa	sekwencja
S-1	GDADADAP	S-9	UDUUDUCP
S-2	AUUDUCUP	S-10	GAUDUUAP
S-3	UDAUUDUP	S-11	GUGUUUGP
S-4	AUUDAUUP	S-12	ACGUGUUP
S-5	UUAUUDAP	S-13	AUADUUCP
S-6	UCUUAUUP	S-14	UDAUADUP
S-7	AUUCUUAP	S-15	CCUUUGG
S-8	CCUUUGAP	S-16	CCUUUGG

Czerwonym kolorem oznaczono reszty nukleotydowe typu LNA, czarnym 2'-*O*-metylowane, kolorem zielonym pseudonukleotyd pirenowy. Literą D oznaczono 2,6-diaminopurynorybozyd.

Oligonukleotydy antysensowe zawierające wyłącznie 2'-*O*-metylowane reszty RNA

nazwa	długość	sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
AB1	20	UUAUUAAAAAAGGAUGAGU
AB2	21	UUGCUAAGAUCCAGCUUCUUA
AB3	20	UGUUUGAUUAUCCUUUGA
AB4	20	AGCCACAGCACGGCGCAUGG

1.11. Roztwory i bufor

Bufor TBE używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w żelach agarozowych i poliakrylamidowych (10x stężony)

1 M Tris

1 M kwas borowy

10 mM Na₂EDTA; pH 8,3

Do rozdzielania elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych stosowano bufor 1x stężony, natomiast do rozdzielania elektroforetycznego w żelach agarozowych stosowano bufor 0,5x stężony.

Bufor TBM używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w nienaturujących żelach poliakrylamidowych (10x stężony)

1 M Tris

1 M kwas borowy

100 mM MgCl₂

Do rozdzielania elektroforetycznego w żelach poliakrylamidowych stosowano bufor 1x stężony.

Bufor TAE używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w żelach agarozowych (50x stężony)

2 M Tris

2 M kwas octowy

50 mM Na₂EDTA; pH 8,3

Do rozdzielania elektroforetycznego w żelach agarozowych stosowano bufor 1x stężony.

Bufor obciążający używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w nienaturujących żelach poliakrylamidowych (10x stężony)

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

50% (w/v) glicerol

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

Bufor obciążający używany do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w denaturujących żelach poliakrylamidowych (2x stężony)

8 M mocznik

0,2% (w/v) błękit bromofenolowy

0,2% (w/v) cyjanol ksylenowy

Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego

0,3 M octan sodu, pH 5,5

Bufor do topień UV i widm CD

100 mM NaCl

20 mM kakodylan sodu

0,5 mM Na₂EDTA; pH 7,0

Bufory F do badania homogenności cząsteczek RNA***Bufor F-a***

1 M NaCl

4 mM MgCl₂***Bufor F-b***

200 mM NaCl

4 mM MgCl₂***Bufor F-c***

100 mM NaCl

15 mM MgCl₂***Bufor F-d***

100 mM NaCl

0,5 mM Na₂EDTA**Bufory hybrydazyjne używane w mapowaniu na mikromacierzach*****Bufor I***

1 M NaCl

4 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor II

200 mM NaCl

4 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor III

100 mM NaCl,

15 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Bufor PBS do drukowania mikromacierzy

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O
1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,3

Roztwór do redukcji nadrukowanych sond

37 mM NaBH₄
72% bufor PBS
28% etanol

Bufor H do mapowania chemicznego (2x stężony)

600 mM NaCl
100 mM HEPES pH 7,5
10 mM MgCl₂

Bufor do lizy ALM1

50 mM D-glukoza
25 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM Na₂EDTA

1.12. Pożywki**Pożywka stała LB z ampicyliną**

2,5 g pepton
1,25 g wyciąg drożdżowy
1,25 g NaCl
3,75 g agar

Dopełniano wodą do 250 ml i sterylizowano w autoklawie, po schłodzeniu do temperatury 55°C do otrzymanego roztworu dodawano roztworu ampicyliny do stężenia końcowego 0,2 mg/ml. Pożywkę wylewano na płytki Petriego na stole z laminarnym przepływem powietrza.

Pożywka płynna LB

10 g pepton

5 g wyciąg drożdżowy

5 g NaCl

Dopełniano wodą do 1000 ml i sterylizowano w autoklawie

Pożywka płynna LB z ampicyliną

Do płynnej pożywki LB dodawano roztworu ampicyliny do stężenia końcowego 0,2 mg/ml.

Roztwór wyjściowy ampicyliny: roztwór ampicyliny w wodzie 0,1 g/ml

Cos-7 pożywka hodowlana

Medium hodowlane DMEM

10% FBS

1x roztwór witamin

1x roztwór antybiotyków

Przed każdorazowym użyciem pożywka była podgrzewana do temperatury 37°C

Cos-7 pożywka hodowlana, używana po odmrażaniu komórek cos-7

Medium hodowlane DMEM

30% FBS

1x roztwór witamin

1x roztwór antybiotyków

Przed każdorazowym użyciem pożywka była podgrzewana do temperatury 37°C

1.13. Żele**Żele agarozowe**

Roztwór agarozy 1% lub 2% w buforze 0,5x TBE lub 1x TAE podgrzewano w kuchence mikrofalowej, dodawano bromku etydyny do końcowego stężenia 7,5 µg/ml, wylewano do aparatu do elektroforezy, pozostawiano do zatężenia.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w warunkach denaturujących

8, 10 lub 12% w/v akrylamid:N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

1x bufor TBE

8 M mocznik

0,6% (w/v) APS

0,04% (v/v) TEMED

Żel wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania kwasów nukleinowych metodą elektroforetyczną w warunkach niedenaturujących

6 % w/v akrylamid:N,N'-metylenobisakrylamid (29:1)

1x bufor TBM

0,6% (w/v) APS

0,04% (v/v) TEMED

Żel wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji.

1.14. Ważniejsza aparatura, którą stosowano podczas prowadzenia badań

- syntetyzer MerMade 12 BioAutomation Corporation
- spektrofotometr UV-VIS Beckman DU-640 z termoprogramatorem
- spektrofotometr UV-VIS JASCO V-650 z termoprogramatorem
- phosphoimager FLA-5100 Fuji
- licznik scyntylicyjny MicroBeta2 Perkin Elmer
- spektrometr masowy MALDI-TOF Bruker Autoflex
- drukarka do mikromacierzy SpotArray 24 PerkinElmer
- drukarka do mikromacierzy NanoPrint microarray printer Arrayit
- automatyczny licznik komórek Automated Cell Counter TC20 Biorad

1.15. Ważniejsze programy stosowane podczas prowadzenia badań

- *MeltWin 3.5*
- *RNAstructure 5.6*
- *vsfold 5*
- *Peak Scanner*

- *Mutli Gauge V3.0*
- *Array Gauge 2.1*
- *RNAComposer*

2. Metody

2.1. Synteza chemiczna oligonukleotydów

Syntezę oligonukleotydów przeprowadzono metodą amidofosforynową na podłożu stałym na syntetyzerze BioAutomation Corporation MerMade 12. Do syntezy wykorzystano handlowo dostępne amidofosforyny RNA, DNA, 2'-O-metylo-RNA oraz fluoresceinę. Amidofosforyny LNA, 2'-O-metylo-2,6-diaminopurynorybozyd oraz pseudonukleotyd pirenowy zostały zsyntetyzowane w Pracowni Chemii RNA.

2.2. Odblokowywanie i oczyszczanie modyfikowanych heptamerów zawierających łącznik C6-aminoheksylowy na końcu 5' oraz pseudonukleotyd pirenowy na końcu 3', stosowanych jako dodatkowe sondy na mikromacierzy.

Podłoże zawierające oligorybonukleotydy i 1 ml 40% wodnego roztworu metyloaminy inkubowano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin. Zebrano roztwór z dna podłoża, po czym podłoże przemywano dwukrotnie 0,5 ml wody. Zebrany roztwór odparowywano do sucha. Do suchych próbek dodawano 0,9 ml 80% wodnego roztworu kwasu octowego, inkubowano 3 godziny w temperaturze pokojowej i odparowano do sucha. Do osadu dodano 0,5 ml wody, odwirowano (5 min. 10000 rpm), przeniesiono roztwór do nowej probówki, a probówki z osadem przepłukiwano jeszcze dwukrotnie 250 μ l wody. Zebrany roztwór odparowywano do sucha. Próbkę rozpuszczano w 150 μ l wody i oczyszczano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytce analitycznej zawierającej żel krzemionkowy 60 F₂₅₄ z zastosowaniem fazy rozwijającej n-propanol/amoniak/woda (55/35/10 v/v/v). Żel krzemionkowy z prążkami zawierającymi pożądane oligonukleotydy zdrapywano z płytki, po czym przemywano trzykrotnie 2 ml wody. Połączone frakcje odparowywano do sucha. Osad rozpuszczano w 500 μ l wody i przenoszono do nowych probówek, dodatkowo probówki z osadem przepłukiwano jeszcze dwukrotnie 200 μ l wody. Całość wirowano 5 minut przy 10 000 rpm. Roztwór przenoszono do nowych probówek. Pozostałości silikażelu przepłukiwano 200 μ l wody i wirowano 5 minut przy 10 000 rpm, roztwór z dna silikażelu łączono z wcześniej zebrany.

Każdy oligonukleotyd był analizowany za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF. Stężenie oligonukleotydów obliczano korzystając ze współczynnika ekstynkcji przewidzianego dla RNA oraz pomiaru absorbancji. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie w świetle UV o długości fali 260 nm.

2.3. Odblokowywanie i oczyszczanie oligorybonukleotydów

Podłoże zawierające oligorybonukleotydy zalewano 1,5 ml 32% wodnego roztworu amoniaku oraz 0,5 ml 96% etanolu. Następnie inkubowano w temperaturze 55°C przez 16 godzin. Próbki schładzano 20 minut w temperaturze -20°C, następnie odsączano roztwór i podłoże, a osad przemywano dwukrotnie 0,5 ml wody. Roztwór odparowywano do sucha. Do osadu dodawano 100 µl N,N'-dimetyloformamidu i ponownie odparowywano. Dodawano 30 µl N,N'-dimetyloformamidu i 270 µl fluorowodoru trietyloamoniowego (dla syntezy oligonukleotydów w skali 1 µM) i inkubowano 2,5 godziny w temperaturze 55°C, co jakiś czas mieszając. Następnie do roztworu dodawano 4 ml n-butanolu i strącano przez 1 godzinę w temperaturze -20°C. Zawiesinę wirowano 10 minut przy 5 000 rpm, supernatant zlewano, a otrzymany osad suszono pod próżnią. Oligorybonukleotydy odsalano za pomocą kolumn zawierających Sephadex G-25 (kolumny NAP-25). Przed nałożeniem prób, kolumny przemywano 30 ml wody. Osad rozpuszczano w 1 ml wody i nakładano na przygotowaną kolumnę. Zbierano 10 frakcji po 1,5 ml. Frakcje, które zawierały oligonukleotyd łączono i odparowywano do sucha. Oligorybonukleotydy oczyszczano za pomocą rozdzielania elektroforetycznego w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm; prążki zawierające oligorybonukleotydy o pożądanej długości wycinano z żelu, z wyciętych fragmentów żelu eluowano oligorybonukleotydy a następnie strącano.

Każdorazowo przeprowadzano analizę masową związków, za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF.

2.4. Odblokowywanie i oczyszczanie oligodeoksyrybonukleotydów oraz oligodeoksyrybonukleotydów zawierających nukleotydy z serii LNA oraz 6-FAM na 5' końcu.

Podłoża zawierające oligodeoksyrybonukleotydy zalewano 1,5-2 ml 32% wodnego roztworu amoniaku. Następnie inkubowano w temperaturze 55°C przez 16 godzin. Próbki

schładzano 20 minut w temperaturze -20°C , następnie odsączano roztwór i podłoże przemywano dwukrotnie 0,5 ml wody. Roztwór odparowywano do sucha. Odblokowane kwasy nukleinowe oczyszczano metodą rozdzielania elektroforetycznego w denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdzielone kwasy nukleinowe lokalizowano dzięki zastosowaniu światła UV o długości fali 260 nm; prążki reprezentujące pożądaną długości kwasy nukleinowe wycinano z żelu, z wyciętych fragmentów żelu eluowano oligodeoksyrybonukleotydy a następnie strącano.

Przeprowadzano analizę masową związków, za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF.

2.5. Pomiary trwałości termodynamicznej z użyciem metody topnienia UV

Pomiary termodynamiczne prowadzono na spektrofotometrze Beckman DU-640 lub JASCO V-650 z termoprogramatorem. Odpowiednie ilości oligonukleotydu odparowywano do sucha i rozpuszczano w buforze do topnień. Przed przystąpieniem do eksperymentu topnienia UV (ang. *UV melting*) oligonukleotydy podgrzewano do 80°C , po czym powoli schładzano do 4°C . Pomiary wykonywano w świetle UV przy długości fali 260 nm, w zakresie temperatury od 4°C do 90°C , szybkość zmiany temperatury wynosiła $1^{\circ}\text{C}/\text{minutę}$, a wartość absorbancji próbek mierzona była co 0,5 minuty. Pomiary trwałości termodynamicznej prowadzono dla dziewięciu różnych stężeń, w zakresie 10^{-3} - 10^{-6} M. Uzyskane w wyniku eksperymentu krzywe topnienia poddawano analizie w programie MeltWin 3.5.

Pomiary trwałości termodynamicznej kompleksów cząsteczek RNA z antybiotykami wykonywano analogicznie jak opisano powyżej. W przypadku neomycyny, kanamycyny i tobramycyny, do oligonukleotydów dodawano odpowiedni antybiotyk w stężeniu wystarczającym, aby do 90% spinek RNA przyłączył się ligand niskocząsteczkowy. W przypadku neomycyny stosunek molowy antybiotyk - RNA wyniósł 10:1, kanamycyny 350:1, tobramycyny 50:1. Namiar molowy mitoksantronu w stosunku do cząsteczki RNA zaburzał pomiary przy długości fali 260 nm, dlatego wykonano pomiary dla równomolowego stosunku RNA do mitoksantronu.

2.6. Pomiary widm dichroizmu kołowego spinek RNA.

Pomiary widm dichroizmu kołowego jedenastu spinek RNA zostały wykonane na spektropolarymetrze JASCO 815. Odpowiednią ilość RNA taką, aby absorbancja przy długości fali 260 nm wynosiła 0,5 została odparowana, a następnie rozpuszczona w tym samym buforze, który używany był do topień UV. Pomiar wykonywano trzykrotnie, w 10°C w zakresie 205-320 nm. Objętość próby wynosiła 1,3 ml, droga optyczna 0,5 cm, a szybkość pomiaru wynosiła 50 nm/min. Wyniki trzech pomiarów widm CD dla każdej spinki RNA zostały uśrednione.

2.7. Znakowanie kwasów rybonukleinowych izotopem ^{32}P

Reakcję przeprowadzano w celu uzyskania znakowanych radioizotopowo cząsteczek RNA wykorzystywanych do hybrydyzacji do izoenergetycznych macierzy RNA. Znakowane cząsteczki RNA otrzymywano korzystając z zestawu do badań biochemicznych Ambion T7-MEGAscriptTM stosując się do zaleceń producenta. Zwykle reakcję przeprowadzano w objętości 10 μl , a mieszanina reakcyjna zawierała: 2 μg matrycy DNA po 1 μl 75mM CTP, GTP, UTP, 0,25 μl 75mM ATP oraz 2 μl [α - ^{32}P] ATP o aktywności 5000 Ci/mmol, 0,5-1 μl mieszaniny T7 polimeraz RNA oraz 1 μl buforu dostarczonego wraz z enzymem. Reakcję prowadzono przez 16 godzin w 37°C. W celu usunięcia matrycowego DNA, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 U DNazy I i inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut.

Transkrypty oczyszczano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym, wizualizowano w świetle UV, eluowano z żelu i strącano. RNA przechowywano w -20°C w stanie zliofilizowanym lub jako roztwory w sterylnej wodzie.

2.8. Elektroforeza DNA w żelach agarozowych produktów reakcji PCR

Produkty reakcji PCR poddawane analizowano metodą elektroforezy w 1% lub 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) w warunkach natywnych. Do prób rozdzielanych w żelu dodawano bufor obciążający. Rozdział prowadzono w buforze 0,5x TBE przy natężeniu 40-50 mA i napięciu 120-130 V. Produkty rozdziału elektroforetycznego analizowano w świetle UV.

2.9. Elektroforeza DNA w żelach agarozowych produktów reakcji RT-PCR

Produkty reakcji RT-PCR analizowano metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (7,5 µg/ml) w warunkach natywnych. Do prób rozdzielanych w żelu dodawano bufor obciążający. Rozdział prowadzono w buforze 1x TAE przy natężeniu 40-50 mA i napięciu 120-130 V. Produkty rozdziału elektroforetycznego analizowano w świetle UV.

2.10. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym o grubości 1 mm w warunkach denaturujących stosowano do oczyszczania cząsteczek RNA po reakcji transkrypcji *in vitro* oraz do oczyszczania oligonukleotydów syntetyzowanych chemicznie. Natomiast do analizy produktów reakcji wydłużania startera (ang. *primer extension*) przeprowadzanej po chemicznym mapowaniu struktury drugorzędowej RNA stosowano żel o grubości 0,5 mm. Stosowano żel poliakrylamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu) z 8 M mocznikiem. Jako bufor elektroforetyczny stosowano 1x TBE. Używano żeli 8, 10 i 12% w zależności od długości rozdzielanych cząsteczek. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 10-15 W (żel 20 x 16 cm), 30-40 W (żel 42 x 22 cm) lub 40-55 W (żel 42 x 33 cm). Każdą elektroforezę poprzedzano 15-30 minutową preelektroforezą. Próbkę przed nałożeniem na żel rozcieńczano w stosunku 1:1 v/v buforami obciążającymi.

2.11. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

Metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących stosowano do analizy homogenności badanych cząsteczek RNA. Żel poliakrylamidowy (6%) wylewano między płyty o rozmiarze 20 x 27 cm z przekładkami o grubości 1 mm. Elektroforezę prowadzono przy mocy prądu 20 W, stosując system chłodzący pozwalający na uzyskanie stałej temperatury 4°C. Elektroforezę poprzedzano 15-30 minutową preelektroforezą. Stosowano żel poliakrylamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akrylamidu do bisakrylamidu) oraz 1x TBM jako bufor elektroforetyczny. Do próbek dodawano buforu obciążającego i nakładano na schłodzony żel. Po zakończeniu elektroforezy

żel suszono. Obraz wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i komputerowego skanera materiałów znakowanych radioizotopowo (PhosphorImager, FLA-5100).

2.12. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego

Żel zawierający kwasy nukleinowe przenoszono do probówek, dodawano buforu do elucji i wytrząsano przy 1000 rpm przez około 2 godziny w temperaturze 4°C. Zbierano supernatant, elucję powtarzano dwa razy. Następnie strącano zawarte w supernatancie kwasy nukleinowe.

2.13. Strącanie kwasów nukleinowych po elucji z żelu poliakrylamidowego

Do supernatantu dodawano 3 objętości schłodzonego do 4°C 96% etanolu i całość inkubowano w temperaturze -20°C minimum przez 2 godziny. Mieszaninę wirowano przy 12 000 rpm, w temperaturze 4°C przez 30 minut dla probówek 1,5 ml lub wirowano przy 6000 rpm w temperaturze 4°C przez 30 minut dla probówek 13 ml, następnie supernatant usuwano. W niektórych przypadkach w celu usunięcia soli osad dodatkowo przemywano 70% etanolem, wirowano przy 12 000 rpm, w temperaturze 4°C przez 10 minut. Supernatant dekantowano, a osad suszono pod próżnią. Próbkę przechowywano w -20°C w stanie zliofilizowanym lub rozpuszczone w sterylnej wodzie.

Stężenie kwasów nukleinowych określano na podstawie pomiaru absorbancji światła UV o długości fali 260 nm oraz korzystając z obliczonego współczynnika ekstynkcji. W przypadku cząsteczek znakowanych radioizotopowo mierzono radioaktywność przy użyciu licznika scyntylicyjnego

2.14. Oczyszczanie kwasów nukleinowych metodą fenol-chloroform

Do 100 µl produktu reakcji PCR dodano 50 µl fenolu i 50 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy 24:1 (v/v) i krótko wytrząsano. Mieszaninę wirowano przy 10 000 rpm przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Usuwano fazę organiczną i czynność powtarzano. Następnie do fazy wodnej dodawano 100 µl mieszaniny chloroform/alkohol izoamylowy 24:1 (v/v) w celu usunięcia śladów fenolu i ponownie wytrząsano i wirowano. DNA zawarte w otrzymanej fazie wodnej strącano poprzez dodanie 3 M octanu sodu pH 5,0 do końcowego stężenia 0,3 M oraz 3 objętości schłodzonego do 4°C 96% etanolu. Całość inkubowano minimum 2 godziny w -20°C. Mieszaninę wirowano przy 12 000 rpm, w

temperaturze 4°C przez 30 minut. Supernatant usuwano, a osad suszono pod próżnią. Próbki przechowywano w -20°C w stanie zliofilizowanym lub rozpuszczone w sterylnej wodzie. Stężenie kwasów nukleinowych określano na podstawie pomiaru absorbancji światła UV o długości fali 260 nm oraz korzystając z obliczonego współczynnika ekstynkcji.

2.15. Otrzymywanie matryc do transkrypcji *in vitro*

W celu otrzymania matrycowych dwuniciowych DNA wykorzystywanych do reakcji transkrypcji *in vitro*, wykonano szereg reakcji PCR. Matryce DNA miały długość 211/212 nukleotydów i zawierały 17 nukleotydów promotora dla polimerazy T7 RNA oraz 194/195 nukleotydowy fragment pre-mRNA genu MAPT. W pierwszym etapie przeprowadzano hybrydyzację równomolowych ilości dwóch oligomerów *maptA* i *maptB*, a następnie reakcję PCR I. Wykorzystano 11 różnych oligonukleotydów *maptB*, które zawierały sekwencje dla formy dzikiej i sekwencje z badanymi mutacjami (11C, 12U, 13G, DD-PAC, 16U, 19G, DD-10C, DDI-17T, WT-10C oraz WTI-17T). Standardowa mieszanina reakcyjna zawierała parę oligomerów, każdy o stężeniu 1,5 µM, 3 mM MgCl₂, mieszaninę czterech dNTP każdy o stężeniu 0,2 mM, bufor z KCl dostarczony wraz z enzymem, 5U polimerazy Taq.

Warunki reakcji PCR I były następujące:

- a) wstępna denaturacja 5 minut 95°C
- b) 8 cykli obejmujących:
 - 75 sekund 95°C
 - 75 sekund 56°C
 - 2 minuty 72°C
- c) końcowe wydłużanie 10 minut, 72°C.

Następnie ta sama mieszanina reakcyjna poddawana była reakcji PCR II, w której produkty reakcji PCR I stanowiły matryce do syntezy dłuższych dwuniciowych DNA z wykorzystaniem jako starterów oligomerów *maptC* i *maptD*.

Warunki reakcji PCR II były następujące:

- a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C
- b) 30 cykli obejmujących:
 - 1 minuta 95°C
 - 30 sekund 58°C
 - 2 minuty 72°C

c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

Kolejno ta sama mieszanina reakcyjna poddawana była reakcji PCR III, w której produkty reakcji PCR II stanowiły matryce do syntezy dłuższych dwuniciowych DNA z wykorzystaniem jako starterów oligomerów maptE i maptF.

Warunki reakcji PCR III były następujące:

a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C

b) 30 cykli obejmujących:

- 1 minuta 95°C

- 30 sekund 58°C

- 2 minuty 72°C

c) końcowe wydłużanie 10 minut, 72°C.

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Skład nukleotydowy matryc sprawdzano poprzez sekwencjonowanie używając starterów maptE i maptF. Niestety, nie udało się uzyskać homogennych matryc, dlatego postanowiono wykonać selekcję odpowiednich matryc wykorzystując plazmid pUC19.

2.16. Selekcja matryc do transkrypcji *in vitro* w plazmidzie pUC19

Mieszanina reakcyjna PCR III poddawana była reakcji PCR IV w celu dobudowania miejsc restrykcyjnych dla enzymów EcoRI i PstI. Produkty reakcji PCR III stanowiły matryce do syntezy dłuższych dwuniciowych DNA z wykorzystaniem jako starterów oligomerów maptE-EcoRI i maptF-PstI.

Warunki reakcji PCR IV były następujące:

a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C

b) 30 cykli obejmujących:

- 1 minuta 95°C

- 30 sekund 50°C

- 2 minuty, 72°C

c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C . DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym.

Następnie produkt reakcji PCR IV i plazmid pUC19 poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi EcoRI i PstI. Ten sam bufor reakcyjny był optymalny dla tych dwóch enzymów restrykcyjnych. Reakcję przeprowadzano w objętości $100\ \mu\text{l}$, dodając $2\ \mu\text{g}$ produktu PCR IV lub plazmidu pUC19, po $5\ \mu\text{l}$ EcoRI i PstI, $10\ \mu\text{l}$ buforu komercyjnie dostępnego, optymalnego dla wybranych enzymów restrykcyjnych. Próby inkubowano minimum 2 godziny w 37°C . Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C . DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym.

Reakcję ligacji produktów reakcji PCR IV i plazmidu pUC19 przeprowadzano w objętości $10\ \mu\text{l}$. Stosunek ligowanego insertu do plazmidu wynosił 3:1, do reakcji dodawano 1U ligazy DNA T4, $1\ \mu\text{l}$ 10x stężonego buforu komercyjnie dostępnego i dopełniano wodą do $10\ \mu\text{l}$. Próby inkubowano w 4°C przez noc.

Kolejnym etapem była transformacja komórek *E. coli* DH5 α metodą szoku termicznego. W tym celu $50\ \mu\text{l}$ zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α rozmrażano w lodzie przez 15 minut. Do zawiesiny komórkowej dodawano $5\ \mu\text{l}$ produktu reakcji ligacji, po czym inkubowano w lodzie przez 45 minut. Następnie zawiesinę ogrzewano w temperaturze 42°C przez 45 sekund. Po czym inkubowano w lodzie przez kolejne 2 minuty.

Do transformowanych komórek dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i wytrząsano przy 300 rpm w 37°C przez 45 minut. Następnie $100\text{-}300\ \mu\text{l}$ otrzymanej zawiesiny wylewano, rozprowadzono bagietką na szalkach ze stałą pożywką LB zawierającą ampicylinę i inkubowano w 37°C przez 12-14 godzin. Pojedyncze kolonie bakterii wyhodowane na stałej pożywce LB zawierały homogenne matryce DNA.

Izolacja plazmidów zawierającym homogeny insert obejmowała kilka etapów. Do 2 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną dodawano pojedynczą kolonię bakteryjną i inkubowano przez noc w 37°C przy 300 rpm. Drugiego dnia całość hodowli (2 ml) zwirowano 1 minutę przy 10 000 rpm, zlewano supernatant, a osad rozpuszczano w $100\ \mu\text{l}$ buforu do lizy ALM1. Probówki umieszczano na lodzie i do każdej próby dodawano $200\ \mu\text{l}$ świeżo przygotowanego roztworu 1% SDS, 0,2 M NaOH, całość delikatnie mieszano przez 5

minut. Następnie dodawano 150 μ l 7,5 M octanu amonu i całość inkubowano na lodzie przez 20 minut, wirowano próby przy 12 000 rpm 15 minut w temperaturze pokojowej, zbierano supernatant. Do probówek z supernatantem dodawano 3 objętości zmrożonego 96% etanolu i pozostawiono próby przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Próby wirowano przy 12 000 rpm, 15 minut w temperaturze pokojowej, supernatant zlewano, osad suszono, następnie rozpuszczano w wodzie z dodatkiem RNazy A (stężenie końcowe 0,01 ng/ μ l). Obecność insertu analizowano w reakcji trawienia enzymami EcoRI i PstI i rozdziale poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Próby posiadające insert analizowano w reakcji sekwencjonowania z użyciem startera SEK-pUC19. W wyniku selekcji matryc w plazmidzie pUC19 otrzymywano matryce DNA o pożądanej sekwencji.

2.17. Amplifikacja matryc do transkrypcji *in vitro*

Plazmidy pUC19 poddawane były reakcji PCR w celu amplifikacji matryc potrzebnych w reakcji transkrypcji *in vitro*, z wykorzystaniem jako starterów oligomerów PCR-1 i PCR-2.

Warunki reakcji amplifikacji matryc były następujące:

- a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C
- b) 30 cykli obejmujących:
 - 1 minuta 95°C
 - 30 sekund 55°C
 - 2 minuty 72°C
- c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym.

2.18. Transkrypcja *in vitro*

Transkrypty otrzymywano korzystając z zestawu do badań biochemicznych Ambion T7-MEGAscriptTM stosując się do zaleceń producenta. Jako matryce stosowano dwuniciowe DNA otrzymane według procedur opisanych powyżej. Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l lub 20 μ l, ilość dodanej matrycy DNA wynosiła 1-4 μ g. Reakcję prowadzono

przez 16 godzin w 37°C. W celu usunięcia matrycowego DNA, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 U DNazy I i inkubowano w temperaturze 37°C przez 15 minut. Transkrypty oczyszczano metodą elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym, wizualizowano w świetle UV, eluowano z żelu i strącano. RNA przechowywano w -20°C w stanie zliofilizowanym lub jako roztwory w sterylnej wodzie.

2.19. Analiza homogenności RNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach niedenaturujących

Cząsteczki RNA znakowano w czasie transkrypcji *in vitro* i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Mieszanina reakcyjna w objętości 10 µl zawierała RNA w ilości 20 000 cpm, 2 µl wybranego buforu F (5x stężony), 1 µl (10x stężonego) buforu obciążającego do elektroforezy w warunkach niedenaturujących. Przebadano warunki denaturacji i renaturacji badanych cząsteczek RNA. Na żel nakładano próbki bez denaturacji, próbki po denaturacji 3 minutowej w 95°C i renaturacji na lodzie oraz próbki po denaturacji 3 minutowej w 95°C i powolnej renaturacji. Próbki analizowano za pomocą elektroforezy w niedenaturującym 6% żelu poliakrylamidowym, w buforze TBM. Po zakończonej elektroforezie żele suszono. Produkty reakcji wizualizowano używając ekranów odwzorowujących i skanera materiałów znakowanych radioizotopowo PhosphorImager, FLA-5100.

2.20. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA metodą SHAPE

Do reakcji użyto 1 pmol RNA zawieszonego w buforze H. Następnie próbkę denaturowano przez 5 minut w 65°C, renaurowano 15 minut w metalowym bloku i 15 minut na statywie w temperaturze pokojowej. Do prawidłowo ufałdowanych cząsteczek RNA dodawano NMIA do końcowego stężenia 20 mM w próbce. Roztwory NMIA sporządzano rozpuszczając go w DMSO. Reakcja prowadzona była przez 3,5 godziny w temperaturze pokojowej. Zatrzymanie reakcji następowało przez dodanie 50 µl wody i 250 µl 0,3 M octanu sodu i 1 µl glikogenu. Do wszystkich reakcji modyfikacji sporządzano próbę kontrolną, traktowaną analogicznie jak próby badane, ale bez dodawania odczynnika modyfikującego. Strącone próbki po modyfikacji wirowano 30 minut przy 12 000 rpm w 4°C, supernatant usuwano, a osad suszono pod próżnią.

Miejsca modyfikacji identyfikowano poprzez przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji (ang. *primer extension*). W tym celu do strąconych wcześniej próbek dodawano 1 pmol startera PE-LNA znakowanego na końcu 5' fluoresceiną, 1 µl buforu do odwrotnej transkrypcji SSIII (5x stężonego) i 3 µl wody. Próby denaturowano 3 minuty w 95°C, po czym inkubowano 10 minut w 55°C. Następnie na lodzie do każdej reakcji dodawano 2 µl buforu SS III, DTT do końcowego stężenia 10 mM, mieszaninę czterech dNTP do końcowego stężenia 0,5 mM oraz 50 U odwrotnej transkryptazy SS III, objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl.

Przeprowadzono analogicznie reakcje odwrotnej transkrypcji z użyciem ddNTP w celu identyfikacji A i C w cząsteczce. Mieszaninę czterech dNTP zastępowano mieszaniną odpowiedniego ddNTP z wszystkimi czterema dNTP. Stężenie końcowe wszystkich trójfosforanów nukleozydów wynosiło 0,5 mM, z wyjątkiem tego dNTP, którego analog w serii ddNTP był dodawany do próby, stężenie takiego dNTP było wówczas 10-krotnie niższe.

Reakcje odwrotnej transkrypcji prowadzono 50 minut w 55°C. Następnie część próby była wykorzystana do analizy poprawności reakcji odwrotnej transkrypcji. Do 4 µl próby dodawano 4 µl buforu obciążającego do elektroforezy w warunkach denaturujących, 1 µl buforu 1x TBE i całość denaturowano 3 minuty w 95°C potem schładzano na lodzie. Próbkę analizowano za pomocą elektroforezy w denaturującym 10% żelu poliakrylamidowym, w buforze TBE. Po zakończonej elektroforezie żele analizowano za pomocą skanera materiałów znakowanych fluorescencyjnie PhosphorImager, FLA-5100.

Próbki z wyraźnymi modyfikacjami były przygotowywane do rozdziału za pomocą elektroforezy kapilarnej w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Do pozostałych 6 µl próby dodawano 5 µl 1 M NaOH i inkubowano 5 minut w 95°C, następnie chłodzono na lodzie. Dodano 4 µl 1 M HCl, 2 µl 3M octanu sodu i 150 µl etanolu. Próbkę strącano przez noc i wirowano 30 minut przy 11 000 rpm w 4°C, osad przemywano 70% etanolem i ponownie wirowano 10 minut przy 11 000 rpm w 4°C, supernatant usuwano, a osad suszono pod próżnią. Rozpuszczony w 10 µl osad był wysyłany do rozdziału techniką elektroforezy kapilarnej. Uzyskane dane były analizowane w programie *Peak Scanner*, potem normalizowane. Wartości wyników pomiędzy 0,3-0,7 uznawano za reaktywność średnią, a wartości powyżej 0,7 za reaktywność mocną.

2.21. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA siarczanem dimetylu

Reakcja mapowania siarczanem dimetylu była wykonywana analogicznie jak mapowanie metodą SHAPE. Jedyną różnicą wynikała z zastosowania czynnika modyfikującego i czasu reakcji modyfikacji. Do prawidłowo ufałdowanych cząsteczek RNA dodawano 1 μ l 300 mM DMS. Roztwory DMS sporządzano rozpuszczając odczynnik modyfikujący w etanolu, a modyfikacja prowadzona była przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane dane były analizowane w programie *Peak Scanner*, następnie normalizowane. Wartości wyników pomiędzy 0,3-0,7 uznawano za reaktywność średnią, a wartości powyżej 0,7 za reaktywność mocną.

2.22. Przygotowanie płytek mikroskopowych

Do 2% wodnego roztworu agarozy dodawano 10 mM NaIO₄. Tak przygotowany roztwór wylewano na aminosilanizowane płytki mikroskopowe (2,5 x 7,5 cm), po 2 ml na płytkę. Pozostawiano na 1 godzinę w celu zateżenia agarozy. Płukano trzykrotnie po 15 minut w wodzie w celu pozbycia się nadmiaru NaIO₄ i pozostawiano do wyschnięcia. Tak sporządzone płytki przechowywano w temperaturze pokojowej do kilku miesięcy.

2.23. Przygotowanie sond do drukowania na mikromacierzy

Funkcja *OligoWalk*, dostępna w programie komputerowym *RNAStructure 5.6* pozwoliła na uzyskiwanie sekwencji pentamerów komplementarnych do badanego RNA z przesunięciem co 1 nukleotyd. Na podstawie tych sekwencji wybierano modyfikowane sondy z biblioteki izoenergetycznej.

Odpowiednie ilości sond zawierających łącznik C6-aminoheksylowy pobrano z biblioteki i odparowywano do sucha po próżną. Następnie, sondy rozpuszczano w buforze do drukowania do stężenia 0,1 mM (w objętości 20 μ l). Przenoszono na 384 dołkową płytkę do drukowania. Na płytce umieszczano również w kilku miejscach oligomer UUUUU lub sam bufor do drukowania jako kontrolę negatywną.

2.24. Drukowanie sond na mikromacierzy

Drukowanie macierzy odbywało się przy zachowywaniu wilgotności 60%, stosowano 8-krotny „preprint”, każdą sondę drukowano w ilości od 4 do 5 powtórzeń, odległość pomiędzy kolejnymi nadrukowanymi punktami wynosiła 750 μ m. Po drukowaniu

mikromacierze inkubowano 16 godzin w 37°C, zachowując 100% wilgotność. Wydrukowane płytki pokrywano 1 ml świeżo przygotowanego roztworu do redukcji i inkubowano 15 minut, po czym macierz płukano 3-krotnie po 15 minut w wodzie. Następnie inkubowano około 1 godziny w 1% roztworze SDS w temperaturze 55°C w celu pozbycia się nadmiaru sond nie związanych kowalencyjnie do agarozy. Kolejny raz płukano trzykrotnie po 15 minut w wodzie. Gotowe mikromacierze suszono w temperaturze pokojowej.

2.25. Hybrydyzacja na mikromacierzy

Cząsteczki RNA znakowano w czasie transkrypcji *in vitro* i oczyszczano na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. 200 000 cpm badanego RNA zawieszano w 200 µl wybranego buforu hybrydyzacyjnego. Następnie RNA poddawano fałdowaniu poprzez denaturację 3 minuty w 95°C oraz renaturację 20 minut w 25°C.

Roztwory nanoszono na szkiełko mikroskopowe zawierające nadrukowaną macierz i przykrywano komorą hybrydyzacyjną. Całość inkubowano 16 godzin w 4°C lub 22°C z zachowaniem 100% wilgotności otoczenia. Następnie roztwór hybrydyzacyjny usuwano, szkiełka płukano 3 minuty w 4°C w tym samym buforze, w którym przeprowadzano hybrydyzację. Płytki osuszano wirując je 2 minuty przy 2 000 rpm i pokrywano przezroczystą folią. Wyniki eksperymentu wizualizowano używając ekranów odwzorowujących oraz skanera materiałów znakowanych radioizotopowo FLA-500. Każdy eksperyment powtarzano trzykrotnie, a otrzymane wyniki uśredniano. Uzyskane dane analizowano w programie *ArrayGauge V2.1* i wyniki normalizowano. Sygnały hybrydyzacyjne sklasyfikowano, jako mocne (wartość pomiędzy 1-3) oraz średnie (wartość pomiędzy 3-9), reszta została odrzucona.

Występowanie alternatywnego miejsca wiązania sprawdzono wykorzystując funkcję „*fold RNA bimolecular*” dostępną w programie *RNAstructure 5.6*. Dla każdego alternatywnego miejsca przewidywano wartość energii swobodnej powstałego dupleksu. Oprogramowanie, z którego korzystano powstało na podstawie parametrów najbliższego sąsiedztwa ustalonych w Pracowni Chemii RNA.

Po przeprowadzeniu eksperymentu hybrydyzacji macierze odzyskiwano do ponownego użycia poprzez trzykrotne płukanie po 15 minut w wodzie. Następnie mikromacierz inkubowano około 1 godziny w 1% roztworze SDS w 55°C w celu pozbycia się cząsteczek RNA zhybrydyzowanych z sondami. Kolejny raz płukano 3 razy po 15 minut w

wodzie. Mikromacierze suszono w temperaturze pokojowej i używano ponownie. Jedna mikromacierz była używana wielokrotnie.

2.26. Przygotowanie plazmidów pSPL3b

Wykonano reakcję PCR w celu amplifikacji fragmentów pre-mRNA bez promotora dla polimerazy T7 RNA, ale z miejscami restrykcyjnymi dla EcoRI i PstI. Matrycą w reakcji były rozcieńczone 100 razy plazmidy pUC19 z odpowiednimi mutacjami, jako startery wykorzystano oligomery maptG i maptF-PstI.

Warunki reakcji PCR V były następujące:

- a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C
- b) 30 cykli obejmujących:
 - 1 minuta 95°C
 - 30 sekund 55°C
 - 2 minuty 72°C
- c) końcowe wydłużanie 10 minut, 72°C.

Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym.

Następnie produkt amplifikacji i plazmid pSPL3b poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi EcoRI i PstI. Ten sam bufor reakcyjny był optymalny dla tych dwóch enzymów restrykcyjnych. Reakcję przeprowadzano w objętości 100 µl, dodając 2 µg produktu amplifikacji lub plazmidu pSPL3b, po 5 µl EcoRI i PstI, 10 µl buforu komercyjnie dostępnego, optymalnego dla wybranych enzymów restrykcyjnych. Próby inkubowano minimum 2 godziny w 37°C. Produkty reakcji oczyszczano przy pomocy zestawu QIAGEN PCR Purification Kit lub poprzez ekstrakcję fenol-chloroform. Oczyszczone DNA rozpuszczano w sterylnej wodzie i przechowywano w temperaturze -20°C. DNA analizowano poprzez elektroforezę w żelu agarozowym.

Reakcję ligacji produktów reakcji amplifikacji i plazmidu pSPL3b przeprowadzano w objętości 10 µl. Stosunek ligowanego insertu do plazmidu wynosił 3:1, do reakcji dodawano 1U ligazy DNA T4, 1µl 10x stężonego buforu komercyjnie dostępnego i dopełniano wodą do 10 µl. Próby inkubowano w 4°C przez noc.

Kolejnym etapem była transformacja komórek *E. coli* DH5 α metodą szoku termicznego. W tym celu 50 μ l zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* DH5 α rozmrażano w lodzie przez 15 minut. Do zawiesiny komórkowej dodawano 5 μ l produktu reakcji ligacji, po czym inkubowano w lodzie przez 45 minut. Następnie zawiesinę ogrzewano w temperaturze 42°C przez 45 sekund, po czym inkubowano w lodzie przez kolejne 2 minuty.

Do transformowanych komórek dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i wytrząsano przy 300 rpm w 37°C przez 45 minut. Następnie 100-300 μ l otrzymanej zawiesiny wylewano i rozprowadzano bagietką na szalkach ze stałą pożywką LB zawierającą ampicylinę inkubowano w 37°C przez 12-14 godzin.

Izolacja plazmidów zawierającym insert obejmowała kilka etapów. Do 2 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną dodawano pojedynczą kolonię bakteryjną i inkubowano przez noc w 37°C przy 300 rpm. Drugiego dnia całość hodowli (2 ml) zwirowano 1 minutę przy 10 000 rpm, zlewano supernatant, a osad rozpuszczano w 100 μ l buforu do lizy ALM1. Probówki umieszczano na lodzie i do każdej próby dodawano 200 μ l świeżo przygotowanego roztworu 1% SDS, 0,2 M NaOH, całość delikatnie mieszano przez 5 minut. Następnie dodawano 150 μ l 7,5 M octanu amonu i całość inkubowano na lodzie przez 20 minut, wirowano próby przy 12 000 rpm 15 minut w temperaturze pokojowej, zbierano supernatant. Do próbek z supernatantem dodawano 3 objętości zmrożonego 96% etanolu i pozostawiono próby przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Próby wirowano przy 12 000 rpm 15 minut w temperaturze pokojowej, supernatant zlewano, osad suszono, następnie rozpuszczano w wodzie z dodatkiem RNazy A (stężenie końcowe 0,01 ng/ μ l). Obecność insertu analizowano w reakcji trawienia enzymami EcoRI i PstI i rozdziale poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Próby posiadające insert analizowano w reakcji sekwencjonowania z użyciem startera SEK-pSPL3b.

2.27. Rozmrażanie komórek *cos-7*

Zamrożone komórki *cos-7* odmrażano w wodzie o temperaturze 37°C i całość przenoszono do butelki hodowlanej T-75. Następnie dodawano 10 ml pożywki hodowlanej po odmrażaniu. Po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji wykonywano pasaż do nowej butelki. Wszystkie prace z komórkami *cos-7* były wykonywane w sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem powietrza.

2.28. Hodowla komórek *cos-7*

Linia komórkowa *cos-7* hodowana była w pożywce DMEM wzbogaconej 10% bydlęcą surowicą płodową FBS, komercyjnie dostępnym zestawem witamin i antybiotyków. Komórki hodowano w inkubatorze, który pozwalał na uzyskanie środowiska optymalnego dla komórek *cos-7*, a zawierającego 5% zawartość CO₂ w atmosferze, temperaturę 37°C, wilgotność 100%. Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90% wykonywano pasaż komórek do nowej butelki, gdzie zredukowano liczbę komórek o 10 razy. Pasaż wykonywano usuwając pożywkę z butelki, przemywając komórki sterylnym buforem PBS. Następnie dodawano 1 ml trypsyny (1x) i inkubowano komórki 3 minuty w 37°C, inaktywowano trypsynę przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej z FBS. Komórki przenoszono do 15 ml probówek, rozbijano komórki i 1/10 zawiesiny przenoszono do nowej butelki hodowlanej, dodawano 9 ml pożywki hodowlanej i butelkę umieszczano w inkubatorze.

2.29. Pasaż komórek *cos-7* na płytkę 24 dołkową

Gdy pokrycie powierzchni butelki hodowlanej przez komórki wynosiło ponad 90% usuwano pożywkę z butelki, przemywano komórki sterylnym buforem PBS. Następnie dodawano 1 ml trypsyny i inkubowano komórki 3 minuty w 37°C, inaktywowano trypsynę przez dodanie 5 ml pożywki hodowlanej z FBS. Komórki przenoszono do 15 ml probówek i wirowano 3 minuty przy 1000 rpm, usuwano pożywkę i komórki zawieszano w 10 ml buforu PBS. Następnie liczone komórki przy pomocy automatycznego licznika komórek i 100 000 komórek *cos-7* pasażowano do jednego dołka w płytce 24 dołkowej, do każdego dołka dodawano 0,5 ml pożywki hodowlanej. Płytkę hodowlaną umieszczano na 24 godziny w inkubatorze.

2.30. Transfekcja komórek *cos-7*

Do transfekcji komórek *cos-7* wykorzystywano odczynnik transfekujący lipofektaminę 2000. Do transfekcji jednego dołka w płytce 24 dołkowej, mieszano 1 µl lipofektaminy z 50 µl pożywki OptiMEM oraz 0,5 µg plazmidu pSPL3b z 50 µl pożywki OptiMEM, całość inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie łączono lipofektaminę i plazmid pSPL3b i razem inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. Z przygotowanej dzień wcześniej płytki 24 dołkowej usuwano pożywkę, przemywano dołki

buforem PBS, na dołek dodawano plazmid pSPL3b wraz z lipofektaminą i zalewano 0,5 ml pożywki hodowlanej bez antybiotyku. Płytkę hodowlaną umieszczano na 24 godziny w inkubatorze i wykonywano izolacje całkowitego RNA z każdego dołka w płytce hodowlanej

W badaniach wpływu niskocząsteczkowych ligandów na alternatywny splicing eksonu 10 genu *MAPT* transfekcję wykonywano analogicznie jak powyżej, przy czym każdy dołek zalewano pożywką hodowlaną z poszczególnym antybiotykiem. Stężenia neomycyny, kanamycyny, tobramycyny, mitoksantronu w pożywce hodowlanej wynosiło 50 μ M, 0,1 mM, 0,5 mM, 5 mM oraz 10 mM.

W badaniach na liniach komórkowych *cos-7* wykorzystano oligonukleotydy antysensowe, które transfekowano do komórek *cos-7* równocześnie z plazmidem pSPL3b. Do transfekcji jednego dołka w płytce 24 dołkowej, mieszano 2 μ l lipofektaminy z 100 μ l pożywki OptiMEM, 0,5 μ g plazmidu pSPL3b z 50 μ l pożywki OptiMEM oraz 20 pmol oligonukleotydu antysensowego z 50 μ l pożywki OptiMEM, całość inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 50 μ l lipofektaminy do plazmidu pSPL3b i oligonukleotydu antysensowego, razem inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. Z przygotowanej dzień wcześniej płytki 24 dołkowej usuwano pożywkę, przemywano dołki buforem PBS, na dołek dodawano plazmid pSPL3b wraz z lipofektaminą i oligonukleotyd antysensowy z lipofektaminą, zalewano 0,5 ml pożywki hodowlanej bez antybiotyku. Płytkę hodowlaną umieszczano na 24 godziny w inkubatorze i wykonywano izolację całkowitego RNA z każdego dołka w płytce hodowlanej.

2.31. Izolacja całkowitego RNA z komórek *cos-7*

Z płytki 24 dołkowej usuwano pożywkę hodowlaną i dołek przepłukiwano buforem PBS. Każdy dołek zalewano 200 μ l Trizolu i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie całość przenoszono do probówek 1,5 ml, dodawano 35 μ l chloroformu, mieszano i inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej, wirowano 15 minut przy 12 000 rpm w 4°C. Kolejno zbierano fazę wodną do nowych probówek i zalewano 100 μ l izopropanolu, inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, wirowano 8 minut przy 12 000 rpm w 4°C, zlewano supernatant. Osad przemywano 200 μ l zimnego 70% etanolu, wirowano 5 minut przy 12 000 rpm w 4°C, suszono. Wyizolowane RNA rozpuszczano w 50 μ l sterylnej wody i inkubowano 10 minut w 55°C, próby przechowywano w -20°C.

2.32. Analiza alternatywnego splicingu w oparciu o reakcje RT-PCR

Pierwszym etapem analizy RT-PCR była reakcja DNazowania wyizolowanych próbek RNA. Reakcje prowadzono w 10 µl objętości. Do 500 ng RNA dodawano 1 µl komercyjnie dostępnego buforu, 2 U DNazy I i wody do objętości 10 µl, całość inkubowano 30 minut w 37°C, reakcję zatrzymywano przez dodanie 1 µl 50 mM Na₂EDTA i inkubację 10 minut w 65°C.

Następnie wykonywano reakcję odwrotnej transkrypcji, gdzie matrycą było całkowite RNA wyizolowane z komórek *cos-7* po usunięciu DNA. Do reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano zestaw do badań biochemicznych iScriptTM Reverse Transcription Supermix. Reakcję wykonywano w objętości 10 µl. Mieszanka reakcyjna zawierała 100 ng RNA po DNazowaniu, 2 µl iScript reverse transcription supermix i wodę do 10 µl.

Warunki reakcji były następujące:

- 5 minut 25°C
- 30 minut 42°C
- 5 minut 85°C

Produkty reakcji odwrotnej transkrypcji stanowiły matryce w reakcji PCR z wykorzystaniem jako starterów oligomerów SA2 i SP6.

Warunki reakcji PCR były następujące:

- a) wstępna denaturacja 2 minuty 95°C
- b) 40 cykli obejmujących:
 - 1 minuta 95°C
 - 30 sekund 58°C
 - 2 minuty 72°C
- c) końcowe wydłużanie 10 minut 72°C.

Reakcję PCR wykonywano w 10 µl objętości, dodawano 2 µl buforu obciążającego do rozdziału na żelach agarozowych i produkty analizowano na 2% żelach agarozowych w warunkach natywnych w buforze TAE. Analizę ilościową produktów wykonywano w programie *MutiGauge V3.0*.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Behzadnia, N., Golas, M. M., Hartmuth, K., Sander, B., Kastner, B., Deckert, J., Dube, P., Will, C. L., Urlaub, H., Stark, H., and Luhrmann, R. (2007) Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes, *EMBO J* 26, 1737-1748.
2. Jurica, M. S., and Moore, M. J. (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins, *Mol Cell* 12, 5-14.
3. Berget, S. M. (1995) Exon recognition in vertebrate splicing, *J Biol Chem* 270, 2411-2414.
4. Sun, H., and Chasin, L. A. (2000) Multiple splicing defects in an intronic false exon, *Mol Cell Biol* 20, 6414-6425.
5. Zhang, M. Q. (1998) Statistical features of human exons and their flanking regions, *Hum Mol Genet* 7, 919-932.
6. Query, C. C., Moore, M. J., and Sharp, P. A. (1994) Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model, *Genes Dev* 8, 587-597.
7. Reed, R. (1996) Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing, *Curr Opin Genet Dev* 6, 215-220.
8. Sheth, N., Roca, X., Hastings, M. L., Roeder, T., Krainer, A. R., and Sachidanandam, R. (2006) Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics, *Nucleic Acids Res* 34, 3955-3967.
9. Ruby, S. W., and Abelson, J. (1991) Pre-mRNA splicing in yeast, *Trends Genet* 7, 79-85.
10. Patterson, B., and Guthrie, C. (1991) A U-rich tract enhances usage of an alternative 3' splice site in yeast, *Cell* 64, 181-187.
11. Zdobnov, E. M., von Mering, C., Letunic, I., Torrents, D., Suyama, M., Copley, R. R., Christophides, G. K., Thomasova, D., Holt, R. A., Subramanian, G. M., Mueller, H. M., Dimopoulos, G., Law, J. H., Wells, M. A., Birney, E., Charlab, R., Halpern, A. L., Kokoza, E., Kraft, C. L., Lai, Z., Lewis, S., Louis, C., Barillas-Mury, C., Nusskern, D., Rubin, G. M., Salzberg, S. L., Sutton, G. G., Topalis, P., Wides, R., Wincker, P., Yandell, M., Collins, F. H., Ribeiro, J., Gelbart, W. M., Kafatos, F. C., and Bork, P. (2002) Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*, *Science* 298, 149-159.
12. Black, D. L. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing, *Annu Rev Biochem* 72, 291-336.
13. Deutsch, M., and Long, M. (1999) Intron-exon structures of eukaryotic model organisms, *Nucleic Acids Res* 27, 3219-3228.
14. Zhang, X. H., Kangsamaksin, T., Chao, M. S., Banerjee, J. K., and Chasin, L. A. (2005) Exon inclusion is dependent on predictable exonic splicing enhancers, *Mol Cell Biol* 25, 7323-7332.
15. Will, C. L., and Luhrmann, R. (2011) Spliceosome structure and function, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
16. Will, C. L., and Luhrmann, R. (2005) Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome, *Biol Chem* 386, 713-724.
17. Maniatis, T., and Tasic, B. (2002) Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans, *Nature* 418, 236-243.
18. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature* 431, 931-945.

19. Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J., and Blencowe, B. J. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing, *Nat Genet* 40, 1413-1415.
20. Graveley, B. R., Brooks, A. N., Carlson, J. W., Duff, M. O., Landolin, J. M., Yang, L., Artieri, C. G., van Baren, M. J., Boley, N., Booth, B. W., Brown, J. B., Cherbas, L., Davis, C. A., Dobin, A., Li, R., Lin, W., Malone, J. H., Mattiuzzo, N. R., Miller, D., Sturgill, D., Tuch, B. B., Zaleski, C., Zhang, D., Blanchette, M., Dudoit, S., Eads, B., Green, R. E., Hammonds, A., Jiang, L., Kapranov, P., Langton, L., Perrimon, N., Sandler, J. E., Wan, K. H., Willingham, A., Zhang, Y., Zou, Y., Andrews, J., Bickel, P. J., Brenner, S. E., Brent, M. R., Cherbas, P., Gingeras, T. R., Hoskins, R. A., Kaufman, T. C., Oliver, B., and Celniker, S. E. (2011) The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*, *Nature* 471, 473-479.
21. Ramani, A. K., Calarco, J. A., Pan, Q., Mavandadi, S., Wang, Y., Nelson, A. C., Lee, L. J., Morris, Q., Blencowe, B. J., Zhen, M., and Fraser, A. G. (2011) Genome-wide analysis of alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*, *Genome Res* 21, 342-348.
22. Schmucker, D., Clemens, J. C., Shu, H., Worby, C. A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J. E., and Zipursky, S. L. (2000) *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity, *Cell* 101, 671-684.
23. Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., and Burge, C. B. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes, *Nature* 456, 470-476.
24. Fox-Walsh, K. L., and Hertel, K. J. (2009) Splice-site pairing is an intrinsically high fidelity process, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1766-1771.
25. Graveley, B. R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions, *RNA* 6, 1197-1211.
26. Shen, H., Kan, J. L., and Green, M. R. (2004) Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly, *Mol Cell* 13, 367-376.
27. Shen, H., and Green, M. R. (2004) A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly, *Mol Cell* 16, 363-373.
28. Hertel, K. J., Lynch, K. W., and Maniatis, T. (1997) Common themes in the function of transcription and splicing enhancers, *Curr Opin Cell Biol* 9, 350-357.
29. Lam, B. J., and Hertel, K. J. (2002) A general role for splicing enhancers in exon definition, *RNA* 8, 1233-1241.
30. Wang, Z., and Burge, C. B. (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code, *RNA* 14, 802-813.
31. Zhu, J., Mayeda, A., and Krainer, A. R. (2001) Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins, *Mol Cell* 8, 1351-1361.
32. Tange, T. O., Damgaard, C. K., Guth, S., Valcarcel, J., and Kjems, J. (2001) The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element, *EMBO J* 20, 5748-5758.
33. House, A. E., and Lynch, K. W. (2006) An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition, *Nat Struct Mol Biol* 13, 937-944.
34. Martinez-Contreras, R., Fiset, J. F., Nasim, F. U., Madden, R., Cordeau, M., and Chabot, B. (2006) Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing, *PLoS Biol* 4, e21.

35. Chen, M., and Manley, J. L. (2009) Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 741-754.
36. Dominski, Z., and Kole, R. (1991) Selection of splice sites in pre-mRNAs with short internal exons, *Mol Cell Biol* 11, 6075-6083.
37. Kornblihtt, A. R., de la Mata, M., Fededa, J. P., Munoz, M. J., and Nogues, G. (2004) Multiple links between transcription and splicing, *RNA* 10, 1489-1498.
38. Gornemann, J., Kotovic, K. M., Hujer, K., and Neugebauer, K. M. (2005) Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex, *Mol Cell* 19, 53-63.
39. Kornblihtt, A. R. (2005) Promoter usage and alternative splicing, *Curr Opin Cell Biol* 17, 262-268.
40. Tardiff, D. F., Lacadie, S. A., and Rosbash, M. (2006) A genome-wide analysis indicates that yeast pre-mRNA splicing is predominantly posttranscriptional, *Mol Cell* 24, 917-929.
41. Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., and Kornblihtt, A. R. (1997) Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11456-11460.
42. de la Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A. R. (2003) A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo, *Mol Cell* 12, 525-532.
43. Hicks, M. J., Yang, C. R., Kotlajich, M. V., and Hertel, K. J. (2006) Linking splicing to Pol II transcription stabilizes pre-mRNAs and influences splicing patterns, *PLoS Biol* 4, e147.
44. Kwek, K. Y., Murphy, S., Furger, A., Thomas, B., O'Gorman, W., Kimura, H., Proudfoot, N. J., and Akoulitchev, A. (2002) U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation, *Nat Struct Biol* 9, 800-805.
45. Corden, J. L., and Patturajan, M. (1997) A CTD function linking transcription to splicing, *Trends Biochem Sci* 22, 413-416.
46. Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R. V., Gentile, C., Gebara, M., and Corden, J. L. (1996) The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6975-6980.
47. Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M. P., Krainer, A. R., Gygi, S. P., and Reed, R. (2007) SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing, *Mol Cell* 26, 867-881.
48. Lewis, J. D., Izaurralde, E., Jarmolowski, A., McGuigan, C., and Mattaj, I. W. (1996) A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site, *Genes Dev* 10, 1683-1698.
49. Nesic, D., and Maquat, L. E. (1994) Upstream introns influence the efficiency of final intron removal and RNA 3'-end formation, *Genes Dev* 8, 363-375.
50. Li, Y., Chen, Z. Y., Wang, W., Baker, C. C., and Krug, R. M. (2001) The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo, *RNA* 7, 920-931.
51. Vagner, S., Vagner, C., and Mattaj, I. W. (2000) The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing, *Genes Dev* 14, 403-413.
52. Millevoi, S., Geraghty, F., Idowu, B., Tam, J. L., Antoniou, M., and Vagner, S. (2002) A novel function for the U2AF 65 splicing factor in promoting pre-mRNA 3'-end processing, *EMBO Rep* 3, 869-874.

53. Kyburz, A., Friedlein, A., Langen, H., and Keller, W. (2006) Direct interactions between subunits of CPSF and the U2 snRNP contribute to the coupling of pre-mRNA 3' end processing and splicing, *Mol Cell* 23, 195-205.
54. McCracken, S., Lambermon, M., and Blencowe, B. J. (2002) SRm160 splicing coactivator promotes transcript 3'-end cleavage, *Mol Cell Biol* 22, 148-160.
55. Kataoka, N., Yong, J., Kim, V. N., Velazquez, F., Perkinson, R. A., Wang, F., and Dreyfuss, G. (2000) Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm, *Mol Cell* 6, 673-682.
56. Chan, C. C., Dostie, J., Diem, M. D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J., and Dreyfuss, G. (2004) eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex, *RNA* 10, 200-209.
57. Nott, A., Le Hir, H., and Moore, M. J. (2004) Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex, *Genes Dev* 18, 210-222.
58. Lejeune, F., and Maquat, L. E. (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells, *Curr Opin Cell Biol* 17, 309-315.
59. Zhang, Z., and Krainer, A. R. (2004) Involvement of SR proteins in mRNA surveillance, *Mol Cell* 16, 597-607.
60. Lareau, L. F., Inada, M., Green, R. E., Wengrod, J. C., and Brenner, S. E. (2007) Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements, *Nature* 446, 926-929.
61. Ni, J. Z., Grate, L., Donohue, J. P., Preston, C., Nobida, N., O'Brien, G., Shiue, L., Clark, T. A., Blume, J. E., and Ares, M., Jr. (2007) Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay, *Genes Dev* 21, 708-718.
62. Palusa, S. G., and Reddy, A. S. (2010) Extensive coupling of alternative splicing of pre-mRNAs of serine/arginine (SR) genes with nonsense-mediated decay, *New Phytol* 185, 83-89.
63. Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., and Misteli, T. (2010) Regulation of alternative splicing by histone modifications, *Science* 327, 996-1000.
64. Hiller, M., Zhang, Z., Backofen, R., and Stamm, S. (2007) Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition, *PLoS Genet* 3, e204.
65. Shepard, P. J., and Hertel, K. J. (2008) Conserved RNA secondary structures promote alternative splicing, *RNA* 14, 1463-1469.
66. Warf, M. B., and Berglund, J. A. (2010) Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing, *Trends Biochem Sci* 35, 169-178.
67. Bocobza, S., Adato, A., Mandel, T., Shapira, M., Nudler, E., and Aharoni, A. (2007) Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom, *Genes Dev* 21, 2874-2879.
68. Warf, M. B., Nakamori, M., Matthys, C. M., Thornton, C. A., and Berglund, J. A. (2009) Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18551-18556.
69. Lee, C. J., and Irizarry, K. (2003) Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation, *Biol Psychiatry* 54, 771-776.
70. Modrek, B., Resch, A., Grasso, C., and Lee, C. (2001) Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes, *Nucleic Acids Res* 29, 2850-2859.

71. Grabowski, P. J., and Black, D. L. (2001) Alternative RNA splicing in the nervous system, *Prog Neurobiol* 65, 289-308.
72. Lagier-Tourenne, C., and Cleveland, D. W. (2009) Rethinking ALS: the FUS about TDP-43, *Cell* 136, 1001-1004.
73. Monani, U. R. (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease, *Neuron* 48, 885-896.
74. Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7737-7741.
75. Wan, Y., Kertesz, M., Spitale, R. C., Segal, E., and Chang, H. Y. (2011) Understanding the transcriptome through RNA structure, *Nat Rev Genet* 12, 641-655.
76. Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S., and Burd, C. G. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA, *Annu Rev Biochem* 62, 289-321.
77. Buratti, E., and Baralle, F. E. (2004) Influence of RNA secondary structure on the pre-mRNA splicing process, *Mol Cell Biol* 24, 10505-10514.
78. Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F. H. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression, *FEBS J* 272, 2118-2131.
79. Barash, Y., Calarco, J. A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B. J., and Frey, B. J. (2010) Deciphering the splicing code, *Nature* 465, 53-59.
80. Estes, P. A., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A. (1992) A native RNA secondary structure controls alternative splice-site selection and generates two human growth hormone isoforms, *J Biol Chem* 267, 14902-14908.
81. Blanchette, M., and Chabot, B. (1997) A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B, *RNA* 3, 405-419.
82. Sirand-Pugnet, P., Durosay, P., Clouet d'Orval, B. C., Brody, E., and Marie, J. (1995) beta-Tropomyosin pre-mRNA folding around a muscle-specific exon interferes with several steps of spliceosome assembly, *J Mol Biol* 251, 591-602.
83. Buratti, E., Muro, A. F., Giombi, M., Gherbassi, D., Iaconcig, A., and Baralle, F. E. (2004) RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon, *Mol Cell Biol* 24, 1387-1400.
84. Muro, A. F., Caputi, M., Pariyarath, R., Pagani, F., Buratti, E., and Baralle, F. E. (1999) Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display, *Mol Cell Biol* 19, 2657-2671.
85. Pagani, F., Raponi, M., and Baralle, F. E. (2005) Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6368-6372.
86. Graveley, B. R. (2005) Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures, *Cell* 123, 65-73.
87. Baraniak, A. P., Lasda, E. L., Wagner, E. J., and Garcia-Blanco, M. A. (2003) A stem structure in fibroblast growth factor receptor 2 transcripts mediates cell-type-specific splicing by approximating intronic control elements, *Mol Cell Biol* 23, 9327-9337.
88. Libri, D., Stutz, F., McCarthy, T., and Rosbash, M. (1995) RNA structural patterns and splicing: molecular basis for an RNA-based enhancer, *RNA* 1, 425-436.
89. Shen, L. X., Basilion, J. P., and Stanton, V. P., Jr. (1999) Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7871-7876.
90. Nogales, E. (2000) Structural insights into microtubule function, *Annu Rev Biochem* 69, 277-302.

91. Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease, *Nat Med* 10 Suppl, S10-17.
92. Wolfe, M. S. (2012) The role of tau in neurodegenerative diseases and its potential as a therapeutic target, *Scientifica (Cairo)* 2012, 796024.
93. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly, *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-1862.
94. Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., and Kirschner, M. W. (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin, *J Mol Biol* 116, 207-225.
95. Binder, L. I., Frankfurter, A., and Rebhun, L. I. (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system, *J Cell Biol* 101, 1371-1378.
96. Papasozomenos, S. C., and Binder, L. I. (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system, *Cell Motil Cytoskeleton* 8, 210-226.
97. Johnson, G. V., and Stoothoff, W. H. (2004) Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction, *J Cell Sci* 117, 5721-5729.
98. Kosik, K. S., and Shimura, H. (2005) Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies, *Biochim Biophys Acta* 1739, 298-310.
99. Lee, V. M., Goedert, M., and Trojanowski, J. Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies, *Annu Rev Neurosci* 24, 1121-1159.
100. Donahue, C. P., Muratore, C., Wu, J. Y., Kosik, K. S., and Wolfe, M. S. (2006) Stabilization of the tau exon 10 stem loop alters pre-mRNA splicing, *J Biol Chem* 281, 23302-23306.
101. Andreadis, A., Brown, W. M., and Kosik, K. S. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene, *Biochemistry* 31, 10626-10633.
102. Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R. A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Neuron* 3, 519-526.
103. Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., and Crowther, R. A. (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain, *EMBO J* 8, 393-399.
104. Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M. (2010) Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines, *J Neurosci* 30, 11938-11950.
105. Ikegami, S., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000) Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice, *Neurosci Lett* 279, 129-132.
106. Frost, B., Jacks, R. L., and Diamond, M. I. (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell, *J Biol Chem* 284, 12845-12852.
107. Guo, J. L., and Lee, V. M. (2011) Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles, *J Biol Chem* 286, 15317-15331.
108. Nonaka, T., Watanabe, S. T., Iwatsubo, T., and Hasegawa, M. (2010) Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases, *J Biol Chem* 285, 34885-34898.
109. Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model, *Neuron* 53, 337-351.

110. Goedert, M., and Jakes, R. (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies, *Biochim Biophys Acta* 1739, 240-250.
111. Ballatore, C., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders, *Nat Rev Neurosci* 8, 663-672.
112. Braak, H., and Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
113. Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr., Morris, J. C., Growdon, J. H., and Hyman, B. T. (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease, *J Neurosci* 16, 4491-4500.
114. Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., Damasio, A. R., and Barnes, C. L. (1984) Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation, *Science* 225, 1168-1170.
115. de Calignon, A., Polydoro, M., Suarez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K. H., Carlson, G. A., Spires-Jones, T. L., and Hyman, B. T. (2012) Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease, *Neuron* 73, 685-697.
116. Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., and Duff, K. (2012) Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo, *PLoS One* 7, e31302.
117. Tanzi, R. E., and Bertram, L. (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective, *Cell* 120, 545-555.
118. Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q., and Mucke, L. (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model, *Science* 316, 750-754.
119. Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A., and Takashima, A. (2006) Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease, *Neurosci Res* 54, 197-201.
120. Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G. R., and Kaye, R. (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease, *FASEB J* 26, 1946-1959.
121. Peterson, D. W., Zhou, H., Dahlquist, F. W., and Lew, J. (2008) A soluble oligomer of tau associated with fiber formation analyzed by NMR, *Biochemistry* 47, 7393-7404.
122. de Calignon, A., Fox, L. M., Pitstick, R., Carlson, G. A., Bacskai, B. J., Spires-Jones, T. L., and Hyman, B. T. (2010) Caspase activation precedes and leads to tangles, *Nature* 464, 1201-1204.
123. Wang, Y., Garg, S., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2010) Proteolytic processing of tau, *Biochem Soc Trans* 38, 955-961.
124. Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Che, L. K., Norton, J., Morris, J. C., Reed, L. A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P. R., Hayward, N., Kwok, J. B., Schofield, P. R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B. A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T., and Heutink, P. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature* 393, 702-705.
125. Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M., and Schellenberg, G. D. (1998) Tau is

- a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia, *Ann Neurol* 43, 815-825.
126. Wszolek, Z. K., Slowinski, J., Golan, M., and Dickson, D. W. (2005) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, *Folia Neuropathol* 43, 258-270.
 127. Edwards, T. L., Scott, W. K., Almonte, C., Burt, A., Powell, E. H., Beecham, G. W., Wang, L., Zuchner, S., Konidari, I., Wang, G., Singer, C., Nahab, F., Scott, B., Stajich, J. M., Pericak-Vance, M., Haines, J., Vance, J. M., and Martin, E. R. (2010) Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease, *Ann Hum Genet* 74, 97-109.
 128. Tobin, J. E., Latourelle, J. C., Lew, M. F., Klein, C., Suchowersky, O., Shill, H. A., Golbe, L. I., Mark, M. H., Growdon, J. H., Wooten, G. F., Racette, B. A., Perlmutter, J. S., Watts, R., Guttman, M., Baker, K. B., Goldwurm, S., Pezzoli, G., Singer, C., Saint-Hilaire, M. H., Hendricks, A. E., Williamson, S., Nagle, M. W., Wilk, J. B., Massood, T., Laramie, J. M., DeStefano, A. L., Litvan, I., Nicholson, G., Corbett, A., Isaacson, S., Burn, D. J., Chinnery, P. F., Pramstaller, P. P., Sherman, S., Al-hinti, J., Drasby, E., Nance, M., Moller, A. T., Ostergaard, K., Roxburgh, R., Snow, B., Slevin, J. T., Cambi, F., Gusella, J. F., and Myers, R. H. (2008) Haplotypes and gene expression implicate the MAPT region for Parkinson disease: the GenePD Study, *Neurology* 71, 28-34.
 129. Mazanetz, M. P., and Fischer, P. M. (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases, *Nat Rev Drug Discov* 6, 464-479.
 130. Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies, *Nat Rev Drug Discov* 8, 783-793.
 131. Majumder, S., Richardson, A., Strong, R., and Oddo, S. (2011) Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits, *PLoS One* 6, e25416.
 132. Krishnamurthy, P. K., and Sigurdsson, E. M. (2011) Therapeutic applications of antibodies in non-infectious neurodegenerative diseases, *N Biotechnol* 28, 511-517.
 133. Kalbfuss, B., Mabon, S. A., and Misteli, T. (2001) Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, *J Biol Chem* 276, 42986-42993.
 134. Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., Lee, E. B., Xie, S. X., Joyce, S., Li, C., Toleikis, P. M., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2005) Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 227-231.
 135. Foster, N. L., Wilhelmsen, K., Sima, A. A., Jones, M. Z., D'Amato, C. J., and Gilman, S. (1997) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants, *Ann Neurol* 41, 706-715.
 136. Reed, L. A., Wszolek, Z. K., and Hutton, M. (2001) Phenotypic correlations in FTDP-17, *Neurobiol Aging* 22, 89-107.
 137. Wszolek, Z. K., Tsuboi, Y., Ghetti, B., Pickering-Brown, S., Baba, Y., and Cheshire, W. P. (2006) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), *Orphanet J Rare Dis* 1, 30.
 138. Tsuboi, Y., Baker, M., Hutton, M. L., Uitti, R. J., Rascol, O., Delisle, M. B., Soulages, X., Murrell, J. R., Ghetti, B., Yasuda, M., Komure, O., Kuno, S., Arima, K., Sunohara, N., Kobayashi, T., Mizuno, Y., and Wszolek, Z. K. (2002) Clinical and genetic studies of families with the tau N279K mutation (FTDP-17), *Neurology* 59, 1791-1793.

139. Varani, L., Hasegawa, M., Spillantini, M. G., Smith, M. J., Murrell, J. R., Ghetti, B., Klug, A., Goedert, M., and Varani, G. (1999) Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8229-8234.
140. Miyamoto, K., Kowalska, A., Hasegawa, M., Tabira, T., Takahashi, K., Araki, W., Akiguchi, I., and Ikemoto, A. (2001) Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10+11-splice site in the tau gene, *Ann Neurol* 50, 117-120.
141. Tolnay, M., Grazia Spillantini, M., Rizzini, C., Eccles, D., Lowe, J., and Ellison, D. (2000) A new case of frontotemporal dementia and parkinsonism resulting from an intron 10 +3-splice site mutation in the tau gene: clinical and pathological features, *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 368-378.
142. Yasuda, M., Takamatsu, J., D'Souza, I., Crowther, R. A., Kawamata, T., Hasegawa, M., Hasegawa, H., Spillantini, M. G., Tanimukai, S., Poorkaj, P., Varani, L., Varani, G., Iwatsubo, T., Goedert, M., Schellenberg, D. G., and Tanaka, C. (2000) A novel mutation at position +12 in the intron following exon 10 of the tau gene in familial frontotemporal dementia (FTD-Kumamoto), *Ann Neurol* 47, 422-429.
143. Stanford, P. M., Halliday, G. M., Brooks, W. S., Kwok, J. B., Storey, C. E., Creasey, H., Morris, J. G., Fulham, M. J., and Schofield, P. R. (2000) Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations, *Brain* 123 (Pt 5), 880-893.
144. Iijima, M., Tabira, T., Poorkaj, P., Schellenberg, G. D., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Schmidt, M. L., Takahashi, K., Nabika, T., Matsumoto, T., Yamashita, Y., Yoshioka, S., and Ishino, H. (1999) A distinct familial presenile dementia with a novel missense mutation in the tau gene, *Neuroreport* 10, 497-501.
145. Stanford, P. M., Shepherd, C. E., Halliday, G. M., Brooks, W. S., Schofield, P. W., Brodaty, H., Martins, R. N., Kwok, J. B., and Schofield, P. R. (2003) Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia, *Brain* 126, 814-826.
146. D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V. M., Bird, T. D., and Schellenberg, G. D. (1999) Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5598-5603.
147. D'Souza, I., and Schellenberg, G. D. (2002) tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites, *J Biol Chem* 277, 26587-26599.
148. D'Souza, I., and Schellenberg, G. D. (2000) Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion, *J Biol Chem* 275, 17700-17709.
149. Llado, A., Ezquerra, M., Sanchez-Valle, R., Rami, L., Tolosa, E., and Molinuevo, J. L. (2007) A novel MAPT mutation (P301T) associated with familial frontotemporal dementia, *Eur J Neurol* 14, e9-10.
150. Sperfeld, A. D., Collatz, M. B., Baier, H., Palmbach, M., Storch, A., Schwarz, J., Tatsch, K., Reske, S., Joosse, M., Heutink, P., and Ludolph, A. C. (1999) FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation, *Ann Neurol* 46, 708-715.
151. Spillantini, M. G., Yoshida, H., Rizzini, C., Lantos, P. L., Khan, N., Rossor, M. N., Goedert, M., and Brown, J. (2000) A novel tau mutation (N296N) in familial dementia

- with swollen achromatic neurons and corticobasal inclusion bodies, *Ann Neurol* 48, 939-943.
152. Iseki, E., Matsumura, T., Marui, W., Hino, H., Odawara, T., Sugiyama, N., Suzuki, K., Sawada, H., Arai, T., and Kosaka, K. (2001) Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel N296H mutation in exon 10 of the tau gene and a widespread tau accumulation in the glial cells, *Acta Neuropathol* 102, 285-292.
 153. Rizzu, P., Van Swieten, J. C., Joosse, M., Hasegawa, M., Stevens, M., Tibben, A., Niermeijer, M. F., Hillebrand, M., Ravid, R., Oostra, B. A., Goedert, M., van Duijn, C. M., and Heutink, P. (1999) High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands, *Am J Hum Genet* 64, 414-421.
 154. Delisle, M. B., Murrell, J. R., Richardson, R., Trofatter, J. A., Rascol, O., Soulages, X., Mohr, M., Calvas, P., and Ghetti, B. (1999) A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy, *Acta Neuropathol* 98, 62-77.
 155. Wilhelmssen, K. C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M., and Nygaard, T. G. (1994) Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22, *Am J Hum Genet* 55, 1159-1165.
 156. Mabon, S. A., and Misteli, T. (2005) Differential recruitment of pre-mRNA splicing factors to alternatively spliced transcripts in vivo, *PLoS Biol* 3, e374.
 157. Ray, P., Kar, A., Fushimi, K., Havlioglu, N., Chen, X., and Wu, J. Y. (2011) PSF suppresses tau exon 10 inclusion by interacting with a stem-loop structure downstream of exon 10, *J Mol Neurosci* 45, 453-466.
 158. Janknecht, R. (2010) Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17), *Am J Transl Res* 2, 223-234.
 159. Kar, A., Fushimi, K., Zhou, X., Ray, P., Shi, C., Chen, X., Liu, Z., Chen, S., and Wu, J. Y. (2011) RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site, *Mol Cell Biol* 31, 1812-1821.
 160. Jiang, Z., Tang, H., Havlioglu, N., Zhang, X., Stamm, S., Yan, R., and Wu, J. Y. (2003) Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta, *J Biol Chem* 278, 18997-19007.
 161. Qian, W., Liang, H., Shi, J., Jin, N., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C. X., and Liu, F. (2011) Regulation of the alternative splicing of tau exon 10 by SC35 and Dyrk1A, *Nucleic Acids Res* 39, 6161-6171.
 162. Gui, J. F., Lane, W. S., and Fu, X. D. (1994) A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle, *Nature* 369, 678-682.
 163. Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J. L., Bell, J. C., and Duncan, P. I. (1996) The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution, *EMBO J* 15, 265-275.
 164. Wang, Y., Wang, J., Gao, L., Stamm, S., and Andreadis, A. (2011) An SRp75/hnRNPG complex interacting with hnRNPE2 regulates the 5' splice site of tau exon 10, whose misregulation causes frontotemporal dementia, *Gene* 485, 130-138.
 165. Ding, S., Shi, J., Qian, W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C. X., and Liu, F. (2012) Regulation of alternative splicing of tau exon 10 by 9G8 and Dyrk1A, *Neurobiol Aging* 33, 1389-1399.
 166. Gao, L., Wang, J., Wang, Y., and Andreadis, A. (2007) SR protein 9G8 modulates splicing of tau exon 10 via its proximal downstream intron, a clustering region for frontotemporal dementia mutations, *Mol Cell Neurosci* 34, 48-58.

167. van Abel, D., Holzel, D. R., Jain, S., Lun, F. M., Zheng, Y. W., Chen, E. Z., Sun, H., Chiu, R. W., Lo, Y. M., van Dijk, M., and Oudejans, C. B. (2011) SFRS7-mediated splicing of tau exon 10 is directly regulated by STOX1A in glial cells, *PLoS One* 6, e21994.
168. Yu, Q., Guo, J., and Zhou, J. (2004) A minimal length between tau exon 10 and 11 is required for correct splicing of exon 10, *J Neurochem* 90, 164-172.
169. Wang, J., Gao, Q. S., Wang, Y., Lafyatis, R., Stamm, S., and Andreadis, A. (2004) Tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia, is regulated by an intricate interplay of cis elements and trans factors, *J Neurochem* 88, 1078-1090.
170. Hartmann, A. M., Rujescu, D., Giannakouros, T., Nikolakaki, E., Goedert, M., Mandelkow, E. M., Gao, Q. S., Andreadis, A., and Stamm, S. (2001) Regulation of alternative splicing of human tau exon 10 by phosphorylation of splicing factors, *Mol Cell Neurosci* 18, 80-90.
171. Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J. J., Mata, A. M., Bhat, R., and Avila, J. (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease, *J Biol Chem* 279, 3801-3806.
172. Smith, P. Y., Delay, C., Girard, J., Papon, M. A., Planel, E., Sergeant, N., Buee, L., and Hebert, S. S. (2011) MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy, *Hum Mol Genet* 20, 4016-4024.
173. Freier, S. M., Kierzek, R., Caruthers, M. H., Neilson, T., and Turner, D. H. (1986) Free energy contributions of G.U and other terminal mismatches to helix stability, *Biochemistry* 25, 3209-3213.
174. Chen, J. L., Dishler, A. L., Kennedy, S. D., Yildirim, I., Liu, B., Turner, D. H., and Serra, M. J. (2012) Testing the nearest neighbor model for canonical RNA base pairs: revision of GU parameters, *Biochemistry* 51, 3508-3522.
175. Longfellow, C. E., Kierzek, R., and Turner, D. H. (1990) Thermodynamic and spectroscopic study of bulge loops in oligoribonucleotides, *Biochemistry* 29, 278-285.
176. Popena, L., Adamiak, R. W., and Gdaniec, Z. (2008) Bulged adenosine influence on the RNA duplex conformation in solution, *Biochemistry* 47, 5059-5067.
177. Kypr, J., Kejnovska, I., Renciuik, D., and Vorlickova, M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA, *Nucleic Acids Res* 37, 1713-1725.
178. Zheng, S., Chen, Y., Donahue, C. P., Wolfe, M. S., and Varani, G. (2009) Structural basis for stabilization of the tau pre-mRNA splicing regulatory element by novantrone (mitoxantrone), *Chem Biol* 16, 557-566.
179. Varani, L., Spillantini, M. G., Goedert, M., and Varani, G. (2000) Structural basis for recognition of the RNA major groove in the tau exon 10 splicing regulatory element by aminoglycoside antibiotics, *Nucleic Acids Res* 28, 710-719.
180. Thomas, J. R., and Hergenrother, P. J. (2008) Targeting RNA with small molecules, *Chem Rev* 108, 1171-1224.
181. Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D. H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure, *J Mol Biol* 288, 911-940.
182. Kierzek, E. (2009) Binding of short oligonucleotides to RNA: studies of the binding of common RNA structural motifs to isoenergetic microarrays, *Biochemistry* 48, 11344-11356.
183. Kierzek, E., Kierzek, R., Moss, W. N., Christensen, S. M., Eickbush, T. H., and Turner, D. H. (2008) Isoenergetic penta- and hexanucleotide microarray probing and chemical mapping provide a secondary structure model for an RNA element orchestrating R2 retrotransposon protein function, *Nucleic Acids Res* 36, 1770-1782.

184. Kierzek, E., Christensen, S. M., Eickbush, T. H., Kierzek, R., Turner, D. H., and Moss, W. N. (2009) Secondary structures for 5' regions of R2 retrotransposon RNAs reveal a novel conserved pseudoknot and regions that evolve under different constraints, *J Mol Biol* 390, 428-442.
185. Jenek, M., and Kierzek, E. (2008) Isoenergetic microarray mapping--the advantages of this method in studying the structure of *Saccharomyces cerevisiae* tRNAPhe, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 219-220.
186. Kierzek, E., Barciszewska, M. Z., and Barciszewski, J. (2008) Isoenergetic microarray mapping reveals differences in structure between tRNA^{iMet} and tRNA^{mMet} from *Lupinus luteus*, *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 215-216.
187. Fratzczak, A., Kierzek, R., and Kierzek, E. (2011) Isoenergetic microarrays to study the structure and interactions of DsrA and OxyS RNAs in two- and three-component complexes, *Biochemistry* 50, 7647-7665.
188. Pasternak, A., Kierzek, E., Pasternak, K., Fratzczak, A., Turner, D. H., and Kierzek, R. (2008) The thermodynamics of 3'-terminal pyrene and guanosine for the design of isoenergetic 2'-O-methyl-RNA-LNA chimeric oligonucleotide probes of RNA structure, *Biochemistry* 47, 1249-1258.
189. Peattie, D. A., and Gilbert, W. (1980) Chemical probes for higher-order structure in RNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4679-4682.
190. Moazed, D., and Noller, H. F. (1989) Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome, *Nature* 342, 142-148.
191. Banerjee, A. R., Jaeger, J. A., and Turner, D. H. (1993) Thermal unfolding of a group I ribozyme: the low-temperature transition is primarily disruption of tertiary structure, *Biochemistry* 32, 153-163.
192. Costa, M., Christian, E. L., and Michel, F. (1998) Differential chemical probing of a group II self-splicing intron identifies bases involved in tertiary interactions and supports an alternative secondary structure model of domain V, *RNA* 4, 1055-1068.
193. Tranguch, A. J., Kindelberger, D. W., Rohlman, C. E., Lee, J. Y., and Engelke, D. R. (1994) Structure-sensitive RNA footprinting of yeast nuclear ribonuclease P, *Biochemistry* 33, 1778-1787.
194. Lavery, R., and Pullman, A. (1984) A new theoretical index of biochemical reactivity combining steric and electrostatic factors. An application to yeast tRNAPhe, *Biophys Chem* 19, 171-181.
195. Watts, J. M., Dang, K. K., Gorelick, R. J., Leonard, C. W., Bess, J. W., Jr., Swanstrom, R., Burch, C. L., and Weeks, K. M. (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome, *Nature* 460, 711-716.
196. McGinnis, J. L., Dunkle, J. A., Cate, J. H., and Weeks, K. M. (2012) The mechanisms of RNA SHAPE chemistry, *J Am Chem Soc* 134, 6617-6624.
197. Wilkinson, K. A., Merino, E. J., and Weeks, K. M. (2006) Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution, *Nat Protoc* 1, 1610-1616.
198. Fratzczak, A., Kierzek, R., and Kierzek, E. (2009) LNA-modified primers drastically improve hybridization to target RNA and reverse transcription, *Biochemistry* 48, 514-516.
199. Walter, A. E., Wu, M., and Turner, D. H. (1994) The stability and structure of tandem GA mismatches in RNA depend on closing base pairs, *Biochemistry* 33, 11349-11354.
200. Tolbert, B. S., Kennedy, S. D., Schroeder, S. J., Krugh, T. R., and Turner, D. H. (2007) NMR structures of (rGCUGAGGCU)₂ and (rGCGGAUGCU)₂: probing the structural features that shape the thermodynamic stability of GA pairs, *Biochemistry* 46, 1511-1522.

201. Popenda, M., Szachniuk, M., Antczak, M., Purzycka, K. J., Lukasiak, P., Bartol, N., Blazewicz, J., and Adamiak, R. W. (2012) Automated 3D structure composition for large RNAs, *Nucleic Acids Res* 40, e112.
202. Buckler, A. J., Chang, D. D., Graw, S. L., Brook, J. D., Haber, D. A., Sharp, P. A., and Housman, D. E. (1991) Exon amplification: a strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4005-4009.
203. Krizman, D. B. (1997) Gene isolation by exon trapping, *Methods Mol Biol* 68, 167-182.
204. Burn, T. C., Connors, T. D., Klinger, K. W., and Landes, G. M. (1995) Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector, *Gene* 161, 183-187.
205. Freeman, W. M., Walker, S. J., and Vrana, K. E. (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential, *Biotechniques* 26, 112-122, 124-115.
206. Stamm, S., Smith, C. W. J., and Lührmann, R. (2012) *Alternative pre-mRNA splicing : theory and protocols*, Weinheim : Wiley-Blackwell, c2012.
207. Krawczak, M., Reiss, J., and Cooper, D. N. (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences, *Hum Genet* 90, 41-54.
208. Aartsma-Rus, A., De Winter, C. L., Janson, A. A., Kaman, W. E., Van Ommen, G. J., Den Dunnen, J. T., and Van Deutekom, J. C. (2005) Functional analysis of 114 exon-internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites, *Oligonucleotides* 15, 284-297.
209. Wilton, S. D., Fall, A. M., Harding, P. L., McClorey, G., Coleman, C., and Fletcher, S. (2007) Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript, *Mol Ther* 15, 1288-1296.
210. van Ommen, G. J., van Deutekom, J., and Aartsma-Rus, A. (2008) The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping, *Curr Opin Mol Ther* 10, 140-149.
211. Khoo, B., Roca, X., Chew, S. L., and Krainer, A. R. (2007) Antisense oligonucleotide-induced alternative splicing of the APOB mRNA generates a novel isoform of APOB, *BMC Mol Biol* 8, 3.
212. Liu, Z. R. (2002) p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex, *Mol Cell Biol* 22, 5443-5450.
213. Walter, A. E., and Turner, D. H. (1994) Sequence dependence of stability for coaxial stacking of RNA helices with Watson-Crick base paired interfaces, *Biochemistry* 33, 12715-12719.
214. Walter, A. E., Turner, D. H., Kim, J., Lyttle, M. H., Muller, P., Mathews, D. H., and Zuker, M. (1994) Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9218-9222.
215. Kim, J., Walter, A. E., and Turner, D. H. (1996) Thermodynamics of coaxially stacked helices with GA and CC mismatches, *Biochemistry* 35, 13753-13761.
216. Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Bakalis, S., and Neve, R. L. (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences, *Neuron* 2, 1389-1397.