

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

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

Joanna Szpotkowska

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii RNA

Promotor: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi, Panu

prof. dr. hab. Jerzemu Ciesiolce

za opiekę naukową, cenne wskazówki i życzliwość

a także:

dr hab. Marioli Dutkiewicz,

dr Agacie Świątkowskiej,

dr Paulinie Żydowicz-Machtel,

dr Agnieszce Górskiej

za owocne dyskusje naukowe i okazaną pomoc

oraz współpracownikom z Zakładu Biochemii RNA

za miłą atmosferę w pracy.

Rodzinie i przyjaciołom dziękuję za nieustające wsparcie.

Pracę dedykuję rodzicom, teściom, Kamilowi, Ignacemu i Romanowi Hildebrandowi.

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

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

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

Kierownik projektu: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka

Grant badawczy w ramach zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2016

*„Weryfikacja miejsca inicjacji translacji białka p53 u *Mus musculus*”*

Kierownik projektu: mgr Joanna Sroka

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

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

Kierownik projektu: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka

W trakcie realizacji pracy doktorskiej byłam współautorką następujących publikacji i doniesień konferencyjnych:

Joanna Szpotkowska, Agata Świątkowska, Jerzy Ciesiołka

Length and secondary structure of the 5' non-coding regions of mouse p53 mRNA transcripts - mouse as a model organism for p53 gene expression studies
RNA Biology 2019 16(1):25-41

Agata Świątkowska, Mariola Dutkiewicz, Paulina Żydowicz-Machtel,
Joanna Szpotkowska, Damian M. Janecki, Jerzy Ciesiołka

Translational Control in p53 Expression: The Role of 5'-Terminal Region of p53 mRNA. International Journal of Molecular Sciences 2019 20(21):5382

Agata Świątkowska, Paulina Żydowicz, Joanna Sroka, Jerzy Ciesiołka

The role of the 5' terminal region of p53 mRNA in the p53 gene expression
Acta Biochimica Polonica 2016 63(4):645-651

Joanna Szpotkowska i współautrzy

Determination of the tertiary structure and thermodynamic properties of the 5' terminal region of p53 mRNA in mice
Publikacja w przygotowaniu

Joanna Sroka, Agnieszka Górka, Aleksandra Kasproicz, Jerzy Ciesiołka

Length and secondary structure of the 5' non-coding regions of p53 mRNA transcripts influence the translation of p53 protein and its $\Delta 41p53$ isoform in mouse
“The Complex Life of mRNA”, Heidelberg, Niemcy, 5-8.10.2016

Joanna Sroka, Agnieszka Górka, Aleksandra Kasproicz, Jerzy Ciesiołka

Identification and secondary structure characterization of the 5' non-coding regions of p53 mRNA transcripts in mouse
2nd Congress of Polish Biochemistry, Cell biology, Biotechnology and Bioinformatics
“BIO2016 – Expanding beyond the limits”, Wrocław, 13-16.09.2016

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	9
Streszczenie	12
Abstract	14
1. Wprowadzenie.....	16
2. Wstęp literaturowy	17
2.1. Gen <i>Trp53</i> u myszy i kodowane przez niego transkrypty mRNA	17
2.2. Budowa mysiego białka p53.....	19
2.3. Izoformy mysiego białka p53	21
2.4. Białka i RNA oddziałujące z regionem niekodującym 5' mysiego mRNA p53	24
2.5. Funkcja mysiego białka p53	27
2.6. Gen <i>TP53</i> u człowieka oraz kodowane przez niego transkrypty mRNA	32
2.7. Budowa ludzkiego białka p53	37
2.8. Izoformy ludzkiego białka p53	37
2.9. Białka i RNA oddziałujące z regionem niekodującym 5' mRNA p53.....	43
2.10. Funkcja p53	46
3. Cel pracy	51
4. Wyniki i dyskusja.....	52
4.1. Identyfikacja długości i sekwencji nukleotydowej regionu niekodującego 5' mRNA p53	52
4.2. Analiza struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' transkryptów mRNA p53.....	64
4.2.1. mRNA(-122)	64
4.2.2. mRNA(-247)	76
4.2.3. Elementy izolowane C(-200):G(-102), C(-51):G9 i A89:U140	82
4.2.4. Mapowanie dostępności RNA w regionie U41:U81	86
4.2.5. mRNA(-166)	91

4.3. Struktura trzeciorzędowa oraz właściwości termodynamiczne regionu terminalnego 5' mRNA(-122) oraz jego wybranych elementów strukturalnych	95
4.4. Wpływ długości regionu niekodującego 5' mRNA p53 na proces inicjacji translacji	111
4.5. Analiza porównawcza względnych ilości białka i mRNA p53 w komórce w warunkach normalnych i stresowych.....	118
4.6. Określenie miejsca inicjacji translacji białka p53 u myszy	121
4.7. Zachowawczość elementów strukturalnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53 oraz identyfikacja <i>in silico</i> białek z nim oddziałujących.....	125
5. Podsumowanie	134
6. Materiały i metody	139
6.1. Reakcja szybkiej amplifikacji końców 5' mRNA - 5'RACE (ang. <i>Rapid Amplification of 5' cDNA Ends</i>) oraz analiza uzyskanych produktów	139
6.2 Otrzymywanie matrycowych dsDNA do reakcji transkrypcji <i>in vitro</i>	140
6.2.1. Konstrukty dsDNA zawierające warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 122 i 247 nukleotydów	140
6.2.2. Konstrukty dsDNA zawierający wariant regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 166 nukleotydów	142
6.2.3. Cząsteczki dsDNA stanowiące matryce do syntezy izolowanych elementów strukturalnych zlokalizowanych w regionie terminalnym 5' mRNA p53	143
6.3. Transkrypcja <i>in vitro</i>	145
6.4. Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ³² P	146
6.5. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA	147
6.5.1. Cięcia RNA indukowane w obecności jonów Pb ²⁺	147
6.5.2. Reakcja acylacji grup 2'-hydroksylowych analizowana za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (SHAPE)	147
6.5.3. Modyfikacja chemiczna RNA z wykorzystaniem siarczanu dimetylu (DMS) w warunkach <i>in vitro</i>	148
6.5.4. Modyfikacja chemiczna RNA z wykorzystaniem siarczanu dimetylu (DMS) w transfekowanej linii komórkowej.....	148

6.5.5. Mapowanie dostępności RNA do hybrydyzacji za pomocą bibliotek kombinatorycznych DNA oraz RNazy H	149
6.6. Odwrotna transkrypcja	149
6.7. Półilościowa analiza poziomu mRNA za pomocą RT-PCR	151
6.8. Mutageneza ukierunkowana	152
6.9. Hodowla mysich fibroblastów	153
6.10. Indukcja warunków stresowych w linii komórkowej NIH3T3	153
6.11. Transfekcja komórek MB352 modelowymi konstruktami mRNA	154
6.12. Cytometria przepływowa	155
6.13. Izolacja RNA z wykorzystaniem odczynnika TRI Reagent	156
6.14. Translacja <i>in vitro</i>	156
6.15. Analiza białek metodą Western blot	157
6.16. Transformacji bakterii <i>E. coli</i>	158
6.17. Przewidywanie oddziaływań białko-RNA	158
6.18. Generowanie struktur trzeciorzędowych fragmentów mRNA	159
6.19. Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS)	159
6.20. Spektrometria dichroizmu kołowego	160
7. Literatura	161

Wykaz stosowanych skrótów

3'UTR – region 3' mRNA nie ulegający translacji (ang. *3'- untranslated region*)

5'RACE – reakcja szybkiej amplifikacji końców 5' mRNA (ang. *rapid amplification of cDNA ends*)

5'UTR – region 5' mRNA nie ulegający translacji (ang. *5'- untranslated region*)

CD – dichroizm kołowy (ang. *circular dichroism*)

cryoEM – mikroskopia krioelektronowa (ang. *electron cryomicroscopy*)

DBD – domena wiążąca DNA (ang. *DNA binding domain*)

DBTSS – baza danych miejsc inicjacji transkrypcji (ang. *DataBase of Transcriptional Start Sites*)

DMS – siarczan dimetylu (ang. *dimethyl sulfate*)

eIF4A – eukariotyczny czynnik inicjacyjny 4A (ang. *eukaryotic initiation factor-4A*)

eIF4E – eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*)

ESCs – embrionalne komórki macierzyste (ang. *embryonic stem cells*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GSP – starter specyficzny dla genu (ang. *gene specific primer*)

HDM2 – ligaza ubikwitynowa E3 (ang. *Human double minute 2 protein*)

HDMX – ang. *Human double minute 4 protein*

hnRNP C1/C2 – heterogenna rybonukleoproteina jądrowa (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2*)

hnRNP L – heterogenna rybonukleoproteina jądrowa L (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L*)

hnRNP Q – heterogenna rybonukleoproteina jądrowa Q (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q*)

I(0) – intensywność rozpraszania przy kącie 0°

IGF-1R – receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 (ang. *insulin-like growth factor 1 receptor*)

IGFBP3 – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor binding protein 3*)

IRES – wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. *internal ribosome entry site*)

ITAF – czynniki wiążące się z IRES *in trans* (ang. *IRES trans-acting factors*)

kpz – liczba par zasad wyrażona w tysiącach

Mdm2 – ‘ligaza ubikwitynowa E3’ (ang. *Mouse double minute 2 homolog*)

miRNA – mikro RNA

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

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)

nt – nukleotydy

OD – domena oligomeryzacyjna (ang. *oligomerization domain*)

$p(r)$ – wykres funkcji odległości międzycząsteczkowych (ang. *interatomic distance distribution function*)

Pdcd4 – białko 4 programowanej śmierci komórki (ang. *Programmed cell death protein 4*)

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

PRD – domena bogata w proliny (ang. *prolin rich domain*)

PSF – czynnik splicingowy wiążący PTB (ang. *PTB associated Splicing Factor*)

PTB – białko wiążące ciągi polipirymidynowe (ang. *Polypyrimidine tract-binding protein*)

RD – domena regulatorowa (ang. *regulatory domain*)

R_g – stała żyrcji (ang. *radius of gyration*)

RHA – helikaza RNA A (ang. *RNA helicase A*)

RMB38 – białko wiążące RNA 38 (ang. *RNA binding motif*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RPL26 – białko rybosomalne L26 (ang. *ribosomal protein L26*)

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

RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy sprzężona z odwrotną transkrypcją (ang. *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*)

SAXS – małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (ang. *small-angle X-ray scattering*)

SERCA – inhibitor endo/sarkoplazmatycznej Ca^{2+} -ATPazy (ang. *inhibitor of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*)

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

SNP – nitroprusydek sodu (ang. *sodium nitroprusside*)

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

SPFQ – czynnik splicingowy związany z PTB (ang. *PTB associated splicing factor*)

TAD – domena transaktywacyjna (ang. *transactivation domain*)

TCP80 – Białko 80 kontrolujące translację (ang. *Translation Control Protein 80*)

TDT – terminalna deoksyrybonukleotydylotransferaza (ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*)

Trp53 – gen mysiego białka p53 związanego z transformacją (ang. *transformation related protein 53*)

U – jednostka (ang. *unit*)

UPR – odpowiedź na niezwinęte białka (ang. *unfolded protein response*)

Streszczenie

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

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

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

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

W kolejnej części pracy wykorzystano małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego do utworzenia struktur *ab initio* regionu terminalnego 5' mRNA(-122) oraz jego wybranych fragmentów. Następnie, otrzymane modele *ab initio* porównano z modelami wygenerowanymi za pomocą programu RNA Composer. Na podstawie pomiarów spektroskopii dichroizmu kołowego wyznaczono temperatury przejść fazowych oraz podstawowe parametry termodynamiczne badanych cząsteczek RNA.

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

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

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

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

Abstract

Protein p53 is a transcription factor that regulates the pool of genes responsible e.g. for the response to cellular stress, regulation of cell cycle, apoptosis, ageing, metabolism, functioning of stem cells and metastasis. Investigation of the role of p53 protein in the cell and on the expression of *TP53* gene have mainly concerned their functioning in the human organism, although for better understanding of the processes involving them, a number of transgenic mice have been studied. However, even though mice have been often used as a model system, literature provides scarce information on the regulation of expression of *Trp53* gene in mice. In particular, as expected, in the p53 mRNA in mice an important element regulating the process of translation initiation is its 5' non-coding region.

The aim of this study was a comprehensive structural and functional analysis of the 5'-terminal region of p53 mRNA in mice.

The length of the 5' non-coding region of p53 mRNA was evaluated using the method of 5' RACE to establish that this length can vary and for further studies two transcripts were chosen: the most often occurred one and the longest identified one, containing the 5' non-coding region of the length of 122 (mRNA(-122)) and 247 nucleotides (mRNA(-247)), respectively.

On the basis of biochemical mapping, the secondary structures of the 5'-terminal regions of the studied mRNA and selected isolated elements of these secondary structures were analyzed. Moreover, the secondary structure of the 166-nucleotide-long 5' non-coding region (in mRNA(-166)) was studied. This transcript was not identified in the 5' RACE experiment, however it had been used in earlier published papers.

In the next stage of the investigation, the small angle X-ray scattering method was employed to generate the *ab initio* structures of the 5'-terminal region of mRNA(-122) and its selected fragments. The obtained *ab initio* models were compared with those generated by the RNA Composer program. The temperatures of phase transitions and basic thermodynamical parameters of the studied RNA molecules were determined by the circular dichroism spectroscopy.

As a result of the *in vitro* translations performed in the presence of increasing concentration of the m⁷GpppG cap analog, it was found that the initiation of translation of mRNA(-122) and mRNA(-166) is a process depending on the presence of the cap

at the 5' terminus of mRNA, while the initiation of translation of mRNA(-247) is independent of the cap presence.

A comparative analysis of the relative amounts of the protein and mRNA p53 in the cell line of mice fibroblasts proved that the endoplasmic reticulum stress leads to slight decrease in the p53 protein, while the genotoxic stress leads to its accumulation. In both cases studied, the level of mRNA did not change. The results suggest that p53 regulation in response to stress takes place at the level of translation.

The next objective of the study was to find out which one of two potential initiation codons, localized in mRNA p53 at a distance of only six nucleotides starts the synthesis of p53 protein. In order to establish this, the mRNA mutants were constructed with changes in the nucleotide triplets which initiate the synthesis of p53 protein and the effects of these mutations on the *in vitro* and *in cellulo* translation reactions were examined.

Finally, the conservation of structural elements localized in the 5'-terminal region of the studied mRNA(-122) and mRNA(-247) transcripts was analyzed. Five mRNA segments characterized by high conservation were distinguished. In order to identify the proteins that can potentially interact with the 5'-terminal region of mRNA(-247), the *in silico* analysis using the program RBPmap was performed.

1. Wprowadzenie

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym znanym jako „strażnik genomu”, który reguluje transkrypcję puli genów odpowiadających m. in. za odpowiedź komórki na stres, naprawę DNA, apoptozę oraz cykl komórkowy, zapewniając tym samym stabilność materiału genetycznego. Ponadto, aktywność p53 powiązano również z regulacją metabolizmu, reprodukcją, starzeniem oraz funkcjonowaniem komórek macierzystych [Marcel *et al.* 2018]. Po raz pierwszy p53 zostało opisane w 1979 roku, jako białko oddziałujące z antygenem T wirusa SV40 [Lane *et al.* 1979]. Od tego czasu prowadzone są intensywne badania mające na celu wyjaśnienie roli oraz mechanizmu działania białka p53. W początkowych latach badań p53 zostało sklasyfikowane jako onkogen, jednak późniejsze prace ukazały rolę p53 jako supresora procesu nowotworzenia [Finlay *et al.* 1989; Kasthuber *et al.* 2017]. W ponad połowie nowotworów ludzkich znaleziono mutacje w obrębie genu *TP53*, a u ponad 90% pacjentów z zespołem Li-Fraumeni, czyli zespołem predyspozycji do nowotworów spowodowanym przez odziedziczenie zmutowanego allelu genu *TP53*, rozwija się choroba nowotworowa [Kaiser *et al.* 2018]. Ponadto, w wielu przypadkach mutacja *TP53* jest związana ze złymi rokowaniami dla pacjentów [Olivier *et al.* 2010; Kasthuber *et al.* 2017]. Niewątpliwym potwierdzeniem roli p53 jako supresora nowotworowego była obserwacja spontanicznego rozwoju nowotworu ze 100% penetracją u myszy transgenicznym pozbawionych aktywnego genu *Trp53* [Biegging *et al.* 2014]. Istotne znaczenie p53 jako supresora nowotworowego wykazano także w przypadku słonia: pomimo swojego rozmiaru zwierzęta te zasadniczo nie chorują na nowotwory, a właściwość tę powiązano z obecnością w ich genomie 20 kopii genu *p53* [Sulak *et al.* 2016].

Na początku historii badań p53 koncentrowano się na działaniach mających na celu identyfikację oraz charakterystykę homologów genu oraz białka p53 w licznych organizmach modelowych, takich jak mysz domowa (*Mus musculus*) [Bienz *et al.* 1984; Czosnek *et al.* 1984; Oren *et al.* 1983], żaba szponiasta (*Xenopus laevis*) [Wang *et al.* 1995; Cox *et al.* 1994; Soussi *et al.* 1987], kura domowa (*Gallus gallus domesticus*) [Takagi *et al.* 1998], świnka morska (*Cavia porcellus*) [D'Ericha *et al.* 1999] lub muszka owocówka (*Drosophila melanogaster*) [Jin *et al.* 2000]. Jednak od pewnego momentu prowadzone badania zaczęły ograniczać się głównie do komórek ludzkich oraz genetycznie modyfikowanych myszy, stanowiących modele badawcze dla procesów zachodzących w komórkach ludzkich. W części literaturowej niniejszej pracy przedstawiona zostanie dotychczasowa wiedza dotycząca produktów ekspresji dwóch wybranych genów: mysiego *Trp53* oraz ludzkiego *TP53*.

2. Wstęp literaturowy

2.1. Gen *Trp53* u myszy i kodowane przez niego transkrypty mRNA

W genomie myszy domowej (*Mus musculus*) białko p53 jest kodowane przez gen *Trp53* (białko p53 związane z transformacją, ang. *transformation related protein 53*), zlokalizowany na chromosomie 11, obejmujący ok. 11,5 tys. nukleotydów¹. Zidentyfikowano również niefunkcjonalną kopię genu *Trp53*: pseudogen zlokalizowany na chromosomie 14 [Oren *et al.* 1983; Oren *et al.* 1983 (2); Zakut-Houri R *et al.* 1983; Czosenk *et al.* 1984].

Dotychczas opisano cztery transkrypty mRNA p53, z których syntetyzowanych jest 7 izoform białka p53. Pre-mRNA genu *Trp53* zbudowany jest z jedenastu eksonów i 10 intronów, których długość waha się odpowiednio pomiędzy 21 a 260 nt oraz pomiędzy 80 a 6100 nt. Długość dojrzałego głównego transkryptu mRNA wynosi ok. 2 tys. nukleotydów (p53mRNA α) [Bienz *et al.* 1984]. W 1984 roku podjęto jedyną dotychczas opisaną w literaturze próbę określenia długości regionu niekodującego 5' (5'UTR, region 5' nie ulegający translacji, ang. *5'- untranslated region*) mRNA mysiego p53. W tym celu przeprowadzono trawienie nukleazą S1 puli RNA w temperaturze obniżonej do 24°C, w wyniku którego otrzymano trzy fragmenty RNA o długości 112, 156 oraz 216 nt. Na podstawie uzyskanych wyników sugerowano występowanie w regionie niekodującym 5' stabilnej termodynamicznie struktury typu spinki do włosów o entalpii swobodnej $\Delta G = -56$ kcal/mol. Nie mniej jednak, autorzy publikacji zwracają uwagę na fakt, że precyzyjne określenie długości regionu niekodującego 5' mRNA nie powiodło się [Bienz *et al.* 1984]. Proponowany element typu spinki do włosów przedstawiono na rysunku 1.



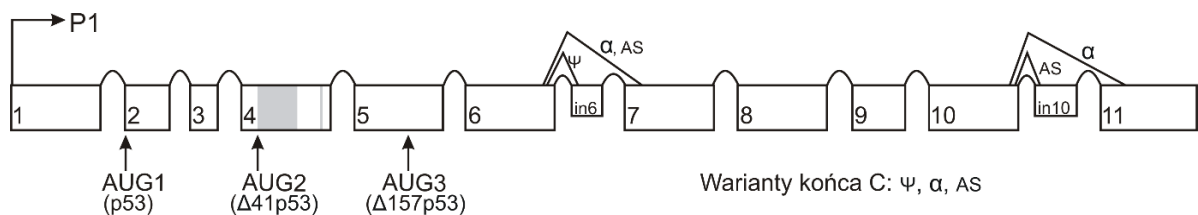
Rys. 1. Proponowana struktura typu spinki do włosów na końcu 5' mysiego mRNA p53 [na podstawie: Bienz *et al.* 1984].

Następnie analizowano możliwe struktury drugorzędowe dla stopniowo wydłużanych sekwencji mRNA p53. Stwierdzono, że każda z zaproponowanych struktur zawierała na końcu 5' wspomnianą powyżej strukturę typu spinki do włosów lub stabilny

¹http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000059552;r=11:69580359-69591873

termodynamicznie element obejmujący 216 nukleotydów regionu niekodującego 5' oraz 284 nt sekwencji kodującej. Entalpia swobodna zaproponowanej struktury wynosiła $\Delta G = -170$ kcal/mol [Mosner *et al.* 1995].

Region niekodujący 3' (3'UTR, region 3' nie ulegający translacji, ang. 3'-*untranslated region*) mRNA składa się z 441 nt. Transkrypt mRNA p53 zaobserwowano zarówno w komórkach zdrowych jak i rakowych [Han *et al.* 1992]. Oprócz opisanego powyżej mRNA, zidentyfikowano również transkrypt p53mRNAAS, powstały w wyniku alternatywnego splicingu końca 3' p53mRNA α , efektem czego p53mRNAAS zawiera dodatkową, 96-nukleotydową, sekwencję nukleotydową intronu 10 pomiędzy nukleotydami 1091 a 1092. Sekwencja ta zawiera kodon stop, co prowadzi do przedwczesnego zakończenia syntezy białka [Arai *et al.* 1986]. Udowodniono, że występowanie tego transkryptu stanowi ok. 25-30% w stosunku do poziomu głównego transkryptu p53 i występuje on w komórkach zarówno zdrowych, jak i rakowych [Han *et al.* 1992 (2), Kulesz-Martin *et al.* 1994]. Ponadto, zaobserwowano obniżony poziom transkryptu p53mRNAAS w nerkach i śledzionie [Will *et al.* 1995]. W 2014 roku opisano transkrypt mRNA Newp53, pozbawiony dwóch sekwencji nukleotydowych: 140-nt pomiędzy nukleotydami 124 a 264 oraz 4-nt pomiędzy nukleotydami 358 a 361 [Chan *et al.* 2014]. Obydwa brakujące odcinki w głównym transkrypcie mRNA znajdują się w obrębie eksonu czwartego.



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie mysiego genu *Trp53*. P1 oznaczono promotor transkrypcyjny p53, pionowymi strzałkami zaznaczono miejsca inicjacji syntezy izoform białka: p53, $\Delta 41$ p53 oraz $\Delta 157$ p53. Ψ , α i AS zaznaczono warianty splicingowe mRNA. Szarymi prostokątami w eksonie czwartym zaznaczono sekwencje brakujące w wariantach Newp53.

Ostatnim zidentyfikowanym wariantem mRNA p53 u myszy jest p53 Ψ , powstający w wyniku alternatywnego splicingu intronu szóstego [Senturk *et al.* 2014]. Wykazano, że miejsce akceptorowe 3' biorące udział w alternatywnym splicingu jest wysoce zachowawcze pomiędzy gatunkami, co nie jest cechą charakterystyczną sekwencji intronowych [Senturk *et al.* 2014; Kloek *et al.* 1996]. mRNA p53 Ψ zawiera przedwczesny kodon terminacyjny UGA,

co prowadzi do syntezy skróconego białka. Transkrypt ten zlokalizowano w komórkach myszy będącej modelem uszkodzenia płuc indukowanego np. poprzez podanie naftalenu. Transkryptu tego poszukiwano również w szeregu tkanek zdrowych, jednak w żadnej z nich nie wykazano jego obecności [Senturk *et al.* 2014]. Nie mniej jednak, mRNA p53 ψ zaobserwowano w komórkach wątroby uszkodzonych tetrachlorometanem. W związku z powyższym, postuluje się, że do ekspresji mRNA p53 ψ dochodzi w tkankach uszkodzonych [Senturk *et al.* 2014]. Wszystkie opisane powyżej transkrypty mRNA przedstawiono schematycznie na rys. 2.

W 1985 roku podjęto próbę określenia względnego poziomu mRNA p53 w komórkach zdrowych, rakowych oraz podczas organogenezy u myszy. W tym celu wyizolowano RNA z tkanek oraz komórek nowotworowych myszy, równe ilości RNA rozdzielono na żelu, a następnie poddano je hybrydyzacji do fragmentu DNA zawierającego sekwencję nukleotydową p53. Na tej podstawie wykazano, że w komórkach rakowych względny poziom mRNA jest wyższy w stosunku do poziomu zaobserwowanego w komórkach zdrowych, natomiast w trakcie organogenezy w płodzie myszy, pomiędzy dniem 9 a 11, poziom mRNA był zbliżony do poziomu w linii niezróżnicowanych komórek macierzystych oraz niektórych komórkach rakowych. Po 11 dniu rozwoju myszy poziom mRNA p53 ulegał znacznej redukcji [Rogel *et al.* 1985]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że w cytowanej pracy nie zastosowano odpowiednich prób kontrolnych, tzn. otrzymanych wyników dotyczących poziomu mRNA p53 w poszczególnych próbkach nie porównano z ilością mRNA dla genu konstytutywnego, jakim jest np. dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) [Barber *et al.* 2005].

2.2. Budowa mysiego białka p53

Mysie białko p53 zbudowane jest z 390 aminokwasów [Bienz *et al.* 1984] i składa się z dwóch domen transaktywacyjnych (TAD1 i TAD2), domeny bogatej w reszty proliny (PRD), domeny wiążącej DNA (DBD) oraz domeny oligomeryzacyjnej (OD) i regulatorowej (RD) znajdującej się na końcu C [Chen *et al.* 2014] (rys. 3).

Region N-końcowy białka obejmujący dwie domeny transaktywacyjne TAD1 (ang. *transactivation domain*) (reszty aminokwasowe 1-40 [Chan *et al.* 2014]), TAD2 (reszty

aminokwasowe 41-61 [Chan *et al.* 2014]) oraz region bogaty w proliny PRD (ang. *prolin rich domain*) (reszty aminokwasowe 63-97 [Chan *et al.* 2014]) nie tworzy uporządkowanej struktury [Raj and Attardi, 2016] i wykazuje silnie kwasowy, zachowawczy ewolucyjnie charakter [Raj and Attardi, 2016, Soussi & May, 1996]. Kwasowy charakter domen aktywacyjnych został również udokumentowany w przypadku innych czynników transkrypcyjnych, takich jak GAL4 lub Fos [Raj and Attardi, 2016, Lech *et al.* 1988, Ma & Ptashne, 1987]. Opisywany region oddziałuje z licznymi białkami, m. in. wchodzącymi w skład maszynery transkrypcyjnej, modyfikującymi chromatynę lub też inhibującymi aktywność p53, jak np. białko HDM2 w komórkach ludzkich [Raj and Attardi, 2016]. Podczas oddziaływania z HDM2 domena transaktywacyjna ludzkiego p53 przyjmuje stabilną strukturę α -helisy, umożliwiającą interakcję pomiędzy białkami [Kussie *et al.* 1996]. Wykazano, że poprzez aktywację odpowiednich genów TAD1 bierze udział w odpowiedzi na silne uszkodzenia DNA, natomiast TAD1 i TAD2 w tłumieniu nowotworów [Raj and Attardi, 2016]. Region bogaty w proliny bierze udział w transaktywacji genów regulowanych przez p53 [Edwards *et al.* 2003].



Rys. 3. Schemat budowy mysiego białka p53. Kolorem zielonym zaznaczono region N-końcowy białka, niebieskim domenę wiążącą DNA, szarym domenę oligomeryzacyjną. TAD1 – domena transaktywacyjna 1, TAD2 – domena transaktywacyjna 2, PRD – domena bogata w proliny, DBD – domena wiążąca DNA, OD – domena oligomeryzacyjna, RD – domena regulatorowa. Liczby pod schematem reprezentują numery reszt aminokwasowych odpowiednie dla poszczególnych domen.

Domena wiążąca DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*) stanowi największą część białka p53 (rys. 3). Obejmuje ona reszty aminokwasowe 102-292 [Chen *et al.* 2014] i jest odpowiedzialna za oddziaływanie z sekwencją nukleotydową genów regulowanych przez p53 [Zhao *et al.* 2001]. Domena ta przyjmuje strukturę kanapki beta (ang. *β -sandwich*) z pętlami oraz krótkimi helisami po przeciwnej stronie. Wykazano, że DBD przyjmuje dwie różne formy w zależności od tego, czy jest to białko w stanie wolnym, czy też związane z DNA. Struktura kanapki beta pozostaje niezmienną w obu przypadkach, natomiast reorganizacji ulega pętla odpowiedzialna za wiązanie do DNA [Zhao *et al.* 2001]. Przyjmuje się, że ponad

80% mutacji genu *TP53* w nowotworach ludzkich zlokalizowanych jest w obrębie domeny DBD [Kaiser *et al.* 2018].

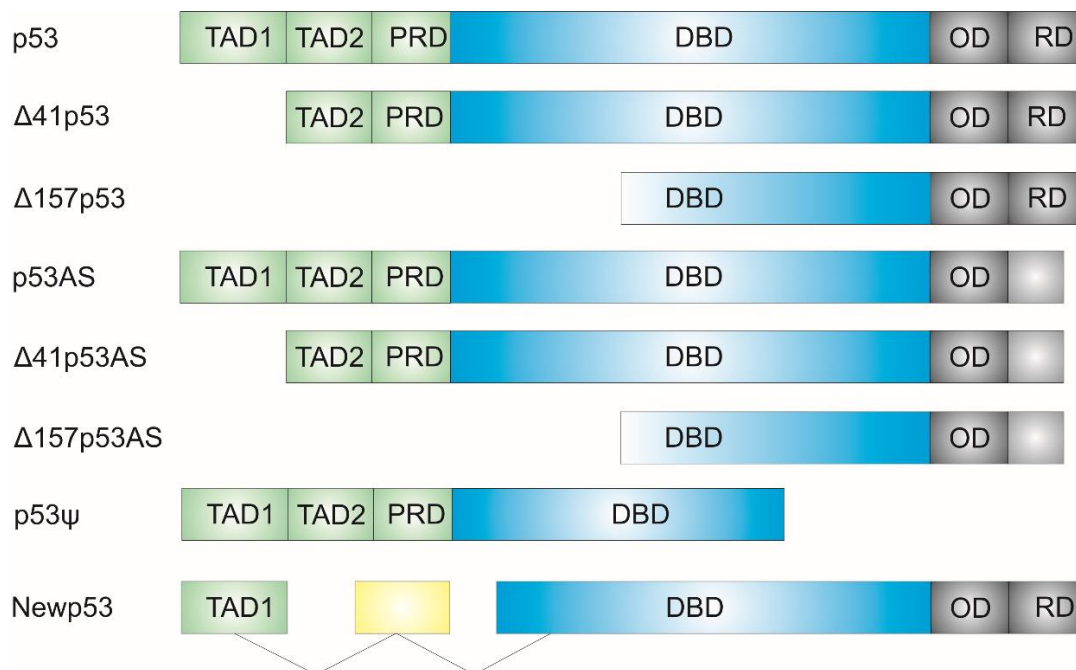
C-końcowa domena oligomeryzacyjna OD (ang. *oligomerization domain*) [Pavletich *et al.* 1993], obejmująca aminowkasy 323-356, odpowiedzialna jest za występowanie białka p53 w jego aktywnej formie homotetrameru. Wykazano, że tak zorganizowane białko p53 ma stukrotnie wyższą aktywność wiązania do DNA niż monomer p53 [Zhang *et al.* 2016, Chene 2001]. Domena OD zawiera dwa motywy drugorzędowej struktury białkowej: α -helisę oraz β -harmonijkę [Chene 2001]. Uważa się, że domena ta jest niezbędna do wiązania DNA, oddziaływania z białkami oraz degradacji p53 [Chene 2001].

Domena regulatorowa RD (ang. *regulatory domain*) znajduje się na końcu karboksylowym białka p53 i obejmuje reszty aminokwasowe 363-390. Dotychczas przedstawiono przynajmniej trzy modele działania RD: pierwszy zakłada wiązanie domeny regulatorowej z DBD, wywołując efekt allosteryczny, w drugim modelu RD stwarza zawadę przestrzenną gdy p53 przyłącza się niespecyficznym do DNA, natomiast w ostatnim modelu założono, że RD stabilizuje p53 [Retzlaff *et al.* 2012]. Ponadto wykazano, że domena regulatorowa stabilizuje tetramer p53 poprzez kontakt z domeną wiążącą DNA kolejnej podjednostki tetrameru, wzmacniając tym samym aktywność transkrypcyjną białka [Retzlaff *et al.* 2012]. Funkcję tej domeny badano również w warunkach *in vivo*, poprzez wyhodowanie myszy transgenicznej, w komórkach której białko p53 zostało zamienione na jego zmutowaną wersję, pozbawioną dwudziestu czterech reszt aminokwasowych na końcu karboksylowym. Homozygotyczne myszy umierały w ciągu dwóch pierwszych tygodni życia z powodu niedokrwistości i nieprawidłowego rozwoju mózdzku [Hamard *et al.* 2013]. W zależności od tkanki, zaobserwowano trzy sposoby kontroli ekspresji genów zależnej od p53: w szpiku kostnym i grasicy koniec C osłabia aktywność p53, w wątrobie koniec karboksylowy jest elementem procesu ekspresji genów niezbędnym w kolejnym etapie po wiązaniu DNA, natomiast w śledzionie koniec C jest odpowiedzialny za kontrolę poziomu białka p53 [Hamard *et al.* 2013].

2.3. Izoformy mysiego białka p53

Dwa z mRNA opisanych w rozdziale „2.1. Gen *Trp53* u myszy i kodowane przez niego transkrypty mRNA”, p53mRNA α i p53mRNAAS, stanowią matrycę do syntezy

sześciu izoform białka p53 różniących się pomiędzy sobą sekwencją końców aminowego i/lub karboksylowego: p53, p53AS, Δ41p53, Δ41p53AS, Δ157p53 oraz Δ157p53AS [Marcel *et al.* 2011]. Białka skrócone z końca N są oznaczone symbolem Δ, po którym następuje numer aminokwasu, od którego rozpoczyna się synteza danej izoformy, natomiast warianty p53 ze zmienionym końcem C posiadają na końcu nazwy dopisane litery AS. Wymienione izoformy białka p53 u myszy powstają w wyniku wykorzystania różnych miejsc inicjacji translacji lub opisanego powyżej alternatywnego splicingu pre-mRNA. Białko p53 jest to białko pełnej długości, którego struktura została przedstawiona w poprzednim rozdziale i stanowi najczęściej występującą formę tego białka.



Rys. 4. Schemat przedstawiający izoformy białka p53 zidentyfikowane dotychczas w komórkach mysich. Kolory i oznaczenia poszczególnych części białka przedstawione zostały w sposób analogiczny do rys. 3. Kolorem żółtym zaznaczono domenę, której funkcja dotychczas nie została poznana.

Izoforma p53AS powstaje z transkryptu p53mRNAAS, składa się z 381 reszt aminokwasowych, tak więc jest skrócona o 9 aminokwasów z końca karboksylowego w stosunku do białka pełnej długości [Arai *et al.* 1986], a sekwencje tych białek różnią się ostatnimi 17 resztami aminokwasowymi [Bayle *et al.* 1995]. Wynika to z opisanej w rozdziale „2.1. Gen *Trp53* u myszy i kodowane przez niego transkrypty mRNA” obecności 96-nukleotydowego fragmentu intronu 10 z dodatkowym kodonem terminacyjnym UGA

w mRNA [Arai *et al.* 1986] i wiąże się ze zmianą w obrębie domeny regulatorowej. Wykazano, że p53AS ma zdolność wiązania do sekwencji docelowych w DNA, ponadto tworzy tetramery oraz hetero-oligomery z białkiem pełnej długości [Wu *et al.* 1994].

Izoforma $\Delta 41p53$, nazywana również p44 [Rovinski *et al.* 1987], została opisana po raz pierwszy w 1985 roku w komórkach śledziony myszy transformowanej wirusem mysiej białaczki Fried, jako białko kodowane przez zmutowany allel p53 pozbawiony eksonu drugiego [Mowat *et al.* 1985]. Izoformę tę zidentyfikowano także w linii komórkowej transformowanej wirusem mysiej białaczki Abelsona, pozbawionej endogennego p53, którą transformowano cDNA p53 [Wolf *et al.* 1985]. Przewidywana masa cząsteczkowa białka $\Delta 41p53$ to 39kDa, a jego synteza rozpoczyna się od wewnętrznego kodonu inicjacyjnego AUG2, zlokalizowanego w eksonie czwartym (rys. 2). Może się ona odbywać w wyniku translacji zależnej od elementu IRES (ang. *internal ribosome entry site*) [Kim *et al.* 2013], mającej szczególne znaczenie w warunkach stresu, w których uniemożliwiona jest translacja zależna od struktury kapu [Komar & Hatzoglou, 2011]. $\Delta 41p53$ jest białkiem skróconym o 40 reszt aminokwasowych z końca aminowego w stosunku do białka pełnej długości [Scrabble *et al.* 2005], w związku z czym pozbawione jest ono domeny transaktywacyjnej TAD1.

Ponadto, w 2011 roku ukazała się informacja o występowaniu izoformy $\Delta 157p53$, mającej powstawać w wyniku wykorzystania wewnętrznego miejsca promotorowego w eksonie 4 oraz odpowiedników białek $\Delta 41p53$ i $\Delta 157p53$ ze zmienionym końcem C: $\Delta 41p53AS$ i $\Delta 157p53AS$ [Marcel *et al.* 2011]. Nie mniej jednak, wyniki prac eksperymentalnych dotyczących tych trzech izoform u myszy dotychczas nie zostały opublikowane. Informacje o nich, znajdujące się w cytowanej publikacji, najprawdopodobniej zostały zaczerpnięte z abstraktu komunikatu konferencyjnego NCRI Cancer Conference z 2009 roku (występuje jeden wspólny autor publikacji oraz komunikatu konferencyjnego). W abstrakcie tym znajduje się również wzmianka o tym, że izoforma $\Delta 41p53$ powstaje w wyniku wykorzystania kryptycznego miejsca splicingowego w intronie drugim. Po przeprowadzeniu analizy sekwencji mRNA p53 okazało się, że kodony inicjacyjne dla izoform $\Delta 41p53$ i $\Delta 157p53$ znajdują się w obrębie otwartej ramki odczytu, co uprawdopodobnia występowanie powyższych izoform w komórkach mysich.

Kolejną izoformą białka p53 występującą w komórkach mysich jest białko Newp53 (rys. 4). Powstaje ono niezależnie od opisanych powyżej białek, z transkryptu mRNA Newp53, pozbawionego dwóch odcinków sekwencji nukleotydowej w obrębie eksonu

czwartego [Chan *et al.* 2014]. W wyniku delecji w mRNA w powstającej izoformie dochodzi do usunięcia sekwencji aminokwasowej pomiędzy resztami 42-89 oraz do przesunięcia otwartej ramki odczytu pomiędzy resztami aminokwasowymi 90-120. W efekcie końcowym białko Newp53, w porównaniu do p53 pełnej długości, nie zawiera domeny transaktywacyjnej TAD2 i regionu bogatego w proliny PRD, a domena wiązania do DNA jest skrócona z końca aminowego. Domena transaktywacyjna TAD1 oraz region C-końcowy pozostają niezmiennione. Udowodniono, że białko Newp53 może tworzyć tetramer z endogennym p53 pełnej długości, lecz pozbawione jest aktywności transaktywacyjnej, przez co nie reguluje ekspresji genów docelowych [Chan *et al.* 2014]. Należy podkreślić, że dotychczas ukazała się tylko jedna praca opisująca wariant Newp53, a jej autorzy zwracają uwagę na fakt, że nie są pewni, czy zidentyfikowany wariant należy uważać za izoformę czy za mutant białka p53.

Izoforma białka p53 ψ dotychczas nie została scharakteryzowana w komórkach mysich, ponieważ po zidentyfikowaniu transkryptu mRNA p53 ψ w mysiej linii komórkowej badania kontynuowano wykorzystując komórki ludzkie. Udowodniono, że występuje w nich zarówno transkrypt mRNA p53 ψ , jak i białko syntezowane na jego matrycy [Senturk *et al.* 2014]. W związku z powyższym można podejrzewać, że w komórkach mysich również dochodzi do syntezy białka p53 ψ . Jego występowanie również uwzględniono na rysunku 4, na którym schematycznie przedstawiono zidentyfikowane dotychczas izoformy białka p53 występujące w komórkach mysich.

2.4. Białka i RNA oddziałujące z regionem niekodującym 5' mysiego mRNA p53

Wykazano, że białka regulatorowe, oddziałujące z mRNA p53, mogą wpływać w istotny sposób na wydajność syntezy izoform p53, działając m. in. jako czynniki wiążące się *in trans* z elementami IRES (ITAF, ang. *IRES trans-acting factors*). Elementy IRES, czyli wewnętrzne miejsca wiązania rybosomu (ang. *internal ribosome entry sites*) są to miejsca w regionie niekodującym 5' mRNA, przyjmujące strukturę umożliwiającą bezpośrednie oddziaływanie z rybosomem i umożliwiające inicjację translacji niezależną od struktury kapu na końcu 5' mRNA, szczególnie w warunkach stresu komórkowego [Komar & Hatzoglou, 2011]. Dotychczas zidentyfikowano jedynie kilka białek wpływających na translację mRNA p53 u myszy (tabela 1).

Jednym z nich jest białko rybosomalne L26 (RPL26, ang. *ribosomal protein L26*). Przeprowadzono nadekspresję tego białka w linii komórkowej mysich limfocytów pre-B BaF3, co spowodowało znaczne podwyższenie poziomu białka p53 w komórkach oraz zwiększenie liczby komórek ulegających apoptozie indukowanej przez promieniowanie jonizujące [Takagi *et al.* 2005]. Wykazano również, że białko RPL26 wpływa w ten sam sposób na regulację syntezy p53 zarówno w mysich, jak i ludzkich liniach komórkowych. Na tej podstawie wnioskuje się, że białko to kontroluje translację p53 oraz odpowiedź na uszkodzenia DNA [Takagi *et al.* 2005]. Ponadto wykazano przyłączanie RPL26 do regionu niekodującego 5' mRNA ludzkiego p53 [Takagi *et al.* 2005]. Bazując na podobieństwie sekwencji nukleotydowej regionów terminalnych 5' mRNA człowieka i myszy można zakładać, że białko to oddziałuje również z regionem 5'UTR mysiego mRNA p53.

Tabela 1. Białka i RNA oddziałujące z regionem niekodującym 5' mysiego mRNA p53.

Czynnik	Funkcja	Referencja
RPL26	Zwiększenie poziomu białka p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA.	Takagi <i>et al.</i> 2005
hnRNP Q	Regulacja syntezy p53 na poziomie inicjacji translacji. ITAF. Wpływa na przyspieszenie apoptozy.	Kim <i>et al.</i> 2013
hnRNP L	ITAF. Wzmacnia translację mRNA p53. Wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę.	Seo <i>et al.</i> 2017
Wrap53 RNA*	Zwiększenie poziomu mRNA i białka p53 na skutek uszkodzeń DNA.	Mahmoudi <i>et al.</i> 2009

*Oddziaływanie zidentyfikowane w komórkach ludzkich, a oddziaływanie z mysim mRNA p53 postuluje się na podstawie wysokiego podobieństwa sekwencji nukleotydowych kodujących Wrap53 i białko p53 w genomie myszy i człowieka.

Kolejnym białkiem regulatorowym łączącym się z 5'UTR p53 jest heterogenna nukleoproteina jądrowa Q (hnRNP Q, ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q*). Zauważono, że pod wpływem stresu oksydacyjnego oraz stresu genotoksycznego w linii komórkowej fibroblastów mysich NIH3T3 dochodzi do zwiększenia ilości białka p53, przy niezmiennym poziomie mRNA. Ponadto wyciszenie hnRNP Q poprzez zastosowanie siRNA znacznie redukuje akumulację p53 pod wpływem stresu oksydacyjnego. Aby sprawdzić, czy hnRNP Q wpływa na translację p53 zależną od elementów IRES, 5'UTR p53 wklonowano w wektor bicistronowy, pomiędzy sekwencje kodujące lucyferazę z renilli

(Rluc) i lucyferazę świetlika (Fluc). W ten sposób translacja Rluc była procesem zależnym od struktury kapu, natomiast wysoki poziom Fluc wskazywał na IRES-zależną translację. W komórkach kontrolnych zaobserwowano wzrost ilości białka Fluc, natomiast w komórkach z wyciszonym białkiem hnRNP Q zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu Fluc w stosunku do kontroli. Kolejno, przeprowadzono test wiązania białka w warunkach *in vitro* do 5'UTR p53 o różnej długości, który wykazał, że najbardziej prawdopodobne miejsce wiązania hnRNP Q do 5'UTR mRNA p53 zlokalizowane jest pomiędzy nukleotydami 87-109 [Kim *et al.* 2013]. Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto wniosek, że hnRNP Q reguluje syntezę p53 na etapie inicjacji translacji i jest czynnikiem wiążącym się z IRES *in trans*. Ponadto sugerowano, że białko to ma również wpływ na przyspieszanie apoptozy [Kim *et al.* 2013].

Heterogenna rybonukleoproteina jądrowa L (hnRNP L, ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L*) jest kolejnym białkiem o aktywności czynnika ITAF. Na podstawie badań przeprowadzonych w analogiczny sposób jak w przypadku hnRNP Q stwierdzono, że hnRNP L wzmacnia translację p53, pod wpływem stresu wiąże się do regionu pomiędzy nukleotydami 87-109 5'UTR mRNA p53, do sekwencji CAUUCA oraz wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę [Seo *et al.* 2017].

Proces translacji może być również regulowany poprzez oddziaływanie mRNA z RNA antysensowym. Pierwsze doniesienia o regulacji ekspresji p53 przez RNA antysensowy dotyczyły jego udziału w regulacji poziomu p53 w indukowanych do różnicowania komórkach mysiej erytroleukemii [Khochbin & Lawrence, 1989]. Podczas procesu różnicowania komórek zauważono stopniowy spadek poziomu mRNA p53 przy jednoczesnym wzroście poziomu transkryptu antysensowego. Na podstawie podobieństwa sekwencji, wynoszącego ponad 80%, autorzy sugerowali, że to transkrypt sekwencji powtórzonej B1 (ang. *B1 repetitive sequence*) bierze udział w opisanej regulacji [Khochbin & Lawrence, 1989].

Cząsteczka RNA Wrap53 jest transkryptem antysensowym p53 i reguluje poziom mRNA p53 oraz indukuje syntezę białka p53 poprzez oddziaływanie z regionem niekodującym 5' mRNA p53 (tabela 1). Wnioski te wyciągnięto m. in. na podstawie obserwacji, że po wyciszeniu Wrap53 w komórce stwierdzono znaczne obniżenie mRNA p53 oraz tłumienie indukcji syntezy p53 pod wpływem uszkodzeń DNA. Ponadto zauważono, że zablokowanie potencjalnego oddziaływania mRNA p53-Wrap53 obniża poziom białka p53

do poziomu obserwowanego podczas wyciszenia Wrap53 [Mahmoudi *et al.* 2009]. Choć badania te zostały przeprowadzone dla ludzkiego mRNA i białka p53, autorzy publikacji zwracają uwagę na bardzo wysoką, 91%, zachowawczość sekwencji nukleotydowych regionów kodujących Wrap53 i białko p53 pomiędzy genomami człowieka i myszy [Mahmoudi *et al.* 2009]. Biorąc to pod uwagę można sugerować, że regulacja p53 przez Wrap53 może zachodzić również w komórkach mysich.

2.5. Funkcja mysiego białka p53

Białko p53 uważane jest za główny czynnik regulujący odpowiedź komórki na stres [Lane & Levine 2010]. Przypuszcza się, że każda z poszczególnych izoform p53 w komórce pełni charakterystyczną rolę, a poznanie w jaki sposób izoformy regulują aktywność komórki ułatwiłoby prace nad nowymi substancjami o aktywności antynowotworowej [Kim *et al.* 2016]. W niniejszym rozdziale przedstawiona zostanie dotychczasowa wiedza dotycząca roli i funkcjonowania białka p53 i jego izoform w komórkach mysich.

Białko p53 jest głównym czynnikiem regulującym ekspresję genów odpowiedzialnych za apoptozę, zatrzymanie cyklu komórkowego, różnicowanie i starzenie się komórek. Kluczowe znaczenie białka p53 dla funkcjonowania myszy opisano w 1992 roku, kiedy to wyhodowano mysz transgeniczną, pozbawioną białka p53 w wyniku rekombinacji homologicznej [Dohenover *et al.* 1992]. Homozygotyczne myszy nie wykazywały zmian w wyglądzie, lecz były podatne na spontaniczny rozwój nowotworów do szóstego miesiąca życia, wskazując tym samym, że brak aktywności genu *Trp53* sprzyja rozwojowi choroby, a zmutowana forma białka p53 nie jest wymagana do zapoczątkowania procesu nowotworzenia [Dohenover *et al.* 1992]. Zauważono, że w organizmie myszy z wyciszonym genem p53 (-/-) średni czas rozwoju nowotworu wynosił ok. 4-5 miesięcy, natomiast u myszy heterozygotycznej p53 (+/-) obejmował ok. 18 miesięcy [Dohenover, 1996]. Istnieje także szereg doniesień, w których funkcje p53 określano na podstawie porównania badań myszy pozbawionej genu *Trp53* z typem dzikim, w którym funkcja p53 nie była zaburzona [Lozano, 2010]. Okazuje się, że w przypadku wyciszenia aktywności genu *Trp53*, skorelowanie danej funkcji białka 53 z odpowiednią izoformą wydaje się niemożliwe.

Główną izoformą białka p53 jest białko pełnej długości. Wiedza dotycząca funkcji białka p53 pełnej długości u myszy jest stosunkowo obszerna, jednak tylko nieliczne prace prowadzone były w warunkach *in vitro*. Na początku lat 80 XX w. opisano wzrost ilości

białka p53 w odpowiedzi na stres komórkowy wywołany światłem UV [Lowe *et al.* 1983; Lu & Lane, 1993; Maltzman & Czyzyk, 1984]. Taka sama odpowiedź pojawiła się, gdy w komórkach linii mysich fibroblastów NIH3T3 wywołano stres oksydacyjny lub stres genotoksyczny indukowany etopozydem [Kim *et al.* 2013].

Wiele informacji o funkcji p53 u myszy, stanowiących potwierdzenie funkcji p53 u człowieka, uzyskano na podstawie badań przeprowadzonych z wykorzystaniem myszy transgenicznnych. W związku z aktywnością białka mogącą powodować zahamowanie proliferacji lub śmierć komórek, ilość białka p53 w warunkach fizjologicznych jest utrzymywana na niskim poziomie [Lozano, 2010] poprzez oddziaływanie z białkiem Mdm2, głównym negatywnym regulatorem p53 [Pant *et al.* 2013]. Regulacja zachodzi z wykorzystaniem dwóch różnych mechanizmów oddziaływania Mdm2 na p53: pierwszy z nich zakłada wiązanie białka Mdm2 do domeny transaktywacyjnej białka p53 [Pant *et al.* 2013; Momand *et al.* 1992; Oliner *et al.* 1993], natomiast według drugiego modelu białko Mdm2, będące ligazą ubikwityny E3, kieruje p53 do degradacji przez proteasom 26S [Pant *et al.* 2013; Honda *et al.* 1997]. Ponadto, *Mdm2* jest genem docelowym dla p53, zatem w wyniku opisanych interakcji wytwarza się ujemne sprzężenie zwrotne [Pant *et al.* 2013; Wu *et al.* 1993]. Występowanie analogicznej interakcji w komórkach mysich potwierdzono poprzez zastosowanie odpowiednich modeli: wyciszenie genu *Mdm2* powodowało śmierć embrionu, lecz dodatkowe wyciszenie genu *Trp53* prowadziło do jego uratowania [Pant *et al.* 2013; Montes de Oca Luna *et al.* 1995; Jones *et al.* 1995]. Dopiero w warunkach stresu komórkowego białko p53 zostaje ustabilizowane [Lozano, 2010; Horn, Vousden, 2007] poprzez fosforylację zachodzącą na końcu aminowym białka, co uniemożliwia jego oddziaływanie z białkiem Mdm2 [Lozano, 2010]. Kinazy ATM i Chk2 przeprowadzają reakcje fosforylacji reszt serynowych odpowiednio w pozycji 18 i 23 białka p53 [Lozano, Zambetti, 2005]. Wykazano, że zamiana jednej z reszt serynowych na alaninową może powodować częściową dysfunkcję apoptozy [Lozano, 2010; Sluss, *et al.* 2004] lub osłabiać stabilizację i aktywację p53 w wyniku stresu wywołanego promieniowaniem γ [Lozano, 2010; MacPherson *et al.* 2004]. Mutacja reszty serynowej znajdującej się na końcu karboksylowym p53, w pozycji 389, zwiększa podatność myszy na występowanie nowotworu skóry, spowodowanego ekspozycją na światło ultrafioletowe [Lozano, 2010; Bruins *et al.* 2004].

Wykazano także, że p53 bierze udział w indukcji apoptozy i regulacji cyklu komórkowego poprzez aktywację genu *p21* [Shaw, 1996, Lozano, 2010]. Białko p21 kontroluje cykl komórkowy na etapie przejścia komórki z fazy cyklu G1 do fazy S [Harper *et al.* 1993]. W modelu mysim wprowadzono mutację aminokwasu 172 [Lozano, 2010; Liu *et*

al. 2004], stanowiącą odpowiednik specyficznej dla nowotworów ludzkich mutacji 175. reszty argininy ludzkiego p53. Dowiedziono, że tak zmutowane białko p53 nie ma możliwości indukcji apoptozy, lecz zachowuje potencjał indukcji genu *p21* [Lozano, 2010; Rowan *et al.* 1996; Ludwig *et al.* 1996]. W przypadku, gdy oprócz wprowadzonej mutacji dochodzi do wyciszenia genu *p21*, obserwuje się silny rozwój nowotworów, porównywalny do odnotowanego u myszy z wyciszonym genem *p53* [Lozano, 2010; Barbazona *et al.* 2006]. Białko p53 bierze również udział w procesie różnicowania komórek i rozwoju myszy. U myszy, u których dochodzi do nadekspresji p53 w komórkach mezenchymalnych rozwijających się nerek, narządy te są mniejsze i zachodzi ekspesja markerów różnicowania, sugerując tym samym zwiększoną intensywność różnicowania tych komórek [Lozano, 2010; Godley *et al.* 1996].

Drugą ważną izoformą białka p53 jest izoforma $\Delta 41p53$, skrócona z końca aminowego oraz pozbawiona domeny transaktywacyjnej TAD1. Wskazywano, że podczas nieobecności białka p53 pełnej długości, jego izoforma $\Delta 41p53$ jest rakotwórcza [Maier *et al.* 2003, Mowat *et al.* 1985], natomiast w przypadku, gdy w komórce występuje p53 pełnej długości, $\Delta 41p53$ powoduje spowolnienie wzrostu [Maier *et al.* 2003, Rovinski and Benchimol 1988; Lavigueur *et al.* 1989]. Udowodniono również, że $\Delta 41p53$ ulega wysokiej ekspresji w mysich embrionalnych komórkach macierzystych (ESCs, ang. *embryonic stem cells*) [Ungewitter & Scrabble, 2010]. $\Delta 41p53$ i p53 oligomeryzują ze sobą, dzięki czemu $\Delta 41p53$ hamuje aktywność transkrypcyjną białka pełnej długości [Courtois *et al.* 2002], utrzymując je tym samym w nieaktywnej formie i zapobiegając utracie pluripotencji komórek związanej z aktywacją p53. Utrata pluripotencji komórek jest spowodowana tym, że genami docelowymi dla p53 są m. in. geny *Nanog* i *Igf-1R*, odpowiadające za utrzymanie pluripotencji w ESC [Mitsui *et al.* 2003] oraz za przechodzenie komórek ze stanu pluripotencji do stanu różnicowania [Ungewitter & Scrabble, 2010]. Ponadto postuluje się, że $\Delta 41p53$ stanowi główną izoformę p53 w trakcie wczesnych etapów embriogenezy u myszy [Ungewitter & Scrabble, 2010]. Wykazano również, że myszy transgeniczne, u których dochodzi do nadekspresji izoformy $\Delta 41p53$, charakteryzują się przedwczesnym starzeniem oraz zahamowaniem wzrostu, natomiast utrzymanie równowagi pomiędzy supresją nowotworu i regeneracją tkanek wymaga odpowiednio zbilansowanego poziomu białka p53 pełnej długości oraz jego izoformy $\Delta 41p53$ [Maier *et al.* 2003]. Transgeniczne myszy homozygotyczne pod względem transgenu kodującego $\Delta 41p53$ wykazują spadek zdolności poznawczych i upośledzenie synaptyczne na wczesnym etapie życia, spowodowane hiperaktywacją receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 IGF-1R (ang. *insulin-like*

growth factor 1 receptor) oraz zmienionym metabolizmem białka tau, wiążącego białko mikrotubulowe [Pehar *et al.* 2010]. Ponadto, $\Delta 41p53$ kontroluje homeostazę glukozy i proliferację komórek β [Hinault *et al.* 2011]. U myszy transgenicznnych, u których dochodzi do nadekspresji izoformy $\Delta 41p53$, rozwija się hipoinsulinemia i nietolerancja glukozy już w wieku trzech miesięcy, a ich stan pogarsza się z wiekiem, prowadząc do jawnej cukrzycy, a następnie do śmierci w wieku około czternastu miesięcy [Hinault *et al.* 2011]. Zauważono również, że wraz ze zmniejszeniem masy komórek β i spadkiem tempa ich proliferacji, dochodzi do zmniejszonej ekspresji dwóch kluczowych regulatorów proliferacji: cykliny D2 i genu homeotycznego trzustki i dwunastnicy (ang. *Pancreatic duodenal homeobox-1*) oraz zwiększenia poziomu ekspresji inhibitora cyklu komórkowego p21 [Hinault *et al.* 2011].

Funkcje izoformy białka p53 ze zmienionym końcem karboksylowym p53AS zostały stosunkowo słabo poznane. W warunkach *in vitro* izoforma ta wykazuje większą zdolność wiązania DNA w stosunku do białka pełnej długości [Wolkowicz *et al.* 1995]. Wykazano również, że białko p53AS jest zdolne do indukcji apoptozy, choć proces ten zachodzi wolniej niż w przypadku białka p53 pełnej długości [Almong *et al.* 1997]. Izoforma p53AS hamuje apoptozę indukowaną przez p53 pełnej długości. Wykazano, że zwiększenie poziomu białka p53 powoduje przyspieszenie apoptozy, natomiast efektem koekspresji białek p53 i p53AS lub zwiększenia poziomu białka p53AS jest inhibicja apoptozy [Almong *et al.* 2000]. Istnieje również doniesienie sugerujące, że białko p53AS aktywuje promotor genu *IGFBP3* (białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu, ang. *insulin-like growth factor binding protein 3*) [Harms & Chen, 2005].

Kolejnym wariantem białka p53, którego funkcje opisano, jest izoforma Newp53. Wykazano, że może ona tworzyć hetero-oligomery z białkiem p53 pełnej długości poprzez oddziaływanie ich końców karboksylowych [Chan *et al.* 2014]. Ważne, że izoforma Newp53 jest pozbawiona aktywności transaktywacyjnej [Chan *et al.* 2014].

Zestawienie funkcji poszczególnych izoform białka p53 zostało przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Funkcje poszczególnych izoform białka p53.

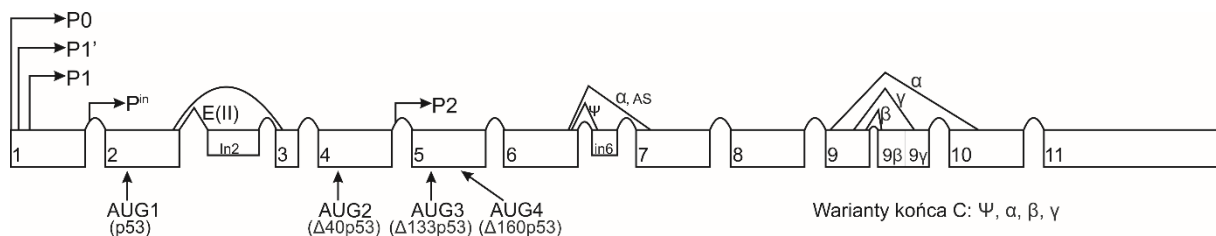
Izoforma	Funkcja	Referencja
p53	Odpowiedź na stres wywołany światłem UV	Lowe <i>et al.</i> 1983, Maltzman & Czyzyk, 1984
	Odpowiedź na stres genotoksyczny i oksydacyjny	Kim <i>et al.</i> 2013
	Indukcja apoptozy	Lozano, 2010
	Kontrola cyklu komórkowego na etapie przejścia komórki z fazy cyklu G1 do fazy S	Shaw, 1996
	Supresja nowotworów	Lozano, 2010
	Udział w różnicowaniu komórek	Lozano, 2010
Δ41p53	Utrzymanie pluripotencji mysich komórek macierzystych	Ungewitter & Scrable, 2010
	Rakotwórcza w warunkach nieobecności białka p53 pełnej długości	Mowat <i>et al.</i> 1985
	Nadekspresja powoduje przedwczesne starzenie i zahamowanie wzrostu myszy	Maier <i>et al.</i> 2003
	Nadekspresja powoduje spadek zdolności poznawczych i upośledzenie synaptyczne na wczesnym etapie życia	Pehar <i>et al.</i> 2010
	Kontrola homeostazy glukozy i proliferacji komórek β	Hinault <i>et al.</i> 2011
p53AS	Zdolność indukcji apoptozy	Almong <i>et al.</i> 1997
	Hamowanie apoptozy indukowanej poprzez białko pełnej długości	Almong <i>et al.</i> 2000
	Hamowanie aktywności transkrypcyjnej białka pełnej długości	Almong <i>et al.</i> 2000
Newp53	Tworzenie hetero-oligomerów z białkiem p53 pełnej długości. Brak aktywności transaktywacyjnej	Chen <i>et al.</i> 2014

2.6. Gen *TP53* u człowieka oraz kodowane przez niego transkrypty mRNA

W genomie człowieka (*Homo sapiens*) białko p53 jest kodowane przez gen *TP53*, umiejscowiony na chromosomie 17, obejmujący ok. 25,7 tys. nukleotydów.

W komórkach ludzkich zidentyfikowano transkrypty genu *TP53* różniące się pomiędzy sobą zarówno na końcu 5' jak i 3'. Stanowią one matryce do syntezy przynajmniej trzynastu izoform białka p53, które powstają w wyniku wykorzystania różnych miejsc inicjacji transkrypcji, translacji lub alternatywnego splicingu. Główny transkrypt składa się z 11 eksonów i 10 intronów, których długość waha się odpowiednio pomiędzy 22 a 1278 nt oraz 81 a 10739 nt. Długość regionu nie ulegającego translacji 5' (5'UTR) waha się pomiędzy 140 a 250 nt, zależnie od wyboru miejsca inicjacji transkrypcji, natomiast 3'UTR obejmuje ok. 1200 nt.

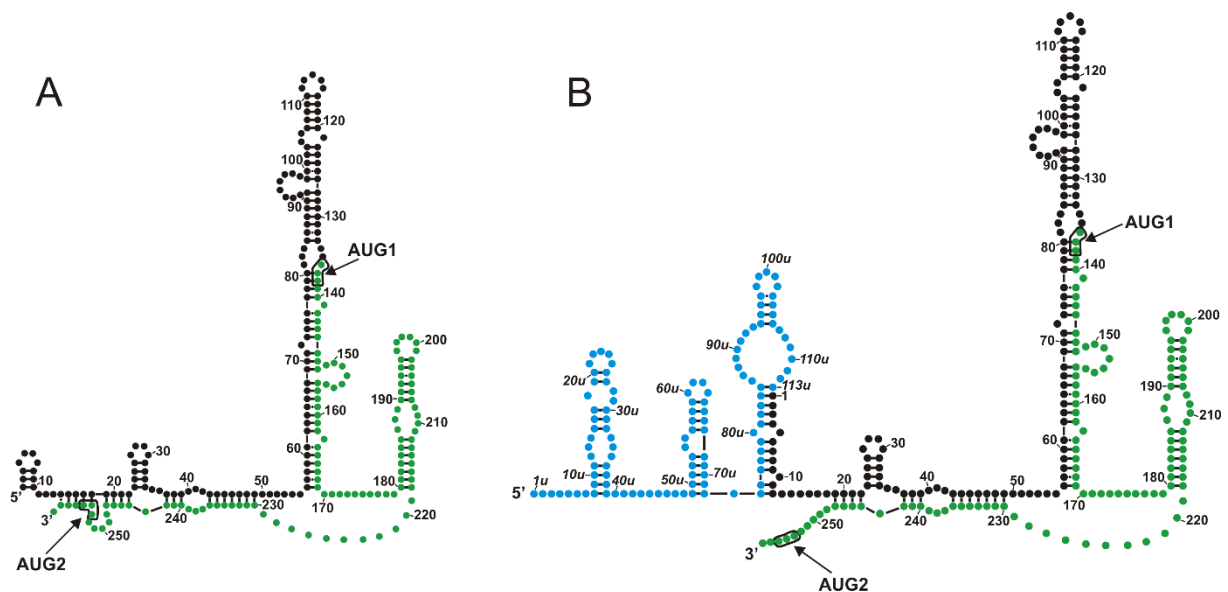
Dotychczas zidentyfikowano pięć miejsc inicjacji transkrypcji, które oznaczono jako P0, P1, P1', P1^{int} i P2 (rys. 5) [Swiatkowska *et al.* 2016, 2019]. W dalszej części pracy nazwy poszczególnych mRNA pochodzą od odpowiednich miejsc inicjacji transkrypcji.



Rys. 5. Schematyczne przedstawienie ludzkiego genu *TP53*. Symbole P0, P1', P1, P1^{int} i P2 oznaczają miejsca inicjacji transkrypcji, pionowymi strzałkami zaznaczono miejsca inicjacji translacji dla izoform białka: p53, $\Delta 40p53$, $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$. Symbolami α , β i γ zaznaczono warianty splicingowe transkryptu, E(II) oznaczono wersję transkryptu z zachowanym intronem drugim, ψ z zachowanym intronem 6.

Dotychczas najwięcej miejsca w literaturze poświęcono transkryptom P1 i P0. Region niekodujący transkryptu P0 obejmuje ok. 250 nt [Lamb & Crawford, 1986], natomiast miejsce inicjacji transkrypcji P1 znajduje się około 110 nt poniżej miejsca P0. Wykazano, że miejsce to nie jest jednorodne, nie mniej jednak transkrypt mRNA najczęściej zawiera region niekodujący 5' o długości ok. 140 nt [Tuck & Crawford, 1989]. Scharakteryzowano strukturę drugorzędową regionu niekodującego 5' transkryptu P1 (rys. 6a) oraz wykazano, że zawiera ona cztery motywy strukturalne typu spinki do włosów: długą, stabilną termodynamicznie

spinkę ($\Delta G = -52,9$ kcal/mol) zawierającą kodon inicjacyjny AUG1 [Błaszczyk & Ciesiołka, 2011], mniejszą ($\Delta G = -11,1$ kcal/mol), która została zaproponowana jako element oddziałujący z białkiem HDM2 [Candeias *et al.* 2008] oraz dwie małe spinki na końcu 5' mRNA. W transkrypcie mRNA P0 zachowane zostały trzy z czterech elementów zaobserwowanych w P1, przy czym mRNA jest wydłużony w kierunku 5' i zawiera trzy dodatkowe elementy typu spinki do włosów, a mała spinka obecna na końcu 5' mRNA P1 wchodzi w skład podstawy większego elementu w mRNA P0 (rys. 6b) [Górska *et al.* 2013]. Zauważono, że mRNA P1 i P0 syntetyzowane są w różnych tkankach. P1 zidentyfikowano w nowotworach pochodzących z jamy ustnej, krtani, wątroby, płuc i piersi oraz w nieśmiertelnych liniach komórkowych, takich jak np. linia raka piersi MCF-7, raka płuc H460 lub oskrzeli BEAS-2B [Strudwick *et al.*, 2003]. Transkrypt P0 zaobserwowano w zdrowych tkankach, np. wątroby, płuc i jąder oraz wykazano, że w większości zdrowych tkanek stanowi on ok. 50% całkowitego poziomu mRNA p53 [Strudwick *et al.*, 2003].



Rys. 6. Schematyczne przedstawienie modeli struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' transkryptów mRNA P1 (A) i P0 (B). Kolorem zielonym zaznaczono część sekwencji kodującej mRNA, czarnym część niekodującą, wspólną dla P1 i P0, niebieskim nukleotydy charakterystyczne dla mRNA P0 [na podstawie: Żydowicz-Machtel *et al.* 2018].

Kolejnym miejscem inicjacji transkrypcji genu *TP53* jest P1', zlokalizowane pomiędzy miejscami P1 i P0 [Swiatkowska *et al.* 2016, 2019], odpowiadające 5'UTR mRNA o długości 190 nt [Tuck & Crawford, 1989; Strudwick *et al.* 2003]. Występowanie tego transkryptu wykazano w zdrowych tkankach, tych samych, w których stwierdzono

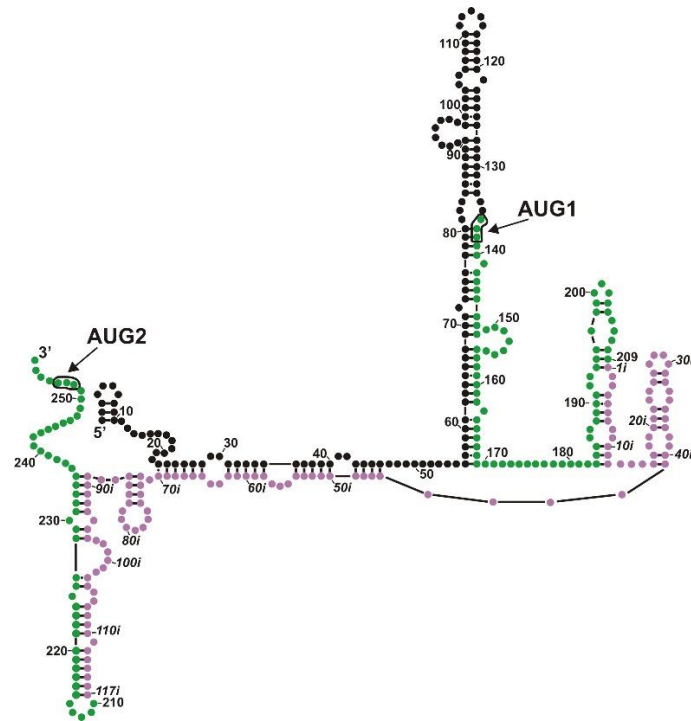
występowanie mRNA P0. Nie mniej jednak, w sutkach, wątrobie i śledzionie stwierdzono występowanie wszystkich trzech opisanych powyżej mRNA, co wskazuje na duże zróżnicowanie miejsc inicjacji transkrypcji genu *TP53* [Strudwick *et al.* 2003].

Miejsce Pⁱⁿ jest miejscem promotorowym zlokalizowanym w obrębie intronu pierwszego genu *TP53* [Reisman *et al.* 1988]. Wykazano, że w systemie reporterowym CAT inicjacja transkrypcji od tego miejsca zachodzi ok. 50 razy bardziej efektywnie niż od miejsca P0 [Reisman *et al.* 1988]. Dotychczas nie określono funkcji transkryptu Pⁱⁿ, nie mniej jednak zasugerowano dwie możliwości: Pⁱⁿ może stanowić miejsce promotorowe dla genu znajdującego się w obrębie intronu pierwszego genu *TP53* lub dwa promotory Pⁱⁿ i P0 mogą być wykorzystywane w regulacji ekspresji p53 w trakcie cyklu komórkowego [Reisman *et al.* 1988].

Kolejnym wyróżnionym dotychczas miejscem inicjacji transkrypcji jest miejsce P2 zlokalizowane w obrębie intronu czwartego [Bourdon *et al.* 2005]. Zostało ono zidentyfikowane poprzez zastosowanie reakcji RACE (ang. *rapid amplification of cDNA ends*), a jego aktywność promotorową potwierdzono w transfekowanej linii komórkowej poprzez zastosowanie genu reporterowego lucyferazy [Bourdon *et al.* 2005]. Aktywność promotorowa P2 może być regulowana w sposób zależny od białka p53: wykazano, że w części niekodującej P2, obejmującej część intronu czwartego, występują elementy, do których wiąże się białko p53 [Marcel *et al.* 2010].

Wykazano, że w komórkach ludzkich występuje jeszcze jeden mRNA p53, różniący się od pozostałych sekwencją regionu terminalnego 5', zawierający sekwencję intronu drugiego p53E(II) [Ghosh *et al.* 2004]. Po raz pierwszy został on opisany w 1987 roku [Matlashewski *et al.* 1987]. Transkrypt p53E(II) powstaje w wyniku alternatywnego splicingu, w trakcie którego intron drugi staje się nowym eksonem, a w jego sekwencji nukleotydowej w otwartej ramce odczytu znajdują się trzy kodony terminacyjne UGA [Ghosh *et al.* 2004]. Przeprowadzono mapowanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA z zachowaną sekwencją intronu drugiego, w wyniku którego zaproponowano model struktury drugorzędowej tego regionu (rys. 7). W modelu tym występuje stabilna spinka zawierająca kodon inicjacyjny AUG1 oraz spinka odpowiedzialna za wiązanie białka HDM2, jednak jej struktura nie została w pełni zachowana. Ponadto, wykazano obecność dwóch dodatkowych elementów strukturalnych typu spinki do włosów [Górska *et al.* 2013]. Udowodniono, że transkrypt ten znajduje się zarówno w zdrowych jak i transformowanych

komórkach ludzkich, lecz jego ilość jest znacznie mniejsza w stosunku do transkryptu kodującego białko p53 pełnej długości [Ghosh *et al.* 2004].



Rys. 7. Schematyczne przedstawienie modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' transkryptu zawierającego zachowany intron drugi. Kolorem czarnym zaznaczono region niekodujący, zielonym nukleotydy sekwencji kodującej, fioletowym sekwencję intronu drugiego [na podstawie: Górnska *et al.* 2013].

Wyróżniono również warianty mRNA p53 różniące się pomiędzy sobą sekwencją nukleotydową regionu terminalnego 3'. Dotychczas zidentyfikowano trzy takie warianty: α , β oraz γ (rys. 5) [Joruz *et al.* 2016; Marcel *et al.* 2011]. Podstawową formą jest sekwencja nukleotydowa pozbawiona intronu dziewiątego. Wariant ten został oznaczony symbolem α i na końcu karboksylowym kodowanego białka posiada sekwencję aminokwasową domeny oligomeryzacyjnej [Marcel *et al.* 2011]. Dwa pozostałe warianty, β i γ , powstają w wyniku częściowego zachowania sekwencji intronu dziewiątego [Marcel *et al.* 2011]. Wariant β opisano w 1996 roku, jako transkrypt zawierający zmianę końca karboksylowego białka, analogiczną do zaobserwowanej wcześniej w p53 w komórkach myszy [Flaman *et al.* 1996]. Ten wariant mRNA u człowieka po raz pierwszy zaobserwowano w limfocytach i wykazano, że zawiera on dodatkowy, 133 nukleotydowy fragment intronu dziewiątego, przekształcony w sekwencję kodującą. Wykazano, że mRNA p53 β występuje w zdrowych tkankach

ludzkich, np. w skórze, piersi, żołądka, pęcherzu i migdałkach [Flaman *et al.* 1996]. Okazało się, że w limfocytach krwi obwodowej mRNA β stanowi ok. 5-10% ogólnej ilości mRNA p53 [Flaman *et al.* 1996]. Kolejny wariant stanowi zidentyfikowany w okrężnicy transkrypt γ , w którego sekwencji nukleotydowej również zostaje zachowana część intronu dziewiątego [Bourdon *et al.* 2005] (rys. 5).

Przeprowadzono badania mające na celu identyfikację tkanek ludzkich, w których dochodzi do transkrypcji sześciu wariantów mRNA p53: z niezmiennym końcem 5' posiadającym różne warianty końca 3': α , β i γ oraz transkryptem inicjowanym w miejscu promotorowym P2, zawierającym trzy wersje końca 3': α , β i γ [Bourdon *et al.* 2005]. Warianty mRNA zostały oznaczone odpowiednio: p53 α , p53 β , p53 γ , P2p53 α , P2p53 β i P2p53 γ . Wykazano, że ekspresja wariantów splicingowych mRNA p53 zachodzi w sposób specyficzny tkankowo [Bourdon *et al.* 2005]. Wariant p53 α ulega ekspresji we wszystkich analizowanych tkankach, p53 β zidentyfikowano w większości badanych tkanek, lecz nie wykryto ich w mózgu, mięśniach, płucach, rdzeniu kręgowym, prostatie, mózgu i wątrobie płodu, a p53 γ nie zostało wykryte w płucach, śledzionie, rdzeniu kręgowym, jądrach oraz w mózgu i wątrobie płodu [Bourdon *et al.* 2005]. Warianty mRNA rozpoczynające się od miejsca P2 również ulegają ekspresji w większości badanych tkanek, za wyjątkiem mięśni szkieletowych, prostaty, macicy i piersi w przypadku P2p53 α oraz mózgu, sercu, płucach, jelicie, piersi, śliniankach i wątrobie płodu w przypadku P2p53 γ . W przeciwieństwie do pozostałych wariantów mRNA, obecność P2p53 β zaobserwowano tylko w nielicznych tkankach: okrężnicy, szpiku kostnym, jelicie, jądrach oraz mózgu płodu [Bourdon *et al.* 2005].

Ostatnim zidentyfikowanym dotychczas mRNA p53 jest p53 ψ , homolog mysiego p53 ψ , który również powstaje w wyniku alternatywnego splicingu intronu szóstego [Senturk *et al.* 2014]. W badaniach wykorzystano materiał pochodzący od pacjentów znajdujących się we wczesnym stadium gruczolaka. Wykazano, że 20% analizowanych tkanek zawiera mRNA p53 ψ [Senturk *et al.* 2014]. Co więcej, po dogłębnej analizie miejsc ulegających mutacjom w genie *TP53* w nowotworach ludzkich zauważono, że mutacja miejsca akceptorowego, zlokalizowanego pomiędzy intronem szóstym a eksonem siódmym, występuje najczęściej spośród wszystkich mutacji intronowych w obrębie genu *TP53*, sprzyjając tym samym wykorzystaniu krytycznego miejsca splicingowego w intronie szóstym oraz faworyzując powstanie izoformy p53 ψ [Senturk *et al.* 2014]. Wykazano, że mRNA p53 ψ stanowił główny wariant ulegający ekspresji w linii komórkowej zawierającej

mutację miejsca splicingowego pomiędzy intronem szóstym a eksonem siódmym w komórkach linii HOP62 [Senturk *et al.* 2014].

2.7. Budowa ludzkiego białka p53

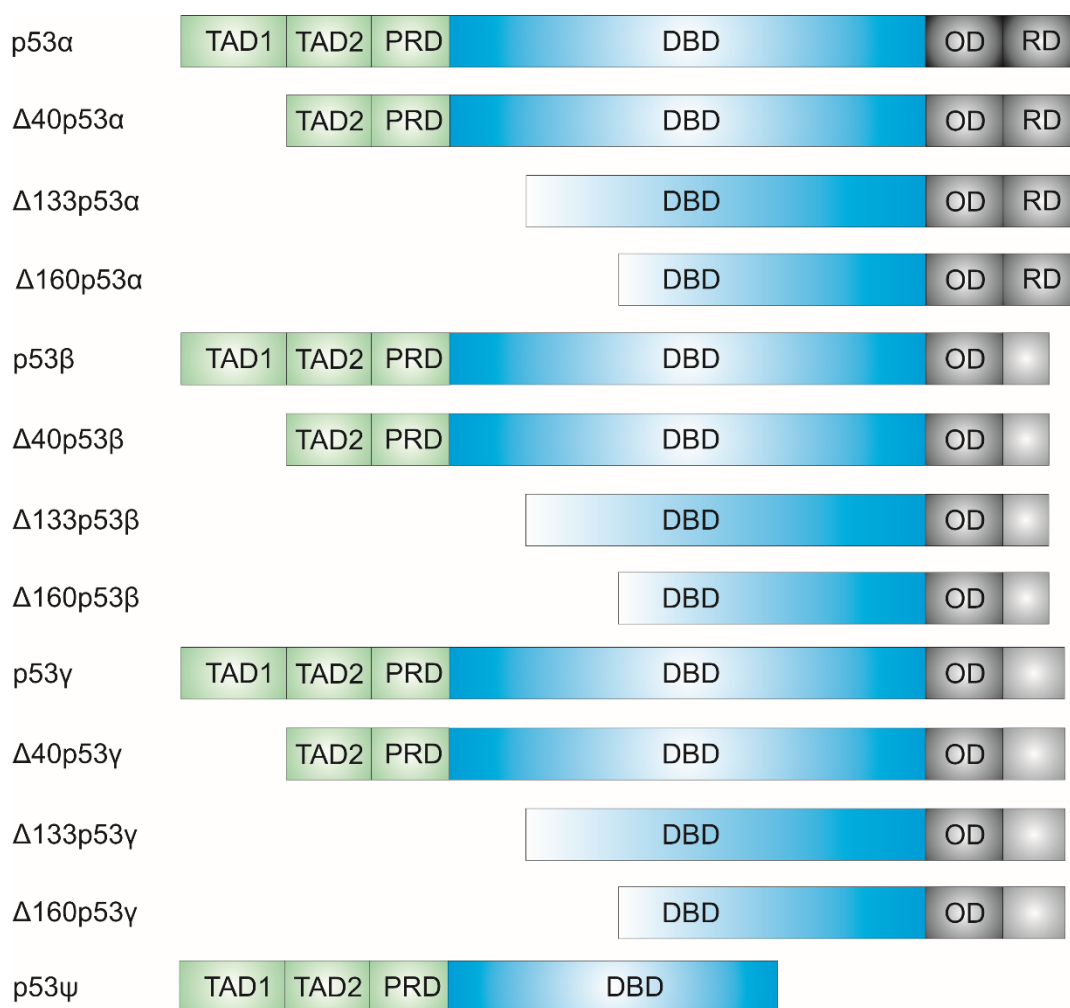
Podstawową izoformą białka p53 jest białko pełnej długości. W komórkach ludzkich składa się ono z 393 reszt aminokwasowych i zawiera domeny o funkcjach analogicznych do występujących w mysim białku p53 pełnej długości [Joerger & Fersht, 2010] (rys. 8).



Rys. 8. Schemat budowy ludzkiego białka p53. Kolorem zielonym zaznaczono region N-końcowy białka, niebieskim domenę wiążącą DNA, szarym domenę oligomeryzacyjną. TAD1 – domena transaktywacyjna 1, TAD2 – domena transaktywacyjna 2, PRD – domena bogata w proliny, DBD – domena wiążąca DNA, OD – domena oligomeryzacyjna, RD – domena regulatorowa. Liczby pod schematem reprezentują numery reszt aminokwasowych odpowiednie dla poszczególnych domen [na podstawie: Joerger & Fersht, 2010].

2.8. Izoforny ludzkiego białka p53

Dotychczas w literaturze opisano przynajmniej trzynaście izoform ludzkiego białka p53, które mogą różnić się pomiędzy sobą zarówno na końcu aminowym, jak i karboksylowym: p53 (zwane również p53 α), Δ 40p53, Δ 133p53, Δ 160p53, p53 β , Δ 40p53 β , Δ 133p53 β , Δ 160p53 β , p53 γ , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 γ oraz p53 ψ (rys. 9) [Marcel *et al.* 2011; Senturk *et al.* 2014]. Ich nazwy są skonstruowane analogicznie do nazw izoform występujących w komórkach mysich: białka skrócone z końca aminowego są oznaczone symbolem Δ , po którym następuje numer aminokwasu, od którego rozpoczyna się synteza danej izoformy, natomiast warianty p53 ze zmienionym końcem karboksylowym posiadają na końcu nazwy dopisane greckie litery α , β i γ . Poszczególne izoformy są syntezowane z wykorzystaniem transkryptów opisanych w rozdziale „2.6. Gen *TP53* u człowieka oraz kodowane przez niego transkrypty mRNA”, powstających poprzez wykorzystanie różnych miejsc paromotorowych lub alternatywny splicing. Dodatkowo, wykorzystywane są również alternatywne miejsca inicjacji translacji znajdujące się w obrębie otwartej ramki odczytu (rys. 5).



Rys. 9. Schemat przedstawiający izoformy białka p53 scharakteryzowane w komórkach ludzkich, różniące się pomiędzy sobą sekwencją reszt aminokwasowych, zlokalizowanych na końcu aminowym i/lub karboksylowym. Kolory i oznaczenia poszczególnych części białka przedstawione zostały w sposób analogiczny do rys. 3.

Białko p53 pełnej długości (p53 α) (rys. 9) stanowi główną izoformę p53 występującą w komórkach ludzkich. Izoforma ta syntezowana jest z kodonu AUG1 umiejscowionego na początku eksonu drugiego [Lamb & Crawford, 1986]. Matrycą mRNA wykorzystywaną do syntezy p53 α są transkrypty, których synteza rozpoczyna się z miejsc promotorowych P0, P1 lub P1' z niezmienionym końcem C. Wykazano, że p53 pełnej długości zlokalizowane jest głównie w jądrze komórkowym [Ghosh *et al.* 2004, Bourdon *et al.* 2005]. Występuje szereg doniesień literaturowych, w których opisano wpływ warunków stresowych na zmiany ilości białka p53 pełnej długości w liniach komórkowych. W przypadku zastosowania czynników wywołujących stres genotoksyczny zaobserwowano kumulację białka p53 w komórkach

[Candeias *et al.* 2006], podobne obserwacje poczyniono analizując wpływ niedoboru glukozy [Khan *et al.* 2015] lub zahamowania procesu transkrypcji [Bourdon *et al.* 2005]. W przypadku stresu siateczki śródplazmatycznej zauważono dwa odmienne efekty: ilość białka p53 pełnej długości zwiększała się lub zmniejszała, w zależności od wykorzystanej linii komórkowej [Candeias *et al.* 2006; Mlynarczyk C & Fähræus R, 2014].

W komórkach ludzkich występują również izoformy białka p53 β oraz γ , które od białka p53 pełnej długości różnią się sekwencją reszt aminokwasowych na końcu karboksylowym białka. Są one syntezowane z wykorzystaniem matryc opisanych wcześniej transkryptów mRNA ze zmienionym końcem 3', powstałym w wyniku retencji intronu 9. Białko p53 β składa się z 341 reszt aminokwasowych, spośród których dziesięć ostatnich jest zmienionych w stosunku do białka p53 α w wyniku alternatywnego splicingu pre-mRNA oraz obecności kodonu terminacyjnego w intronie dziewiątym [Bourdon *et al.* 2005]. Zmiany w obrębie końca karboksylowego powodują, że p53 β pozbawione jest części domeny oligomeryzacyjnej [Flaman *et al.* 1996]. Udowodniono, że pomimo jej braku, izoformy p53 β i p53 α mogą tworzyć kompleks białkowy [Bourdon *et al.* 2005]. Ponadto zaobserwowano, że białko p53 β nie wiąże DNA w warunkach *in vitro*, a jego aktywność transkrypcyjna jest uszkodzona w warunkach *in vivo* zarówno w komórkach drożdżowych, jak i ssaczy [Flaman *et al.* 1996]. W kolejnych badaniach udowodniono, że p53 β może wzmacniać aktywność transkrypcyjną p53 w stosunku do wybranych promotorów. Analizując materiał pobrany od trzydziestu pacjentek cierpiących na raka piersi wykazano obecność mRNA p53 β u dziesięciu z nich [Bourdon *et al.* 2005]. Białko p53 β zlokalizowane zostało głównie w jądrze komórkowym, choć jego niewielkie ilości zaobserwowano również w cytoplazmie. Ponadto wykazano, że pod wpływem zastosowania aktynomycyny D, inhibitora transkrypcji [Sobell, 1985], nie dochodzi do zwiększenia poziomu białka p53 β w komórkach linii komórkowej raka piersi MCF7 oraz linii komórkowej kostniakomięsaka U2OS. Wzrost poziomu tego białka zaobserwowano w komórkach nowotworowych raka płuc H1299, transfekowanych wektorem zawierającym sekwencję DNA kodującą białko p53 β . Sugeruje się, że brak zwiększenia poziomu p53 β w liniach komórkowych MCF7 i S2OS może być spowodowany nieprawidłową regulacją syntezy białka p53 β [Bourdon *et al.* 2005].

Izoformę białka p53 γ opisano po raz pierwszy w 2005 roku [Bourdon *et al.* 2005]. W wyniku alternatywnego splicingu intronu dziewiątego ostatnich dwadzieścia pięć reszt aminokwasowych występujących w p53 α zostało zastąpione piętnastoaminokwasową sekwencją, co, podobnie jak w przypadku p53 β , również skutkuje utratą części domeny

oligomeryzacyjnej [Khoury & Bourdon, 2011]. W związku z trudnością w wytworzeniu specyficznego przeciwciała, białko p53 γ nie zostało dotychczas scharakteryzowane w lizacie komórkowym. Nieliczne badania dotyczące tego białka były prowadzone w transfekowanej linii komórkowej H1299 [Bourdon *et al.* 2005]. Izoforma p53 γ zlokalizowana została zarówno w jądrze komórkowym jak i w cytoplazmie, w związku z czym sugeruje się, że może ona przemieszczać się pomiędzy tymi przedziałami subkomórkowymi. Nie wiadomo czy p53 γ może wywierać wpływ na przebieg procesów nowotworowych, jako że mRNA p53 γ nie zostało zidentyfikowane w materiale pobranym od trzydziestu pacjentów cierpiących na raka piersi [Bourdon *et al.* 2005].

Kolejną izoformą białka p53 jest Δ 40p53, zwana również p53/47 [Courtois *et al.* 2002], p47 [Ghosh *et al.* 2004] lub Δ Np53 [Błaszczyk & Ciesiołka, 2011]. W komórkach ludzkich izoformę tę zidentyfikowano w 1984 roku [Matlashewski *et al.* 1984], a następnie w 2002 roku opisano ją ponownie jako naturalnie występującą izoformę białka p53 [Courtois *et al.* 2002]. Izoforma Δ 40p53 pozbawiona jest pierwszych 39 aminokwasów, tym samym nie zawiera ona domeny TAD1 [Courtois *et al.* 2002]. Synteza Δ 40p53 zachodzi z kodonu AUG2 zlokalizowanego w eksonie czwartym (rys. 5) [Courtois *et al.* 2002]. Matrycę do syntezy Δ 40p53 mogą stanowić te same mRNA, co w przypadku p53 α , czyli P0, P1 lub P1' z niezmienionym końcem 3'. Postuluje się, że Δ 40p53 może powstawać poprzez wykorzystanie następujących mechanizmów inicjacji translacji [Swiatkowska *et al.* 2016]: reinicjację translacji, nieprecyzyjne skanowanie (ang. *leaky scanning*) polegające na pominięciu prawidłowego kodonu start podczas inicjacji translacji i rozpoczęciu syntezy białka od innego kodonu AUG [Dzikiewicz & Szweykowska-Kulińska, 2006] lub na skutek translacji zależnej od elementów IRES [Yang *et al.* 2006]. W przypadku wykorzystania wyżej wymienionych mRNA jako matrycy, w komórkach ludzkich może dochodzić do koekspresji izoform p53 α i Δ 40p53. Synteza Δ 40p53 mogłaby zachodzić również z wykorzystaniem transkryptu z zachowanym intronem drugim. Jest to jedyna dotychczas opisana izoforma powstająca z tego transkryptu, jako że synteza p53 pełnej długości jest uniemożliwiona poprzez występowanie kodonów terminacyjnych w obrębie eksonu drugiego, zlokalizowanych powyżej kodonu AUG będącego kodonem inicjacyjnym dla Δ 40p53 [Ghosh *et al.* 2004]. Wykazano także, że mogą powstawać oligomery białek Δ 40p53 i p53 pełnej długości, a Δ 40p53 hamuje aktywność transkrypcyjną p53 [Courtois *et al.* 2002]. W komórkach nowotworowych niezawierających endogennego p53 ekspresja Δ 40p53 jest tolerowana, podobnie jak ekspresja p53 w obecności Δ 40p53, jednak ekspresja jedynie p53

nie była możliwa. Na podstawie powyższych obserwacji sugeruje się, że $\Delta 40p53$, poprzez kontrolę p53 pełnej długości, wpływa na żywotność komórek [Ghosh *et al.* 2004]. Zaobserwowano również, że $\Delta 40p53$ jest zlokalizowana głównie w cytoplazmie i ma zdolność do zmiany lokalizacji p53 pełnej długości z jądrowej na cytoplazmatyczną [Ghosh *et al.* 2004]. Ponadto, zastosowanie czynników wywołujących stres komórkowy, np. genotoksyczny, siateczki śródplazmatycznej czy niedoboru glukozy, skutkowało zwiększeniem poziomu izoformy $\Delta 40p53$ w komórkach [Candeias *et al.* 2006; Młynarczyk C & Fähræus R, 2014; Khan *et al.* 2015].

Postuluje się występowanie dwóch dodatkowych izoform $\Delta 40p53$ zawierających odmienne sekwencje aminokwasowe końców karboksylowych: $\Delta 40p53\beta$ i $\Delta 40p53\gamma$ [Marcel *et al.* 2011]. Białka te są syntezowane na podstawie transkryptów wykorzystywanych podczas syntezy p53 β i p53 γ , a brak domeny transaktywacyjnej TAD1 spowodowany jest, podobnie jak w przypadku p53 α , wykorzystaniem mechanizmu wewnętrznej inicjacji translacji. Izoformom $\Delta 40p53\beta$ i $\Delta 40p53\gamma$ poświęcono stosunkowo niewiele badań, w związku z czym dotychczas nie opisano ani lokalizacji komórkowej tych białek ani jaki wpływ na poziom odpowiedniej izoformy w komórce wywołuje zastosowanie warunków stresowych.

Białka $\Delta 133p53$ oraz $\Delta 160p53$ stanowią dwie kolejne izoformy skrócone z końca aminowego o odpowiednio 132 i 159 reszt aminokwasowych. Syntetyzowane są z wykorzystaniem jako matrycy mRNA transkrybowanego z miejsca promotorowego P2 (rys. 5). Zarówno $\Delta 133p53$ jak i $\Delta 160p53$ mogą występować w formie ze zmienionym końcem C, powstałym w wyniku opisanego wcześniej alternatywnego splicingu pre-mRNA: $\Delta 133p53\beta$, $\Delta 133p53\gamma$ oraz $\Delta 160p53\beta$ i $\Delta 160p53\gamma$ [Joruz & Bourdon, 2016].

Izoforma $\Delta 133p53$ została opisana po raz pierwszy w 2005 roku i wykazano, że zlokalizowana jest głównie w obrębie jądra komórkowego, a niewielkie jej ilości zostały również zauważone w cytoplazmie [Bourdon *et al.* 2005]. Istotnym utrudnieniem w badaniach nad tą izoformą białka jest fakt, że wszystkie reszty aminokwasowe występujące w $\Delta 133p53$ zawarte są również w białku pełnej długości, co uniemożliwia wyprodukowanie przeciwciała skierowanego specyficznie przeciw $\Delta 133p53$ [Bourdon *et al.* 2005]. Nie mniej jednak, w 24 spośród analizowanych 30 przypadków raka piersi wykazano występowanie mRNA kodującego $\Delta 133p53$, nie stwierdzono go natomiast w materiale kontrolnym, pobranym od osób zdrowych [Bourdon *et al.* 2005].

Występowanie dwóch kolejnych wariantów $\Delta 133p53$ udowodniono poprzez transfekcję komórek plazmidem zawierającym odpowiednią sekwencję DNA, kodującą $\Delta 133p53\beta$ lub $\Delta 133p53\gamma$ [Bourdon *et al.* 2005]. Ponadto wykazano, że w komórkach ludzkich izoforma $\Delta 133p53\beta$ jest syntezowana, natomiast izoforma $\Delta 133p53\gamma$ dotychczas nie została scharakteryzowana w lizacie komórkowym, w związku z trudnością w wytworzeniu specyficznego przeciwciała. Jednak badania dotyczące tego białka były prowadzone w transfekowanej linii komórkowej H1299 [Bourdon *et al.* 2005]. Izofoma $\Delta 133p53\beta$ została zlokalizowana zarówno w obrębie jądra komórkowego, jak i w cytoplazmie, na podstawie czego można sugerować, że lokalizacja komórkowa białka p53 jest zależna od obu końców białka, zarówno aminowego, jak i karboksylowego. Wykazano również, że w części komórek białko $\Delta 133p53\beta$ tworzy skupiska, tzw. *foci* [Bourdon *et al.* 2005]. W przypadku białka $\Delta 133p53\gamma$ wykazano, że znajduje się ono jedynie w cytoplazmie. Na podstawie tej obserwacji sugerowano, że lokalizacja komórkowa może być regulowana przez odcinek znajdujący się w obrębie alternatywnego końca C [Bourdon *et al.* 2005]. Podobnie jak w przypadku p53 β , po wywołaniu stresu komórkowego spowodowanego zastosowaniem inhibitora transkrypcji, poziom białka $\Delta 133p53\beta$ w liniach komórkowych MCF7 i U2OS nie zwiększył się. Jak dotąd obecności mRNA kodującego białko $\Delta 133p53\beta$ i $\Delta 133p53\gamma$ nie wykazano ani w materiale pochodzącym od pacjentów cierpiących na raka piersi, ani w materiale kontrolnym, pobranym od pacjentów zdrowych [Bourdon *et al.* 2005].

Izofomę $\Delta 160p53$ opisano w 2010 roku [Marcel *et al.* 2010]. Podczas prac nad mRNA rozpoczynającym się z miejsca promotorowego P2 zauważono, że prawdopodobnie na matrycy tego transkryptu mogą być syntezowane dwa białka. Transkrypt P2, oprócz kodonu inicjacyjnego dla izoformy $\Delta 133p53$, w eksonie piątym zawiera jeszcze jeden kodon AUG (AUG4, rys. 5), z którego może być syntezowana izoforma $\Delta 160p53$. Kodon ten jest zlokalizowany w otwartej ramce odczytu, w obrębie optymalnej sekwencji 'Kozak' [Marcel *et al.* 2010]. Potwierdzenie syntezy izoformy $\Delta 160p53$ z mRNA P2 uzyskano poprzez zamianę kodonu AUG4 na kodon leucynowy, co uniemożliwiło detekcję białka $\Delta 160p53$ [Marcel *et al.* 2010]. Dzięki transfekcji linii komórkowej H1299, pozbawionej endogennego p53, wektorami kodującymi izoformy, odpowiednio: $\Delta 160p53\alpha$ lub $\Delta 160p53\beta$ wykazano syntezę obu izoform w komórce. $\Delta 160p53\alpha$ zlokalizowane jest głównie na obrzeżach jądra komórkowego, natomiast $\Delta 160p53\beta$ w niektórych komórkach tworzy skupiska, tzw. *foci*. Biorąc pod uwagę fakt, że w przypadku izoformy $\Delta 133p53\beta$ również obserwowane są podobne skupiska sugeruje się, że za ich tworzenie odpowiedzialny jest peptyd kodujący

izofর্মę β [Marcel *et al.* 2010]. Poziom białka $\Delta 160p53\beta$ może być regulowany podczas procesu różnicowania komórek przy zastosowaniu heminy [Marcel *et al.* 2010].

Dotychczas nie wykazano syntezy izoformy $\Delta 160p53\gamma$, jednak sugeruje się jej występowanie na podstawie detekcji analogicznych izoform białka p53, zawierających wydłużoną sekwencję aminokwasową z końca aminowego (np. $\Delta 133p53$) [Marcel *et al.* 2010].

Ostatnią zidentyfikowaną dotychczas izofর্মą białka p53 jest p53 ψ . Białko to po raz pierwszy opisano w 2014 roku. Syntetyzowane jest ono na matrycy mRNA powstającej w wyniku opisanego powyżej alternatywnego splicingu intronu szóstego. W związku z występowaniem w sekwencji nukleotydowej mRNA przedwczesnego kodonu terminacyjnego, izoforma p53 ψ jest skrócona z końca karboksylowego w stosunku do białka p53 pełnej długości: pozbawiona jest części białka niezbędnej do wiązania sekwencji DNA oraz domeny oligomeryzacyjnej [Senturk *et al.* 2014]. Udowodniono, że w związku z brakiem sekwencji wiążącej DNA, izoforma p53 ψ nie wykazuje aktywności transkrypcyjnej. Może ona prowadzić do hamowania ekspresji genów regulowanych przez białko p53 pełnej długości oraz do nabycia przez komórkę cech komórek mezenchymalnych [Senturk *et al.* 2014]. W warunkach fizjologicznych izoforma p53 ψ zlokalizowana jest głównie w cytoplazmie [Senturk *et al.* 2014]. Schematyczne zestawienie wszystkich opisanych powyżej izoform ludzkiego białka p53 przedstawiono na rysunku 9.

2.9. Białka i RNA oddziałujące z regionem niekodującym 5' mRNA p53

W komórkach ludzkich scharakteryzowano dotychczas więcej czynników oddziałujących z regionem niekodującym 5' mRNA p53 niż w przypadku myszy, z czego dużą część stanowią białka o aktywności ITAF. Wszystkie opisane czynniki w istotny sposób wpływają na funkcjonowanie mRNA kodującego białko p53 (tabela 3).

Białkiem, które zostało scharakteryzowane jako ITAF jest białko PTB (ang. *polypyrimidine tract-binding protein*), wiążące ciągi polipirymidynowe, zwane również hnRNP1. Wykazano, że wyciszenie białka PTB skutkowało obniżeniem aktywności elementu IRES. Ponadto, po zastosowaniu doksorubicyny, czynnika wywołującego stres genotoksyczny, zauważono translokację PTB z jądra do cytoplazmy, co powiązано ze zwiększoną syntezą izoform białka p53 [Grover *et al.* 2008]. Wykazano, że występujący naturalnie w regionie 5'UTR mRNA p53 polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP, ang.

single nucleotide polymorphism) C119T powoduje spadek wiązania PTB do mRNA, powodując jednocześnie spadek aktywności IRES [Khan *et al.* 2013].

Tabela 3. Czynniki wiążące się do regionu niekodującego 5' mRNA p53.

Czynnik	Funkcja	Referencja
PTB (hnRNP1)	ITAF. Wzmacnia translację mRNA p53. W stresie genotoksycznym ulega translokacji z jądra do cytoplazmy, prawdopodobnie umożliwiając zwiększoną syntezę p53.	Khan <i>et al.</i> 2013
TCP80 (NF90)	ITAF. Wzmacnia translację mRNA p53. W warunkach stresowych wiąże się z RHA, nadekspresja obu białek zwiększa syntezę p53.	Halaby <i>et al.</i> 2015
RHA	W warunkach stresowych wiąże się z TCP80, nadekspresja obu białek zwiększa syntezę p53.	Halaby <i>et al.</i> 2015
Pdcd4	ITAF. Hamuje translację mRNA p53. Wiąże się z eIF4A, wpływając na zahamowanie translacji.	Wedeken <i>et al.</i> 2011
Ku	ITAF. Hamuje translację mRNA p53.	Lamaa <i>et al.</i> 2016
RMB38 (HNPC1)	ITAF. Hamuje translację mRNA p53. Wiąże się z eIF4E, wpływając na zahamowanie translacji.	Zhang <i>et al.</i> 2011
PSF (PSFQ)	Wpływa na syntezę p53 oraz $\Delta 40p53$.	Sharathchandra <i>et al.</i> 2012
Anneksyna A2	Wpływa na syntezę p53 oraz $\Delta 40p53$.	Sharathchandra <i>et al.</i> 2012
DAP5 (p97, NAT1)	ITAF. Wzmacnia translację mRNA p53.	Weingarten-Gabbay <i>et al.</i> 2014
RPL26	Wzmacnia translację w odpowiedzi na uszkodzenie DNA.	Takagi <i>et al.</i> 2005
Nukleolina	Hamuje translację mRNA p53. W warunkach stresowych wzmacnia translację mRNA p53.	Takagi <i>et al.</i> 2005
p53	Hamuje translację mRNA p53.	Mosner <i>et al.</i> 1995
Wrap53	Reguluje poziom mRNA p53 w komórce.	Mahmoudi <i>et al.</i> 2009

Białko TCP80 (NF90) kontrolujące translację (ang. *Translation Control Protein 80*) również pełni funkcję ITAF. Wykazano, że oddziałuje z regionem niekodującym 5' mRNA p53 *in vivo* po zastosowaniu stresu genotoksycznego, a jego nadekspresja powoduje wzrost aktywności elementów IRES w odpowiedzi na uszkodzenie RNA. Ponadto, w warunkach

stresowych TCP80 wiąże się z helikazą RNA A, RHA (ang. *RNA helicase A*), a nadekspresja obu białek, TCP80 i RHA, prowadzi do zwiększonej ekspresji p53 [Halaby *et al.* 2015].

Następnym scharakteryzowanym białkiem jest białko programowanej śmierci komórki Pdc4 (ang. *Programmed cell death protein 4*), które wiążąc się do mRNA p53 hamuje syntezę białka p53, utrzymując tym samym jego niski poziom w komórce. Wykazano również, że na obserwowany efekt obniżenia efektywności syntezy wpływa także wiązanie Pdc4 z eukariotycznym czynnikiem inicjacyjnym 4A eIF4A (ang. *eukaryotic initiation factor-4A*) [Wedeken *et al.* 2011].

Białko Ku scharakteryzowano jako białko oddziałujące z elementem strukturalnym typu spinki do włosów zlokalizowanym w regionie niekodującym 5' mRNA p53. Białko Ku ma wpływ na utrzymanie białka p53 na niskim poziomie w komórce. Hamowanie syntezy p53 przez białko Ku ulega zaburzeniu po zastosowaniu stresu genotoksycznego, co jest spowodowane acylacją białka Ku i zaburzeniem oddziaływania Ku z mRNA p53 [Lamaa *et al.* 2016].

Również białko wiążące RNA RMB38 (HNPC1) (ang. *RNA binding motif*) opisano jako regulujące translację mRNA p53 poprzez wiązanie m. in. do regionu 5'UTR. Jego działanie polega na hamowaniu syntezy białka p53 poprzez bezpośrednie oddziaływanie z czynnikiem eIF4E, uniemożliwiające wiązanie tego czynnika do mRNA [Zhang *et al.* 2011]. Fosforylacja seryny 195 białka RBM38 blokuje oddziaływanie z mRNA p53, co prowadzi do aktywacji translacji [Zhang *et al.* 2013].

Dwa kolejne białka funkcjonujące jako ITAF to aneksyna A2 (ang. *Annexin A2*) i czynnik splicingowy wiążący PTB, PSF lub PSFQ (ang. *PTB associated Splicing Factor*). Oba białka mają wpływ na regulację syntezy zarówno p53 pełnej długości, jak i jego skróconej izoformy $\Delta 40p53$. Wykazano, że białka te mogą się wiązać do mRNA p53 w więcej niż jednym miejscu, m. in. w okolicy kodonów inicjacyjnych AUG1 oraz AUG2. Przypuszcza się, że białka te mogą brać udział w wiązaniu podjednostki rybosomu 40S lub stabilizować kompleks podczas wewnętrznej inicjacji. Ponadto wykazano, że białka te wiążą się do mRNA w tych samych miejscach, można więc domniemywać że mogą być one wykorzystywane oddzielnie w różnych warunkach stresowych [Sharathchandra *et al.* 2012].

Białko DAP5, nazywane również p97 lub NAT1, opisano jako czynnik promujący translację mRNA zawierających elementy IRES. Wykazano oddziaływanie DAP5 z IRES zlokalizowanym w mRNA p53 i udowodniono, że wyciszenie DAP5 prowadzi do obniżenia syntezy p53 oraz izoformy $\Delta 40p53$ [Weingarten-Gabbay *et al.* 2014].

Kolejnym białkiem, które opisano jako oddziałujące z regionem 5'UTR mRNA p53 jest rybosomalne białko L26 (RPL26, ang. *ribosomal protein L26*), opisane w rozdziale charakteryzującym czynniki oddziałujące z regionem niekodującym 5' mRNA p53 myszy.

Nukleolina (ang. *nucleolin*) również oddziałuje z regionem niekodującym 5' mRNA p53. W warunkach normalnych białko to hamuje translację p53, utrzymując tym samym jego niski poziom w komórce. W warunkach stresowych nukleolina stymuluje syntezę p53 i konkuruje z białkiem RPL26 [Takagi *et al.* 2005, Harnikova *et al.* 2019].

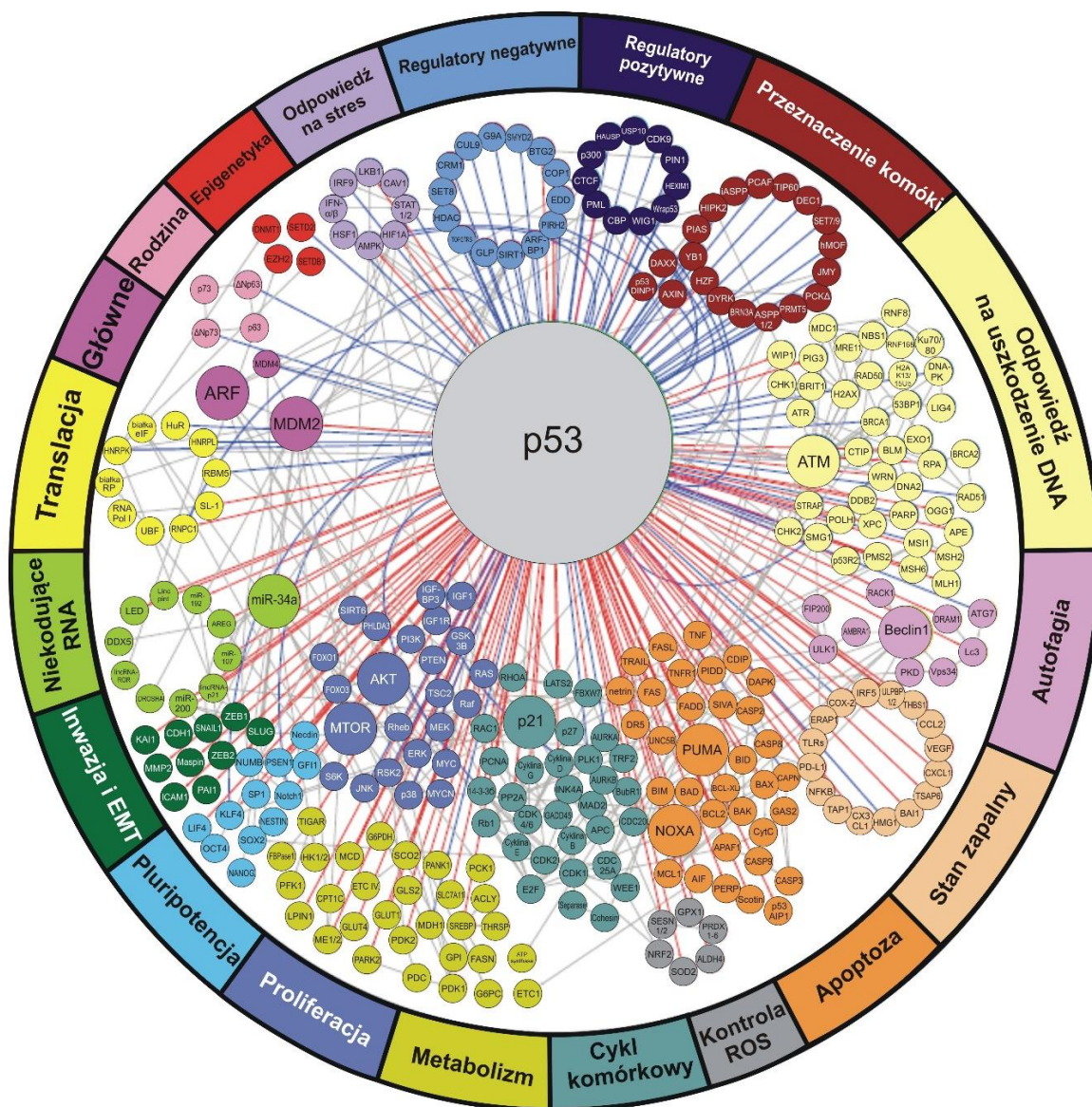
Należy również zaznaczyć, że białko p53 pełnej długości również może się wiązać do własnego mRNA, hamując jego translację [Mosner *et al.* 1995].

Przeprowadzono badania wykazujące, że nie tylko białka, ale również RNA może wiązać się do regionu terminalnego 5' mRNA p53, wpływając na jego translację. Takim RNA jest Wrap53, naturalny transkrypt antysensowy regulujący poziom mRNA p53, wykazujący się dużą zachowawczością ewolucyjną [Mahmoudi *et al.* 2009].

Zestawienie wszystkich opisanych czynników oddziałujących z regionem niekodującym 5' mRNA p53 zaprezentowano w tabeli 3.

2.10. Funkcja p53

Białko p53 bierze udział w regulacji licznych procesów komórkowych. Celem niniejszego rozdziału nie jest dokładne przedstawienie wszystkich funkcji p53, lecz jedynie nakreślenie ogólnego obrazu ilustrującego ważną rolę tego białka w procesach komórkowych (rys.10). Białko p53 w odpowiedzi na stres reguluje zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę DNA, apoptozę oraz starzenie. Są to tak zwane „klasyczne odpowiedzi p53” [Kaiser *et al.* 2018]. Odpowiedź p53 na stres jest elastyczna i zależy od wielu różnych czynników, takich jak rodzaj oraz stopień zróżnicowania komórek, warunki stresowe oraz sygnały docierające do komórki z otoczenia [Kasthuber *et al.* 2017]. Wykazano, że p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA hamuje proliferację poprzez przejściowe zahamowanie fazy G1 cyklu komórkowego. Zatrzymanie to może być spowodowane m. in. indukcją ekspresji genu *Cdkn1a*, kodującego inhibitor kinazy zależnej od cykliny p21 (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor p21*) [Kaiser *et al.* 2018; Lane, 1992; Kastan *et al.* 1991; Brugarolas *et al.* 1995].



Rys. 10. Koło obrazujące udział p53 w regulacji różnych procesów komórkowych, opisanych na obwodzie. W środku koła każdy punkt reprezentuje gen, każda linia przedstawia oddziaływanie. Niebieskimi liniami zaznaczono bezpośredni wpływ na p53, czerwonymi bezpośredni wynik działania p53. ROS – reaktywne formy tlenu, EMT – przejście epitelialno-mezenchymalne, główne – główne czynniki regulujące aktywność p53 [na podstawie: Kasthuber *et al.* 2017].

W czasie, w którym komórka znajduje się tymczasowo w zatrzymanej fazie G1 dochodzi do naprawy potencjalnie onkogennych mutacji [Kaiser *et al.* 2018; Biegging *et al.* 2014]. p53 może również stymulować naprawę DNA, odbywającą się na drodze wycinania uszkodzonych nukleotydów lub naprawy niepoprawnie sparowanych zasad. p53 wpływa na te procesy poprzez regulowanie genów kodujących białka uczestniczące w naprawie DNA [Kaiser *et al.* 2018]. W odpowiedzi na uszkodzenia oraz na sygnały świadczące

o hiperprolifracji p53 indukuje apoptozę poprzez aktywację genów takich jak *Bax*, *Puma* lub *Noxa* [Michalak *et al.* 2009; Fridman *et al.* 2003]. Dzięki apoptozie usuwane są komórki uszkodzone oraz nieprawidłowo proliferujące, co zapobiega nowotworzeniu [Kaiser *et al.* 2018].

Białko p53 jest również zaangażowane w regulację szeregu innych procesów, takich jak metabolizm, ferroptoza, metastaza i inwazja komórek nowotworowych czy funkcjonowanie komórek macierzystych. Regulacja metabolizmu przez p53 odbywa się poprzez wpływ na funkcjonowanie procesów takich jak aktywność antyoksydacyjna, stymulacja glukoneogenezy, zwiększony katabolizm glutaminy, zmniejszona synteza lipidów czy zwiększone utlenianie kwasów tłuszczowych [Kastenhuber *et al.* 2017; Kriuswijk *et al.* 2015]. Białko p53 ogranicza glikolizę oraz wzmacnia fosforylację oksydacyjną wykorzystując mechanizmy takie jak ograniczenie wychwytywania glukozy poprzez transaktywację genów modulujących aktywność kluczowych enzymów cyklu kwasów trkarboksylowych (TCA) oraz zahamowanie ekspresji *Glut1* [Kaiser *et al.* 2018].

Ferroptoza, proces regulowany przez p53, jest to śmierć komórkowa następująca w wyniku zależnej od żelaza akumulacji produktów peroksydacji lipidów [Yu *et al.* 2017]. Wykazano, że p53 reguluje ekspresję genów zaangażowanych w ferroptozę [Kaiser *et al.* 2018; Jennis *et al.* 2016; Ou, *et al.* 2016]. Ponadto, p53 hamuje transkrypcję *SLC7A11*, genu kodującego element transportera cystyny i glutaminy (ang. *cystine/glutamine transporter*). Zablockowanie działania transportera zmniejsza wychwytywanie cystyny, a w konsekwencji prowadzi do skierowania komórki na drogę ferroptozy [Kaiser *et al.* 2018; Jiang *et al.* 2015]. W całym procesie istotną rolę odgrywa lizyna 98 białka p53, czyli czwarte miejsce acetylacji tego białka. Udowodniono, że wprowadzenie mutacji w tym miejscu powoduje uwolnienie transkrypcji *SLC7A11*, a komórka nie zostaje skierowana na drogę ferroptozy [Kaiser *et al.* 2018; Wang *et al.* 2016].

Białko p53 hamuje inwazję komórek nowotworowych i metastazę [Kaiser *et al.* 2018; Muller *et al.* 2011]. Wykazano, że p53 ogranicza przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT, ang. *epithelial–mesenchymal transition*), proces, w którym komórki nabłonkowe tracą właściwości adhezyjne i nabywają cechy komórek mezenchymalnych, takie jak zwiększona mobilność, inwazyjność oraz zwiększona odporność na apoptozę [Kalluri *et al.* 2009]. p53 pośrednio wpływa na EMT przez indukcję ekspresji negatywnych regulatorów czynników transkrypcyjnych kluczowych w procesie przejścia epitelialno-mezenchymalnego [Kaiser *et al.* 2018; Kim *et al.* 2011; Chang *et al.* 2011; Wang *et al.* 2009].

Twierdzi się, że w trakcie rozwoju białko p53 sprzyja różnicowaniu komórek i przeciwdziała pluripotencji [Kaiser *et al.* 2018]. W następstwie uszkodzeń DNA dochodzi do indukcji różnicowania komórek poprzez bezpośrednią supresję transkrypcji *Nanog* [Kaiser *et al.* 2018; Lin *et al.* 2005]. p53 może również indukować transkrypcję mikro RNA *miR-34a*, tym samym regulując również w sposób pośredni ekspresję genu *Nanog* oraz innych genów odpowiedzialnych za pluripotencję [Kaiser *et al.* 2018; Choi *et al.* 2011]. Dodatkowo, liczne prace dowodzą, że p53 tłumi reprogramowanie komórek somatycznych do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych [Kaiser *et al.* 2018; Marion *et al.* 2009; Hanna *et al.* 2009; Utikal *et al.* 2009; Hong *et al.* 2009; Kawamura *et al.* 2009].

Białko p53 nie wpływa zazwyczaj jedynie na pojedynczy regulowany proces. Okazuje się, że aktywność p53 może jednocześnie zmieniać przebieg kilku na pozór niepowiązanych procesów. Na podstawie analizy genów docelowych p53 stwierdzono, że p53 bierze udział w regulacji autofagii oraz wpływa na kontrolę reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) [Kasthuber *et al.* 2017]. Wykazano, że kinaza ATM chroni komórki przed apoptozą regulowaną przez p53 poprzez zablokowanie autofagii, utrzymując tym samym ROS na niskim poziomie. Należy nadmienić, że w tym przypadku apoptoza nie jest regulowana przez geny docelowe dla p53 [Kasthuber *et al.* 2017; Sullivan *et al.* 2015]. Udowodniono również, że zmiany zachodzące w procesach metabolicznych pod wpływem p53 wpływają na apoptozę, ferroptozę oraz autofagię [Kasthuber *et al.* 2017; Gao *et al.* 2016]. p53 bierze udział w regulacji regeneracji i reorganizacji tkanek (ang. *tissue remodeling*). W początkowej fazie procesu dochodzi do aktywacji mitogenów, a aktywność p53 zostaje zahamowana, umożliwiając prawidłowy przebieg reorganizacji [Kasthuber *et al.* 2017, Charni *et al.* 2017].

Białko p53 może również modulować procesy zachodzące na wyższym poziomie niż komórkowy. Wpływa ono na odpowiedź immunologiczną, umożliwiając ekspresję genów zaangażowanych w rekrutację komórek układu odpornościowego, np. w raku wątroby białko p53 umożliwia transkrypcję cytokin wpływających na rekrutację makrofagów, neutrofilii oraz komórek NK (ang. *natural killer*) [Kaiser *et al.* 2018; Xue *et al.* 2007].

Gama procesów, w których białko p53 odgrywa istotną rolę nieustannie się powiększa. Stosunkowo nowymi i ciekawymi nurtami badań są prace wskazujące na udział p53 w odpowiedzi na infekcje wirusowe oraz ważną rolę w rybosomopatiach.

Różne etapy infekcji wirusowych są regulowane przez białko p53. Postuluje się, że wpływanie na aktywność p53 może stanowić terapię celowaną przeciw infekcjom wirusowym, np. poprzez aktywację p53 i indukcję apoptozy [Aloni-Grinstein *et al.* 2018]. Przykładem wstępnych badań nad wspomnianą terapią jest próba leczenia raka płaskonabłonkowego głowy i szyi powodowanego przez wirus HPV (HNSCC, ang. *HPV head and neck squamous cell carcinoma*) z wykorzystaniem 5-azacytydyny (5-aza, ang. *5-Azacytidine*). 5-azacytydyna wpływa na demetylację DNA, prowadząc m. in. do redukcji ekspresji genów wirusa HPV oraz do stabilizacji białka p53, które indukuje apoptozę [Aloni-Grinstein *et al.* 2018; Biktasova *et al.* 2017].

Rybosomopatie są to choroby spowodowane obniżoną syntezą lub mutacjami czynników niezbędnych do składania rybosomów [Farley-Barnes *et al.* 2019]. Zaobserwowano korelację pomiędzy nieprawidłowościami w funkcjonowaniu rybosomów a nowotworzeniem, jednak dotychczas nie poznano mechanizmu łączącego powyższe procesy [Sulima *et al.* 2019]. Białko p53 może odgrywać istotną rolę w rybosomopatiach poprzez wpływ na wiele mechanizmów regulujących funkcjonowanie komórki. Nieprawidłowe składanie rybosomu powoduje zwiększenie dostępności wolnych białek rybosomalnych, co z kolei może prowadzić do aktywacji p53, a następnie wzmożonej hypoproliferacji, przechodzącej do hiperproliferaacji, przez co pacjenci cierpiący na choroby spowodowane nieprawidłowościami w funkcjonowaniu rybosomów wykazują zwiększone ryzyko zachorowania na raka [Sulima *et al.* 2019]. Także dysfunkcja rybosomu może prowadzić do aktywacji p53: niektóre wolne białka rybosomalne, np. RPL5, może wiązać białko Mdm2, uniemożliwiając tym samym degradację p53 zależną od Mdm2, co prowadzi do indukcji aktywności p53 [Sulima *et al.* 2019; Bursac *et al.* 2012]. Przykładem rybosomopatii jest wrodzona dyskeratoza sprzężona z chromosomem X (DC, ang. *X-linked dyskeratosis congenita*), w której mutacja genu kodującego dyskerynę odpowiedzialną za pseudourydylację prowadzi do zahamowania IRES-zależnej translacji p53 [Sulima *et al.* 2019; Bellodi *et al.* 2010], zaburzając tym samym istotną rolę tego białka w komórce. Rola p53 w infekcjach wirusowych i rybosomopatiach jest nadal stosunkowo słabo poznana i wymaga dalszych badań.

3. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie kompleksowej analizy strukturalnej i funkcjonalnej regionu terminalnego 5' mRNA p53 myszy.

Badania postanowiono rozpocząć od określenia długości regionu niekodującego 5' mRNA p53 za pomocą reakcji 5' RACE.

W ramach analizy strukturalnej planowano określić strukturę zarówno drugorzędową, jak i trzeciorzędową regionu terminalnego 5' mRNA p53. Do tego celu zamierzano wykorzystać techniki mapowania biochemicznego, takie jak indukcja cięcia RNA w obecności jonów Pb^{2+} , SHAPE i modyfikacja siarczanem dimetylu, a także technikę małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego.

W trakcie analizy funkcjonalnej planowano uzyskać odpowiedź na dwa pytania dotyczące procesu inicjacji translacji:

- czy proces ten może zachodzić w sposób niezależny od struktury kapu, zlokalizowanej na końcu 5' mRNA p53, analogicznie do obserwacji poczynionych wcześniej dla ludzkiego mRNA p53,
- od którego z dwóch potencjalnych kodonów inicjacyjnych AUG, zlokalizowanych w odstępnie sześciu nukleotydów, rozpoczyna się synteza mysiego białka p53 pełnej długości.

Ponadto, interesujące wydawało się także sprawdzenie czy i w jaki sposób wywołanie stresów genotoksycznego i siateczki śródplazmatycznej może wpływać na funkcjonowanie białka p53 w komórce: czy poziom białka i mRNA będzie zaburzony, czy pozostanie bez zmian. Planowano także określić metodami przewidywania komputerowego, jakie białka potencjalnie mogłyby się wiązać do regionu terminalnego 5' mRNA p53 myszy.

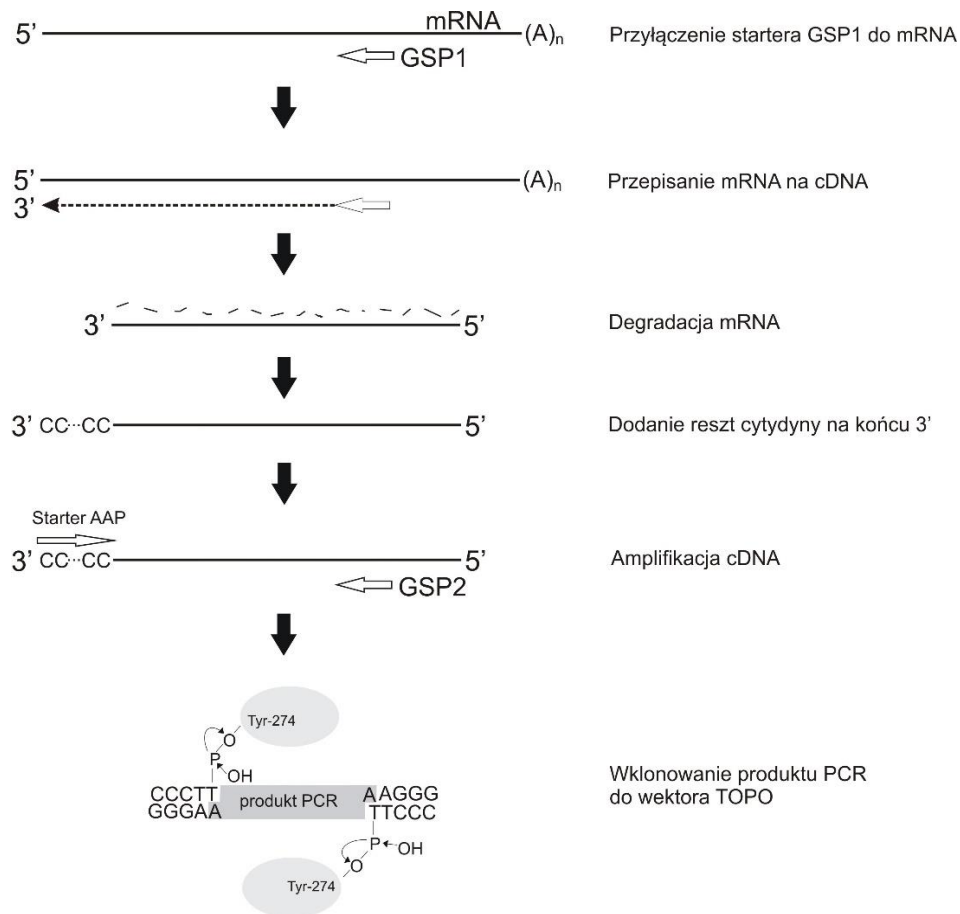
4. Wyniki i dyskusja

4.1. Identyfikacja długości i sekwencji nukleotydowej regionu niekodującego 5' mRNA p53

Region niekodujący 5' mRNA pełni istotną rolę regulatorową w procesie translacji [Świątkowska *et al.* 2019; Harnikova *et al.* 2019; Leppek *et al.* 2018; Takagi *et al.* 2005]. W komórkach ludzkich 5'UTR mRNA p53 jest odpowiedzialny za regulację syntezy białka w odpowiedzi na stres komórkowy, np. poprzez oddziaływanie z białkami takimi jak RPL26 lub nukleolina, jak również dzięki elementom IRES (ang. *internal ribosome entry site*) umożliwiającym translację niezależną od struktury kapu [Haronikova *et al.* 2019]. Pomimo istotnej funkcji, jaką przypisuje się temu odcinkowi transkryptu, w przypadku mysiego mRNA p53 długość regionu 5'UTR nie została dotychczas precyzyjnie określona. Na podstawie podjętej wcześniej próby charakterystyki tego regionu zaproponowano, że jego długość wynosi 216 nukleotydów, a na końcu 5' powstaje element strukturalny typu spinki do włosów. Nie mniej jednak, autorzy publikacji opisane przez siebie wyniki dotyczące długości regionu niekodującego 5' określają jako „nierozstrzygające” (ang. *inconclusive*) [Bienz *et al.* 1984].

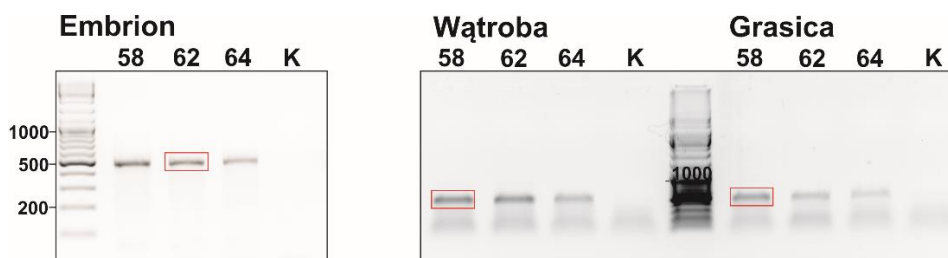
W związku z informacjami przedstawionymi powyżej, podjęto działania umożliwiające precyzyjne określenie długości regionu niekodującego 5' mRNA p53. W tym celu przeprowadzono reakcję szybkiej amplifikacji końców 5' mRNA (5'RACE, ang. *rapid amplification of cDNA ends*) (rys. 11). Jest to proces wieloetapowy: na matrycy mRNA syntetyzuje się komplementarny cDNA, przy użyciu odwrotnej transkryptazy i startera komplementarnego do sekwencji mRNA, którego określany jest koniec 5' (GSP1, ang. *gene-specific primer*). Następnie, oryginalny mRNA ulega degradacji, a nić cDNA zostaje wydłużona na końcu 3' przez terminalną deoksyrybonukleotydylotransferazę (TDT, ang. *terminal deoxynucleotidyl transferase*) o odcinek składający się z reszt cytydyny. W ostatnim etapie uzyskana matryca ulega amplifikacji przy wykorzystaniu startera komplementarnego do ciągu cytydyn, zawierającego w swojej sekwencji ciąg nukleotydów guanozyny i inozyny (AAP) oraz startera komplementarnego do sekwencji matrycy cDNA (GSP2), zlokalizowanego powyżej startera GSP1. Uzyskane produkty reakcji były wklonowane w wektor TOPO z systemu TOPO TA Cloning (Invitrogen), umożliwiającego bezpośrednią insercję produktu PCR do wektora, dzięki wydłużeniu zlinearyzowanego wektora o reszty nukleotydów tymidynowych na końcach 3' oraz dołączeniu topoizomerazy I do końców wektora. Otrzymane w ten sposób produkty reakcji zostały poddane

sekwencjonowaniu. Poszczególne etapy eksperymentu zostały schematycznie przedstawione na rys. 11.



Rys. 11. Schemat przedstawiający poszczególne etapy reakcji 5' RACE oraz wklonowanie produktu reakcji do wektora. Przygotowano na podstawie protokołu 5' RACE (5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0, Invitrogen) oraz protokołu TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen).

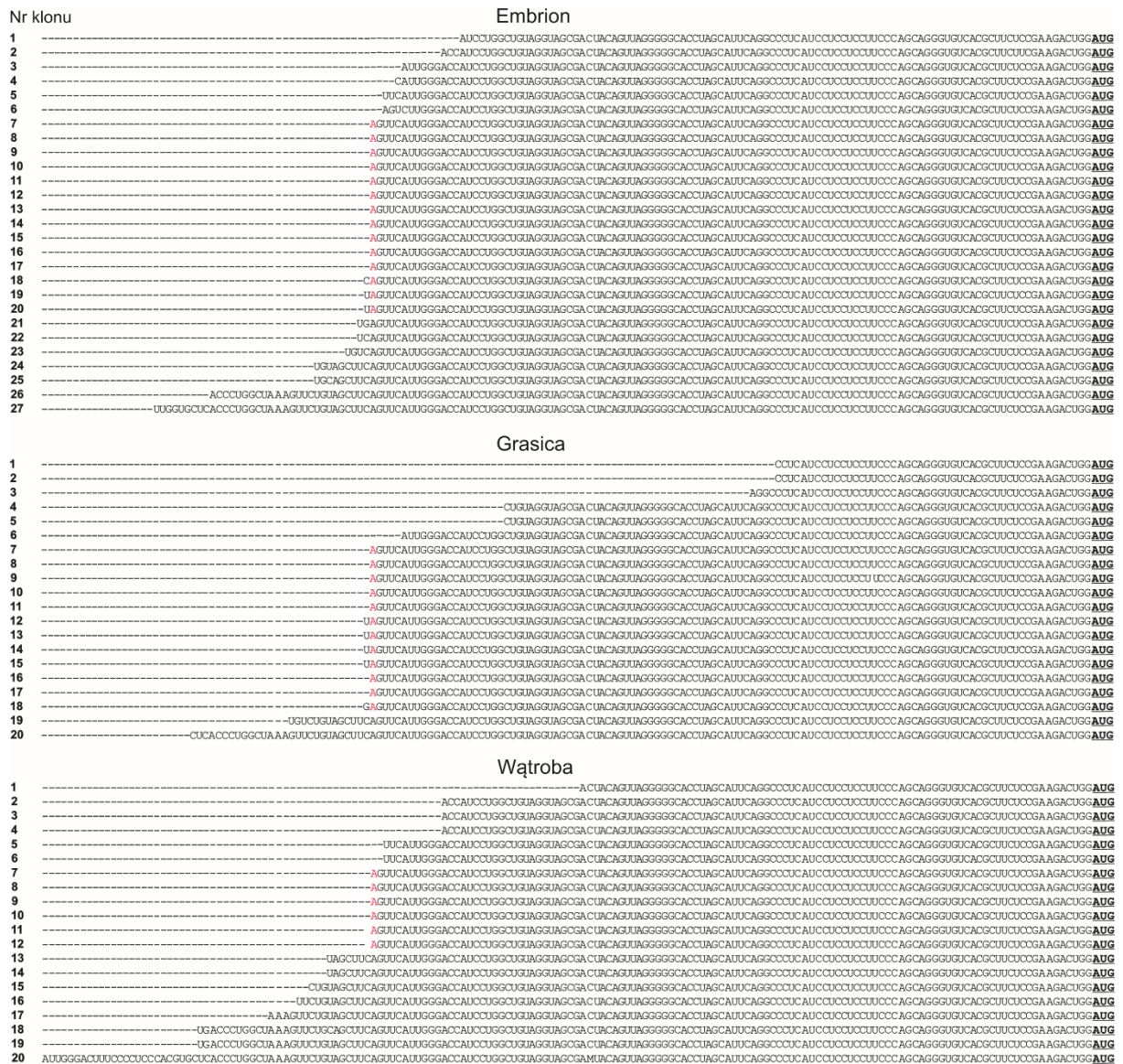
W reakcji 5'RACE wykorzystano materiał mRNA wyizolowany z trzech różnych źródeł: 11-dniowych embrionów myszy, mysiej wątroby oraz grasicy. Reakcję PCR dla każdej próbki przeprowadzono w trzech różnych warunkach temperaturowych: 58°C, 62°C oraz 64°C, celem uzyskania jak najbardziej jednorodnego produktu reakcji oraz wyeliminowania produktów niespecyficznych. Wyniki reakcji PCR przedstawiono na rys. 12. Do dalszych etapów, czyli wklonowania do wektora TOPO oraz sekwencjonowania, wybrano następujące produkty reakcji PCR: dla embrionu produkty uzyskane w 62°C, natomiast w przypadku wątroby i grasicy produkty PCR uzyskane w 58°C.



Rys. 12. Wyniki reakcji PCR przeprowadzonej w ramach eksperymentu 5'RACE. Reakcję prowadzono w trzech wybranych warunkach temperaturowych: 58°C, 62°C oraz 64°C. Czerwonym prostokątem zaznaczono produkty PCR wykorzystane w dalszych etapach eksperymentu. K oznacza reakcję kontrolną, w której wykorzystano otrzymany cDNA, przed dodaniem TDT.

Sekwencjonowaniu poddano 29 klonów zawierających inserty pochodzące z embrionów oraz po 20 klonów obejmujących inserty pochodzące z wątroby i grasicy. Na podstawie uzyskanych wyników można postulować, że mRNA p53 ma wiele miejsc inicjacji transkrypcji, co więcej, ich rozkład różni się zarówno pomiędzy tkankami, jak i w ich obrębie. Wyniki sekwencjonowania zaprezentowano na rysunku 13.

Przyjęto, że cząsteczki mRNA zostaną oznaczone w następujący sposób: pierwszy nukleotyd kodonu inicjacyjnego zostanie oznaczony jako 1, natomiast wszystkie nukleotydy w regionie niekodującym 5' oznaczone będą liczbami ujemnymi, o wartościach bezwzględnych rosnących w kierunku końca 5', a długość regionu 5'UTR stanowić będzie jednocześnie nazwę danego transkryptu.

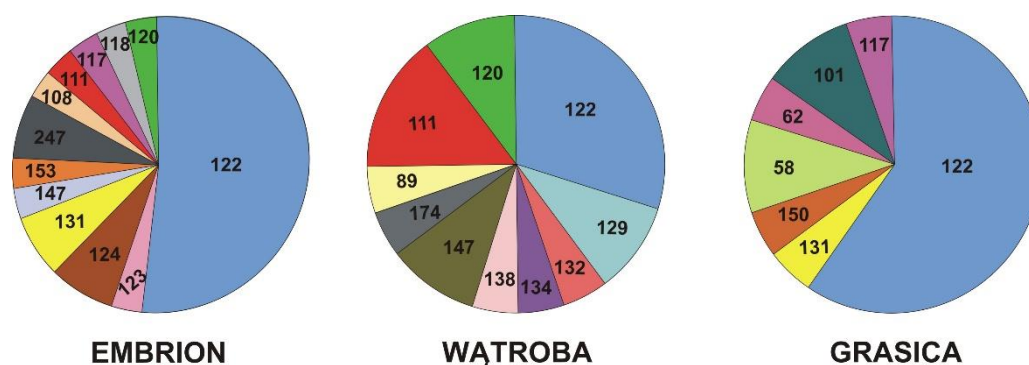


Rys. 13. Zestawienie sekwencji uzyskanych w wyniku reakcji 5'RACE. W eksperymencie wykorzystano mRNA pochodzący z trzech różnych źródeł: embrionu, grasicy i wątroby. W przypadku embrionu niewidoczne są dwie najdłuższe sekwencje. Kodon start został pogrubiony i podkreślony, kolorem czerwonym zaznaczono pierwszy nukleotyd najczęściej występującego transkryptu.

We wszystkich analizowanych tkankach najczęściej występuje transkrypt zawierający 122-nukleotydowy region niekodujący 5' (RNA najczęściej występujący, mRNA(-122)). Na zestawieniu sekwencji (rys. 13) pierwszy nukleotyd mRNA(-122) jest zaznaczony kolorem czerwonym. W niektórych przypadkach jest on poprzedzony innym nukleotydem, co uznano za artefakt wynikający z procedury eksperymentu. W trakcie amplifikacji cDNA wykorzystywano starter AAP, w którego sekwencji znajduje się deoksyinozyna (I). Deoksyinozyna jest to nukleozyd zawierający hipoksantynę, zasadę azotową mogącą wiązać

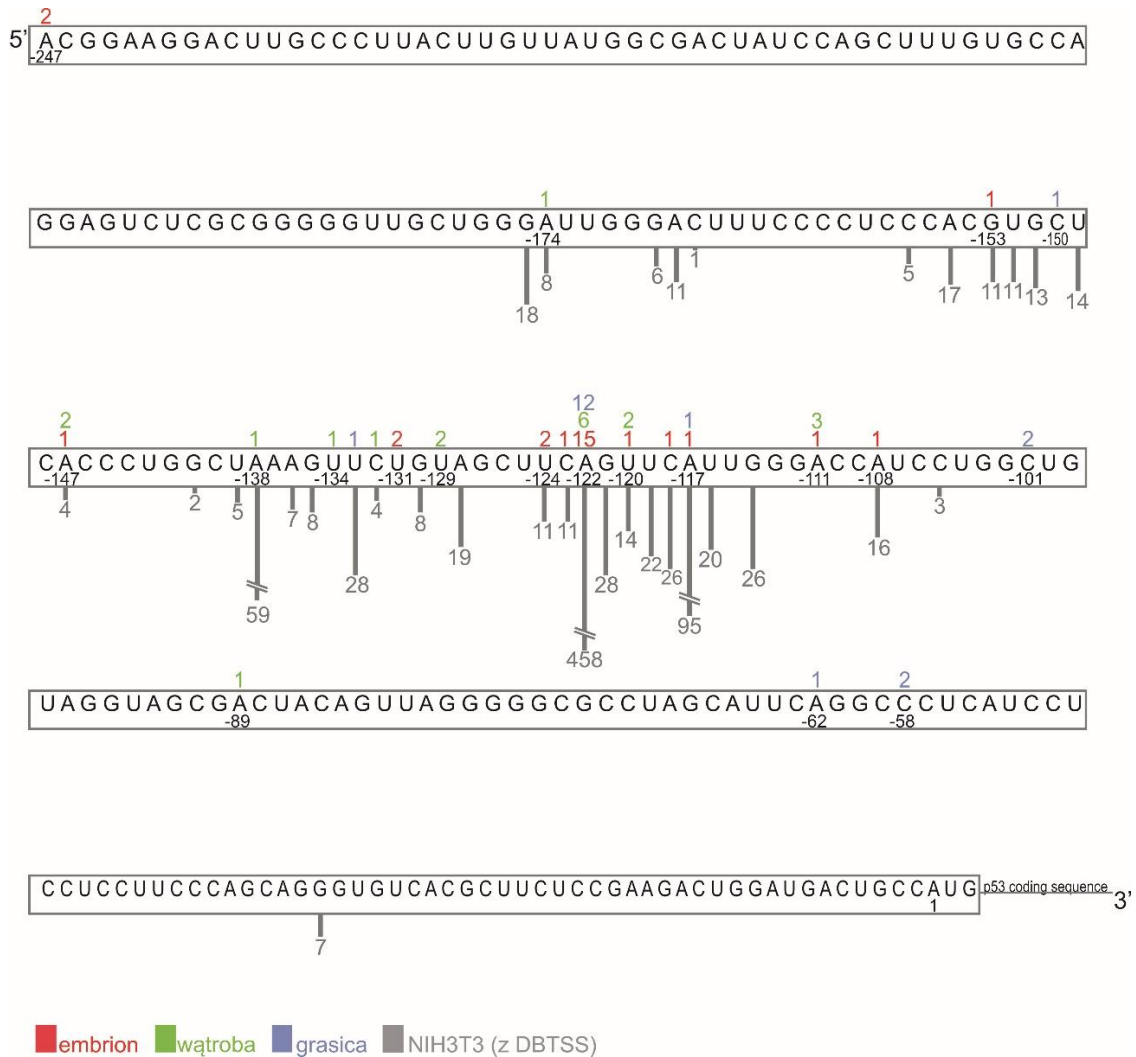
się z każdą z czterech podstawowych zasad azotowych [Martin *et al.* 1985]. Przypuszcza się, że w trakcie reakcji amplifikacji do deoksyinozyny mógł przyłączyć się nukleotyd inny niż oczekiwany guaninowy, co skutkuje wydłużeniem pojedynczych sekwencji o jeden nukleotyd, niekomplementarny do sekwencji mRNA p53.

Liczba transkryptów najczęściej występujących w przypadku embrionu stanowi ponad 50%, natomiast w wątrobie i grasicy wynosi odpowiednio 30% i 60% wszystkich zsekwencjonowanych transkryptów. Zauważono, że w grasicy częściej występują transkrypty krótsze od mRNA(-122), natomiast w wątrobie dominują mRNA zawierające 5'UTR dłuższy od 122-nukleotydowego regionu 5'UTR. Procentowe zestawienie mRNA zawierających różne długości regionu niekodującego 5' zostały przedstawione na rysunku 14, w formie wykresów kołowych.



Rys. 14. Rozkład procentowy długości regionów niekodujących 5' w mRNA p53 pochodzących z embrionu, wątroby i grasicy. Liczby określające nazwę transkryptu wskazują jednocześnie na długość regionu niekodującego 5' danego transkryptu.

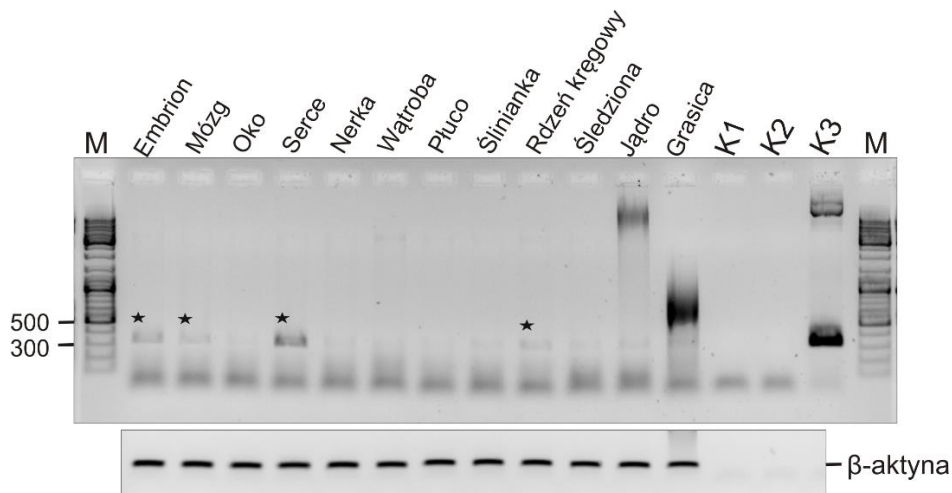
Uzyskane dane porównano z informacjami dostępnymi w bazie danych miejsc inicjacji transkrypcji (DBTSS, ang. *DataBase of Transcriptional Start Sites*), wersja 10.1, w której zdeponowane są dane uzyskane w wyniku głębokiego sekwencjonowania regionów terminalnych 5' mRNA zawierających strukturę kapu na końcu 5' [Yamashita *et al.* 2010] (rys. 15). Długości regionów niekodujących 5' transkryptów uzyskanych w eksperymencie 5'RACE zostały porównane do długości regionów scharakteryzowanych w linii komórkowej fibroblastów mysich NIH3T3. Wyniki eksperymentu 5'RACE są „mniej rozproszone” w porównaniu do informacji zawartych w bazie danych, co może wynikać ze znacznie mniejszej liczby analizowanych sekwencji niż w przypadku sekwencjonowania wysokoprzepustowego.



Rys. 15. Schematyczne przedstawienie wyników eksperymentu 5'RACE oraz ich porównanie z danymi z bazy danych miejsc inicjacji transkrypcji DBTSS. W ramce znajduje się sekwencja nukleotydomowa 5'UTR p53 myszy, numery ponad nią reprezentują wyniki 5'RACE i oznaczają liczbę zsekwencjonowanych klonów o danej długości. Poniżej sekwencji umieszczone zostały dane z sekwencjonowania wysokoporzepustowego mRNA, wyizolowanego z linii komórkowej fibroblastów mysich NIH3T3, zdeponowane w DBTSS. Numery pod słupkami obrazują liczbę odczytów dla każdej długości sekwencji. mRNA pochodzące z embrionu, wątroby, grasicy i NIH3T3 oznaczone zostały kolorami czerwonym, zielonym, fioletowym oraz szarym.

Większość danych uzyskanych w eksperymencie 5'RACE pokrywa się z informacjami zawartymi w bazie danych, choć dla części transkryptów nie znaleziono odpowiedników w DBTSS. Należy wziąć pod uwagę fakt, że dodanie odcinka sekwencji nukleotydomowej składającej się z ciągu guanozyn do mRNA skutkuje tym, że zidentyfikowanie mRNA p53, które zawierają reszty guanozyny na końcu 5' jest znacznie utrudnione. W związku z tym możliwe jest, że np. mRNA(-129) zidentyfikowany w 5'RACE jest odpowiednikiem transkryptu -130, a mRNA(-134) odpowiednikiem transkryptu -135.

Zidentyfikowano również mRNA, dla których nie znaleziono odpowiedników w DBTSS, np. najdłuższy zidentyfikowany transkrypt -247 oraz mRNA -101, -89, -62 oraz -58. Brak odpowiedników może być spowodowany tkankowo-specyficzną ekspresją powyższych mRNA. W związku z powyższym, postanowiono przeprowadzić analizę względnej ilości mRNA(-247) w wybranych narządach mysich. Do analizy wybrano najdłuższy zidentyfikowany transkrypt, ponieważ tylko w tym przypadku możliwa była amplifikacja konkretnego mRNA – jego koniec 5' jest unikalny i pozostałe transkrypty mRNA p53 nie zawierają tej sekwencji. Analizę przeprowadzono wykorzystując technikę RT-PCR (ang. *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) oraz cDNA zsyntetyzowany na matrycy RNA wyizolowanego z embrionu oraz jedenastu narządów myszy, a uzyskane wyniki zaprezentowano na rys. 16.



Rys. 16. Analiza względnej ilości mRNA p53 zawierającego 247-nukleotydowy region niekodujący 5' w embrionie i wybranych narządach mysich. Obecność transkryptu zaobserwowano w większości analizowanych przypadków, najwyższy poziom mRNA wykazano w sercu, embrionie, mózgu i rdzeniu kręgowym (oznaczono gwiazdkami). Przeprowadzono trzy reakcje kontrolne: K1 – negatywna kontrola reakcji syntezy cDNA, K2 – negatywna kontrola reakcji PCR, K3 – kontrola pozytywna, w której jako matrycę wykorzystano plazmid zawierający sekwencję transkryptu -247. Dodatkowe prążki, obserwowane w próbce wyizolowanej z jądra i grasicy, stanowią niespecyficzne produkty reakcji. β -aktynę wykorzystano jako zewnętrzną kontrolę ilości matrycy wykorzystywanej w reakcji.

Najwyższy poziom mRNA zaobserwowano w sercu oraz w embrionie, mózgu i rdzeniu kręgowym. W nerkach, wątrobie, płucach oraz grasicy mRNA(-247) znajduje się na bardzo niskim poziomie. Na podstawie zaprezentowanych powyżej danych można sugerować, że u osobników dorosłych transkrypt ten może pełnić istotną rolę w prawidłowym

funkcjonowaniu organów, których komórki nie ulegają namnażaniu, jednak weryfikacja tej hipotezy wymaga dalszych badań.

Porównując przedstawione przeze mnie dane z informacjami zawartymi w literaturze, w pierwszej kolejności należy zwrócić uwagę na rozbieżność w numeracji nukleotydów w obrębie regionów niekodujących 5'. Powodem tego jest występowanie w mRNA p53 dwóch potencjalnych kodonów inicjacyjnych w obrębie otwartej ramki odczytu, w odległości zaledwie sześciu nukleotydów. Dotychczas w literaturze pierwszy kodon AUG był uznawany za kodon start. Nie mniej jednak, po przeprowadzeniu analizy zachowawczości sekwencji mRNA p53 z 11 różnych gatunków ssaków (rys. 17), zauważono, że to drugi z potencjalnych kodonów inicjacyjnych jest zachowany w procesie ewolucji. Ponadto, w porównaniu do pozostałych analizowanych gatunków, u myszy występuje 20-nukleotydowa luka, która rozdziela nukleotydy wchodzące w skład pierwszego potencjalnego kodonu inicjacyjnego, co istotnie zmniejsza prawdopodobieństwo wyboru tego kodonu na miejsce startu syntezy mysiego białka p53 (więcej informacji na ten temat w rozdziale „4.6. Określenie miejsca inicjacji translacji białka p53 u myszy”). W związku z powyższym, w niniejszej pracy to drugi kodon AUG został uznany za inicjacyjny, co spowodowało 9-nukleotydowe przesunięcie w numeracji nukleotydów w mRNA w stosunku do numeracji dotychczas stosowanej w literaturze.

Na podstawie eksperymentów przeprowadzonych podczas wcześniejszej próby identyfikacji miejsca inicjacji transkrypcji mysiego p53 [Bienz *et al.* 1984], można sądzić, że transkrypcja może się rozpoczynać w trzech różnych miejscach: -112 (odpowiada transkryptowi -121 w niniejszej pracy), -156 (odpowiada transkryptowi -166 w niniejszej pracy) oraz -216 (odpowiada transkryptowi -225 w niniejszej pracy). Co więcej, w późniejszych pracach dotyczących mRNA p53 u myszy stosowano mRNA zawierający 157-nukleotydowy region niekodujący 5' [Kim *et al.* 2013] (odpowiednik transkryptu -167). Zestawiając powyższe informacje z uzyskanymi przeze mnie danymi, dotyczącymi regionu niekodującego 5' mRNA p53 można zaobserwować, że długość 5'UTR mRNA najczęściej występującego różni się jedynie o jeden nukleotyd w stosunku do opisanego wcześniej miejsca -112 (rys. 17). Miejsce -216 nie zostało zidentyfikowane w 5'RACE, nie mniej jednak jest to mRNA stosunkowo długi w porównaniu do pozostałych opisanych mRNA, podobnie jak transkrypt -247. Dla pozostałych dwóch potencjalnych długości regionu niekodującego 5', -156 i -157, sugerowanych przez Bienz *et al.* [1984] oraz Seo *et al.* [2017], nie zidentyfikowano odpowiedników ani w eksperymencie 5'RACE ani w bazie danych

DBTSS. Nie należy jednak wykluczać istnienia mRNA zawierających region niekodujący o tych długościach, a fakt, że nie zostały one zaobserwowane podczas analizy, mógłby wynikać z ich tkankowo-specyficznej ekspresji. Zestawiając dane przedstawione w niniejszej pracy dla modelu mysiego z informacjami opisanymi dotychczas dla człowieka można zauważyć, że również w tym przypadku scharakteryzowano wiele miejsc inicjacji transkrypcji [Tuck & Crawford, 1989].

W kolejnym kroku przeprowadzono analizę zachowawczości ewolucyjnej fragmentu 5' mRNA p53. W tym celu porównano sekwencję nukleotydową regionu terminalnego 5' najdłuższego zidentyfikowanego mysiego mRNA p53 z analogicznymi sekwencjami nukleotydowymi pochodzącymi z dziesięciu gatunków ssaków: człowieka, szczura, królika, świni, świnki morskiej, krowy, szympansa, kota, owcy oraz makaka (rys. 17). W przypadku, gdy w bazie danych GeneBank sekwencja mRNA analizowanego gatunku ssaka była krótsza niż mRNA(-247), uzupełniano ją sekwencją nukleotydową genu w kierunku 5'. Takie podejście pozwala na określenie stopnia zachowawczości całego regionu terminalnego 5' mRNA(-247), tym bardziej, że nie można wykluczyć występowania homologicznych transkryptów w pozostałych analizowanych gatunkach. Na zaprezentowanym zestawieniu wyraźnie wyodrębnione zostały dwa obszerne regiony charakteryzujące się wysoką, prawie stuprocentową, zachowawczością ewolucyjną: region terminalny 5' od nukleotydu -238 do -126, odpowiadający w dużej części regionowi specyficznemu dla mRNA(-247) oraz region od nukleotydu 20 do 80, który może wskazywać na istotną rolę tego odcinka w prawidłowym funkcjonowaniu mRNA p53. Ponadto, na zestawieniu sekwencji strzałkami zaznaczono miejsca inicjacji transkrypcji najczęściej występujących ludzkich mRNA p53: transkrybowanego z miejsca P1 oznaczonego jako h(P1) oraz z miejsca P0, oznaczonego jako h(P0), a także najczęściej występującego oraz najdłuższego zidentyfikowanego mysiego mRNA p53. Na podstawie tego porównania można zauważyć, że długość najczęściej analizowanego ludzkiego mRNA, h(P1), różni się jedynie o jeden nukleotyd w stosunku do najczęściej występującego, 122-nukleotydowego mRNA mysiego p53. Najdłuższy transkrypt zidentyfikowany w eksperymencie 5'RACE może odpowiadać ludzkiemu mRNA transkrybowanemu z miejsca promotorowego P0. Biorąc pod uwagę podobieństwo długości regionów niekodujących 5' mRNA p53, występujących w komórkach ludzkich i mysich, można przypuszczać, że poszczególne transkrypty pełnią bardzo zbliżone funkcje w komórkach obu organizmów.

Na podstawie przeprowadzonego porównania stwierdzono, że mysi mRNA(-122), czyli najczęściej występujący, oraz mRNA(-247), czyli najdłuższy zidentyfikowany

transkrypt, stanowią najbardziej interesujące obiekty badań. W związku z tym do dalszych, bardziej szczegółowych badań wybrano te dwa transkrypty mRNA.

m **h(P0)** **m**

-240 -220 -200 -180 -160 -140

Mysz
 Człowiek
 Szczur
 Królik
 Świnia
 Świnia_morska
 Krowa
 Szympans

```

ACGGAAGGACUUGCCUUACUU-GUUAUGGGGACUAUCAGCUUUGUGCCAGGAGUCUCGCGGGGGUUGCUGGGAUUGGGACUUUCCCUCCCAUGUGCUC-AACCUG--GCUAAAUCUGUAGCUUCA-----
ggcggattacttgcccttacttGGUUAUGGGGACUUCAGCUUUGUGCCAGGAGCCUCGCGAGGGUUGAUGGGAUUGGGUUAUCCCUCCCAUGUGCUCUAGACUGGCCUUAAGUUUGAGCUUCUCAAAA
acagaatgacttgcccttactt-gttatggcgactatccagctttgtgcaggagttctcgcggggtctgtgggattgggttttccctcccacgtgctc-acactg--gctaaagtUCUGAGCUCCA-----
ggcgaatgacttgcccttactt-gtcatggcgactgtc-----caggagctctcgcggggtctgtgggattgggttttccctcccacgtgctc-ggactggcgctaaaagttttgagcctcctcaaaa
agggtaatgtcttgcccttactt-gtcatggcgag-----tttgtgcaggagttctcgcgatgtgtctgtgggattgggttttccctcccacgtgctc-ggactggcgctaaaagttttgagcctcctcaaaa
GUUAUGGGGACUUCAGCUUUGUGCCAGGAGCCUCGCGAGGGUUGAUGGGAUUGGGUUAUCCCUCCCAUGUGCUCUAGACUGGCCUUAAGUUUGAGCUUCUCAAAA
aggggaattgcttgcccttactt-gtcatggcgactgtccagctttgtgcaggagctctcgcgagggttctgtgggattgggttttccctcccacgtgctcggactggcgctaaaagttttgagccttCUAAA
agggcgattacttgcccttactt-gtcatggcgactgtccagctttgtgcaggagctctcgagggttGAUGGGAUUGGGUUAUCCCUCCCAUGUGCUCUAGACUGGCCUUAAGUUUGAGCUUCUCAAAA
  
```

h(P1)

-120 -100 -80 -60 -40 -20

Mysz
 Człowiek
 Szczur
 Królik
 Świnia
 Świnia_morska
 Krowa
 Szympans
 Kot
 Owca
 Makak

```

GUUCAUGGGAC-CAUCCUGGUCUAGGUAAGGACUACAGUUAAGGGGCACCUAGCAUUCAGGCCUUCUUCUCCUCCUUCUCCAGCAGGGUUCACGCUUCUCCGAGACUGGA-----UGAC
GUUCAAGAGCCAC-CGUCCAGGAGCAGGUAGCUCUGGGUCUCCGGGGACACUUUGCGUUCGGGUCUGGAGCG---UGCUUCCACGACGGUGACACGCUUCCUG--GAUUGGC-AGCCAGACUGCCUUCGGGUCAC
GUUCAUGGGACUUUCCUUGCUAUAGGUAGCGACUACAGUUAAGGGGUACUCCUGGCAUCCGGGCCCGCCACCC---UAUUCUCCAGCAGGGUGUCACGCUCCUCCUAGAGCUGGA-----UAAC
tgGGCAGGAGAC-CGUCCGGGAAGCAGGUAGCGCGUGGCGUCUCCGGGGGCACCUAGCGUCCGUGGCCGGAGCG---UGCGCCCGGGGGCGUACACGCUUCUCCUAGGACUGGC-G---A-----CCCGGCCG
GUCCAAGGGCCAC-CAUCCUGGCGCAGGUAGCUCUGGGUCUCCGGGGUACCCUGACGUCUCCGUCUC-GAGCG---UGCAUCCAGGACAGUACACGCUUCUCCUAGCUCUGGC-GGCCACACUCCUUCAGGAGC
GUCCAAGGGCCAC-CAUCCUGAGCACAGGUAGCUCUGGGUCUCCGGGGUACCUUGCGUCCGGGCUUGGAGUG---UCCUCC---AAGACACGCUCCUUGAGAACAGC-AGCUG-----UCCUGCUCG
GUCCAAGAGCCAC-CAUCCUGGCGCAGGUAGCGCGUGGUCUCCGGGGUCAUUAAGCGUCCGACUCCGGAGCG---UGCAUCCAGGACGGUGACACCCUCCUCCUAGCUCUGGC-GGCCACACACUCCUUCAGGAGC
GUUCAAGAGCCAC-CGUCCAGGAGCAGGUAGCUCUGGGUCUCCGGGGACACUUUGCGUUCGGGUCUGGAGCG---UGCUUCCACGACGGUGACACGCUUCCUG--GAUUGGC-AGCCAGACUGCCUUCGGGUCAC
G-CGGCCGCGCCAGGUAGCUCUGGGUCUCCGGGGUCCUUGCGGUCUCCGGGUCUGGAGCG---UGCUUCCAGGACGGUGACACGCUCCUCCUAGGUUCGGC-GGCCGACUUGCCUCCAGGGGC
G-CAUCCUGGCGCAG-UGGCGGUGGUCUCCGGGGUCAUUAAGCGUCCGACUCCGGAGCG---UGCAUCCAGGACGGUGACACCCUCCUCCUAGCUCUGGC-CGGCCACACACUCCUUCAGGAGC
GGACACUUGCGGUCUGGAGCG---UGCUUCCAGGACGGUGACACGCUUCCUAGGAAUGGC-AGCCAGACUGCCUUCAGGGUAC
  
```

1 20 40 60 80 100

Mysz
 Człowiek
 Szczur
 Królik
 Świnia
 Świnia_morska
 Krowa
 Szympans
 Kot
 Owca
 Makak

```

UGCCAUGGAGGAGUACAGUCGGAUAUCAGCCUCGAGUCUCCUCGAGCCAGGAGACAUUUUCAGGUUAUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGAUUUCUGCC-----AUCACCUACUGCAUGGACGA
UGCCAUGGAGGAGCCGAGUCAGAUCUAGCCUCCUGAGCCUCCUCUGAGUCAGGAAACAUUUUCAGACCUAUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGAUUUCUGCCUCCUUGCCGUC-----C---CAAACAUGGAUGA
UGUCAUGGAGGAAUACAGUCGGAUAUAGGACUCGAGUCUCCUUCGAGUCAGGAGACAUUUUCAGUUAUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGAUUUCUGCCACACAGCGAAGGAGGUCACCUAAUUCUUGGAAGA
CGCCAUGGAGGAGUCGAGUCGGAUCUAGCCUCCUGAGUCAGGAGACUUUUCAGACCUUGGAAACUGCUUCCUCCAGAGACAACCCUGGACCAUCCUGAGAA-----C---CCUCCGUGGAUGA
UGCAAUGGAGGAGUCGAGUCGAGUCGUGGGGUGGAGCCUCCUUGAGUCAGGAGACAUUUUCAGACUUGGAAACUGCUUCCUCCAGAGACAACCCUGGUCUCCUUGAGCUCUC-----CCUGGAGCAGGAGAACGA
CGCUAUGGAGGAGCCACAUCGGACCCUAGCUCGAGCCUCCACUGAGUCAAGAACAUUUUCAGACUUAUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGACAACCCUUCUGUCGGAUCAUUGUC-----C---CCUCCUAGGACCA
UACAAUGGAAGAUAACAGGAGAGAAUCUUAUGGAGCCUCCUUGAGUCAGGAGACAUUUUCGACUUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGACAACCUUUCUGUCUCCGAGCUCUC-----GCACCCGUGGAUGA
UGCCAUGGAGGAGCCGAGUCAGAUCUAGCCUCCUGAGCCUCCUUGAGUCAGGAAACAUUUUCAGACCUAUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGACAACCCUUCUGUCUCCUUGCCAU-----C---CAAGCAUGGAUGA
CACAAUGCAGGAGCCGCUUGGAAUCUACCAUCGAGCCUCCUUGAGCCAGGAGACAUUUUCGAAUUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGACAACCUUUCUGUCUCCGAAUUGUC-----C---UCAGGAGUAGAUGA
UACAAUGGAAGAUAUCGAGAGAGAAUCUGGUGGAGCCUCCUUGAGUCAGGAGACAUUUUCGACUUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGACAACCUUUCUGUCUCCGAGCUCUC-----GCACCCGUGGAUGA
UGCCAUGGAGGAGCCGAGUCAGAUCUAGCUCGAGCCUCCUUGAGUCAGGAAACAUUUUCAGACCUAUGGAAACUAUUCUCCUCCAGAGACAACCCUUCUGUCUCCUUGCCGUC-----C---CAAACAUGGAUGA
  
```

AUG1

AUG2

120 140 160

Mysz
 Człowiek
 Szczur
 Królik
 Świnia
 Świnia_morska
 Krowa
 Szympans
 Kot
 Owca
 Makak

```

UCUGUUGCUGCCAG---GAUGUAGGAGUUAUUU---GAAGG-----CCCAAGUGAAGCCUCCGA
UUUGAUGCUGUCCCGGACGAUAUUGAACAAUGGUUACUGAAGACCCAGGUCCAGAUGAAGCUCUCCAGA
UCUGUUCUGCCAG---GAUGUAGCAGAGUUA---GAAGG-----CCCAGAGGAGCCUCCAA
U---CUGCUGUCUGAGAGACGUAUGCAAAUCGGCUAACGAAGA---CCCAGAGAGAGGGUCCGA
UCUGCUGCUGUCCAG---UCCAGAACUGGUGGAUAGAAA-----UCCAGAUAGCUCUCCAGA
UCUUCUGCUGUCCAGAGAGGUUGCAAGCUGGUGGGAGAAAA-----CCCAGUAGGAGUAGGCCAU
CCUGCUCUCCGUAACA---GAUGUUGCCACCUCCUGGUGGAUAGAAUG-----UCCGAUAAGCGCCCAA
UUUGAUGCUGUCCCGGACGAUAUUGAACAAUGGUUACUGAAGACCCAGGUCCAGAUGAAGCUCUCCAGA
GCUGCCG---CUUCGGGAAGUUCGCAAAUCUGGUGGAUAGGC-----ACCAGAUAGUUCUCCGGA
CCUGCUCUCCGUAACUAGAAGAUGUUGUACACCUCCUGGUGGAUAGAGUG-----UCCGAUAAGCGCCCAA
UUUGAUGCUGUCCAGACGAUCUUGCAAAUGGUUAACUGAAGACCCAGGUCCAGAUGAAGCUCUCCAGA
  
```

Rys. 17. Zestawienie sekwencji nukleotydowej fragmentów mRNA p53 jedenastu wybranych gatunków ssaków. Duże litery oznaczają sekwencje mRNA (GeneBank), małe litery symbolizują sekwencje genu (Ensembl) regionu homologicznego do najdłuższego zidentyfikowanego mysiego transkryptu genu *p53*. Miejsce inicjacji transkrypcji ludzkich mRNA P1 i P0 zostały oznaczone odpowiednio jako h(P1) oraz h(P0), natomiast miejsce inicjacji transkrypcji mRNA(-122) oraz mRNA(-247) jako m. Kodony inicjacyjne AUG1 oraz AUG2 podkreślono. Porównanie sekwencji przeprowadzono w programie Clustal Omega w dwóch etapach: powyżej oraz poniżej miejsca inicjacji P1, a uzyskane porównania połączono. Poszczególne nukleotydy w porównywanych sekwencjach oznaczono kolorami w zależności od stopnia ich zachowawczości: czerwony: 100%, zielony 80%-99%, niebieski 60%-79%.

4.2. Analiza struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' transkryptów mRNA p53

Kolejnym celem mojej pracy było zaproponowanie modeli struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' wybranych mysich mRNA p53.

Do dalszej analizy wybrano: najczęściej występujący mRNA(-122) oraz najdłuższy zidentyfikowany transkrypt mRNA(-247). W rozdziale przedstawione zostaną również wyniki analiz struktur drugorzędowych trzech wybranych elementów strukturalnych typu spinki do włosów: C(-200):G(-102), C(-51):G9 i A89:U140, występujących oryginalnie w zaproponowanych modelach regionów terminalnych 5'. Dodatkowo, postanowiono zbadać strukturę drugorzędową regionu terminalnego 5' mRNA zawierającego 166-nukleotydowy region niekodujący 5'. Choć ten transkrypt mRNA nie został zidentyfikowany w wykonanej przeze mnie analizie 5'RACE, w dostępnej literaturze pojawia się fragment dyskusji dotyczący elementów strukturalnych występujących w 5'UTR o długości 166 nukleotydów [Seo *et al.* 2017].

4.2.1. mRNA(-122)

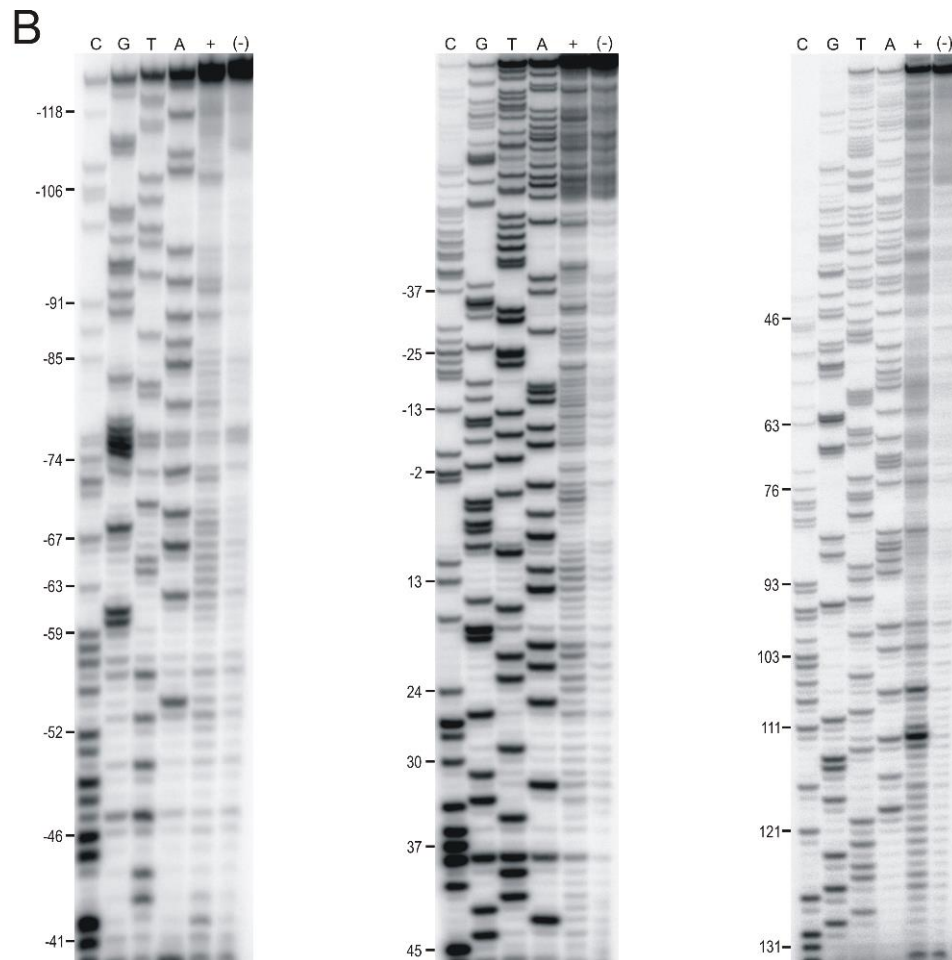
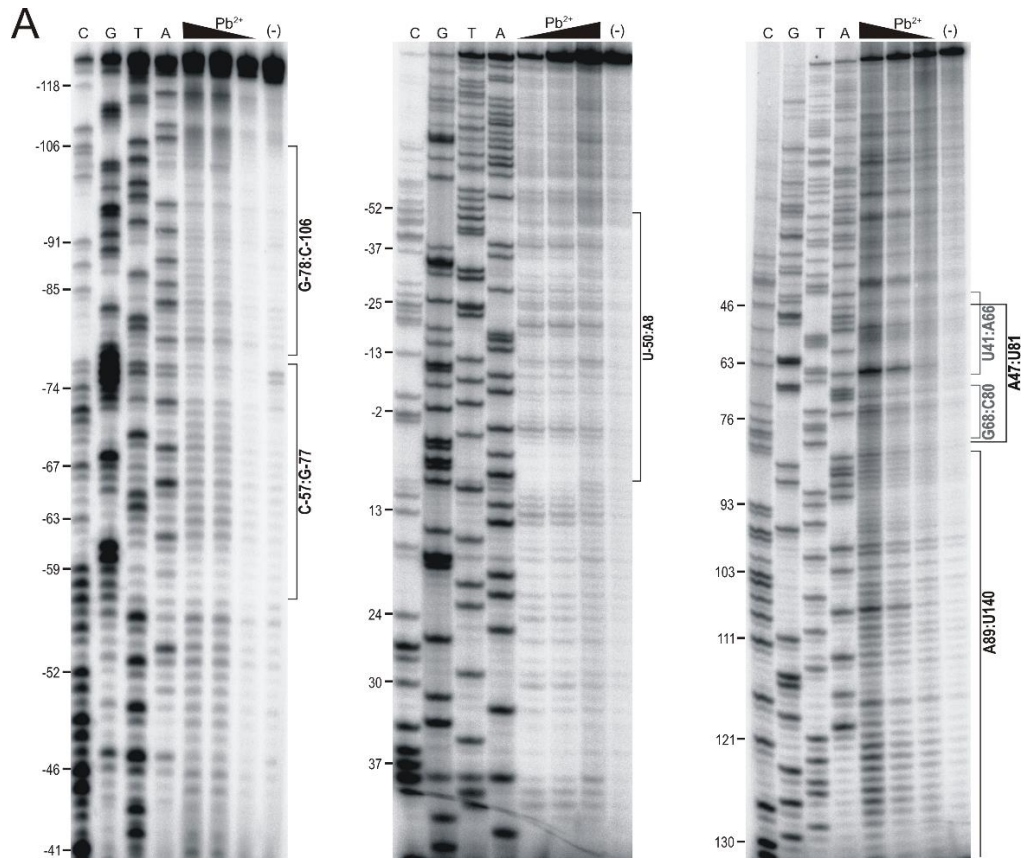
Analiza struktury w warunkach *in vitro*

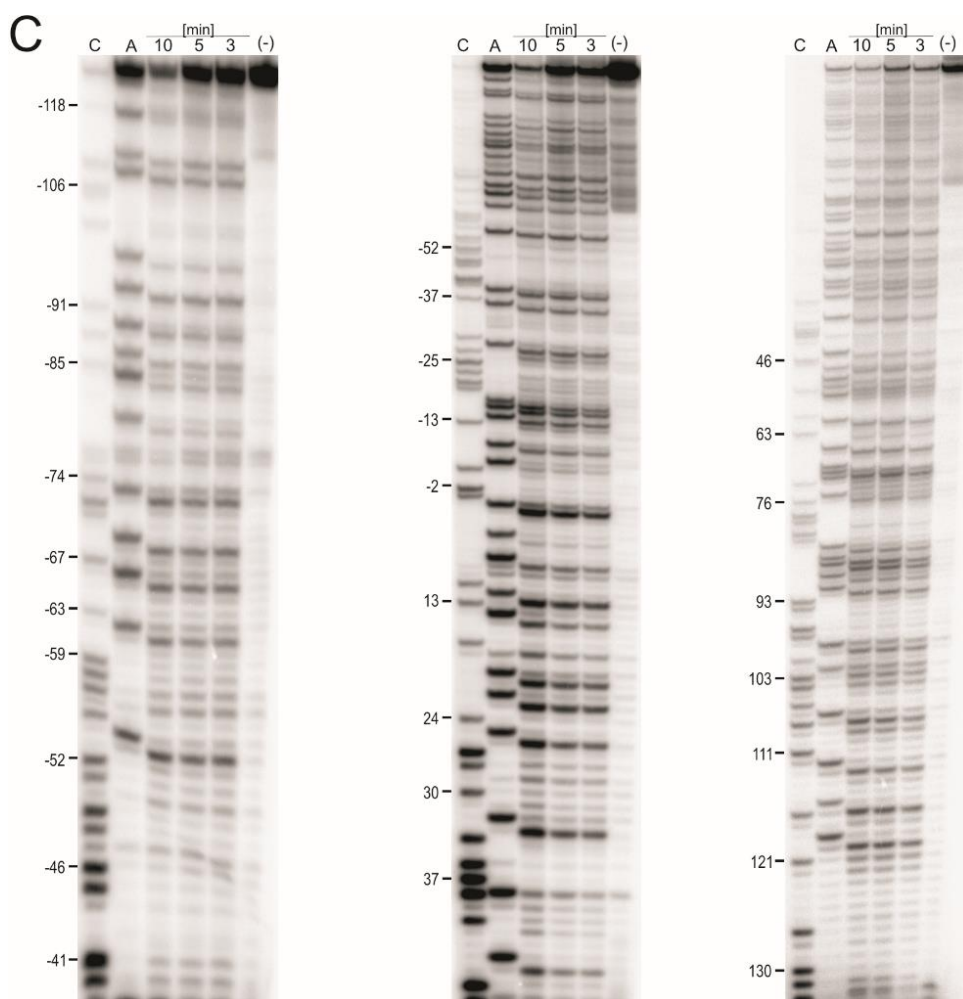
Cząsteczka mRNA(-122) została scharakteryzowana jako najczęściej występujący transkrypt genu *Trp53* w komórkach mysich. Analizowany mRNA zawierał 122-nukleotydowy region niekodujący 5', region kodujący, obejmujący 1164 nukleotydy oraz region 3'UTR składający się z 441 nukleotydów. Zaprojektowano i otrzymano dsDNA stanowiący matrycę do syntezy mRNA(-122), który zawierał sekwencję promotora transkrypcyjnego dla polimerazy RNA z faga T7, umożliwiającą transkrypcję RNA w warunkach *in vitro* (przygotowanie konstruktów zawierających matrycę dsDNA oraz otrzymywanie RNA opisano w rozdziale „Materiały i metody”).

Analizę struktury drugorzędowej mRNA(-122) rozpoczęto od przeprowadzenia mapowania struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem następujących technik: cięcia RNA indukowanego jonami ołowiu Pb²⁺ [Kirsebom & Ciesiołka, 2005], reakcji acylacji grup 2'-hydroksylowych analizowanej za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (SHAPE, ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) [Wilkinson *et al.* 2006] oraz modyfikacji siarczanem dimetylu (DMS, ang. *dimethyl sulfide*) [Tijerina *et al.* 2007].

Metoda cięcia RNA indukowanego jonami ołowiu jest stosowana w naszym laboratorium od wielu lat. Wykorzystanie jej w badaniach strukturalnych RNA umożliwia identyfikację regionów jednoniciowych w strukturze drugorzędowej RNA, a także pętli i wybrzuszeń. Degradację RNA pod wpływem jonów ołowiu obserwuje się również w regionach dwuniciowych, destabilizowanych poprzez występowanie niekanonicznych par nukleotydowych. Z reguły cięcie RNA nie obserwuje się w dwuniciowych, stabilnych odcinkach RNA o niezaburzonej strukturze helikalnej [Ciesiołka *et al.* 1998; Kirsebom & Ciesiołka 2005]. Metodę SHAPE opisano po raz pierwszy w 2006 roku. W reakcji wykorzystuje się bezwodnik *N*-metyloizatoiczny (NMIA, *ang.* *N-methylisatoic anhydride*), który acyluje grupy 2'OH reszt rybozy zlokalizowanych w obrębie regionów jednoniciowych RNA [Wilkinson *et al.* 2006]. Technika modyfikacji siarczanem dimetylu, jako jedyna z zastosowanych w ramach niniejszej pracy, wykazuje specyficzność względem określonych zasad azotowych. DMS metyluje atomy azotu w pozycji trzeciej reszty cytozyny oraz w pozycji pierwszej adeniny [Tijerina *et al.* 2007]. Produkty reakcji otrzymane w wyniku mapowania struktury drugorzędowej RNA trzema opisanymi powyżej metodami analizowałam za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem starterów DNA znakowanych izotopem ³²P na końcu 5', a uzyskane fragmenty poddawałam elektroforezie w 8% żelu poliakrylamidowym. W celu identyfikacji długości produktów przeprowadzono reakcje sekwencjonowania DNA metodą Sangera. Uzyskane autoradiogramy zaprezentowano na rys. 18.

W przypadku metody SHAPE intensywności poszczególnych prążków obserwowanych na autoradiogramach były odczytywane przy użyciu programu *Multi Gauge v. 3.0*, a następnie normalizowane do prążków w linii kontrolnej, w celu uzyskania wartości odpowiadających reaktywności poszczególnych reszt nukleotydowych. Wykorzystując dane eksperymentalne uzyskane przy zastosowaniu metody SHAPE i modyfikacji DMS wygenerowano model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122) przy użyciu programu *RNA Structure v. 5.6*. Cięcia indukowane obecnością jonów Pb²⁺ zostały naniesione na uzyskaną strukturę. Zaproponowano model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122), który przedstawiony został na rys. 19. W badanym regionie występuje przynajmniej pięć elementów strukturalnych typu spinki do włosów, różniących się pomiędzy sobą entalpiami swobodnymi ΔG obliczonymi *in silico*: C(-106):G(-78) ($\Delta G = -15,7$ kcal/mol), G(-77):C(-57) ($\Delta G = -4,6$ kcal/mol), C(-51):G9 ($\Delta G = -20,9$ kcal/mol), A47:U81 ($\Delta G = -6,3$ kcal/mol) oraz A89:U140 ($\Delta G = -10,5$ kcal/mol).





Rys. 18. Autoradiogramy uzyskane w wyniku przeprowadzenia reakcji cięcia indukowanego jonami Pb^{2+} (A), SHAPE (B) oraz modyfikacji DMS (C), analizowane za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem trzech starterów znakowanych radioizotopowo. Na panelu A, po prawej stronie, zaznaczono motywy strukturalne typu spinki do włosów obecne w zaproponowanym modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122). Po lewej stronie zaznaczono wybrane reszty cytydyny. Oznaczenia: czarne trójkąty: zmieniające się stężenie jonów Pb^{2+} , +: reakcja SHAPE, min: czas prowadzenia reakcji modyfikacji DMS wyrażony w minutach, (-): reakcja kontrolna, C, G, T, A: sekwencjonowanie.

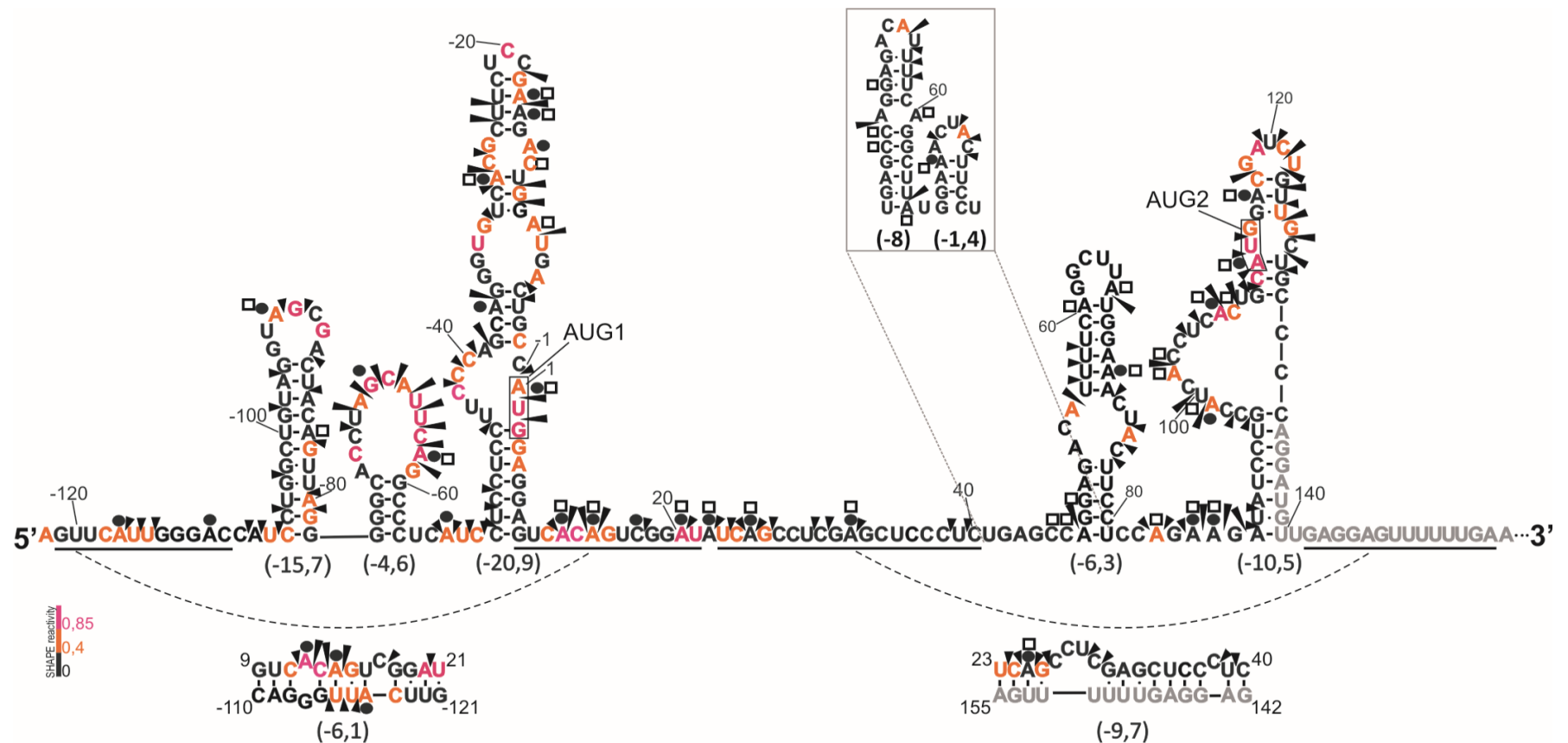
Należy zwrócić uwagę na możliwość alternatywnego zwijania regionu U41:U81, w którym to zamiast spinki A47:U81 występują dwa mniejsze motywy strukturalne U41:A66 i G68:C80 o wartościach entalpii swobodnych $\Delta G = -8$ kcal/mol oraz $\Delta G = -1,4$ kcal/mol. Możliwość alternatywnego zwijania się tego fragmentu RNA spowodowana jest faktem, że na podstawie wzorów cięć i modyfikacji uzyskanych dla tego regionu jednoznaczne stwierdzenie występowania jednego z zaproponowanych wariantów jest utrudnione (więcej informacji znajduje się w rozdziale „4.2.4. Mapowanie dostępności RNA w regionie U41:U81”). Poszczególne elementy strukturalne zaznaczono na autoradiogramie (rys. 18A).

Zauważono, że cięcia i modyfikacje naniesione na model struktury drugorzędowej RNA dobrze korespondują z występowaniem poszczególnych elementów strukturalnych.

W pierwszym od końca 5' elemencie strukturalnym typu spinki do włosów C(-106):G(-78) znajduje się 7-nukleotydomowa pętla oraz trzon spinki składający się z 11 par reszt nukleotydowych. Najwięcej modyfikacji i cięć znajduje się w obrębie pętli, co jest zgodne z informacjami na temat specyficzności wykorzystanych technik mapowania, natomiast pojedyncze cięcia i modyfikacje, którym ulega trzon spinki, mogą być spowodowane występowaniem dwóch par niekanonicznych GU. Takie pary nukleotydowe obniżają stabilność trzonu spinki, czyniąc go tym samym bardziej podatnym na modyfikację. Nie mniej jednak, pomimo obserwowanych, pojedynczych modyfikacji w trzonie spinki, cały element jest termodynamicznie stabilny, na co wskazuje wysoka przewidywana entalpia swobodna $\Delta G = -15,7$ kcal/mol.

Kolejnym elementem strukturalnym jest spinka G(-77):C(-57) o stosunkowo niskiej entalpii swobodnej $\Delta G = -4,6$ kcal/mol, składająca się z trzonu obejmującego cztery pary nukleotydowe GC oraz z dużej, 13-nukleotydowej pętli, ulegającej silnym modyfikacjom oraz cięciom.

Trzecia zidentyfikowana spinka C(-51):G9 składa się z trzech wybrzuszeń dwustronnych (ang. *internal loops*) oraz pętli apikalnej, oddzielonych od siebie odcinkami składającymi się z trzech lub czterech par nukleotydowych, a cały element strukturalny zakończony jest trzonem składającym się z siedmiu par nukleotydowych. Zauważono, że w obrębie całej spinki RNA występują liczne modyfikacje oraz cięcia. Obecność modyfikacji w regionach dwuniciowych może być spowodowana tym, że stabilność krótkich sparowanych odcinków została zaburzona poprzez występowanie wielonukleotydowych pętli ulegających licznym modyfikacjom. Ponadto, spinka ta zawiera kodon inicjacyjny AUG1. W kodonie AUG1 tylko ostatnia reszta nukleotydowa, guaniny, jest sparowana i wchodzi w skład podwójnej helisy stanowiącej podstawę spinki. Nukleotydy adenozyne i urydyny stanowią część trójnukleotydowego wybrzuszenia, co może korzystnie wpływać na ich dostępność podczas inicjacji procesu translacji [Błaszczyk & Ciesiołka, 2011].



Rys. 19. Model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122). Pierwsza reszta nukleotydowa regionu kodującego została oznaczona jako 1, reszty nukleotydowe zlokalizowane w obrębie regionu niekodującego zaznaczono numerami ujemnymi. Pod każdym motywem strukturalnym, w nawiasach, znajdują się szacowane entalpie swobodne ΔG , wyrażone w kcal/mol. Czarne grotki wskazują miejsca cięcia jonami Pb^{2+} , czarne koła i białe kwadraty oznaczają reszty nukleotydowe modyfikowane siarczanem dimetylu, odpowiednio w warunkach *in vitro* oraz w transfekowanej linii komórkowej. Kolorami czarnym, pomarańczowym i czerwonym zaznaczono reszty nukleotydowe w zależności od ich reaktywności w reakcji SHAPE, kolorem szarym oznaczono miejsce wiązania startera. Kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2 zaznaczono czarną ramką. W szarej ramce zaprezentowano alternatywne zwijanie regionu U41:U81.

Kolejnym regionem przyjmującym zdefiniowaną strukturę drugorzędową jest odcinek U41:U81, dla którego zaproponowano dwa alternatywne sposoby zwinięcia (rys. 19). Na podstawie uzyskanego wzoru modyfikacji i cięć nie można jednoznacznie wykluczyć żadnej z propozycji zwijania tego regionu (więcej informacji w rozdziale „4.2.4. Mapowanie dostępności RNA w regionie U41:U81”). Pierwsza z zaproponowanych struktur stanowi spinkę do włosów A47:U81 składającą się z segmentów dwuniciowych, złożonych z pięciu oraz sześciu par nukleotydowych, oddzielonych wybrzuszeniem dwustronnym, a cała spinka zakończona jest 6-nukleotydową pętlą. Przewidywana *in silico* entalpia swobodna elementu wynosi -6,3 kcal/mol. Druga propozycja zwijania regionu U41:U81 obejmuje dwa elementy typu spinki do włosów. Pierwszy z nich, U41:A66, o entalpii swobodnej $\Delta G = -8$ kcal/mol, składa się z 4-nukleotydowej pętli apikalnej oraz dwóch segmentów dwuniciowych złożonych z czterech i sześciu par nukleotydowych, oddzielonych jednonukleotydowymi wybrzuszeniami dwustronnymi. Druga z zaproponowanych spinek o $\Delta G = -1,4$ kcal/mol składa się z trzonu złożonego z czterech par nukleotydowych oraz 5-nukleotydowej pętli apikalnej.

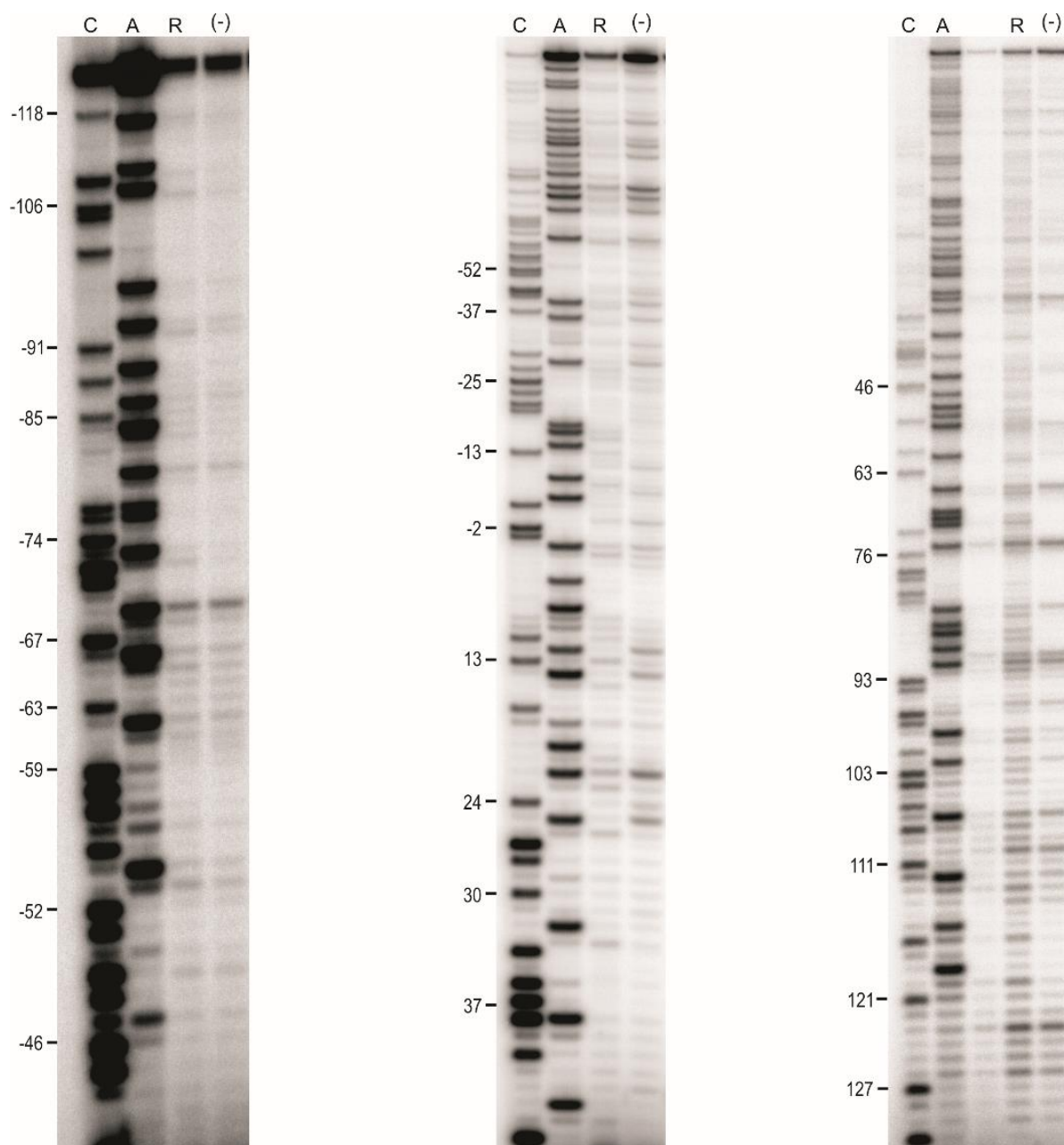
Ostatnim z zaproponowanych elementów w analizowanym regionie terminalnym 5' jest spinka do włosów A89:U140, której podstawa składa się z ośmiu par nukleotydowych oraz z dwóch segmentów dwuniciowych, składających się z trzech par nukleotydowych, oddzielonych od siebie wybrzuszeniami dwustronnymi, spośród których jedno jest wyjątkowo duże, składające się z trzynastu reszt nukleotydowych. Spinka zakończona jest 5-nukleotydową pętlą, a całość stanowi stabilną strukturę o entalpii swobodnej $\Delta G = -10,5$ kcal/mol. W obrębie spinki zlokalizowany jest kodon AUG2, od którego rozpoczyna się inicjacja translacji izoformy p53 skróconej z końca aminowego, $\Delta 41p53$. Otoczenie strukturalne kodonu inicjacyjnego AUG2 różni się od otoczenia obserwowanego dla kodonu AUG1. W przypadku AUG2 reszta adenozyiny wchodzi w skład regionu dwuniciowego, natomiast pozostała część kodonu, reszty urydyny i guanozyiny, zlokalizowane są w jednoniciowym wybrzuszeniu. Nukleotydy wchodzące w skład kodonu AUG2 oraz znajdujące się w jego bliskim otoczeniu wykazują się reaktywnością w reakcji SHAPE, a w regionie tym obecne są liczne cięcia jonami Pb^{2+} .

Ponadto w zaproponowanym modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 występują dwa oddziaływania dalekiego zasięgu: regionu G(-121)C(-110) z regionem G9U21 ($\Delta G = -6,1$ kcal/mol) oraz fragmentu U23C40 z odcinkiem G142A155 ($\Delta G = -9,7$ kcal/mol). Nukleotydy wchodzące w skład oddziaływania G(-121)C(-110) -

G9U21 wykazują dużą reaktywność, zwłaszcza w obrębie pętli oraz znajdującego się pomiędzy nimi regionu dwuniciowego składającego się z trzech par nukleotydowych, wśród których znajduje się niekanoniczna para GU. W przypadku drugiego oddziaływania U23C40 - G142A155 obserwuje się pojedyncze nukleotydy ulegające modyfikacjom oraz słabe cięcia indukowane jonami Pb^{2+} , co można tłumaczyć wzrostem entalpii swobodnej w stosunku do regionu G(-121)C(-110) - G9U21. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że nukleotydy znajdujące się w odcinku G142A155 zlokalizowane są w obrębie wiązania startera i nie były analizowane żadną z zastosowanych metod.

Analiza struktury w warunkach *in cellulo*

W następnym etapie badań przeprowadzono mapowanie struktury drugorzędowej mRNA(-122) siarczanem dimetylu w warunkach *in cellulo*. W tym celu wykorzystano linię komórkową fibroblastów mysich pozbawionych endogennego p53, MB352, którą transfekowano mRNA(-122) otrzymanym metodą transkrypcji *in vitro*. Takie podejście eksperymentalne gwarantuje, że badany jest tylko jeden transkrypt, a informacje na temat jego struktury drugorzędowej nie zostały zaburzone poprzez odczyty danych pochodzących z transkryptów o innych długościach. DMS jest odczynnikiem, który może przechodzić przez błonę komórkową, w związku z czym można go stosować do mapowania struktury drugorzędowej RNA w komórce, a eksperyment przygotowano na podstawie protokołu opublikowanego w 2013 roku [Kwok *et al.* 2013]. Wyniki mapowania przedstawiono na rysunku 19 w postaci białych kwadratów, a autoradiogramy zaprezentowano na rysunku 20.



Rys. 20. Autoradiogramy uzyskane w wyniku przeprowadzenia reakcji modyfikacji DMS *in cellulose*, analizowane za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem trzech starterów znakowanych radioizotopowo. Po lewej stronie zaznaczono wybrane reszty cytydyny. Oznaczenia: R: reakcja modyfikacji DMS, (-): reakcja kontrolna, C, A: sekwencjonowanie.

Okazało się, że wzór modyfikacji DMS w warunkach *in cellulose* jest bardzo podobny do wzoru uzyskanego w warunkach *in vitro*. Na tej podstawie można sugerować, że badana struktura drugorzędowa w warunkach *in cellulose* i *in vitro* jest bardzo podobna i nie ulega silnej rearanzacji. Nie mniej jednak, odnotowano drobne różnice: w regionie G(-121)C(-110), który potencjalnie może tworzyć oddziaływania dalekiego zasięgu, w pętli spinki G(-77):C(-57) oraz w odcinku łączącym tę spinkę z motywem strukturalnym zawierającym

kodon inicjacyjny AUG1. W tych regionach występują pojedyncze modyfikacje reszt nukleotydowych w warunkach *in vitro*, które nie zostały zauważone w warunkach komórkowych. Na podstawie uzyskanego wzoru modyfikacji można sugerować, że opisane regiony mogą stanowić miejsca oddziaływania z czynnikami działającymi *in trans*, np. z białkami komórkowymi. W takim przypadku oddziaływanie białko-RNA uniemożliwiłoby modyfikację reszty nukleotydowej przez DMS, w związku z tym nie byłaby obserwowana na autoradiogramie. Aby potwierdzić tę hipotezę niezbędne byłoby jednak wykonanie dodatkowych badań. Zaobserwowano również miejsca, w których reszty nukleotydowe ulegają modyfikacji DMS jedynie w warunkach komórkowych, np. przy podstawie oraz w okolicy pętli apikalnej spinki A47:U81 oraz w obrębie dużego wybrzuszenia bocznego spinki A89:U140. Modyfikacje obserwowane jedynie w warunkach *in cellulo* sugerują zwiększoną dostępność danych regionów mRNA dla czynników komórkowych, a modyfikacje sąsiadujące z regionami jednoniciowymi mogą świadczyć o tzw. „oddychających” (ang. „*breathing*”) regionach dwuniciowych w strukturze mRNA.

Dyskusja wyników

Podczas analizy długości regionów niekodujących 5' mRNA p53 różnych gatunków ssaków zauważono, że miejsce inicjacji transkrypcji mysiego mRNA(-122) jest przesunięte jedynie o jeden nukleotyd w stosunku do miejsca inicjacji transkrypcji P1 ludzkiego mRNA (rys. 17). Pomimo że długość regionów niekodujących mysiego i ludzkiego mRNA wynosi odpowiednio 122 i 135 nukleotydów, miejsce inicjacji transkrypcji pozostaje zachowane pomiędzy tymi gatunkami, m. in. dzięki występowaniu w obrębie sekwencji mRNA trzech różnic gatunkowo-specyficznych. W obrębie mysiego 5'UTR znajduje się 3-nukleotydowa sekwencja UCC, charakterystyczna dla myszy, której nie zaobserwowano w sekwencjach mRNA pozostałych gatunków branych pod uwagę w trakcie analizy. Ponadto, w stosunku do ludzkiego 5'UTR mRNA p53, mysi region niekodujący pozbawiony jest dwóch odcinków sekwencji: 19-nukleotydowego fragmentu znajdującego się powyżej kodonu inicjacyjnego AUG1 oraz 5-nukleotydowej delecji zlokalizowanej bezpośrednio przed miejscem inicjacji transkrypcji mRNA(-122). Brak obu odcinków zauważono jedynie w przypadku myszy i szczura. Na tej podstawie można sugerować, że jest to cecha charakterystyczna dla podrodziny myszy.

Porównując analizowany region terminalny 5' mRNA(-122) z homologicznym fragmentem mRNA, ulegającym transkrypcji w komórkach ludzkich, zaobserwowano wyższy stopień uporządkowania mysiego 5'UTR mRNA p53, pomimo że fragment ten jest skrócony w stosunku do swojego ludzkiego odpowiednika. Wykazano, że struktura drugorzędowa tego regionu zawiera przynajmniej pięć stosunkowo stabilnych termodynamicznie elementów typu spinki do włosów. W przypadku homologicznego końca 5' mRNA ludzkiego p53 wykazano występowanie czterech motywów strukturalnych, spośród których dwa stanowią małe spinki do włosów o podstawach składających się odpowiednio z trzech i czterech par nukleotydowych oraz dwóch stabilnych spinek: dużej G64:C169 o przewidywanej entalpii swobodnej $\Delta G = -52,9$ kcal/mol, zawierającej kodon inicjacyjny AUG1 oraz mniejszej U180:A218 [Błaszczyk & Ciesiołka, 2011]. Zaobserwowanej różnicy w stopniu uporządkowania nie można tłumaczyć długością badanych fragmentów, ponieważ w obu przypadkach w analizie brano pod uwagę sekwencje składające się z regionów niekodujących 5' oraz fragmentów sekwencji kodującej zakończonych za kodonem AUG2.

Pomimo istotnych różnic pomiędzy regionami terminalnymi 5' mysiego i ludzkiego mRNA p53, zaobserwowano również podobieństwa, np. występowanie spinki A47:U81 w mRNA mysim oraz spinki U180:A218 w transkrypcje ludzkim. Zawierają one odmienne długości trzonów, a ich sekwencje różnią się od siebie jedynie trzema nukleotydami. Istotna rola tego elementu strukturalnego zostanie opisana w dalszej części niniejszej pracy (4.2.4. Mapowanie dostępności RNA w regionie U41:U81). Ponadto, w obu przypadkach zaobserwowano występowanie kodonu inicjacyjnego AUG1 w obrębie dużej, stabilnej termodynamicznie spinki do włosów. Spinka występująca w mRNA ludzkim wykazuje wyższą przewidywaną entalpię swobodną ($\Delta G = -52,9$ kcal/mol) w stosunku do spinki obecnej w transkrypcje mysim ($\Delta G = -20,9$ kcal/mol), co spowodowane jest krótszą długością oraz występowaniem licznych wybrzuszeń bocznych w spince w mysim mRNA. Opisany element strukturalny G64:C169 ludzkiego mRNA zawiera 19-nukleotydową sekwencję, nieobecną w mRNA mysim, która powoduje wydłużenie spinki, a w związku z tym również zwiększenie jej przewidywanej energii swobodnej ΔG .

Opisane powyżej różnice nie wpływają istotnie na otoczenie strukturalne kodonu inicjacyjnego AUG1. W obu przypadkach, zarówno w mRNA mysim jak i ludzkim, zlokalizowany jest on w obrębie połączenia odcinka jednoniciowego z dwuniciowym. W przypadku mysiego mRNA pierwsze dwie reszty nukleotydowe AU wchodzi w skład wybrzuszenia, a reszta guanozyny znajduje się w obrębie trzonu spinki. W elemencie

strukturalnym G64:C169 w mRNA ludzkim pierwsza reszta nukleotydowa zlokalizowana jest w wybrzuszeniu, a pozostałe dwie są sparowane. Niesparowanie pierwszych reszt nukleotydowych kodonu inicjacyjnego wpływa pozytywnie na wspomnianą wcześniej dostępność kodonu inicjacyjnego w procesie inicjacji translacji [Błaszczuk & Ciesiołka, 2011]. Otoczenie strukturalne kodonu inicjacyjnego AUG2 w mRNA ludzkim jest analogiczne do otoczenia AUG1, natomiast w przypadku myszy jest zmienione: reszta adenozyyny znajduje się w odcinku dwuniciowym, natomiast reszty UG zlokalizowane są w obrębie jednoniciowego wybrzuszenia. Takie zmiany mogłyby wpływać na efektywność procesu inicjacji translacji. W przypadku mRNA p53 myszy należy zwrócić uwagę na fakt, że kodon AUG2 poprzedzony jest dużym, trzynastonukleotydowym wybrzuszeniem ulegającym licznym modyfikacjom w warunkach *in vitro* oraz *in cellulo*, a region sparowany, oddzielający to wybrzuszenie od regionu jednoniciowego, zawierającego reszty nukleotydowe UG wchodzące w skład kodonu AUG2, składa się jedynie z trzech par nukleotydowych, co związane jest ze stosunkowo niską energią niezbędną do zerwania wiązań wodorowych pomiędzy resztami nukleotydowymi. Na tej podstawie można wnioskować, że pomimo odmiennego kontekstu strukturalnego AUG2, synteza izoforny białka p53 skróconej z końca aminowego $\Delta 40p53$ powinna zachodzić podobnie.

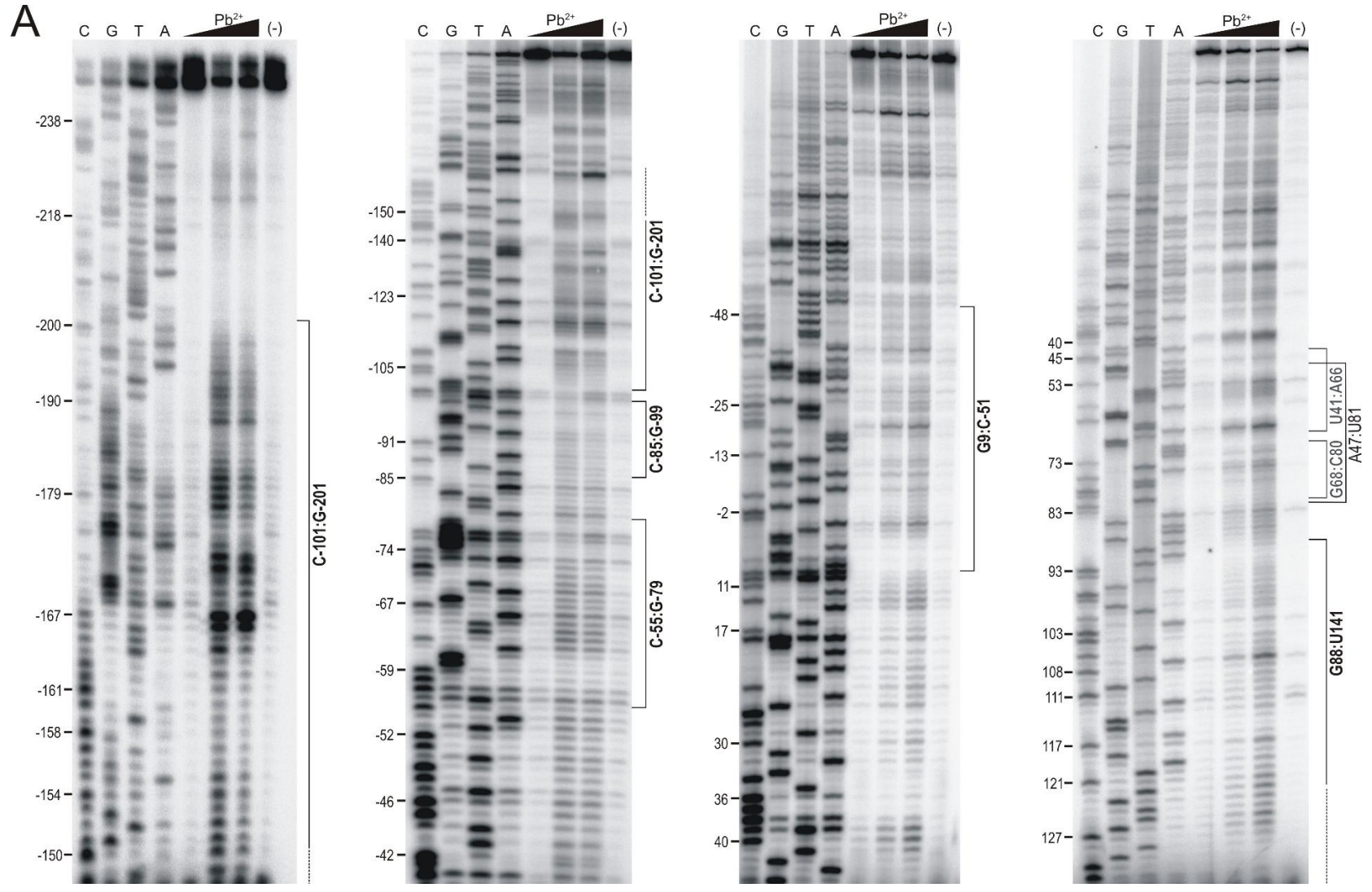
4.2.2. mRNA(-247)

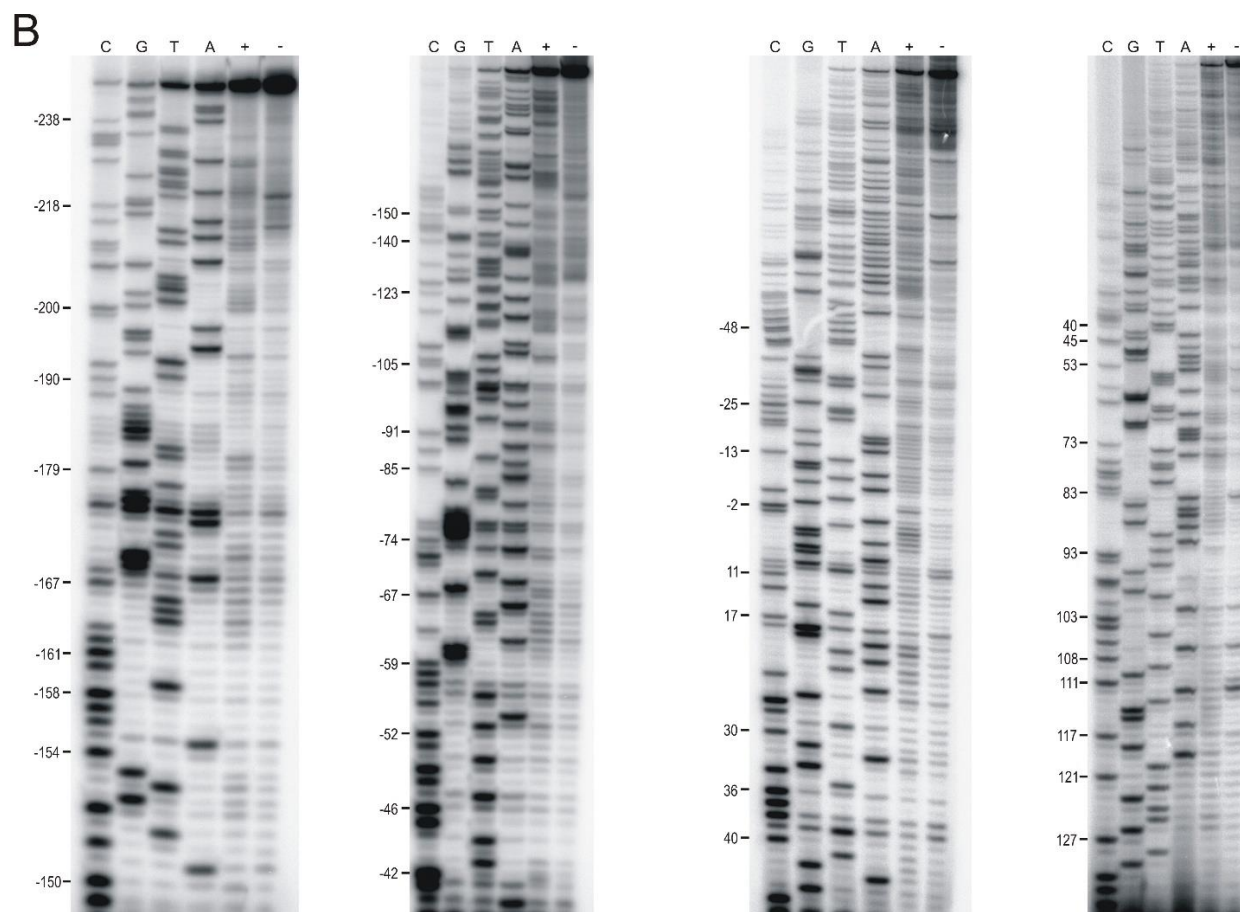
Cząsteczka mRNA(-247) jest najdłuższym zidentyfikowanym transkrypcyjnym w eksperymencie 5'RACE. Sekwencja badanego mRNA zawierała region niekodujący 5' składający się z 247 nt oraz, analogicznie do mRNA(-122), zawierała 1164-nukleotydową sekwencję kodującą oraz 441-nukleotydowy region 3'UTR. Matryca dsDNA do syntezy mRNA(-247) przygotowywana została analogicznie do matrycy dsDNA dla mRNA(-122), a opis otrzymywania konstruktów znajduje się w rozdziale „Materiały i metody”.

Analizę struktury drugorzędowej mRNA(-247) przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch opisanych wcześniej metod mapowania struktury drugorzędowej RNA: cięcia RNA indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} oraz techniki SHAPE. Autoradiogramy otrzymane w wyniku mapowania struktury mRNA zaprezentowano na rys. 21.

Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-247), składający się przynajmniej z siedmiu elementów strukturalnych typu spinki do włosów: A(-247):U(-224) ($\Delta G = -2,8$ kcal/mol), C(-200):G(-102) ($\Delta G = -38$ kcal/mol), C(-101):G(-83) ($\Delta G = -6,3$ kcal/mol), G(-79):C(-55) ($\Delta G = -8,2$ kcal/mol), C(-51):G9 ($\Delta G = -20,9$ kcal/mol), A47:U81 ($\Delta G = -6,3$ kcal/mol) oraz A89:U140 ($\Delta G = -10,5$ kcal/mol). Podobnie jak w przypadku mRNA(-122) region U41:U81 może również związać się alternatywnie tworząc dwie spinki U41:A66 ($\Delta G = -8$ kcal/mol) oraz G68:C80 ($\Delta G = -1,4$ kcal/mol).

Spinka zlokalizowana na końcu 5' mRNA składa się z podstawy złożonej z ośmiu par nukleotydowych, zawierającej dwa jednonukleotydowe wybrzuszenia oraz pętli apikalnej złożonej z sześciu nukleotydów. Dalej w kierunku 3' znajduje się duża, stabilna domena C(-200):G(-102). Składa się ona z segmentu zbudowanego z jedenastu par nukleotydowych, pośród których znajduje się małe, dwunukleotydowe wybrzuszenie. Następnie, 11-nukleotydowe wybrzuszenie oraz mała spinka C(-126):G(-141) oddziela trzon spinki od dużej części spinki G(-142):C(-188), zbudowanej z siedemnastu par nukleotydowych, połączonych od siebie wybrzuszeniami bocznymi: trzynukleotydowym dwustronnym, trzynukleotydowym jednostronnym oraz dwustronnym dwu- i jednonukleotydowym, a cała spinka zakończona jest pętlą apikalną, złożoną z trzech reszt nukleotydowych.

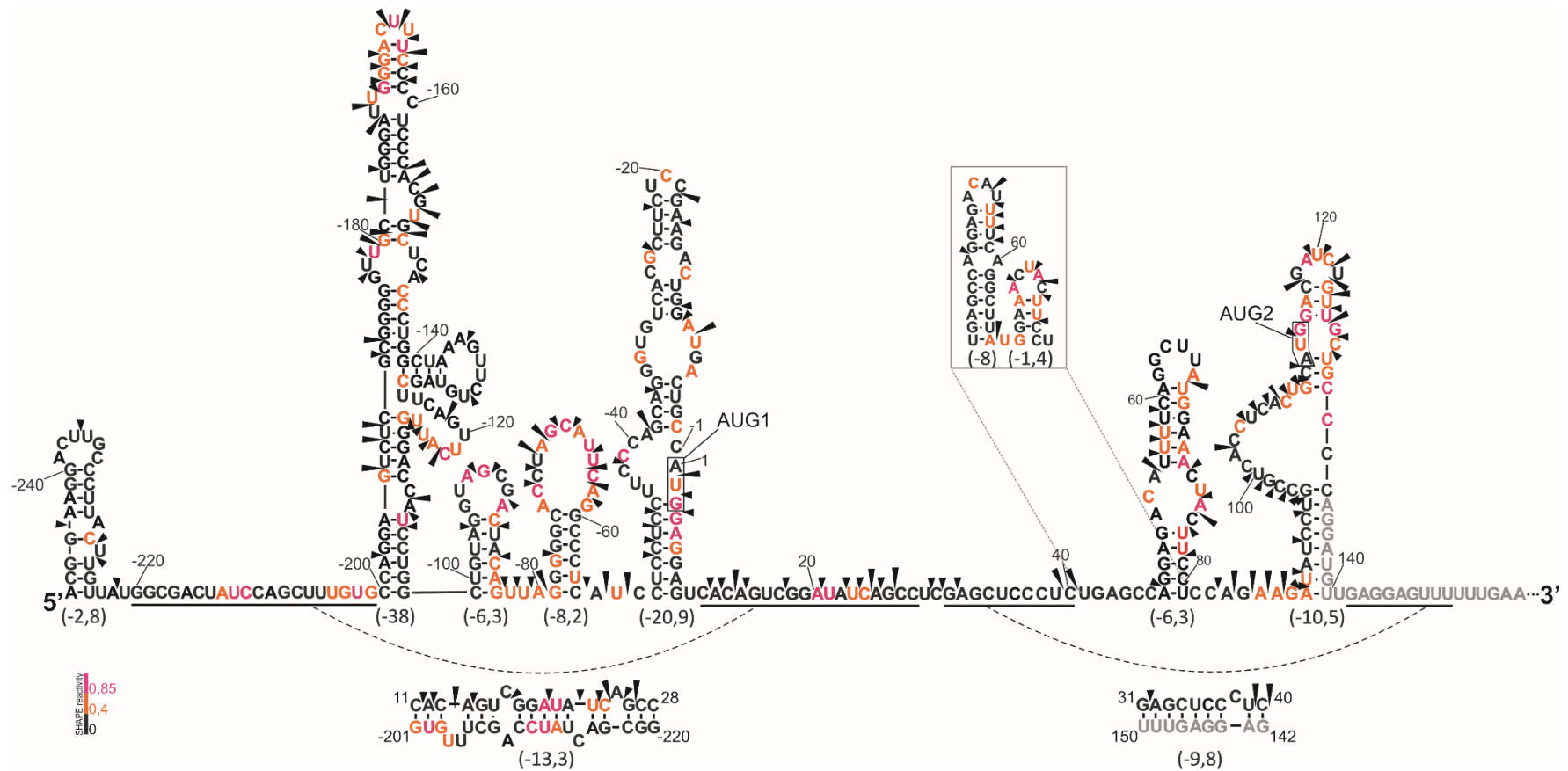




Rys. 21. Autoradiogramy dla mRNA(-247), uzyskane w wyniku przeprowadzenia reakcji cięcia indukowanego jonami Pb^{2+} (A) oraz SHAPE (B), analizowane za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem czterech starterów znakowanych radioizotopowo. Na panelu (A) po prawej stronie zaznaczono motywy strukturalne typu spinki do włosów, obecne w zaproponowanym modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-247). Po lewej stronie zaznaczono wybrane reszty cytydyny. Oznaczenia: czarne trójkąty: zmieniające się stężenie jonów Pb^{2+} , +: reakcja SHAPE, (-): reakcja kontrolna, C, G, T, A: sekwencjonowanie.

Spinka C(-101):G(-83) zbudowana jest z trzonu złożonego z sześciu par nukleotydowych oraz pętli z siedmiu reszt nukleotydowych. Element strukturalny G(-79):C(-55) zawiera 13-nukleotydową pętlę apikalną oraz podstawę złożoną z sześciu par reszt nukleotydowych. Wszystkie zaproponowane elementy strukturalne w mRNA(-247), zlokalizowane w części kodującej i niekodującej od nukleotydu A(-54), znajdują się również w modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122), w związku z czym zostały one szczegółowo opisane wcześniej. Zaproponowano również występowanie dwóch stabilnych oddziaływań dalekiego zasięgu: odcinka G(-220)G(-201) z fragmentem C11C28 o przewidywanej entalpii swobodnej $\Delta G = -13,3$ kcal/mol oraz sekwencji G31C40 z odcinkiem G142U150 o $\Delta G = -9,8$ kcal/mol. Model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-247) został zaprezentowany na rysunku 22.

Zauważono, że model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-247) w dużej części odzwierciedla model zaproponowany dla homologicznego odcinka mRNA(-122). W obu strukturach występują identyczne elementy od nukleotydu A(-54) do końca analizowanej sekwencji w kierunku 3', co może wskazywać na ich istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mRNA. Ponadto, niewielką różnicę zauważono pomiędzy spinkami C(-101):G(-83) i G(-79):C(-55) w mRNA(-247) a spinkami C(-106):G(-78) i G(-77):C(-57) w mRNA(-122). Pętle apikalne obu elementów strukturalnych pozostają nienaruszone, jednak fakt, że odcinek C(-106)G(-102) wchodzi w skład podstawy domeny C(-200):G(-102) powoduje powstanie spinki C(-101):G(-83) w mRNA(-247) skróconej o pięć par nukleotydowych w podstawie w stosunku do spinki C(-106):G(-78) w mRNA(-122). Co więcej, odcinek U(-82)G(-78) sparowany z C(-106)G(-102) w spince C(-106)G(-102) w mRNA(-122) w modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-247) stanowi połączenie z motywem G(-79):C(-55), którego podstawa w stosunku do analogicznego motywu w mRNA(-122) została wydłużona o dwie pary reszt nukleotydowych.



Rys. 22. Model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-247). Pierwsza reszta nukleotydowa regionu kodującego została oznaczona jako 1, reszty nukleotydowe zlokalizowane w obrębie regionu niekodującego zaznaczono numerami ujemnymi. Pod każdym motywem strukturalnym, w nawiasach, znajdują się szacowane entalpie swobodne ΔG , wyrażone w kcal/mol. Czarne grotki wskazują miejsca cięcia jonami Pb^{2+} , kolorami czarnym, pomarańczowym i czerwonym zaznaczono reszty nukleotydowe w zależności od ich reaktywności w reakcji SHAPE, kolorem szarym oznaczono miejsce wiązania startera. Kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2 zaznaczono czarną ramką. W szarej ramce zaprezentowano alternatywnie zwijanie regionu U41:U81.

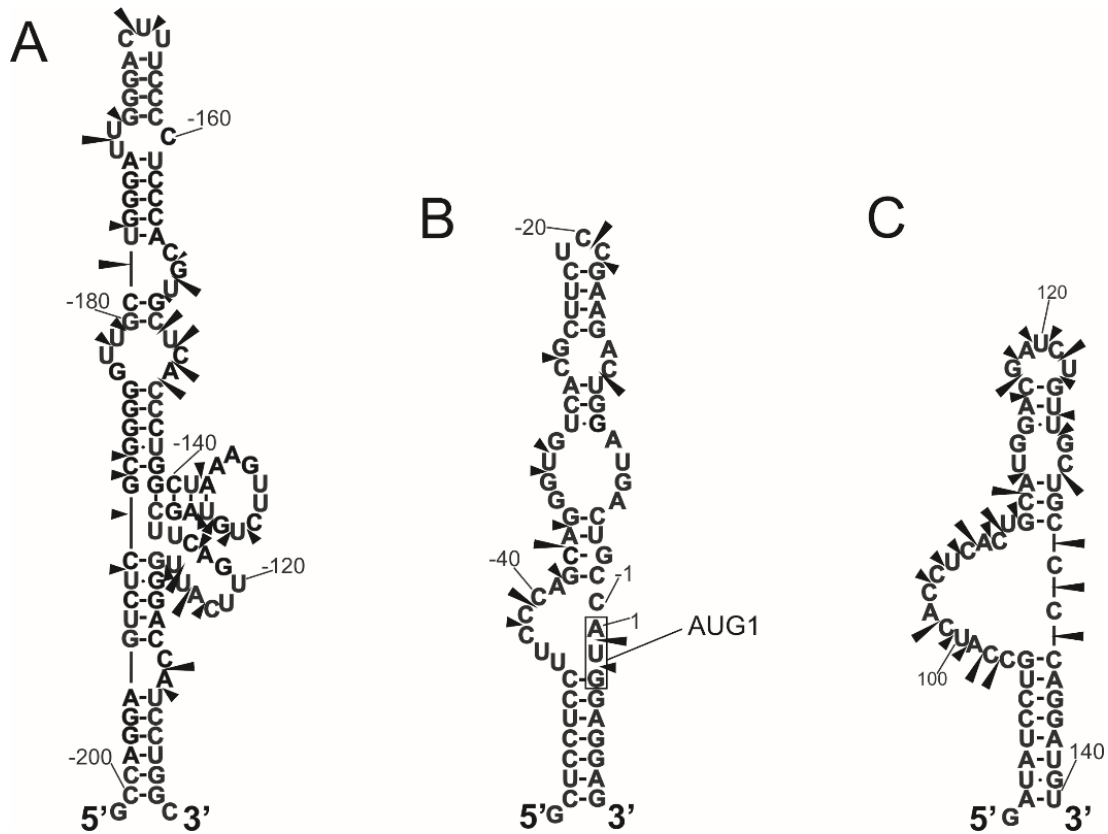
Porównując modele struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' mysiego mRNA(-247) oraz ludzkiego mRNA transkrybowanego z miejsca P0 można zauważyć mniejszy stopień uporządkowania transkryptu P0 w porównaniu do jego mysiego odpowiednika, podobnie jak w przypadku mRNA najczęściej występującego, syntetyzowanego od miejsca P1. W obu przypadkach zarówno mysi, jak i ludzki mRNA, zwijają się podobnie do ich wersji ze skróconymi regionami terminalnymi 5': istotne elementy strukturalne są zachowane, pomimo zmiany długości regionu 5'UTR.

4.2.3. Elementy izolowane C(-200):G(-102), C(-51):G9 i A89:U140

W kolejnym etapie postanowiłam sprawdzić prawdopodobieństwo występowania w badanych mRNA trzech wybranych elementów strukturalnych typu spinki do włosów C(-200):G(-102), C(-51):G9 i A89:U140. W tym celu zastosowałam tzw. „podejście domenowe”, polegające na analizie krótkich fragmentów RNA, których sekwencja nukleotydowa odpowiadała elementom zaproponowanym wcześniej w modelach struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' mRNA(-247) i mRNA(-122). W dalszej części pracy do opisu tych cząsteczek wykorzystuję termin „fragmenty izolowane”. W celu ułatwienia transkrypcji RNA z wykorzystaniem promotora T7, do oligomerów C(-51):G9 i A89:U140 na końcu 5' dodano resztę guanozyny, natomiast sekwencję oligomeru C(-200):G(-102) wydłużono o reszty nukleotydowe guanozyny i cytydyny, odpowiednio na końcach 5' i 3'. W przypadku oligomerów C(-200):G(-102) oraz A89:U140 dodane reszty nukleotydowe występują naturalnie w sekwencji mRNA. W kolejnym kroku uzyskane cząsteczki znakowano izotopem ^{32}P na końcu 5', a następnie mapowano ich strukturę wykorzystując metodę cięcia indukowanego w obecności jonów Pb^{2+} . Uzyskane produkty analizowano na żelu poliakrylamidowym, a wzór cięć RNA otrzymany dla danej cząsteczki porównywano ze wzorem uzyskanym dla analogicznego fragmentu znajdującego się w mRNA pełnej długości. Analizę *in silico* badanych fragmentów mRNA przeprowadzono wykorzystując program *RNA structure* v. 5.6. Wykazano, że wszystkie trzy RNA przyjmują struktury typu spinki do włosów, analogiczne do zaproponowanych wcześniej w modelu struktury drugorzędowej końca 5' całej cząsteczki mRNA. Zaproponowane struktury drugorzędowe stanowią najstabilniejsze termodynamicznie warianty zwijania tych fragmentów RNA, o przewidywanych entalpiach swobodnych ΔG wynoszących $\Delta G = -41,4$ kcal/mol, $-21,1$ kcal/mol oraz $-10,9$ kcal/mol odpowiednio dla spinek C(-200):G(-102), C(-51):G9 i A89:U140.

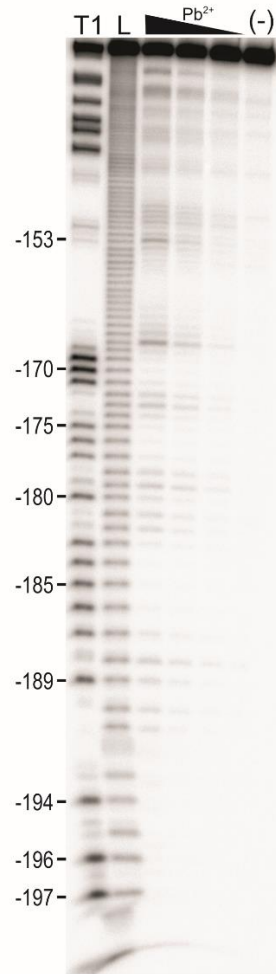
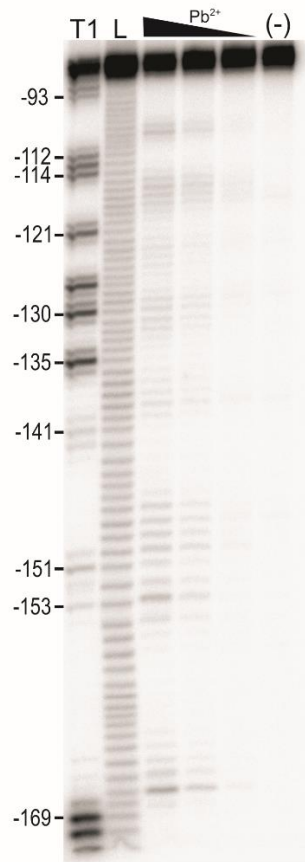
Wyniki przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono na rysunku 23. Zaobserwowano, że we wszystkich analizowanych przypadkach wzór cięć elementu izolowanego był bardzo podobny do wzoru otrzymanego dla analogicznego fragmentu w mRNA pełnej długości. W izolowanej spince C(-200):G(-102) zaobserwowano zmniejszenie liczby cięć RNA w obrębie rejonów dwuniciowych, zwłaszcza w odcinku bezpośrednio sąsiadującym z pętlą apikalną oraz w podstawie całej domeny. Uzyskany wzór jest zgodny z zasadami przewidzianymi dla mapowania struktury RNA przy wykorzystaniu jonów ołowiu. Obserwowane dodatkowe cięcia dla tego fragmentu w mRNA pełnej długości

mogą wynikać np. ze zmniejszenia stabilności poszczególnych części domeny, co może być spowodowane obecnością dodatkowych odcinków sekwencji w mRNA pełnej długości.

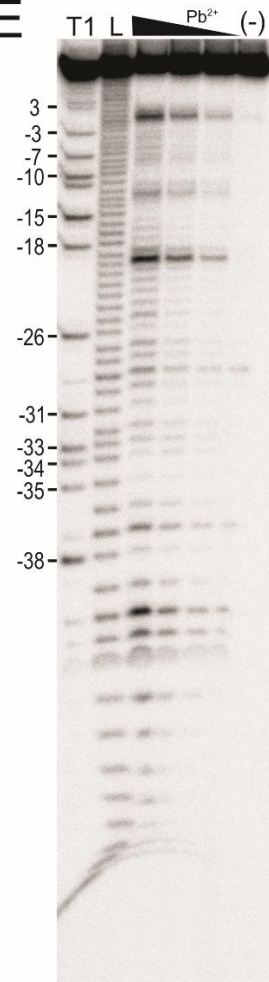


Rys. 23. Struktura drugorzędowa izolowanych elementów mRNA oraz autoradiogramy uzyskane w wyniku mapowania ich struktury drugorzędowej metodą cięć indukowanych obecnością jonów Pb^{2+} . Elementy C(-200):G(-102) (A, D), C(-51):G9 (B, E) i A89:U140 (C, F). Po lewej stronie zaznaczono wybrane reszty cytydyny. Oznaczenia: czarne trójkąty: zmieniające się stężenie jonów Pb^{2+} , +: reakcja SHAPE, (-): reakcja kontrolna, C, G, T, A: sekwencjonowanie. Panele D, E i F znajdują się na kolejnej stronie.

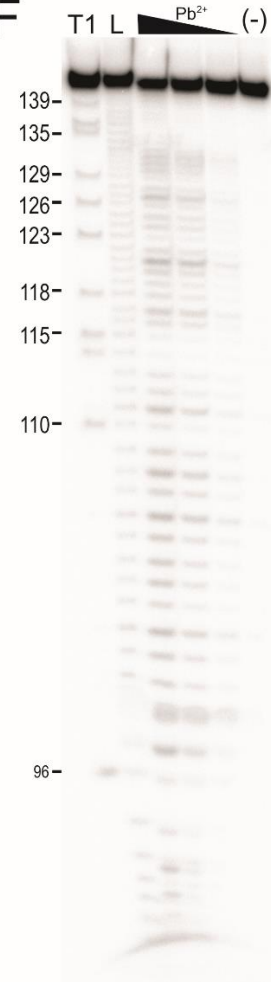
D



E



F



W przypadku spinki C(-51):G9 uzyskany wzór cięć odpowiada strukturze drugorzędowej zaproponowanej *in silico*, choć w przypadku mRNA pełnej długości obserwowane są dodatkowe cięcia w regionie apikalnym spinki. Można przypuszczać, że podobnie jak w przypadku spinki C(-200):G(-102), obserwowane różnice wynikają ze zmniejszonej stabilności tego elementu w mRNA w stosunku do elementu izolowanego. W ostatniej analizowanej spince A89:U140 wzór mapowań oligomeru jest bardzo zbliżony do wzoru uzyskanego w mRNA pełnej długości. Zaobserwowano jedynie mniej cięć w podstawie spinki, co spowodowane jest najprawdopodobniej brakiem zaburzania struktury przez sąsiadujące elementy mRNA, oraz dodatkowe cięcia w obrębie dwójki nukleotydowej 141CC142. Brak cięć RNA w analogicznym regionie w cząsteczce pełnej długości można także tłumaczyć wykorzystaniem różnych podejść analitycznych: elementy izolowane znakowane były na końcach 5', co umożliwiło analizę całej spinki, natomiast w mRNA pełnej długości nukleotydy 141CC142 sąsiadują bezpośrednio z miejscem wiązania startera w reakcji odwrotnej transkrypcji, co mogło skutkować brakiem odczytu danych dla tego regionu.

Podsumowując, dane uzyskane w tzw. „podejściu domenowym” bardzo dobrze korelują z informacjami uzyskanymi podczas mapowania struktury regionu terminalnego 5' całych mRNA. Otrzymane wyniki potwierdzają występowanie poszczególnych elementów strukturalnych w cząsteczkach pełnej długości. Może to stanowić przesłankę do dalszych badań roli tych elementów strukturalnych w mRNA, sugerując zarazem ich istotne znaczenie dla prawidłowego przebiegu procesów komórkowych związanych z regulacją transkrypcji mRNA p53 oraz regulacją inicjacji translacji.

4.2.4. Mapowanie dostępności RNA w regionie U41:U81

Niezwykle ważne było zaproponowanie sposobu zwijania odcinka mRNA U41:U81. Jest to region silnie zachowawczy ewolucyjnie (rys. 17), co może świadczyć o jego istotnej roli funkcjonalnej. W mRNA ludzkim region homologiczny do odcinka U45:A83 przybiera formę spinki do włosów U180:A218 [Błaszczuk & Ciesiołka, 2011] o przewidywanej entalpii swobodnej $\Delta G = -11,1$ kcal/mol. Spinka ta jest miejscem oddziaływania z białkiem HDM2 (ang. *human/murine double minute 2 protein*) [Candeias *et al.* 2008], głównym regulatorem poziomu p53 w komórce. Wykazano, że zmiany nukleotydów w spince uniemożliwiają wiązanie białka HDM2 do mRNA, wpływając tym samym na poziom białka p53 w komórce [Candeias *et al.* 2008]. Do spinki wiąże się również białko HDMX (ang. *human/murine double minute 4 protein*), które promuje interakcję mRNA-HDM2 i indukcję syntezy p53 [Malbert-Colas, *et al.* 2014]. Dotychczas wygenerowano liczne modelowe myszy transgeniczne [Tackmann & Zhang, 2017]. Na podstawie badań nad myszami wnioskowano o wpływie oddziaływania Mdm2-p53 na prawidłowe funkcjonowanie organizmu, pomimo że w przypadku myszy nie opisano w literaturze samego oddziaływania białka Mdm2 z mRNA p53, a interakcja ta jest domniemana na podstawie oddziaływania ludzkiego HDM2 z mRNA p53.

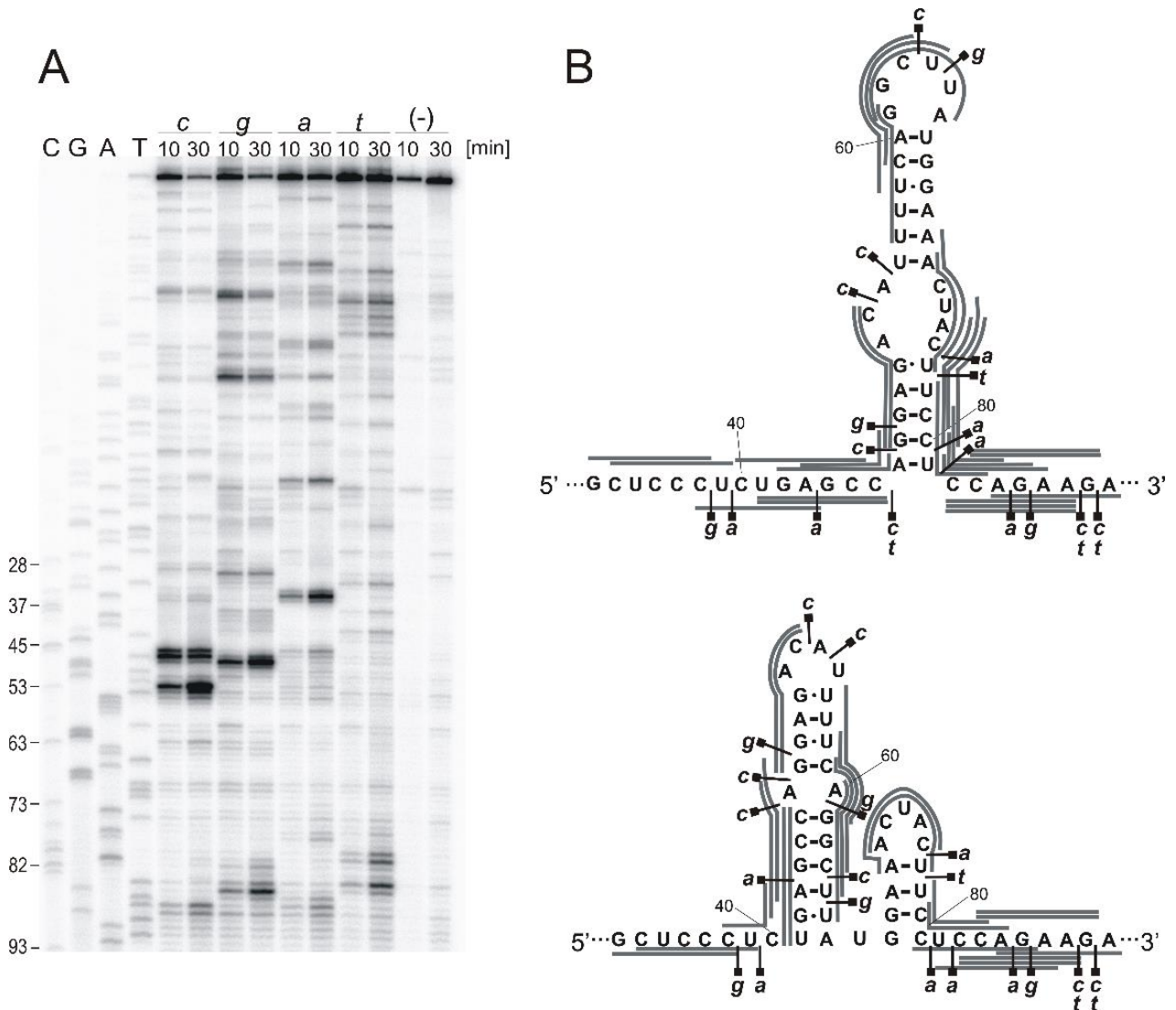
Na podstawie wysokiego podobieństwa regionu U41:U81 pomiędzy mRNA ludzkim i mysim można przypuszczać, że region ten w mysim mRNA przybiera homologiczną strukturę typu spinki do włosów. Jednakże, po przeprowadzeniu analizy *in silico* okazuje się, że struktura termodynamicznie najstabilniejsza to dwa małe elementy typu spinki do włosów U41:A66 i G68:C80, o przewidywanej entalpii swobodnej wynoszącej odpowiednio -8 kcal/mol oraz -1,4 kcal/mol. Wartość entalpii swobodnej całego odcinka U41:U81 o strukturze drugorzędowej dwóch spinek wynosi -12,9 kcal/mol. Okazało się jednak, że wśród mniej stabilnych struktur drugorzędowych regionu terminalnego 5' mRNA p53 myszy wygenerowanych komputerowo znajduje się wariant zawierający w odcinku U41:U81 motyw strukturalny typu spinki do włosów A47:U81 o przewidywanej entalpii swobodnej $\Delta G = -6,3$ kcal/mol. Istotna różnica w przewidywanych wartościach energii ΔG homologicznych spinek ludzkiej (-11,1 kcal/mol) i mysiej (-6,3 kcal/mol) spowodowana jest zmianą trzech pozycji nukleotydowych w mRNA mysim: C45, C82 i C83 (rys. 24). W mRNA ludzkim w tych pozycjach znajdują się odpowiednio reszty urydyny, guanozyny oraz adenozyne. Powyższe zmiany ewolucyjne powodują, że podstawa potencjalnej mysiej spinki A47:U81 jest skrócona o dwie pary nukleotydowe w stosunku do spinki ludzkiej, co powoduje istotne obniżenie energii ΔG . Ponadto, ΔG może zostać dodatkowo obniżona poprzez zamianę reszty

nukleotydowe występują losowo [Wrzesiński *et al.* 2000]. Oligomery DNA przyłączają się do dostępnych regionów mRNA, tworząc hybrydy RNA-DNA, których występowanie zostaje potwierdzone poprzez hydrolizę RNA za pomocą RNazy H. Podejście takie zostało zastosowane wcześniej dla ludzkiego mRNA p53 [Górska *et al.* 2013]. Zakładano, że porównanie wzoru dostępności mRNA do hybrydyzacji oligomerów z proponowanymi zwinięciami regionu U41:U81 pozwoli określić, który występuje w mysim mRNA z większym prawdopodobieństwem. Wyniki przeprowadzonego mapowania zaprezentowano na rys. 25.

W przypadku, w którym w mRNA proponowana jest jedna spinka A47:U81, obserwuje się hybrydyzację oligonukleotydów do pętli apikalnej i wybrzuszeń bocznych oraz bardzo silną hybrydyzację do podstawy spinki i przylegających do niej regionów jednoniciowych. Występowanie hybryd DNA-RNA w obrębie podstawy spinki może być spowodowane jej obniżoną stabilnością, co może być następstwem występowania niekanonicznej pary GU oraz faktem, że oprócz niej w trzonie spinki występują cztery pary nukleotydowe, spośród których jedynie dwie pary tworzą silne oddziaływania typu GC. Ponadto, w regionie dwuniciowym, zlokalizowanym pomiędzy wybrzuszeniami bocznymi a pętlą apikalną, obserwuje się pojedyncze oddziaływania DNA-RNA. Można to uzasadnić tym, że opisywany rejon charakteryzuje się mniejszą dostępnością w stosunku do trzonu spinki, co spowodowane jest występowaniem większej ilości par nukleotydowych. Obserwowane oddziaływania są zgodne ze schematem przewidzianym dla mapowania dostępności RNA dla oligomerów.

Drugi wariant związania się badanego odcinka mRNA przybiera formę dwóch małych spinek. Analizując dostępność badanego fragmentu RNA do hybrydyzacji oligomerów DNA można zauważyć, że oddziaływania RNA-DNA występują w regionach jednoniciowych zlokalizowanych u podstawy struktur oraz w regionie pętli apikalnej małej spinki G68:C80, co jest zgodne z regułami hybrydyzacji oligomerów do RNA. Nie mniej jednak, można również zaobserwować silną dostępność dla oligomerów w obrębie regionów dwuniciowych prawie całej większej spinki U41:A66, pomimo że region pomiędzy pętlą apikalną i podstawą zawiera jedynie jedno wybrzuszenie dwustronne. Górny segment spinki składa się z czterech par nukleotydowych, spośród których dwie stanowią pary niekanoniczne typu GU. Znacznie większa dostępność obserwowana jest w dolnej części spinki, składającej się z pięciu par nukleotydowych. Obserwowana dostępność do hybrydyzacji i proponowana struktura drugorzędowa nie są zgodne biorąc pod uwagę reguły dostępności RNA do hybrydyzacji

[Wrzesiński *et al.* 2000]. Proponowany trzon spinki powinien stanowić stabilną strukturę, w związku z tym mniej dostępną do hybrydyzacji oligomerów. Ponadto, nie zaobserwowano wiązania oligonukleotydów w obrębie pętli apikalnej większej spinki ani w regionie łączącym obie spinki, do których powinny przyłączać się oligomery DNA.



Rys. 25. Mapowanie dostępności fragmentu U41:U81 regionu terminalnego 5' mRNA p53 do hybrydyzacji oligomerów DNA. Do określenia miejsc wiązania wykorzystano biblioteki kombinatoryczne oligomerów DNA oraz hydrolizę hybryd RNA-DNA przy użyciu RNazy H. (A) Autoradiogram uzyskany w wyniku reakcji mapowania fragmentu RNA U41:U81, analizowanej za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem startera znakowanego radioizotopowo. Reakcję prowadzono w czasie 10 i 30 minut. C, G, A, T: sekwencjonowanie. (B) Proponowane motywy strukturalne mRNA z zaznaczonymi miejscami wiązania oligomerów (szare linie). Miejsca cięcia zaznaczono czarnymi grotami. c, g, a, t: biblioteki kombinatoryczne DNA.

Na podstawie powyższych informacji można wnioskować, że najbardziej prawdopodobnym motywem strukturalnym występującym w odcinku U41:U81 regionu terminalnego 5' mysiego mRNA p53 jest pojedyncza spinka do włosów A47:U81. W tym przypadku wzór hybrydyzacji oligomerów do poszczególnych elementów zaproponowanej struktury był zgodny z oczekiwanym, w przeciwieństwie do wzoru hybrydyzacji obserwowanego dla dwóch mniejszych spinek. Silne wiązanie oligomerów DNA do trzonu większej spinki oraz brak wiązania do jej pętli apikalnej są niezgodne z możliwością występowania dwóch mniejszych spinek w regionie U41:U81. Analogiczny eksperyment mapowania przeprowadzono wcześniej dla ludzkiego mRNA p53 (rys. 26) [Górska *et al.* 2013]. Zaproponowany wzór hybrydyzacji oligomerów DNA do ludzkiego mRNA w analizowanym regionie jest zbliżony do wzoru określonego dla spinki A47:U81 w mysim mRNA. W obu przypadkach obserwowane jest wiązanie oligomerów DNA w obrębie pętli apikalnej oraz podstawy spinki. Większa liczba oligonukleotydów przyłączających się do podstawy mysiej spinki A47:U81 w stosunku do oligomerów wiążących się do podstawy spinki ludzkiej może być uwarunkowana mniejszą stabilnością tego regionu. Wynika ona ze zamiany reszt nukleotydowych zlokalizowanych u podstawy ludzkiej spinki, co w efekcie prowadzi do skrócenia trzonu spinki mysiej w stosunku do spinki ludzkiej.



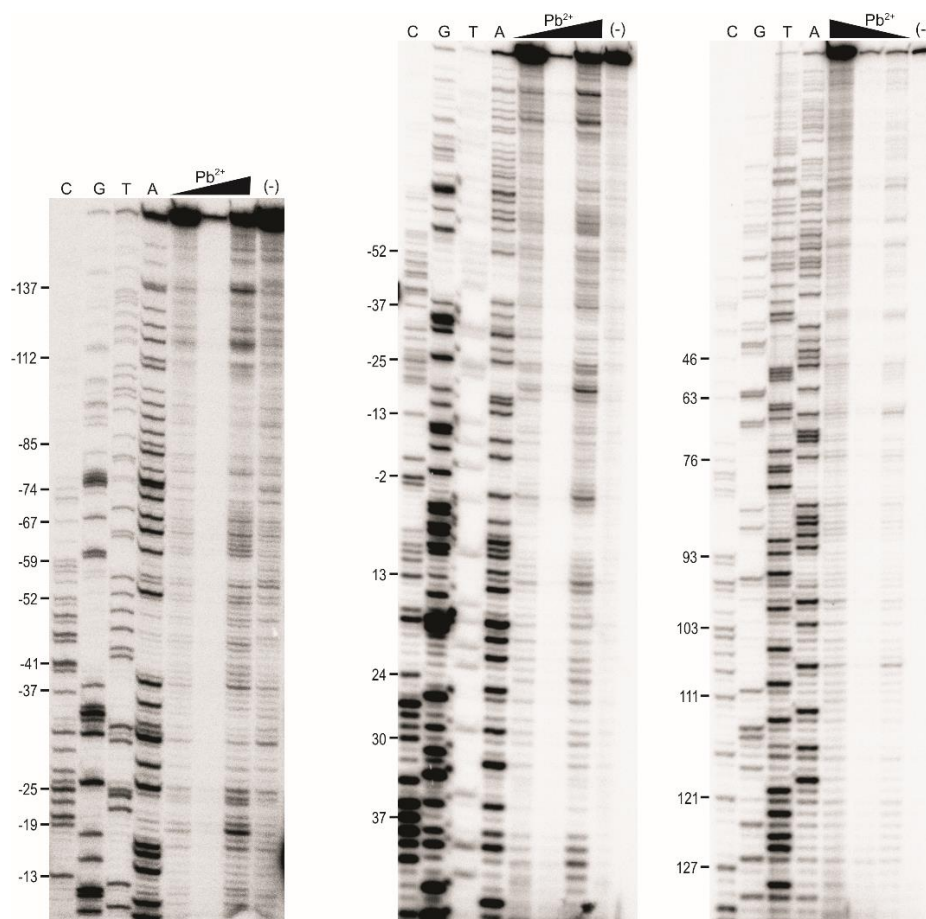
Rys. 26. Spinka U180:A218 w ludzkim mRNA p53, odpowiedzialna za wiązanie białka HDM2, z zaznaczonymi miejscami wiązania oligomerów DNA (oznaczone szarymi liniami). Miejsca wiązania oligomerów DNA wskazują regiony RNA dostępne do hybrydyzacji. Linia przerywana wskazuje, że dany oligonukleotyd wiąże się do sekwencji występującej poza zaprezentowaną spinką [na podstawie: Górska *et al.* 2013].

4.2.5. mRNA(-166)

Cząsteczka mRNA(-166) jest transkryptem obejmującym 166-nukleotydowy region niekodujący 5' mRNA p53 oraz, analogicznie do mRNA(-122) oraz mRNA(-247), 1164-nukleotydową sekwencję kodującą. Opisywany transkrypt nie został zidentyfikowany w reakcji 5'RACE, nie mniej jednak, w dotychczas opublikowanych pracach, w których brano pod uwagę region niekodujący 5' mRNA p53 w komórkach mysich, analizowano mRNA zawierający 5'UTR o długości 166 nukleotydów. W związku z rozbieżnością w numeracji, spowodowaną wyborem innego kodonu AUG jako kodonu inicjacyjnego, w literaturze region ten jest opisywany jako 157-nukleotydowy [Kim *et al.* 2013]. Opisywany region niekodujący jest najczęściej wykorzystywanym w pracach badawczych dotyczących komórek mysich. Z tego powodu postanowiono przeprowadzić badania mające na celu zaproponowanie modelu struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' obejmującego 166-nukleotydowy 5'UTR celem sprawdzenia, czy poszczególne elementy jego struktury drugorzędowej zostają zachowane w stosunku do obecnych w mRNA(-122). Zaplanowano i przygotowano dsDNA stanowiące matrycę do syntezy mRNA(-166) poprzez wykorzystanie reakcji PCR, a dokładny opis jej syntezy znajduje się w rozdziale „6. Materiały i metody”. Analizę struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-166) przeprowadzono wykorzystując metodę cięć indukowanych obecnością jonów ołowiu, a uzyskane autoradiogramy zaprezentowano na rys. 27.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano model struktury drugorzędowej badanego regionu terminalnego (rys. 28) obejmujący przynajmniej siedem elementów strukturalnych typu spinki do włosów: U(-157):A(-111) ($\Delta G = -5,6$ kcal/mol), C(-105):G(-79) ($\Delta G = -12,4$ kcal/mol), G(-77):C(-57) ($\Delta G = -4,6$ kcal/mol), C(-51):G9 ($\Delta G = -13,9$ kcal/mol), G18:C37 ($\Delta G = -2,3$ kcal/mol), C38:G69 ($\Delta G = -8,7$ kcal/mol) oraz A70:U153 ($\Delta G = -17,3$ kcal/mol). Zaobserwowano, że struktura regionu C(-105):G9 jest bardzo zbliżona do struktury analogicznego fragmentu występującego w modelu struktury drugorzędowej mRNA(-122). Zauważono, że struktura spinki G(-77):C(-57) pozostaje bez zmian, w spince C(-105):G(-79) zaobserwowano skrócenie podstawy spinki o jedną parę reszt nukleotydowych, w elemencie zawierającym kodon AUG1 C(-51):G9 występują drobne rearanżacje, efektem których jest zmniejszenie stabilności spinki, natomiast spinka C38:G69 odpowiada elementowi U41:A65, występującemu w modelu mRNA(-122) jako alternatywne zwinięcie regionu U41:U81. Podstawa spinki C38:G69 została wydłużona o dwie pary nukleotydowe oraz reszty

nukleotydowe cytydyny i urydyny, stanowiące jednostronne wybrzuszenia boczne w stosunku do występującej w mRNA(-122) spinki U41:A65.

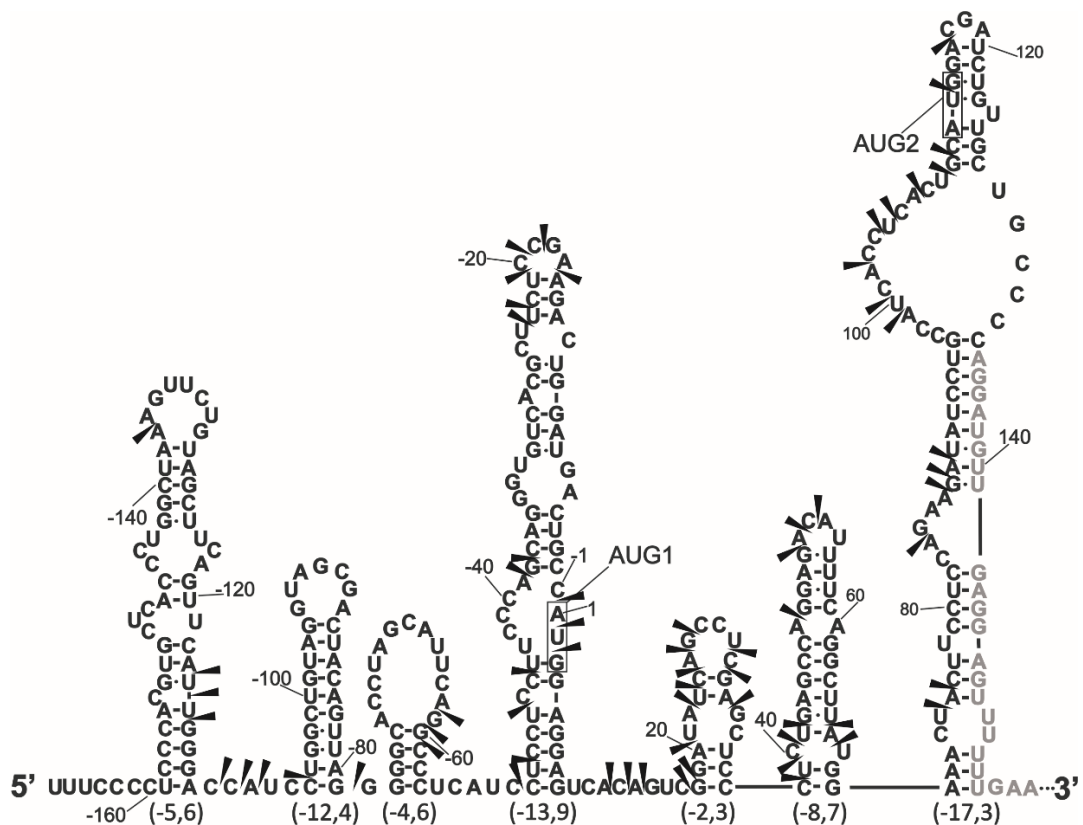


Rys. 27. Autoradiogramy uzyskane w wyniku przeprowadzonej reakcji cięcia mRNA(-166) indukowanego jonami Pb^{2+} , analizowane za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem starterów znakowanych radioizotopowo. Po lewej stronie zaznaczono wybrane reszty nukleotydowe. Oznaczenia: czarne trójkąty: zmieniające się stężenie jonów Pb^{2+} , (-): reakcja kontrolna, C, G, T, A: sekwencjonowanie.

W zaproponowanym modelu na końcu 3' analizowanego regionu mRNA(-166) znajduje się spinka A70:U153. Podstawa spinki zbudowana jest z dziewiętnastu par nukleotydowych, oddzielonych wybrzuszeniami jedno- i dwustronnymi. Motyw A70:U153 w swojej strukturze zawiera motyw bardzo podobny do spinki A89:U140, występującej w mRNA(-122) i mRNA(-247): region C97:U109, poprzedzający kodon AUG2 jest jednoniciowy, a sparowanie regionów A89:G96 i C133:U140 jest identyczne jak w pozostałych modelach. Drobne zmiany zaobserwowano w regionie U113:C132, efektem których są: powstanie pętli apikalnej złożonej z trzech reszt nukleotydowych, wydłużenie

prawostronnego wybrzuszenia bocznego do pięciu reszt nukleotydowych oraz całkowite sparowanie reszt kodonu inicjacyjnego AUG2, choć nukleozydy U i G tworzą mniej stabilne pary niekanoniczne GU.

Ponadto zaobserwowano, że zaproponowane zwinięcie regionu U41:U81 umożliwiłoby powstanie spinki A47:U81, opisanej we wcześniejszych modelach mRNA(-122) oraz mRNA(-247), bez naruszenia pozostałych motywów strukturalnych.

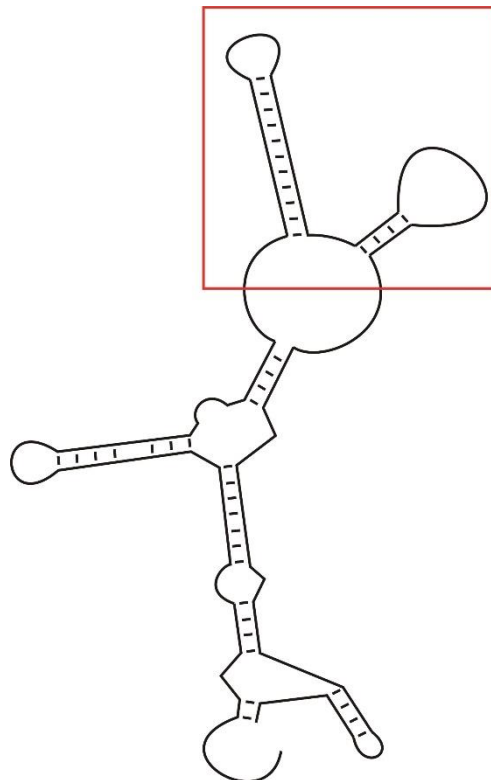


Rys. 28. Model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-166). Pierwsza reszta nukleotydowa regionu kodującego została oznaczona jako 1, reszty nukleotydowe zlokalizowane w obrębie regionu niekodującego zaznaczono numerami ujemnymi. Pod każdym motywem strukturalnym, w nawiasach, znajdują się obliczone entalpie swobodne ΔG , wyrażone w kcal/mol. Czarne groty wskazują miejsca cięcia jonami Pb^{2+} , kolorem szarym oznaczono miejsce wiązania startera. Kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2 zaznaczono czarną ramką.

W zaproponowanym modelu mRNA(-166) występują również motywy niezaobserwowane w modelach mRNA(-122) i mRNA(-247): region G18:C37 przyjmuje strukturę spinki, której trzon złożony z pięciu par nukleotydowych jest oddzielony dwu-nukleotydowymi pętlami bocznymi oraz ze spinki U(-159):A(-111), zlokalizowanej

na końcu 5', zbudowanej z ośmionukleotydu pętli apikalnej oraz z czternastu par nukleotydowych, oddzielonych pętlami bocznymi.

Zaproponowany model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA (-166) porównano do modelu struktury analogicznego regionu niekodującego 5' opublikowanego w 2013 roku, nazwanego p53(1-157), wygenerowanego za pomocą metod *in silico* (rys. 29) [Kim *et al.* 2013]. Okazało się, że jedynie dwa elementy strukturalne C(-105):G(-79) i G(-77):C(-57) są takie same. Pozostała część struktury mRNA p53(1-157) istotnie różni się od modelu mRNA(-166). W modelu mRNA p53(1-157) zaproponowano parowanie regionów 5' i 3', czego nie zaobserwowano w mRNA(-166). Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że p53(1-157) obejmuje jedynie region niekodujący, część kodująca mRNA została pominięta, a model wygenerowano metodą *in silico*. Różnice te mogą być powodem rozbieżności w zaproponowanych strukturach.



Rys. 29. Model struktury drugorzędowej 157-nukleotyduowego regionu niekodującego 5' p53(1-157). Czerwoną ramką zaznaczono spinki analogiczne do elementów zidentyfikowanych w mRNA(-166). [Na podstawie: Kim *et al.* 2013]

4.3. Struktura trzeciorzędowa oraz właściwości termodynamiczne regionu terminalnego 5' mRNA(-122) oraz jego wybranych elementów strukturalnych

Kolejnym celem mojej pracy było zaproponowanie modelu struktury trzeciorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122) a także, dodatkowo, modeli struktur wybranych elementów zlokalizowanych w tym regionie: spinki C(-51):G9 oraz fragmentu U41:U140. W spince C(-51):G9 zlokalizowany jest kodon inicjacyjny AUG1, od którego syntetyzowane jest białko p53. Struktura tej spinki może odgrywać istotną rolę w procesie inicjacji translacji. Natomiast odcinek U41:U140 zawiera spinkę zawierającą kodon inicjacyjny AUG2, od którego syntetyzowana jest izoforma Δ 41p53. Odcinek ten zawiera także spinkę A47:U81 i jego analiza może stanowić dodatkowe potwierdzenie występowania w mRNA spinki A47:U81 zamiast dwóch spinek U41:A66 i G68:C80 (problem ten został opisany wcześniej w niniejszej pracy, w rozdziale „4.2.4. Mapowanie dostępności RNA w regionie U41:U81”). Ponadto, dla każdego badanego fragmentu przeprowadzono analizę jego właściwości termodynamicznych. Aby zrealizować powyższe cele wykorzystano małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS, ang. *small-angle X-ray scattering*), a jego wyniki, czyli parametry strukturalne (R_g , D_{max} , V) i niskorozdzielcze struktury (modele *ab initio*), porównywałam z modelami struktur trzeciorzędowych, wygenerowanych przy użyciu programu RNA Composer [Popenda *et al.* 2012; Antczak *et al.* 2016]. W następnym kroku zebrano widma dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) w szerokim zakresie temperatur, umożliwiające analizę parametrów termodynamicznych badanych elementów strukturalnych. Przygotowanie doświadczeń oraz analizę wyników wykonywano we współpracy z doktorem Kamilem Szpotkowskim.

Do modelowania komputerowego struktury trzeciorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122) oraz wybranych elementów strukturalnych wykorzystano program RNA Composer, pozwalający na automatyczne generowanie struktur trzeciorzędowych RNA. Modelowanie struktur przebiega na podstawie wprowadzonej przez użytkownika struktury drugorzędowej RNA, zapisanej w notacji kropkowo-nawiasowej. Struktura ta jest dzielona na mniejsze fragmenty, zawierające nakładające się na siebie kanoniczne pary zasad. Następnie jest generowana struktura trzeciorzędowa pojedynczych fragmentów, wybierana na podstawie homologii struktury drugorzędowej i sekwencji spośród struktur RNA zdeponowanych w bazie danych PDB (Protein Data Bank) [Biesiada *et al.* 2016]. Modelowanie tych struktur jest możliwe poprzez połączenie programu RNA Composer z bazą danych RNA FRABASE [Popenda *et al.* 2008; Popenda *et al.* 2010]. Po wygenerowaniu

struktur trzeciorzędowych dla wszystkich fragmentów zostają one nałożone na siebie automatycznie, w efekcie czego powstaje model struktury trzeciorzędowej całej cząsteczki [Biesiada *et al.* 2016].

Analizę właściwości termodynamicznych regionu terminalnego 5' mRNA(-122) oraz wybranych elementów strukturalnych przeprowadzono wykorzystując spektroskopię dichroizmu kołowego. Dichroizm kołowy jest opisywany jako niejednakowa absorpcja światła spolaryzowanego kołowo lewoskrętnie (ang. *left-handed*) i prawoskrętnie (ang. *right-handed*) [Greenfield *et al.* 2006] przez cząsteczkę aktywną optycznie (musi zawierać chromofor i wykazywać chiralność) [Langeveld-Voss, *et al.* 2000]. Ogromną zaletą zastosowania spektroskopii dichroizmu kołowego jest możliwość monitorowania zmian strukturalnych zachodzących w cząsteczce pod wpływem zmiany temperatury, siły jonowej lub pH [Dodero *et al.* 2011]. Na podstawie otrzymanych wyników możliwe jest wyznaczenie entalpii swobodnej (ΔG , entalpia swobodna Gibbsa), entropii (ΔS) oraz entalpii (ΔH) [Rinnenthal *et al.* 2010], a także temperatur topnienia. Dodatkową zaletą pomiarów CD jest mała ilość materiału niezbędna do wykonania pomiaru [Dodero *et al.* 2011]. Spektroskopia dichroizmu kołowego ma również swoje wady. W przypadku kwasów nukleinowych brak jest możliwości pozyskania informacji o szczegółach dotyczących struktur badanych cząsteczek [Dodero *et al.* 2011].

Technika małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS, ang. *small-angle X-ray scattering*)

SAXS jest to technika umożliwiająca otrzymanie parametrów strukturalnych takich jak promień żyracji (R_g), wielkość maksymalna (D_{max}), objętość (V) oraz niskorozdzielczych struktur cząsteczek znajdujących się w roztworze [Cantara *et al.* 2017]. Wykorzystuje się ją głównie do określania struktury białek, jednak w ostatnim czasie jest coraz powszechniejsza w badaniach strukturalnych RNA [Chen *et al.* 2016]. Wykorzystując tę technikę określono m. in. strukturę w roztworze elementu IRES wirusa HCV [Perard *et al.* 2013], a także strukturę kompleksu Dcp2-Dcp1, usuwającego kap z końca 5' mRNA, w zaktywowanej konformacji [Valkov *et al.* 2016].

Niewątpliwymi zaletami techniki SAXS są:

- możliwość uzyskania niskorozdzielczych struktur białek, RNA i DNA, a także informacji o ich konformacji, interakcji i tworzonych kompleksach w roztworze. Co ważne, pomiary SAXS można prowadzić w szerokim zakresie temperatur, ciśnień oraz składników buforów. [Putnam *et al.* 2007],
- pozwala na badanie struktur dynamicznych i labilnych [Putnam *et al.* 2007],
- szeroki zakres wielkości badanych cząsteczek: od małych peptydów i fragmentów kwasów nukleinowych do całych wirusów oraz dużych, gigadaltonowych kompleksów [Gräwert *et al.* 2020],
- stosunkowo łatwe przygotowanie próbki (w porównaniu do krystalografii, gdzie niezbędne jest otrzymanie kryształu) i szybki pomiar [Putnam *et al.* 2007] – obecny postęp w budowie źródeł synchrotronowych umożliwia analizę procesów zmiany struktury w czasie 0.01s.

Wadą techniki SAXS jest fakt, że otrzymana struktura jest niskorozdzielcza, w związku z czym nie jest możliwe określenie na jej podstawie szczegółów strukturalnych badanych cząsteczek. Aby otrzymać dokładny model uzyskaną niskorozdzielczą strukturę należy zestawić z modelami komputerowymi lub strukturami wysokorozdzielczymi otrzymanymi za pomocą innych metod, takich jak krystalografia, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*) lub mikroskopia krioelektronowa (cryoEM, ang. *electron cryomicroscopy*) [Putnam *et al.* 2007, Shin *et al.* 2016].

W trakcie pomiarów źródło promieniowania rentgenowskiego produkuje wiązkę promieniowania. Obecnie najczęściej stosuje się źródła synchrotronowe, charakteryzujące się wysoką intensywnością, kolimacją wiązki oraz przestrajalnością długości fali. Przed próbką znajduje się układ optyczny, którego zadaniem jest kolimacja wiązki. Wiązka po przejściu przez próbkę trafia na detektor, który dzięki dużej intensywności źródła synchrotronowego może być umieszczony w znacznej odległości, dzięki czemu można zbierać dane w szerokim zakresie wektora falowego (s). Wiązka promieniowania jest rozpraszana na dyfundujących w roztworze cząsteczkach. Odległość między badaną próbką a ekranem może być różna i determinuje kąt padania promieniowania. Uzyskanie danych dotyczących tylko badanej cząsteczki wiąże się z koniecznością usunięcia sygnału pochodzącego od buforu, co jest możliwe dzięki różnej gęstości elektronowej białka/RNA i buforu [Chen & Pollack,

2016]. Wynikiem uzyskanym w trakcie eksperymentu jest zależność $I(s)$ do s . Przy czym I reprezentuje intensywność wzoru rozpraszania (ang. *scattering pattern*), s symbolizuje amplitudę wektora rozpraszania (ang. *scattering vector*) lub transferu momentu pędu (ang. *momentum transfer*) [Henderson, 2011].

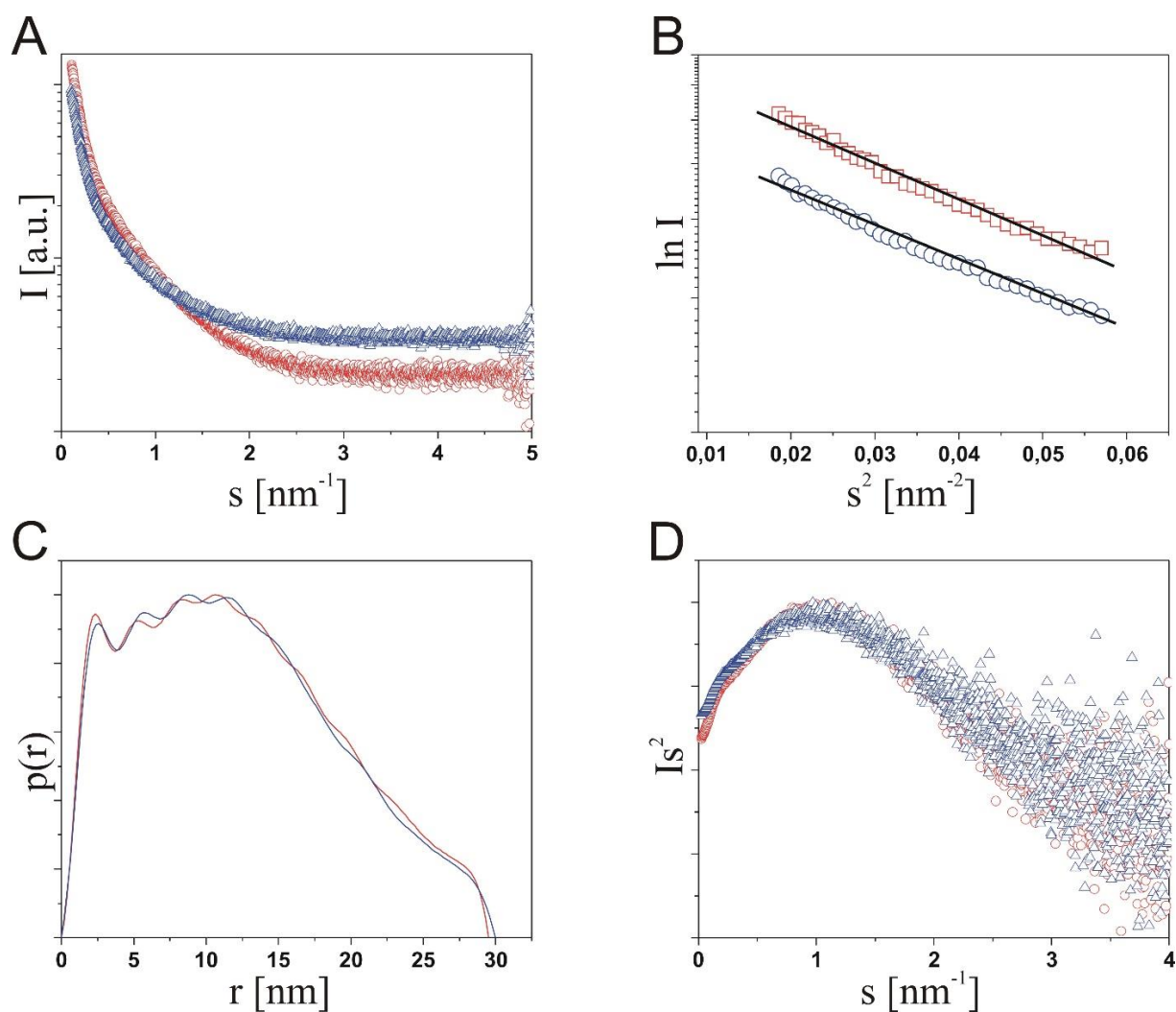
Analiza danych SAXS obejmuje :

- wykres Guiniera (ang. *Guinier plot*) obrazujący logarytm naturalny intensywności rozpraszania $I(s)$ względem kwadratu amplitudy wektora rozpraszania (s) [Henderson, 2011]. Na wykresie powinna być widoczna linia prosta, na podstawie której obliczana jest stała żyracji (R_g , ang. *radius of gyration*) oraz intensywność rozpraszania przy kącie 0° ($I(0)$, ang. *forward (or zero-angle) scattered intensity*). R_g dostarcza informacji o rozkładzie masy w cząsteczce, opisuje się ją jako wartość średnią kwadratową wszystkich cząsteczek od osi rotacji. Cząsteczki o takiej samej objętości, lecz różnych kształtach mają różną wartość R_g . Wartość $I(0)$ jest wykorzystywana do obliczania masy cząsteczkowej [Jacques & Trewhella, 2010].
- Wykres Kratky'ego (ang. *Kratky plot*) [$s^2I(s)$ jako funkcja od s]. Na podstawie wykresu dokonuje się oceny sfałdowania oraz dynamiki badanej cząsteczki [Putnam *et al.* 2007].
- Funkcje odległości wewnątrzcząsteczkowych ($p(r)$, ang. *interatomic distance distribution function*) odnosi się do odległości pomiędzy elektronami w cząsteczkach rozpraszających promieniowanie w badanej próbce. $p(r)$ oblicza się wykonując transformatę Fouriera krzywej rozpraszania (ang. *scattering curve*). Na podstawie krzywej na wykresie można określić ogólny kształt badanej cząsteczki [Putnam *et al.* 2007].

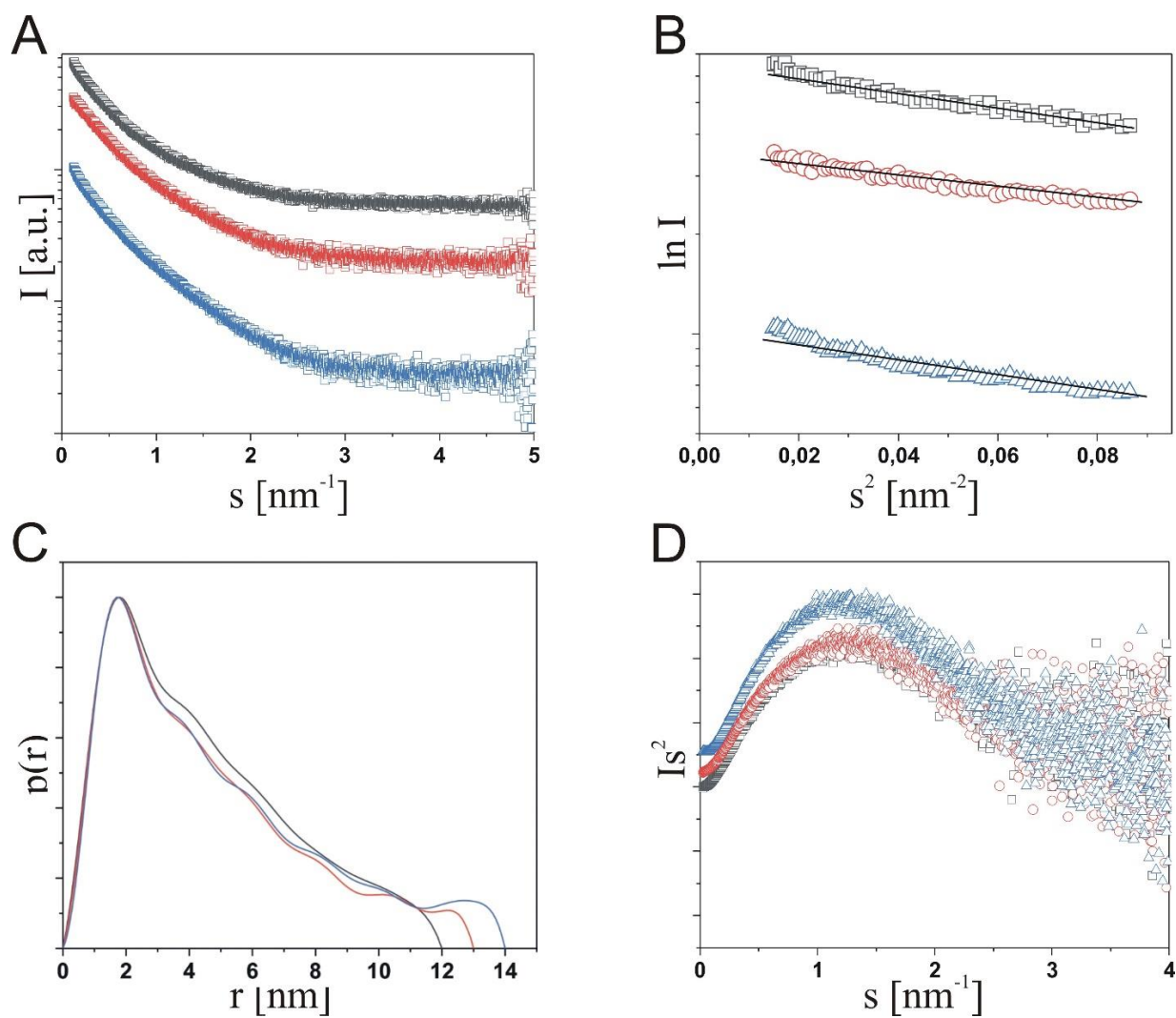
Ostatnim etapem analizy danych SAXS jest wygenerowanie *ab initio* struktury niskorozdzielczej. Można tego dokonać za pomocą programu DAMMIN lub DAMMIF. W obu programach jest wykorzystywane kulkowe modelowanie *ab initio* (ang. *ab initio bead modeling*) [Mertens & Svergun, 2010], a niskorozdzielcza struktura przedstawiona jest w formie gęsto upakowanych kulek [Gräwert *et al.* 2020]. Uzyskany model porównuje się z modelem komputerowym lub strukturami wysokorozdzielczymi.

Analiza danych strukturalnych i modeli *ab initio* fragmentów RNA

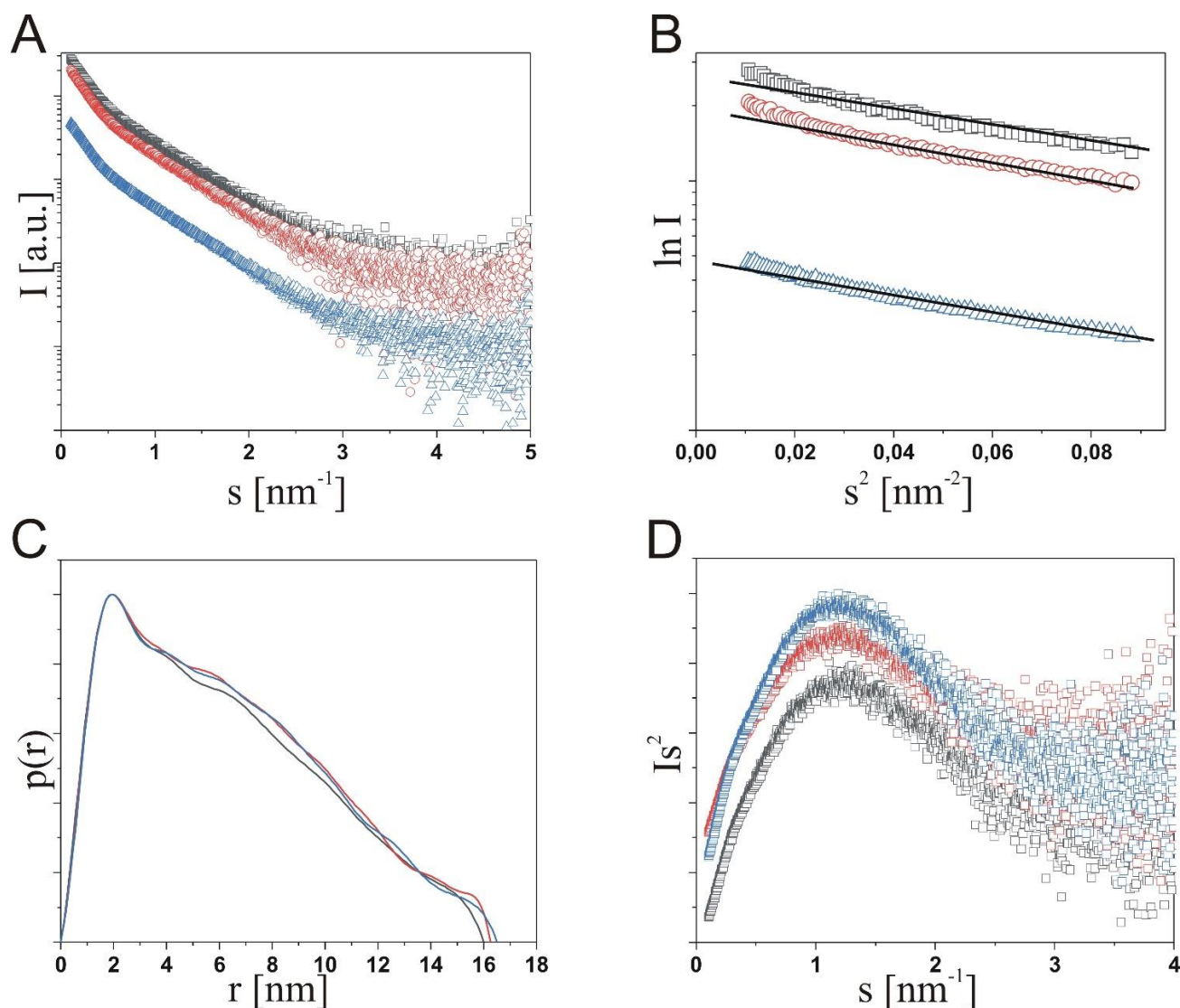
Aby określić strukturę w roztworze regionu terminalnego 5' mRNA(-122), spinki C(-51):G9 oraz fragmentu U41:U140, wykorzystano technikę SAXS. Analizę przeprowadzono przy trzech różnych stężeniach jonów magnezu: 0 mM, 2,5 mM oraz 5 mM. Jony magnezu umożliwiają utworzenie stabilnej struktury RNA poprzez odgrywanie roli ładunku kompensacyjnego do polianionowego charakteru RNA, spowodowanego przez odpychanie elektrostatyczne ściśle upakowanego szkieletu fosforanowego. Kationy odgrywają istotną rolę w redukcji odpychania oraz fałdowania RNA, dzięki czemu RNA przybiera formy aktywne [Serra *et al.* 2002]. Wyniki badań przedstawiono w formie wykresów (rys. 30, 31, 32). Podstawą wszystkich prowadzonych analiz były krzywe rozpraszania (rys. 30(A), 31(A), 32(A)). Na ich podstawie sporządzono wykres Guiniera. Bazując na wykresie Guiniera stwierdzono, że badane fragmenty mRNA p53 tworzą w roztworze układ monodispersyjny, o czym świadczy otrzymana prosta (rys. 30(B), 31(B), 32(B)). Delikatne zakrzywienie punktów na początku prostej, przy wektorze falowym s dążącym do zera ($s \rightarrow 0$), świadczy o zdolności badanych fragmentów mRNA p53 do agregacji. Odcięcie tych punktów umożliwia analizę danych pochodzących jedynie od niezagregowanych cząsteczek, przyjmujących właściwą strukturę. W zakresie Guiniera wyznaczono również promień żyracji (R_{gG}) (tab. 4). Wykazano, że zwiększanie stężenia jonów magnezu powoduje zwiększenie promienia żyracji regionu terminalnego 5' mRNA (-122) i spinki C(-51):G9. Dla fragmentu U41:U140 wykazano spadek wartości promienia żyracji wraz ze wzrostem stężenia jonów Mg^{2+} . W kolejnym etapie wyznaczono funkcje odległości wewnątrzcząsteczkowych $p(r)$ (rys. 30(C), 31(C), 32(C)). Dla spinki C(-51):G9 i fragmentu U41:U140 funkcja $p(r)$ jest asymetryczna z maksimum położonym przy $r=2$ nm, co świadczy o silnie wydłużonym kształcie cząsteczki. W przypadku regionu terminalnego 5' mRNA(-122) widoczne są cztery maksima położone przy $r=2$ nm, $r=5,5$ nm, $r=9$ nm i $r=11$ nm. Świadczy to o tym, że powierzchnia cząsteczki może mieć bardziej skomplikowany kształt. Należy zaznaczyć, że funkcja $p(r)$ w tym przypadku również jest asymetryczna, wskazując tym samym na asymetryczny kształt cząsteczki. Na podstawie funkcji $p(r)$ wyznaczono także promień żyracji oraz maksymalną wielkość cząsteczki (D_{max}). Należy zauważyć, że w trakcie pomiarów nie udało się zebrać danych dobrej jakości dla regionu terminalnego 5' mRNA(-122) przy 0 mM $MgCl_2$, w konsekwencji czego warunki te nie były brane pod uwagę w trakcie analizy tej cząsteczki. Zestawienie otrzymanych wielkości znajduje się w tabeli 4.



Rys. 30. Zastawienie danych SAXS dla regionu terminalnego 5' mRNA(-122). (A) Eksperymentalne krzywe SAXS ($\log I$ vs s) w zakresie $0,0005-5 \text{ nm}^{-1}$ w badanych stężeniach jonów magnezu (czerwony: $2,5 \text{ mM MgCl}_2$, niebieski: 5 mM MgCl_2). (B) wykres Guiniera (C) funkcja odległości wewnątrzcząsteczkowych oraz (D) wykres Kratky'ego.



Rys. 31. Zastawienie danych SAXS dla spinki C(-51):G9. (A) Eksperymentalne krzywe SAXS ($\log I$ vs s) w zakresie 0,0005-5 nm⁻¹ w badanych stężeniach jonów magnezu (czarny: 0 mM MgCl₂, czerwony: 2,5 mM MgCl₂, niebieski: 5 mM MgCl₂). (B) wykres Guiniera (C) funkcja odległości wewnątrzcząsteczkowych oraz (D) wykres Kratky'ego.



Rys. 32. Zastawienie danych SAXS dla fragmentu U41:U141. (A) Eksperymentalne krzywe SAXS ($\log I$ vs s) w zakresie $0,0005-5 \text{ nm}^{-1}$ w badanych stężeniach jonów magnezu (czarny: 0 mM MgCl_2 , czerwony: $2,5 \text{ mM MgCl}_2$, niebieski: 5 mM MgCl_2). (B) wykres Guiniera (C) funkcja odległości wewnątrzcząsteczkowych oraz (D) wykres Kratky'ego.

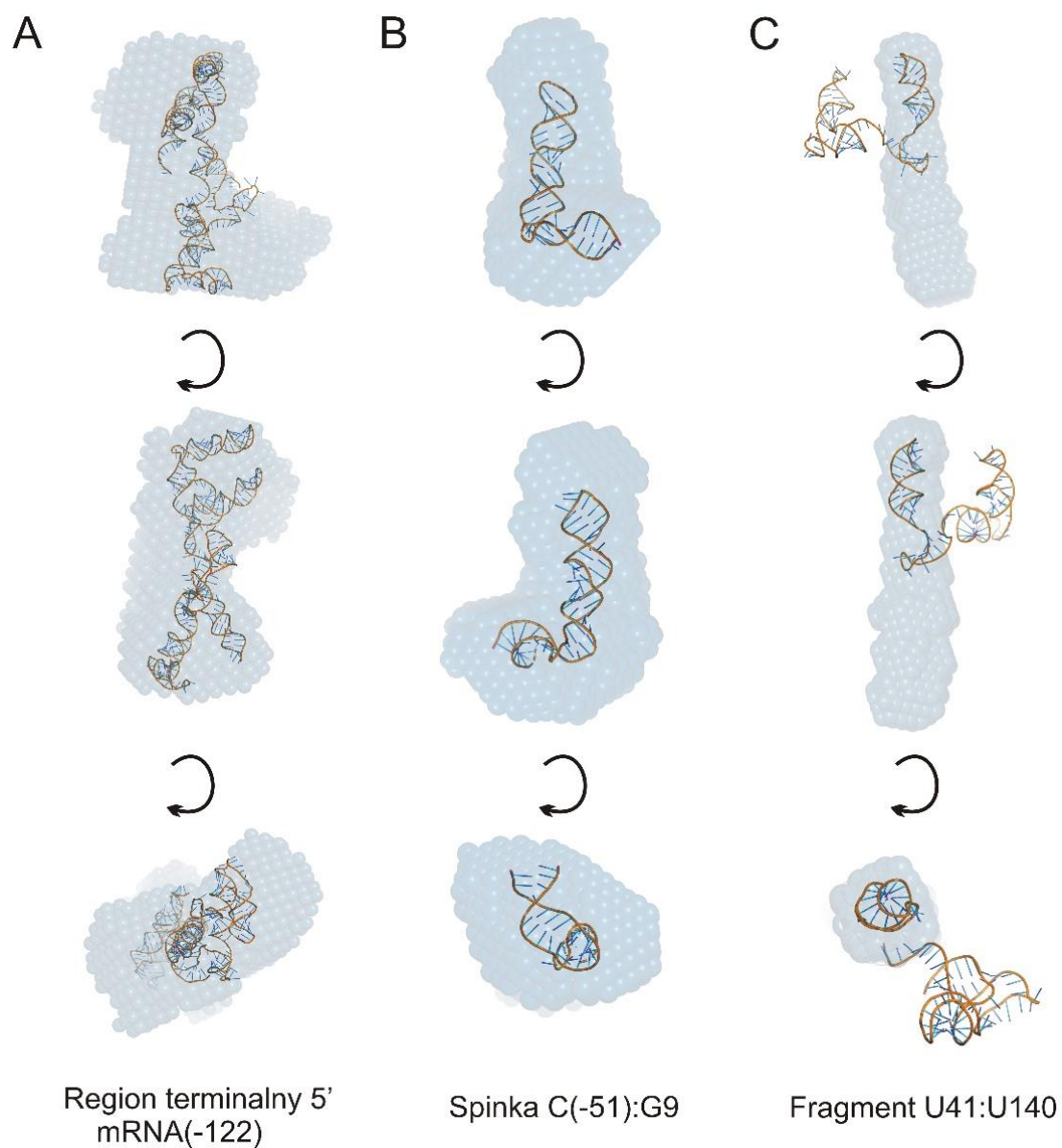
Promienie żyracji wyznaczone z funkcji odległości wewnątrzcząsteczkowych wskazują, że wzrost stężenia jonów magnezu powoduje zwiększenie wartości R_g . Na tej podstawie można wnioskować, że w czasie stabilizacji badanych odcinków RNA przez jony Mg^{2+} struktura zajmuje większą objętość. Co więcej, wyznaczone R_g odpowiadają promieniom żyracji wyznaczonym na podstawie modeli wygenerowanych przez RNA Composer (tabela 4). Różnice obserwowane pomiędzy tendencjami dla R_g wyznaczonego z zakresu Guiniera i funkcji $p(r)$ spowodowane są sposobem liczenia R_g . Wyznaczenie wartości D_{\max} umożliwiło określenie zmian wielkości cząsteczki pod wpływem wzrostu stężenia jonów Mg^{2+} . Wykazano, że wartość D_{\max} dla fragmentu U41:U141 nie zmienia się, natomiast dla regionu terminalnego mRNA(-122) oraz spinki C(-51):G9 wzrost stężenia

jonów magnezu powoduje wzrost wartości D_{\max} , a więc wzrost maksymalnej wielkości cząsteczek mRNA.

W kolejnym etapie analizy danych sporządzono wykresy Kratky'ego ($I s^2$ do s), umożliwiające monitorowanie struktury trzecio- i czwartorzędowej białek i kwasów nukleinowych (rys. 30(D), 31(D), 32(D)). W przypadku badanych fragmentów mRNA p53 stwierdzono, że wzrastające stężenia jonów magnezu Mg^{2+} powoduje wzrost ilości struktur trzeciorzędowych. Widoczne jest to jako tworzenie się wyraźnego maksimum przy $s \sim 1,2 \text{ nm}^{-1}$. Warto jednak podkreślić, że nawet przy 0 mM stężeniu jonów Mg^{2+} widoczne jest maksimum o słabej intensywności sugerujące, że jony magnezu nie są czynnikiem niezbędnym do tworzenia struktur trzeciorzędowych. Wzrost intensywności maksimum spowodowany wzrostem stężenia jonów magnezu należy tłumaczyć jako stabilizowanie struktury. Analiza zależności Kratky'ego pozwala stwierdzić, że badane fragmenty mRNA charakteryzują się gausowską dynamiką łańcucha RNA.

Na podstawie otrzymanych danych SAXS wygenerowano struktury *ab initio*, a następnie porównano je z odpowiednimi modelami wygenerowanymi przy użyciu programu RNA Composer (rys. 33). W przypadku regionu terminalnego 5' mRNA(-122) zauważono dużą zgodność w dopasowaniu modeli *ab initio* z modelami otrzymanymi z wykorzystaniem programu RNA Composer. Współczynnik dopasowania χ^2 wynosił 2,5. Biorąc pod uwagę charakterystykę sposobu uporządkowania widoczną na zależności Kratky'ego (rys. 30(D)) oraz dużą różnicę objętości pomiędzy objętością teoretyczną a doświadczalną (tabela 5) wpasowanie modeli wydaje się bardzo dobre. Należy także zaznaczyć, że zastosowane modele wygenerowane zostały z wykorzystaniem danych otrzymanych metodami teoretycznymi a nie danych krystalograficznych. W przypadku spinki C(-51):G9 współczynnik dopasowania χ^2 wynosił 1,9, co świadczy o bardzo dobrym dopasowaniu. Należy jednak podkreślić, że struktura *ab initio* charakteryzuje się znacznie większą objętością niż model teoretyczny. Takie różnice można wytłumaczyć znaczną elastycznością badanej cząsteczki, na co wskazuje charakterystyka Kratky'ego oraz parametry strukturalne. W przypadku fragmentu U41:U140 obserwowana jest duża zgodność obserwowanych parametrów strukturalnych, natomiast porównanie kształtu krzywych rozpraszania oraz modeli pokazuje dużą niezgodność. Jest to spowodowane obecnością krótkiego fragmentu o znacznej giętkości, który powoduje, że struktura jest w połowie zgięta. Model *ab initio* wskazuje, że fragment U41:U140 w roztworze przyjmuje kształt wydłużonej pałeczki. Wpasowanie struktur teoretycznych pokazuje, że model *ab initio* dokładnie opisuje

pojedyncze spinki modelu badanej cząsteczki. Obserwowane różnice pomiędzy modelami *ab initio* i modelami teoretycznymi spowodowane są dużą elastycznością łańcuchów RNA. Z drugiej strony modele teoretyczne są oparte na strukturach krystalograficznych, które charakteryzują się gęstym upakowaniem w komórce elementarnej.



Rys. 33. Zestawienie modeli trzeciorzędowych analizowanych fragmentów mRNA p53: (A) Region terminalny 5' mRNA(-122), (B) spinka C(-51):G9, (C) fragment U41:U140. Dla każdego modelu zaprezentowano trzy rzuty zaproponowanych modeli.

Tabela 4. Porównanie danych strukturalnych dla analizowanych fragmentów mRNA p53.

Fragment	R_{gG} [nm]			R_g [nm]			R_{gt} [nm]	D_{max} [nm]			V_t	V_{exp}
	0	2.5	5	0	2.5	5		0	2.5	5		
Stężenie jonów Mg^{2+}	0	2.5	5	0	2.5	5		0	2.5	5		
Fragment U41:U140	5.05	4.98	4.91	5.05	5.05	5.15	5.498	16.00	15.50	16.50	29590	32680
Spinka C(-51):G9	4.01	4.18	4.55	3.96	3.76	4.08	3.491	14.00	13.00	14.00	17720	18952
Region terminalny 5' mRNA(-122)	-	9.78	10.4	-	9.78	10.4	9.545	-	30.00	32.50	94110	99982

R_{gG} – promień żyracji obliczony z zakresu Guiniera,

R_g – promień żyracji obliczony z funkcji odległości wewnątrzcząsteczkowych $p(r)$.

R_{gt} – promień żyracji wyznaczony dla modelu z RNAcomposer.

V_t – objętość teoretyczna [\AA^3]

V_{exp} – objętość wyliczona z eksperymentu [\AA^3]

Tabela 5. Porównanie objętości teoretycznych oraz wyznaczonych z danych SAXS dla analizowanych fragmentów mRNA p53.

Fragment	M_t	M_0	$M_{2.5}$	M_5
Fragment U41:U140	62421.9	65510	68010	69197
Spinka C(-51):G9	18575	20124	21245	21253
Region terminalny 5' mRNA(-122)	99858.5	-	101925	101978

M_t – masa cząsteczkowa wyliczona z sekwencji [Da]

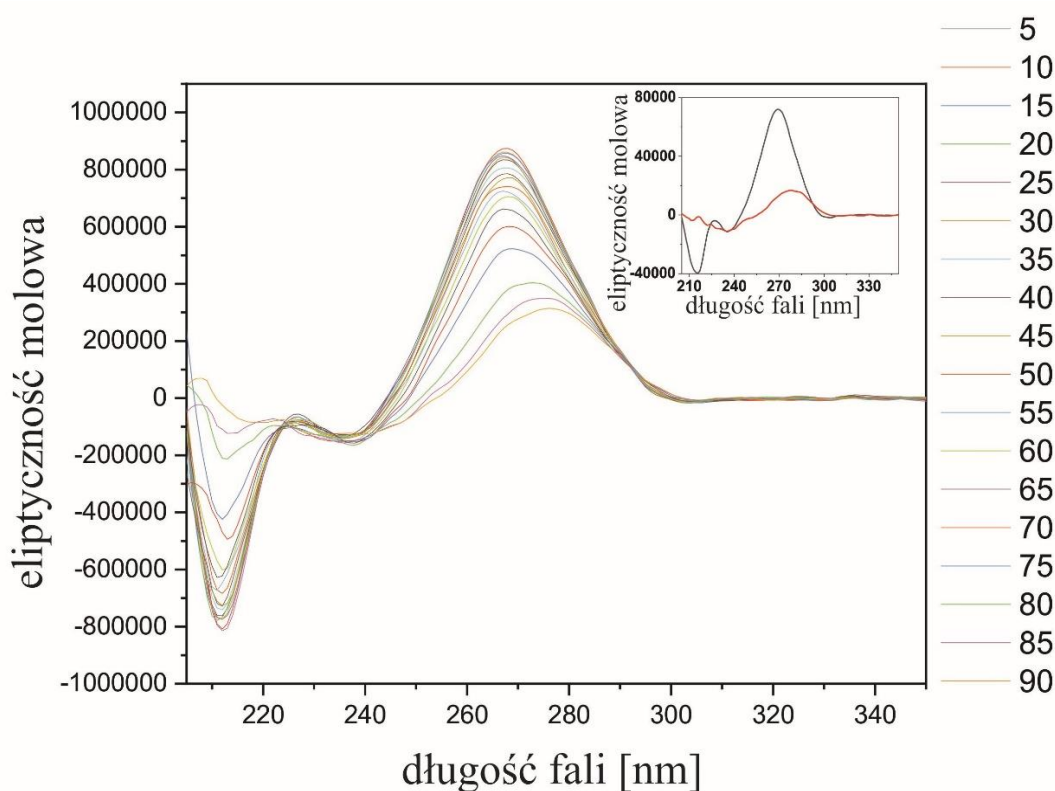
M_0 – masa wyliczona z eksperymentu przy stężeniu $MgCl_2$ 0 mM [Da]

$M_{2.5}$ – masa wyliczona z eksperymentu przy stężeniu $MgCl_2$ 2,5 mM [Da]

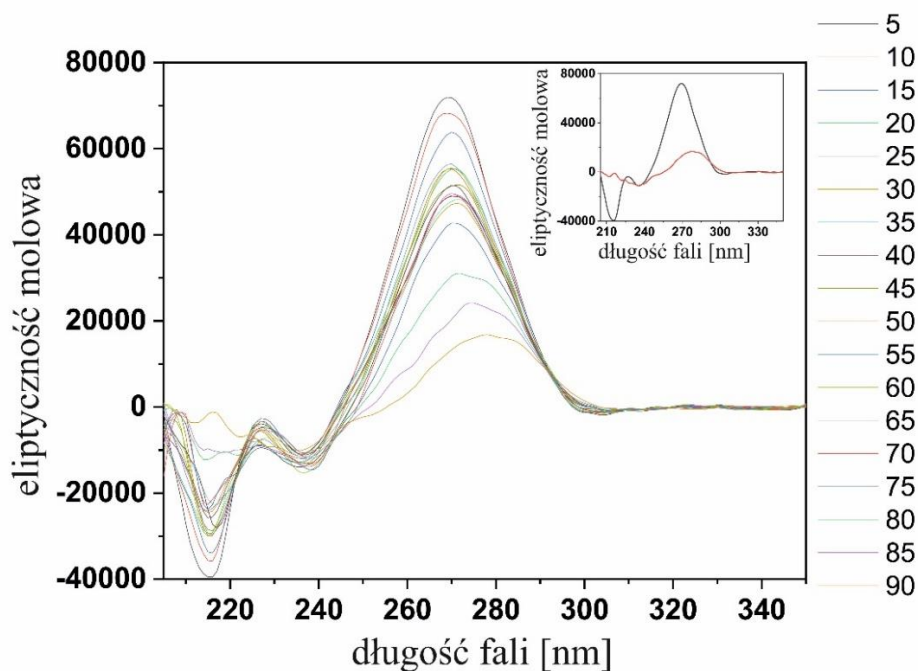
M_5 – masa wyliczona z eksperymentu przy stężeniu $MgCl_2$ 5 mM [Da]

Porównanie właściwości termodynamicznych badanych fragmentów RNA na podstawie analizy widm dichroizmu kołowego.

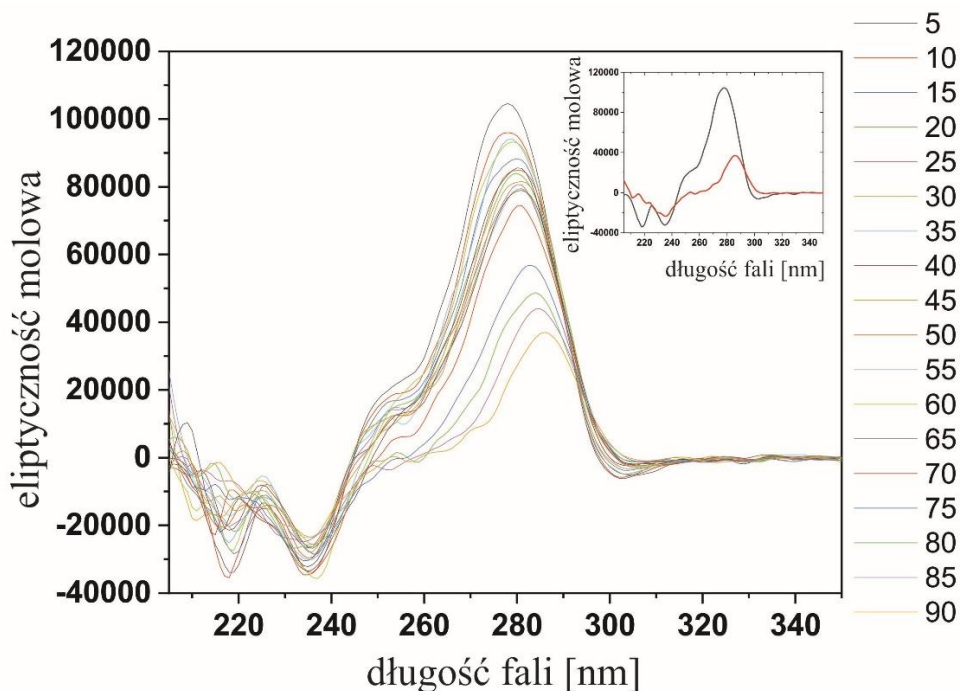
Przeprowadzono badania spektroskopii dichroizmu kołowego dla regionu terminalnego mRNA(-122) (rys. 34), spinki C(-51):G9 (rys. 35) oraz fragmentu U41:U140 (rys. 36).



Rys. 34. Widma dichroizmu kołowego dla regionu terminalnego 5' mRNA(-122), zebrane w zakresie długości fali 205-350 nm, w zakresie temperatur 5°C-90°C, w obecności 5 mM Mg^{2+} . W ramce w prawym górnym rogu przedstawiono widma zebrane w temperaturze 5°C (kolor czarny) oraz 90°C (kolor czerwony).



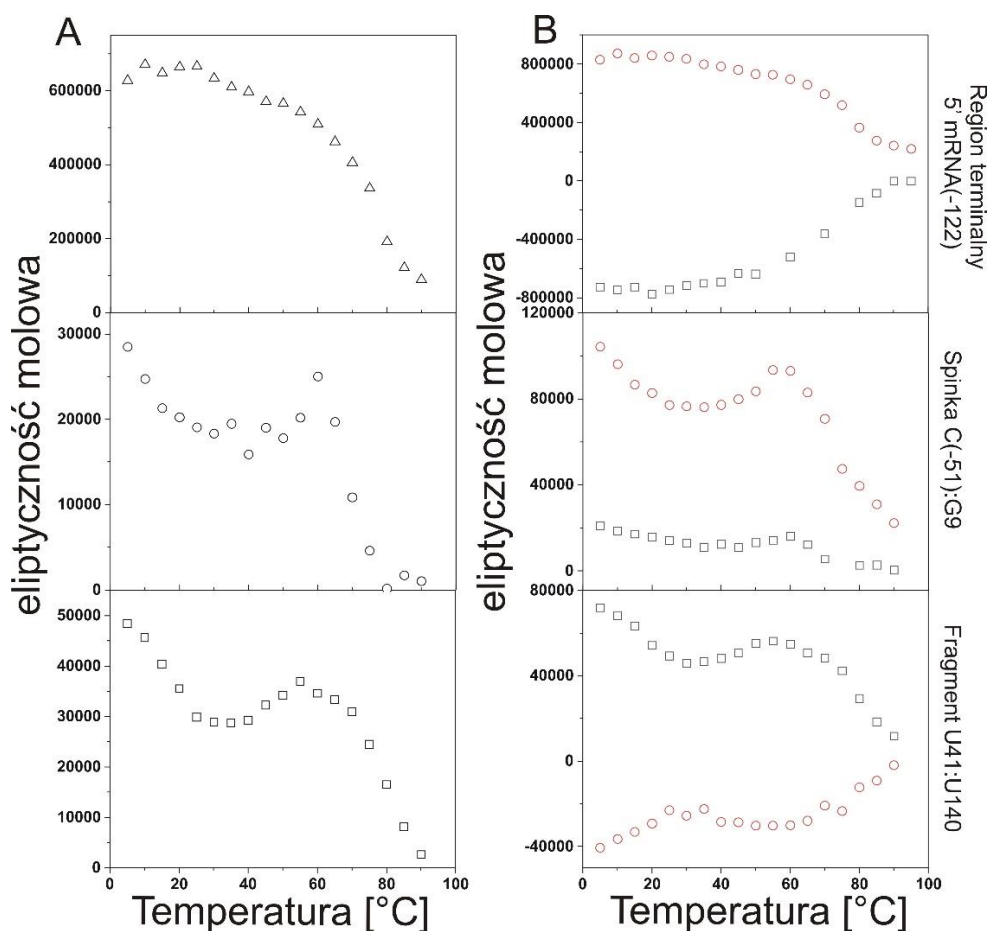
Rys. 35. Widma dichroizmu kołowego dla spinki C(-51):G9, zebrane w zakresie długości fali 205-350 nm, w zakresie temperatur 5°C-90°C, w obecności 5 mM Mg^{2+} . W ramce w prawym górnym rogu przedstawiono widma zebrane w temperaturze 5°C (kolor czarny) oraz 90°C (kolor czerwony).



Rys. 36. Widma dichroizmu kołowego dla fragmentu U41:U140, zebrane w zakresie długości fali 205-350 nm, w zakresie temperatur 5°C-90°C, w obecności 5 mM Mg^{2+} . W ramce w prawym górnym rogu przedstawiono widma zebrane w temperaturze 5°C (kolor czarny) oraz 90°C (kolor czerwony).

Widma CD rejestrowano przy długościach fali w zakresie 205-350 nm oraz w zakresie temperatur 5-90°C, co 5°C, w buforze zawierającym 5 mM Mg²⁺. Dla regionu terminalnego 5' mRNA(-122) zaobserwowano trzy maksima absorpcji, przy długości fali 215 nm, 230 nm oraz 275 nm. Dla spinki C(-51):G9 widnieją cztery maksima absorpcji, przy długości fali 215 nm, 230 nm, 240 oraz 275 nm. Dla fragmentu U41:U140 występuje pięć maksimów absorpcji, przy długości fali 215 nm, 230 nm, 240, 254 oraz 275 nm. Przy wszystkich długościach fali maksimum absorpcji przesuwa się ku zeru w miarę wzrostu temperatury, co wskazuje na rozplatanie struktur drugorzędowych obecnych w badanym fragmencie RNA pod wpływem wzrostu temperatury [Larsen *et al.* 2015]. Zauważono, że w miarę spadku długości cząsteczki zwiększa się ilość maksimów obserwowanych na widmach CD. Można sądzić, że widma CD rejestrowane dla krótkich fragmentów RNA lepiej odwzorowują złożoność struktury trzeciorzędowej, jaką przyjmuje badany fragment RNA. Mniej obserwowanych maksimów dla dłuższych cząsteczek może wynikać z faktu, że im dłuższa cząsteczka RNA, tym trudniejsza do wykrycia jest obecność poszczególnych oddziaływań trzeciorzędowych. Na podstawie widm dichroizmu kołowego można wnioskować o skręcalności optycznej całej cząsteczki, a nie jej poszczególnych fragmentów, w związku z czym obserwowane widma pochodzą od całej cząsteczki, a nie od poszczególnych elementów strukturalnych zlokalizowanych w jej obrębie.

Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono zależność intensywności maksimum przy długości fali 260 nm od temperatury dla wszystkich trzech badanych cząsteczek RNA (rys. 37). Zakłada się, że cząsteczki RNA przyjmują tak zwaną formę A, która w widmach CD daje charakterystyczny sygnał przy 260 nm [Vorlíčková *et al.* 2012].



Rys. 37. Zależności intensywności maksimów od temperatury dla badanych cząsteczek: końca terminalnego 5' mRNA(-122), spinki C(-51):G9 oraz fragmentu U41:U140. (A) Intensywność maksimum przy 260 nm. (B) Intensywność maksimów charakterystycznych dla poszczególnych cząsteczek.

Z tej zależności wyznaczono temperatury topnienia dla poszczególnych fragmentów RNA (tab. 6). Wyznaczono również zależności intensywności charakterystycznych maksimów dla poszczególnych fragmentów od temperatury topnienia. Dla regionu terminalnego 5' mRNA (-122) charakterystyczne widma występowały przy długości fali 267 nm i 210 nm, dla spinki C(-51):G9 przy długościach fali 269 nm i 216 nm, dla fragmentu U41:U140 przy długościach fali 278 nm i 254 nm (rys. 36). Z tych zależności wyznaczano również temperatury topnienia. Zgodnie z oczekiwaniami okazało się, że im dłuższy fragment, tym wyższa temperatura topnienia. Ponadto, dla spinki C(-51):G9 oraz dla odcinka U41:U140 widoczne są dwie wyraźne nieciągłości, ok. 30 °C i 70 °C. W tabeli 6 przedstawiono porównanie teoretycznych i eksperymentalnych danych termodynamicznych wyznaczonych dla badanych fragmentów RNA. Obserwowana jest duża zbieżność pomiędzy danymi eksperymentalnymi i teoretycznymi.

Tabela 6. Zestawienie parametrów termodynamicznych dla badanych fragmentów RNA.

Cząsteczka	Masa molekularna [Da]	Zawartość GC [%]	T _{mbasic}	T _{msalt}	T _{m dośw}	T _{m nearest neighbor}	RlnK [cal/(°K mol)]	ΔG [Kcal/mol]	ΔG _{dośw} [Kcal/mol]	ΔH [Kcal/mol]	ΔH _{dośw} [Kcal/mol]	ΔS [cal/(°K mol)]	ΔS _{dośw} [cal/(°K mol)]
U41:U140	62421,9	51	82	95	39; 61	84,15	33,404	318,5	310	1715,2	1695	4487,4	4765
Spinka C(-51):G9	18575	61	78	90,5	30; 70	78,79	33,404	97,1	92	526,3	510	1367,4	1410
Region terminalny 5' mRNA(-122)	99858,5	55	85	98,9	80	86,64	33,404	524,7	505	2774,8	2705	7237,9	7450

T_{mbasic} – temperatura topnienia [°C]

T_{msalt} – temperatura topnienia w roztworze z solą [°C]

T_{m dośw} – temperatura topnienia wyznaczona doświadczalnie [°C]

R - stała gazowa

K – stała równowagi

ΔG – energia swobodna

ΔG_{dośw} – energia swobodna wyznaczona doświadczalnie

ΔH – entalpia swobodna

ΔH_{dośw} – entalpia swobodna wyznaczona doświadczalnie

ΔS – entropia

ΔS_{dośw} - entropia wyznaczona doświadczalnie

4.4. Wpływ długości regionu niekodującego 5' mRNA p53 na proces inicjacji translacji

W dostępnej literaturze sugeruje się występowanie zależności pomiędzy długością regionu niekodującego 5' mRNA a efektywnością translacji. Zakładano, że im dłuższy 5'UTR mRNA, tym mniej wydajnie przebiega proces translacji [Vassilenko *et al.* 2011, Gorska *et al.* 2013, Zydowicz-Machtel *et al.* 2018]. Postanowiłam sprawdzić, czy proponowane założenie ma swoje odzwierciedlenie w przypadku mysiego mRNA i białka p53. W tym celu przeprowadzono translację w warunkach *in vitro* wykorzystując mRNA zawierający odpowiednio 122- (mRNA(-122)) lub 247-nukleotydowy 5'UTR (mRNA(-247)) (rys. 38A). Zauważono, że ilość białka pełnej długości powstającego z mRNA(-247) została zredukowana do poziomu 60% w stosunku do białka pełnej długości syntezowanego z mRNA(-122). Nie odnotowano natomiast istotnej różnicy w ilościach izoformy skróconej z końca aminowego, $\Delta 41p53$: obserwowana ilość białka jest taka sama w obu przypadkach, niezależnie od długości regionu niekodującego 5' mRNA. Stanowi ona ok. 20% białka pełnej długości powstającego z mRNA(-122). W doświadczeniu jako kontrolę zastosowano ludzkie mRNA p53, ulegające transkrypcji od miejsca promotorowego P1. Podejście to pozwoliło potwierdzić, że obserwowane na autoradiogramie produkty białkowe mysie są odpowiednikami ludzkich białek p53 pełnej długości i izoformy $\Delta 40p53$. Na podstawie wyników przeprowadzonego eksperymentu można wnioskować, że przedstawiona powyżej reguła traktująca o wpływie długości 5'UTR mRNA na proces translacji ma swoje zastosowanie również w przypadku mysiego mRNA p53. Ponadto, zauważono, że dla mRNA(-122) białka p53 i $\Delta 41p53$ są syntezowane w stosunku 5:1 (rys. 38A), czyli takim samym, jaki został określony dla odpowiednich izoform ludzkich [Błaszczuk & Ciesiołka, 2011; Gorska *et al.*, 2013]. Na tej podstawie można wnioskować, że synteza izoform mysich i ludzkich zachodzi z podobną wydajnością.

W następnym etapie badań sprawdzono w jaki sposób długość regionu niekodującego 5' mRNA p53 myszy wpływa na proces inicjacji translacji. Inicjacja translacji może zachodzić w sposób zależny lub niezależny od struktury kapu, zlokalizowanej na końcu 5' mRNA. Powszechnie akceptowanym modelem inicjacji translacji zależnej od struktury kapu jest tzw. model skaningowy [Kozak, 1999]. W modelu tym zakłada się, że czynnik inicjacyjny eIF4E (eukariotyczny czynnik inicjujący translację 4E, ang. *eukaryotic translation*

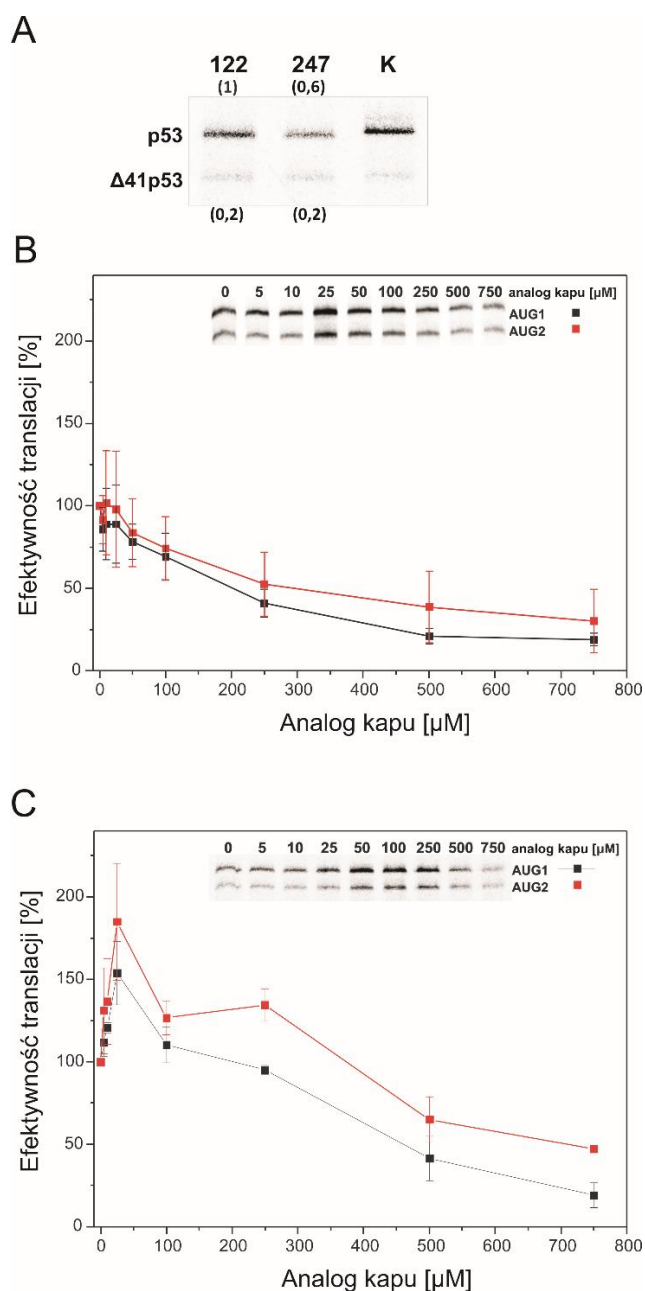
initiation factor 4E) przyłącza się do końca 5' mRNA. Następnie, powstaje kompleks preinicjacyjny PIC (ang. *preinitiation complex*), zawierający czynniki inicjacji translacji, małą podjednostkę rybosomalną 40S oraz metioninowy tRNA. PIC skanuje region niekodujący 5', aż do momentu odnalezienia pierwszego kodonu AUG znajdującego się w optymalnym kontekście nukleotydowym, tzw. kontekście 'Kozak', po czym do małej podjednostki 40S przyłącza się duża podjednostka rybosomalna 60S, tworząc tym samym rybosom 80S, a następnie rozpoczyna się synteza białka [Kozak, 1999, Sonenberg & Hinnebusch, 2009, Komar & Hatzoglou, 2011].

Inicjacja translacji niezależna od struktury kapu zachodzi, gdy kap-zależna inicjacja translacji jest utrudniona, np. w warunkach stresu komórkowego, a jej przykładem jest inicjacja translacji zależna od elementów IRES (ang. *internal ribosomal entry site*) [Komar & Hatzoglou, 2011]. Elementy IRES są to miejsca w regionie niekodującym 5', których struktura umożliwia bezpośrednie oddziaływanie z rybosomem, pomijając etap skanowania 5'UTR mRNA [Komar & Hatzoglou, 2011]. Taki mechanizm inicjacji translacji jest również postulowany dla ludzkiego mRNA p53 [Ray *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2006, Błaszczyk & Ciesiołka, 2011].

Aby sprawdzić, który z modeli inicjacji translacji ma swoje zastosowanie w przypadku mysiego mRNA p53, przeprowadzono translację mRNA(-122) oraz mRNA(-247) w warunkach *in vitro*, w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu m⁷G(5')ppp(5')G. Analog ten wiąże się z czynnikiem inicjującym translację eIF4E, blokując tym samym jego oddziaływanie z kapem obecnym na końcu 5' mRNA, w efekcie czego dochodzi do inhibicji translacji zależnej od kapu [Sonenberg, 2008]. Ilość uzyskanych produktów białkowych, których synteza rozpoczynała się od kodonów AUG1 i AUG2, została określona w stosunku do próby, do której nie został dodany wolny analog kapu, a otrzymane wyniki określono mianem efektywności translacji (rys. 38 B, C).

W przypadku eksperymentu przeprowadzanego dla mRNA zawierającego 122-nukleotydowy region niekodujący 5' (rys. 38B) obserwowana jest silna inhibicja translacji: przy 250 μM stężeniu analogu kapu poziom powstającego białka został zredukowany do 40% dla izoformy syntezowanej z AUG1 oraz do 50% dla izoformy powstającej z AUG2, natomiast przy najwyższym zastosowanym stężeniu analogu kapu (750 μM) zauważalny jest spadek ilości białka do ok. 20% i 30% dla izoform syntezowanych odpowiednio z AUG1

i AUG2 w stosunku do wyjściowej ilości białka. Na podstawie otrzymanych danych można wnioskować, że inicjacja translacji obu izoform białka p53 z mRNA(-122) jest procesem zależnym od struktury kapu na końcu 5' mRNA.



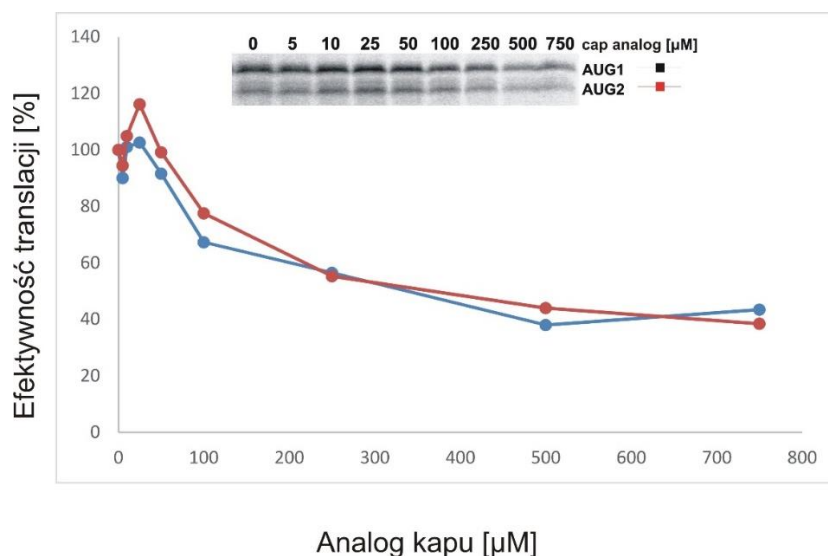
Rys. 38. Translacja mRNA zawierającego 122- i 247-nukleotydowy region niekodujący 5' w warunkach *in vitro*. (A) mRNA(-122) i mRNA(-247) zawierające strukturę kapu na końcu 5' zostały poddane translacji w warunkach *in vitro* w obecności znakowanej izotopowo ³⁵S-metioniny. Ludzkie mRNA p53 stanowiło kontrolę reakcji translacji. Intensywność prążków zmierzono wykorzystując program MultiGauge (Fuji), względne ilości białka przedstawiono w nawiasach. Na kolejnych panelach B i C przedstawiono wpływ zwiększającego się stężenia analogu kapu na efektywność translacji mRNA(-122) i mRNA(-247) z kodonów AUG1 i AUG2.

Analogiczny eksperyment przeprowadzono wykorzystując najdłuższy zidentyfikowany mRNA p53, zawierający 247-nukleotydowy 5'UTR (rys. 38C). W tym przypadku uzyskano całkowicie odmienne wyniki: już przy niskich stężeniach wolnego analogu kapu obserwowana jest silna stymulacja syntezy obu izoform białka p53. Najwyższy przyrost ilości białka widoczny był przy 25 μ M stężeniu analogu kapu, w którym efektywność translacji białka syntezowanego od kodonu AUG1 wynosiła ok. 155%, a białka powstającego od kodonu AUG2 185% w stosunku do reakcji kontrolnej. Następnie, w miarę wzrostu stężenia analogu, ilości syntezowanych białek zaczęły systematycznie spadać, wynosiły one odpowiednio 95% i ok. 135% przy stężeniu analogu równym 250 μ M i spadły aż do poziomu ok. 20% i ok. 50% odpowiednio dla białek syntezowanych od AUG1 oraz AUG2 przy 750 μ M stężeniu analogu kapu. Przebieg krzywych uzyskanych na wykresie dla białek syntezowanych od AUG1 i AUG2 (rys. 38C) jest charakterystyczny dla kap-niezależnej inicjacji translacji [Błaszczuk & Ciesiołka, 2011, Gorska *et al.*, 2013]. Na podstawie otrzymanych wyników można sugerować, że w przypadku translacji z mRNA(-247) mamy do czynienia z procesem inicjacji translacji niezależnym od struktury kapu na końcu 5' mRNA. Można przypuszczać, że element odpowiedzialny za translację niezależną od struktury kapu w mRNA mysim znajduje się pomiędzy nukleotydami -247 a -123. Możliwe jest, że p53 syntezowane z mRNA(-247) powstaje w procesie IRES-zależnej translacji, szczególnie, że występowanie elementów IRES w mysim mRNA sugerowano już w 2013 roku [Kim *et al.* 2013]. Autorzy publikacji do badań wykorzystali mRNA zawierający 157-nukleotydowy 5'UTR [Kim *et al.* 2013], który według numeracji stosowanej w niniejszej pracy odpowiada transkryptowi z regionem niekodującym 5' o długości 166 nt (RNA(-166)). Opisany mRNA nie odpowiada żadnemu z transkryptów zidentyfikowanych w eksperymencie 5'RACE. Nie mniej jednak możliwe jest, że 157-nukleotydowy region niekodujący zawiera element IRES obecny również w mRNA(-247).

Aby potwierdzić opisywane powyżej przypuszczenia, wykonano eksperyment inhibicji translacji w obecności analogu kapu wykorzystując RNA zawierający 166-nukleotydowy region niekodujący 5' (rys. 39). Eksperyment przeprowadzono w warunkach analogicznych do zastosowanych w reakcjach prowadzonych dla mRNA(-247) i mRNA (-122). Analizując wyniki uzyskane podczas translacji *in vitro* w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu z wykorzystaniem mRNA(-166) zauważono, że już przy 100 μ M

stężeniu analogu kapu dochodzi do znacznego zahamowania syntezy białka, zarówno z kodonów AUG1 jak i AUG2, do poziomu odpowiednio ok. 65% i 75%, w porównaniu do reakcji kontrolnej. Przy zastosowanych wyższych stężeniach $m^7G(5')ppp(5')G$ obserwuje się systematyczny spadek ilości białka, do ok. 55% przy zastosowanym stężeniu 250 μM , aż do ok. 40% przy najwyższym zastosowanym stężeniu analogu 750 μM . Ponadto, nie zaobserwowano znacznie zwiększonej syntezy białka przy niskich stężeniach $m^7G(5')ppp(5')G$, tak jak to miało miejsce w przypadku mRNA(-247), a ilość białka syntezowanego w tych warunkach pozostaje podobna przy początkowych stężeniach, aż do zastosowanego 50 μM stężenia analogu.

Porównując rezultaty uzyskane na podstawie doświadczenia przeprowadzonego dla mRNA(-166) z wynikami translacji mRNA(-122) i mRNA(-247) można zauważyć, że przebieg krzywych uzyskanych dla białek syntezowanych z kodonów AUG1 i AUG2 na matrycy mRNA(-166) w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu jest zbliżony do wzoru obserwowanego dla mRNA(-122): w miarę wzrostu stężenia $m^7G(5')ppp(5')G$ obserwowany jest systematyczny spadek ilości syntezowanego białka. Na tej podstawie można sugerować, że dochodzi do zahamowania translacji kap-zależnej, w wyniku przyłączenia czynnika inicjacyjnego eIF4E do analogu kapu zamiast do struktury kapu zlokalizowanej na końcu 5' mRNA. Zmniejszająca się ilość powstającego białka świadczy o braku aktywacji IRES-zależnej translacji. Na podstawie wyników uzyskanych podczas eksperymentu translacji dla mRNA(-166) można sugerować, że proces ten przebiega w sposób zależny od struktury kapu. W związku z powyższym można przypuszczać, że element odpowiedzialny za kap-niezależną translację białek powstających na matrycy mRNA(-247) znajduje się powyżej nukleotydu -167 w kierunku 5'.



Rys. 39. Wpływ zwiększającego się stężenia analogu kapu na efektywność translacji *in vitro* mRNA zawierającego 166-nukleotydowy region niekodujący 5'.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że prezentowane powyżej wyniki eksperymentu inhibicji syntezy p53 na matrycy mRNA(-166) są niezgodne z rezultatami opublikowanymi w 2013 roku przez Kim i wsp. [Kim *et al.* 2013]. Autorzy tego doniesienia sugerują występowanie IRES-zależnej translacji mRNA p53, a mRNA wykorzystywany w powyższej pracy zawierał region niekodujący 5' o długości 157 nukleotydów (odpowiadający regionowi 5'UTR o długości 166 nukleotydów, stosowanym w moich badaniach). Przepuszczalnie, zaobserwowana rozbieżność w wynikach może być spowodowana dwoma czynnikami: długością analizowanej sekwencji mRNA i/lub systemem translacji zastosowanym w trakcie badań. W niniejszej pracy eksperyment translacji wykonywano w warunkach *in vitro*, w systemie bezkomórkowym, a matrycę stanowił mRNA pełnej długości, tzn. zawierający 166-nukleotydowy 5'UTR oraz pełną sekwencję kodującą białko p53. Natomiast do analizy aktywności elementu IRES w pracy z 2013 roku wykorzystywano system podwójnego reportera, oparty o dwa białka reporterowe: lucyferazę *Renilla* (Rluc) oraz lucyferazę *Firefly* (Fluc), który stosuje się w systemie komórkowym, a wykorzystywany w doświadczeniach fragment mRNA mysiego p53 obejmował jedynie region niekodujący 5'. Różnice w długości stosowanej sekwencji mRNA mogą odgrywać istotną rolę w funkcjonowaniu elementu IRES poprzez wpływ na prawidłowe zwinięcie mRNA: w niniejszej pracy wykazałam oddziaływanie regionu niekodującego 5' z sekwencją kodującą, co potencjalnie może blokować aktywność IRES. Taka blokada może nie zachodzić w przypadku, gdy brany jest

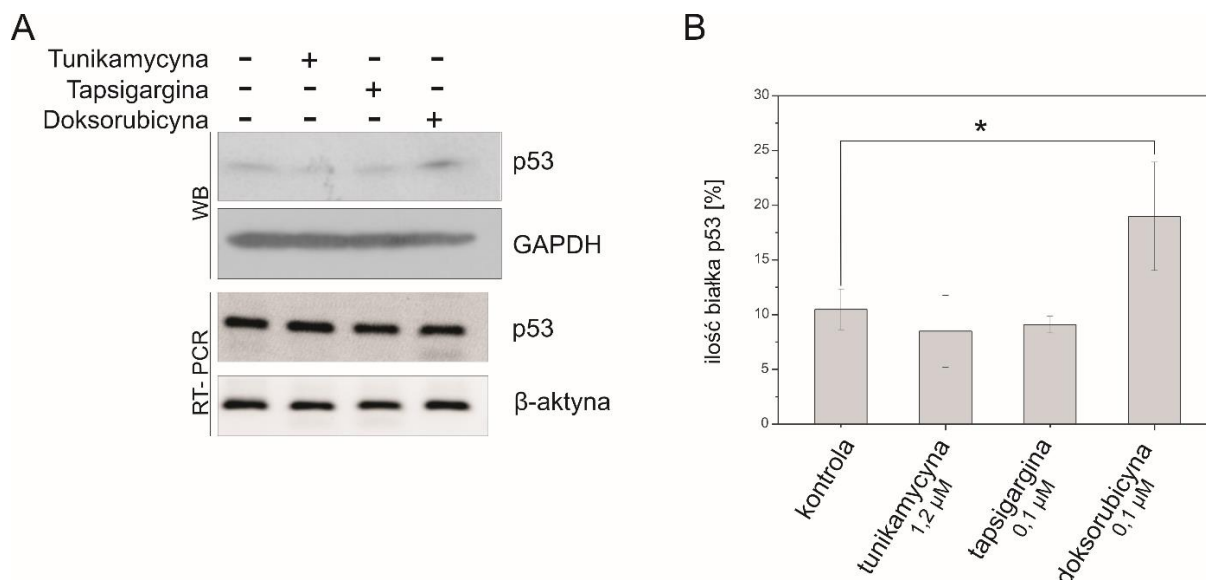
pod uwagę jedynie 5'UTR, gdyż zwinięcie tego regionu zachodzi w inny sposób. Do obserwowanych rozbieżności może się również przyczyniać zastosowany system translacji, ponieważ mogą powstawać różnice w wynikach otrzymanych w warunkach *in vitro* oraz *in cellulo*, spowodowane np. obecnością dodatkowych czynników białkowych w systemach komórkowych.

4.5. Analiza porównawcza względnych ilości białka i mRNA p53 w komórce w warunkach normalnych i stresowych

W dostępnej literaturze udokumentowano wzrost ilości białka p53 w odpowiedzi na stres komórkowy [Candeias *et al.* 2006, Mlynarczyk & Fahraeus, 2014, Khan *et al.* 2015]. W przypadku myszy taką reakcję zanotowano w odpowiedzi na stres wywołany światłem UV [Maltzman & Czyzyk, 1984], stres genotoksyczny wywołany etopozydem oraz stres oksydacyjny spowodowany nitroprusydkiem sodu (SNP, ang. *sodium nitroprusside*) [Kim *et al.* 2013]. Postanowiono sprawdzić, jaki wpływ na ekspresję genu *Trp53* może mieć stres siateczki śródplazmatycznej oraz stres genotoksyczny wywołany innym czynnikiem niż etopozyd. W tym celu do badań wykorzystano następujące czynniki stresowe: tunikamycynę, tapsigarginę oraz doksorubicynę. Tunikamycyna powoduje zahamowanie N-glikozylacji białek, co prowadzi do nieprawidłowego ich fałdowania [Bassik & Kampmann, 2011]. Tapsigargina jest inhibitorem endo/sarkoplazmatycznej Ca^{2+} -ATPazy (SERCA, ang. *inhibitor of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) i powoduje obniżenie stężenia jonów wapnia w retikulum endoplazmatycznym [Osłowski & Urano, 2011]. Działanie tunikamycyny i tapsigarginy prowadzi do wywołania odpowiedzi na niezwinęte białka (UPR, ang. *unfolded protein response*) i powstawania stresu siateczki śródplazmatycznej. Doksorubicyna jest cytostatykiem, który może interkalować w dwuniciową strukturę DNA, hamować topoizomerazę II, sieciować DNA (ang. *cross-link DNA*) oraz wytwarzać reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) [Lüpertz *et al.* 2010], wywołując tym samym stres genotoksyczny.

Postanowiono przeprowadzić eksperyment, w którym fibroblasty mysie z linii komórkowej NIH3T3 inkubowano przez 16 godzin z medium zawierającym jeden z opisanych powyżej czynników stresowych w następujących stężeniach: 1,2 μ M tunikamycyną, 0,1 μ M tapsigarginą oraz 0,1 μ M doksorubicyną. Następnie, wykorzystując metody Western blot oraz cytometrię przepływową, sprawdzono, jak zmieniła się ilość białka p53 pod wpływem poszczególnych czynników stresowych. Stosując te dwie niezależne metody uzyskano bardzo zbliżone wyniki. Zauważono, że wywołanie stresu siateczki śródplazmatycznej skutkuje nieznacznym obniżeniem poziomu białka p53, a stres genotoksyczny prowadzi do wzrostu poziomu białka. Nie mniej jednak odnotowano, że tylko potraktowanie komórek doksorubicyną powoduje istotny statystycznie przyrost białka p53

(rys. 40 A, B). Obserwowane zmiany występują jedynie na poziomie translacji. W przeciwieństwie do zmieniającego się poziomu białka, we wszystkich analizowanych przypadkach poziom mRNA analizowany metodą RT-PCR pozostaje niezmienny (rys. 40 A, dolny panel).



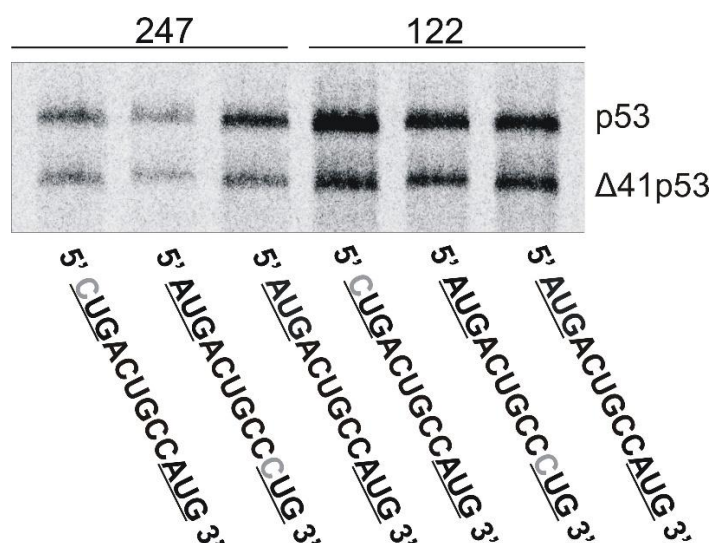
Rys. 40. Synteza białka p53 w warunkach stresu genotoksycznego oraz siateczki śródplazmatycznej w linii komórkowej fibroblastów mysich NIH3T3. Komórki traktowano przez 16 godzin następującymi czynnikami: 0,1 μM dokсорubicyną, 1,2 μM tunikamycyną, 0,1 μM tapsigarginą lub odpowiednią objętością DMSO, a następnie zebrano. Endogenny poziom białka p53 oznaczono stosując techniki Western blot (A) oraz cytometrię przepływową (B), wykorzystując przeciwciało 1C12. GAPDH wykorzystano jako kontrolę ilości białka. Poziom mRNA analizowano poprzez RT-PCR, wykorzystując całkowity RNA izolowany z komórek NIH3T3 traktowanych analogicznie do prób wykorzystywanych w metodach Western blot i cytometrii przepływowej. Jako kontrolę ilości matrycy wykorzystano β-aktynę.

Uzyskane wyniki wskazują, że regulacja aktywności p53 w odpowiedzi na stres zachodzi na poziomie translacji, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami [Kim *et al.* 2013]. Niestety, wykorzystanie przeciwciała 1C12 pozwala na wizualizację jedynie białka p53 pełnej długości, w związku z czym niemożliwe było wykrycie izofomy Δ41p53 oraz porównanie, jak zmienia się jej synteza pod wpływem zastosowanych warunków stresowych w komórkach mysich.

W przypadku ludzkiego p53 w jednej z prac postulowano przyrost ilości p53 w odpowiedzi na opisane powyżej warunki stresowe w sposób charakterystyczny dla danej

linii komórkowej [Candeias *et al.* 2006]. W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe raka piersi (BT474 i BT549) oraz komórki ludzkiego mięsaka (MLS-1765). Co ciekawe, obserwowane zmiany poziomu białka p53 pełnej długości indukowane pod wpływem stresu nie były zależne od schorzenia: odnotowano wzrost białka w liniach komórkowych MLS-1765 i BT459 w wyniku działania wszystkich wywołanych stresów komórkowych, natomiast w przypadku komórek linii BT474 tylko doksorubicyna spowodowała wzmożoną syntezę białka p53 [Candeias *et al.* 2006]. Analogiczny eksperyment przeprowadzono również dla linii komórkowych raka jelita HCT116 oraz raka płuc A549 wykorzystując tapsigarginę i doksorubicynę. W tym przypadku autorzy odnotowali obniżenie poziomu białka p53 pełnej długości [Młynarczyk & Fahraeus, 2014]. Co ciekawe, autorzy nie postulują indukcji syntezy p53 w odpowiedzi na stres komórkowy w sposób zależny od linii komórkowej. Porównując wyniki uzyskane dla obu organizmów można stwierdzić, że synteza p53 pod wpływem zastosowanych czynników stresowych u myszy, u człowieka przebiega analogicznie w liniach komórkowych HCT116 i A549, choć są to linie pochodzące z różnych tkanek. Należy zwrócić również uwagę na fakt, że linia komórkowa NIH3T3 nie należy do rakowych linii komórkowych, w przeciwieństwie do linii ludzkich, w których analizowano zmiany poziomu białka p53. W innej publikacji w 2017 roku porównywano zmiany poziomu białka p53 w mysich liniach komórkowych: fibroblastów NIH3T3 oraz czerniaka B16F10, traktowanych czynnikiem genotoksycznym, etopozydem [Seo *et al.* 2017]. Obserwowany efekt indukcji syntezy białka p53 był taki sam w obu przypadkach, zarówno w linii nowotworowej, jak i nienowotworowej, co pozwala sądzić, że taki sam efekt będzie obserwowany w obu liniach w odpowiedzi na pozostałe czynniki stresowe. Większość dotychczasowych badań nad ludzkim p53 prowadzona jest z wykorzystaniem nowotworowych linii komórkowych. Utrudnia to znacznie porównanie obserwowanych efektów do efektów obserwowanych dla nierakowej linii komórkowej.

w lizacie z króliczych retikulocytów (RRL, ang. *rabbit reticulocyte lysate*) w obecności znakowanej L-[S³⁵] metioniny. Wyniki eksperymentu w postaci autoradiogramu przedstawiono na rysunku 42.

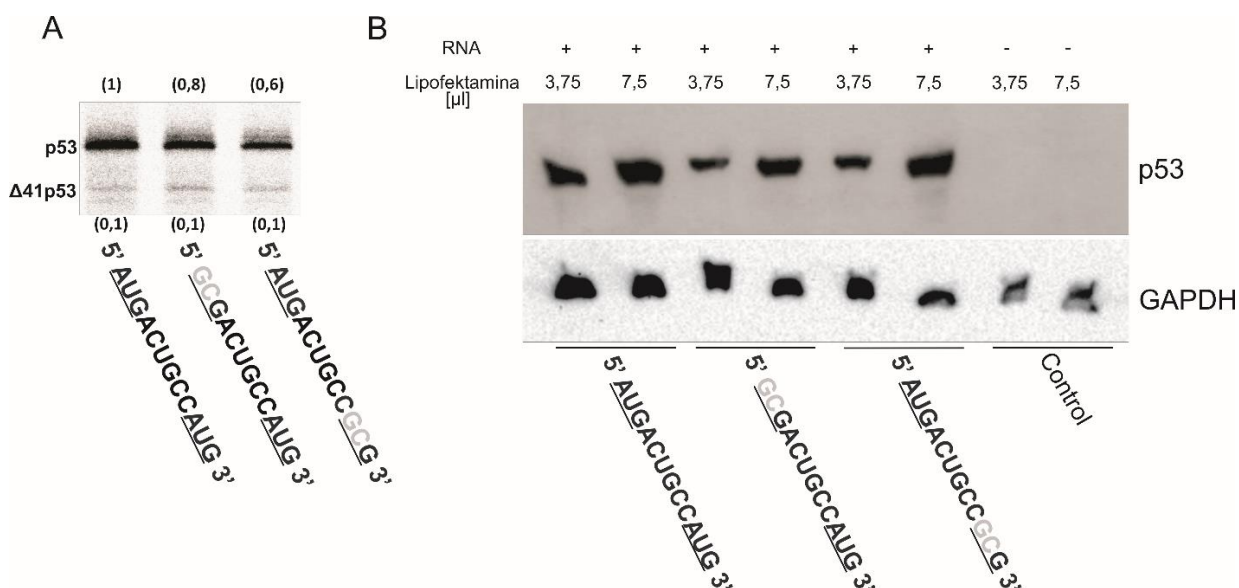


Rys. 42. Wpływ zmiany dwóch potencjalnych kodonów inicjacyjnych AUG na kodony CUG na proces translacji białka p53 w warunkach *in vitro*. Potencjalne kodony inicjacyjne podkreślono, a zmieniony nukleotyd zaznaczono kolorem szarym.

Zaobserwowano, że żadna z wprowadzonych mutacji nie spowodowała całkowitego zablokowania syntezy białka p53. Nie mniej jednak, zarówno dla mRNA(-122), jak i mRNA(-247), wprowadzenie mutacji w obrębie drugiego kodonu AUG skutkowało zmniejszeniem ilości syntetyzowanego białka w stosunku do białka uzyskanego z mRNA ze zmutowanym pierwszym potencjalnym kodonem inicjacyjnym. Należy uwzględnić, że kodon CUG należy do grupy alternatywnych kodonów inicjacyjnych [Kearse & Wilusz, 2017]. W związku z faktem, że od kodonu CUG również możliwa jest inicjacja syntezy białka, trudno jest ocenić wpływ wprowadzonej zmiany nukleotydów na ilość otrzymanych produktów białkowych. W konsekwencji, nie zdecydowano się na określenie ich relatywnej ilości.

Postanowiono zatem przeprowadzić analogiczne doświadczenie, wykorzystując modelowe warianty mRNA(-122), w których odpowiednie potencjalne kodony inicjacyjne AUG zmieniono na kodony GCG, kodujące alaninę. Wykazano wcześniej, że zamiana kodonu AUG na kodon GCG skutecznie blokuje syntezę białka [Błaszczuk, Ciesiołka, 2011]. Co ciekawe, w przeprowadzonym eksperymencie produkty białkowe zostały zaobserwowane

we wszystkich trzech przypadkach (rys. 43), sugerując tym samym, że proces syntezy białka może rozpocząć się zarówno od pierwszego, jak i od kolejnego kodonu AUG.



Rys. 43. Wpływ zmiany dwóch potencjalnych kodonów inicjacyjnych AUG na kodony GCG na proces translacji w warunkach *in vitro* (A) oraz w transfekowanej linii komórkowej (B). Potencjalne kodony inicjacyjne podkreślono, a zmienione reszty nukleotydowe zaznaczono kolorem szarym. (A) Translację *in vitro* przeprowadzono w RRL, a relatywne ilości syntezowanych białek podano w nawiasach. (B) Transfekcję mRNA do linii komórkowej MB352 przeprowadzono wykorzystując dwa różne stężenia lipofektaminy. GAPDH wykorzystano jako kontrolę ilości białka.

Zaobserwowano, że wprowadzenie mutacji w obrębie kodonu AUG spowodowało jedynie zahamowanie syntezy białka p53 o odpowiednio 20% w przypadku zmiany pierwszego potencjalnego kodonu inicjacyjnego (poziom obserwowanego białka wynosi 80% w stosunku do poziomowi wyjściowemu, czyli białka pełnej długości, otrzymanego w wyniku translacji mRNA bez mutacji) oraz o 40% w przypadku zmiany drugiego potencjalnego kodonu inicjacyjnego. Wprowadzone zmiany kodonów inicjacyjnych nie wpłynęły na efektywność syntezy izoformy skróconej z końca aminowego $\Delta 41p53$. We wszystkich trzech przypadkach poziom białka nie zmienił się, czyli stanowi ok. 10% w stosunku do poziomowi białka pełnej długości, otrzymanego w wyniku translacji mRNA bez mutacji. Otrzymane wyniki wskazują, że inicjacja translacji może rozpocząć się od obu potencjalnych kodonów inicjacyjnych, lecz to drugi z nich, zlokalizowany w obrębie optymalnego kontekstu Kozak, jest wiodącym kodonem start, gdyż wprowadzona w tym miejscu zmiana reszt nukleotydowych spowodowała silniejsze zahamowanie syntezy białka p53. Hipotezę tę

wspiera również fakt, że to właśnie drugi z potencjalnych kodonów inicjacyjnych jest zachowany w procesie ewolucji, w przeciwieństwie do pierwszego kodonu AUG. W porównaniu sekwencji mysiego mRNA p53 z homologicznymi sekwencjami pochodzącymi z innych gatunków ssaków, reszty nukleotydowe pierwszego kodonu AUG są oddzielone 20-nukleotydową delecją (rys. 17).

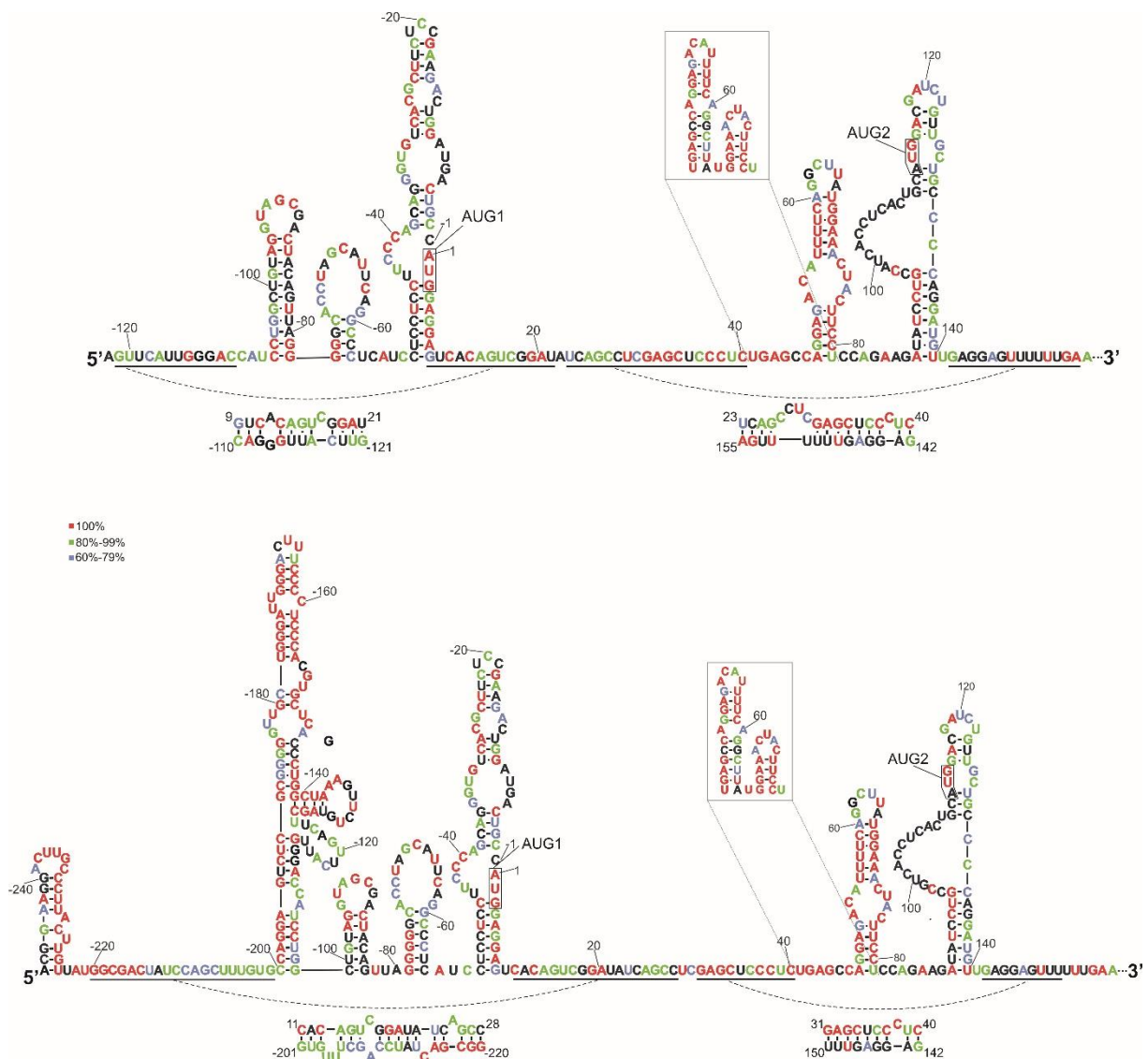
Następnie postanowiono sprawdzić, jak wprowadzone mutacje wpływają na translację w warunkach *in cellulo*. W tym celu mRNA ze zmienionymi kodonami start oraz kontrolny mRNA bez mutacji wprowadzono do komórek MB352, czyli linii komórkowej mysich fibroblastów pozbawionych endogennego p53 (rys. 43B). Eksperyment przeprowadzono stosując dwa różne stężenia odczynnika do transfekcji. We wszystkich trzech przypadkach, niezależnie od wprowadzonych mutacji, zaobserwowano produkty translacji. Kontrolę eksperymentu stanowiły komórki nietransfektowane mRNA, lecz traktowane w identyczny sposób jak pozostałe komórki. W ścieżkach kontrolnych obecność białka p53 nie została wykryta. Na tej podstawie można podtrzymywać hipotezę, że inicjacja translacji może zachodzić z obu kodonów inicjacyjnych również w warunkach komórkowych.

4.7. Zachowawczość elementów strukturalnych w regionie terminalnym 5' mRNA p53 oraz identyfikacja *in silico* białek z nim oddziałujących

W kolejnej części pracy podjęłam próbę wyodrębnienia istotnych elementów strukturalnych zaproponowanych w strukturach drugorzędowych regionów terminalnych 5' mRNA(-122) oraz mRNA(-247), poprzez określenie zachowawczości ewolucyjnej poszczególnych nukleotydów. Przypuszcza się, że zachowawczość regionów może mieć istotne znaczenie dla funkcjonowania mRNA, np. poprzez oddziaływanie z białkami. Aby określić stopień zachowawczości poszczególnych elementów strukturalnych, modele struktur drugorzędowych regionów terminalnych mRNA(-122) i mRNA(-247) porównałam z zachowawczością sekwencji nukleotydowej w obrębie analizowanego regionu (rys. 44). Cząsteczka mRNA(-166) została wykluczona z analizy, ponieważ w prowadzonych przeze mnie badaniach nie wykazano jej występowania w komórce.

Pierwszym regionem wykazującym wysoką zachowawczość jest odcinek C40:C80, który w zaproponowanych modelach może przyjmować postać spinki do włosów lub, alternatywnie, dwóch mniejszych spinek. Wykazano, że spinka homologiczna do spinki A47:U81, występująca w mRNA ludzkim, może oddziaływać z białkiem HDM2 [Candeias *et al.* 2008] oraz białkiem PTB (ang. *polypyrimidine tract-binding protein*) [Khan *et al.* 2013]. Główną funkcją białka PTB jest wpływ na proces splicingu, lecz białko to może również brać udział w procesie poliadenylacji, inicjacji translacji oraz w stabilizacji mRNA [Sawicka *et al.* 2008]. Ponadto wykazano, że w odpowiedzi na stres komórkowy, wywołany działaniem cytostatyków, do opisywanej spinki zlokalizowanej w mRNA ludzkim może się wiązać również białko hnRNP C1/C2 (ang. *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2*), stanowiące stabilny heterotetramer złożony z dwóch izoform hnRNP C: hnRNP C1 oraz hnRNP C2, dłuższej o trzynaście reszt aminokwasowych [Christian *et al.* 2008]. W komórce hnRNP C1/C2 pełni istotne funkcje w wielu procesach komórkowych: IRES-zależnej translacji białek zaangażowanych w podział komórkowy i apoptozę, splicingu oraz w stabilizacji mRNA [Christian *et al.* 2008]. Spinka ta zawiera również miejsca wiązania białek SPFQ (ang. *PTB associated Splicing Factor*) oraz aneksyny A2, regulujących poziom białka p53 oraz jego krótszej izoformy $\Delta 40p53$ w warunkach stresowych [Sharathchandra *et al.* 2012].

Kolejnymi regionami, które cechują się wysoką zachowawczością jest odcinek obejmujący nukleotydy od 1 do 8, zawierający kodon inicjacyjny AUG1 oraz odcinek A(-97):U(-87). Zarówno w modelu regionu terminalnego 5' mRNA(-122), jak i mRNA (-247), pierwszy odcinek znajduje się w podstawie spinki C(-51):G9, natomiast drugi w obrębie pętli apikalnej spinki C(-106):G(-78) mRNA(-122) i spinki C(-101):G(-83) mRNA(-247).



Rys. 44. Modele struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' mRNA(-122) i mRNA(-247) z zaznaczonym stopniem zachowawczości poszczególnych nukleotydów. Stopień zachowawczości oznaczano na podstawie zestawienia sekwencji mRNA p53, pochodzących z jedenastu różnych gatunków (rys. 17). Reszty nukleotydowe są oznaczone kolorami, w zależności od stopnia ich zachowawczości (czerwony: 100%, zielony: 80%-99%, niebieski: 60%-79%).

We fragmencie sekwencji nukleotydowej A(-97):U(-87) jedynie dwa nukleotydy nie wykazują silnej zachowawczości. Oba wymienione regiony mogą stanowić miejsca potencjalnych oddziaływań z białkami.

Regionem, który cechuje się mniejszą zachowawczością, lecz jest odpowiedzialny za wiązanie białek hnRNP Q oraz hnRNP L jest spinka G(-79):C(-55). Jej budowa jest bardzo zbliżona w mRNA(-122) i mRNA(-247). Choć w tych modelach długość podstawy spinki różni się o dwie pary nukleotydowe, jej 13-nukleotydowa pętla apikalna pozostaje niezmienna i to właśnie w tym regionie dochodzi do oddziaływania z wymienionymi powyżej czynnikami działającymi *in trans* [Kim *et al.* 2013, Seo *et al.* 2017].

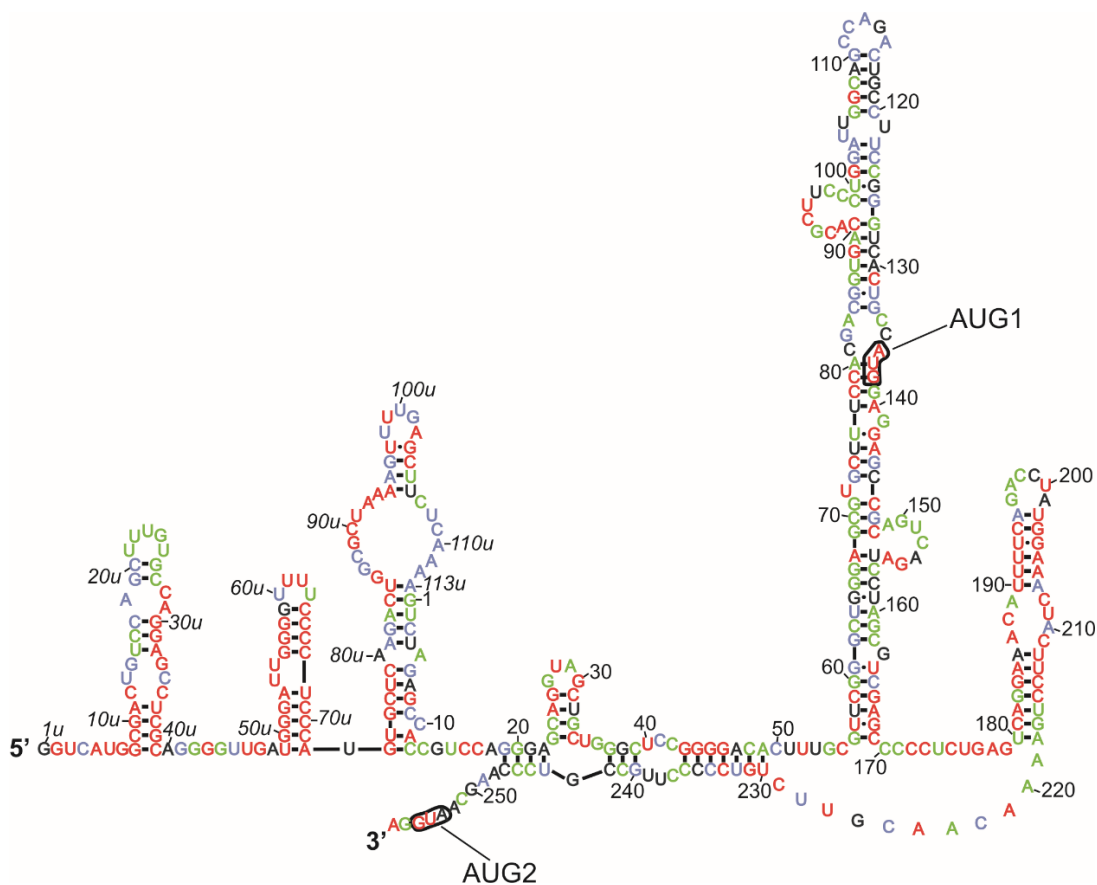
Kolejne odcinki mRNA, których prawie wszystkie reszty nukleotydowe wykazują stuprocentową zachowawczość, znajdują się w mRNA(-247), w regionach spinek zlokalizowanych na końcu 5' zaproponowanego modelu.

Pierwszy z nich, C(-215):C(-238), znajduje się najbliżej końca 5'. W jego skład wchodzi pętla apikalna oraz jedna strona trzonu spinki A(-247):U(-224), a także sąsiadująca sekwencja jednoniciowa. Zachowawcza sekwencja zlokalizowana w obrębie spinki A(-247):U(-224) składa się z ciągu reszt pirymidynowych, oddzielonych dwoma resztami guanozyny i jedną resztą adenozyyny. Tak wysoce zachowawcza sekwencja nukleotydowa może stanowić miejsce oddziaływania z białkami oddziałującymi z resztami pirymidynowymi.

Drugi wysoce zachowawczy region C(-126):C(-199) stanowi większą część spinki C(-200):G(-102). Szczególnie interesujący jest odcinek U(-178):A(-155), czyli górna część spinki. Składa się ona z dwóch segmentów złożonych z czterech i pięciu par nukleotydowych, oddzielonych jedno- i dwunukleotydowym wybrzuszeniem bocznym, a całość zakończona jest trójnukleotydową pętlą apikalną. Homologiczną spinkę zaproponowano w modelu regionu terminalnego 5' ludzkiego transkryptu P0 [Górska *et al.* 2013], stanowiącą osobny element strukturalny, niewchodzący w skład większej domeny. Jedyna różnica strukturalna występująca pomiędzy zaproponowanymi spinkami to zwiększenie o jedną resztę nukleotydową pętli apikalnej, a tym samym brak jednonukleotydowego wybrzuszenia bocznego w spince U51u:A72u w ludzkim transkrypcie P0 (rys. 45). Podobnie jak we wcześniejszych przypadkach, wysokie podobieństwo pomiędzy transkryptami mysim

i ludzkim może świadczyć o ich istotnej roli funkcjonalnej podczas oddziaływania mRNA z czynnikami działającymi *in trans*.

W następnym etapie badań przeprowadziłam analizę *in silico*, mającą na celu identyfikację białek potencjalnie oddziałujących z mRNA p53 oraz określenie prawdopodobnych miejsc ich oddziaływania. Powinno to pomóc stwierdzić, czy zachowawczość sekwencji nukleotydowej może korelować z miejscami oddziaływania białko-mRNA. W celu identyfikacji białek potencjalnie oddziałujących z regionem terminalnym 5' mRNA(-247) p53 wykorzystano program RBPmap [Paz *et al.* 2014].



Rys. 45. Model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' ludzkiego transkryptu P0 z zaznaczonym stopniem zachowawczości poszczególnych nukleotydów. Stopień zachowawczości oznaczano na podstawie zestawienia sekwencji mRNA p53, pochodzących z jedenastu różnych gatunków (rys. 17). Reszty nukleotydowe są oznaczone kolorami, w zależności od stopnia ich zachowawczości (czerwony: 100%, zielony: 80%-99%, niebieski: 60%-79%).

Do badania wykorzystano sekwencję nukleotydową regionu terminalnego 5' mRNA(-247), dla którego na wcześniejszym etapie badań zaproponowano model struktury

drugorzędowej. Sekwencja ta obejmuje 247-nukleotydowy region niekodujący. W wyniku przeprowadzonej analizy zaproponowano 24 białka mogące oddziaływać z badanym fragmentem mRNA. Dla części białek zaproponowano więcej niż jedno miejsce oddziaływania białko-RNA. Zestawienie białek zaprezentowano w tabeli 7. Oprócz nazwy białka, sekwencji nukleotydowej potencjalnie oddziałującej z białkiem oraz jej lokalizacji zaprezentowano również podstawowe funkcje poszczególnych białek. Białka przedstawiono w kolejności alfabetycznej. Ze względu na różną lokalizację miejsc wiązania białek, zrezygnowano z ich przedstawienia na strukturze drugorzędowej. Nie odnotowano także korelacji pomiędzy zachowawczością sekwencji a potencjalnym miejscem wiązania białek.

Tabela 7. Identyfikacja białek potencjalnie oddziałujących z regionem terminalnym 5' mRNA(-247). W nawiasach pod nazwą białka podano ich alternatywne nazwy. Sekwencja, do której potencjalnie przyłącza się białko, została zaznaczona kolorem czerwonym, wraz z nukleotydami sąsiadującymi z nią z końca 3' i 5'.

Białko	Motyw wiążący białko	Pozycja wiązania	Sekwencja w mRNA p53	Funkcja białka	Cytowanie
CUG-BP (CELF1)	ugcug	(-181):(-177)	gggu <u>ugcug</u> gggau	Bierze udział w regulacji: -alternatywnego splicingu pre-mRNA, - translacji - edycji RNA - stabilności RNA - degradacji RNA. Zlokalizowane w jądrze komórkowym i cytoplazmie. Zaburzony poziom w licznych nowotworach ludzkich. Ulega nadekspresji w dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1). Sugerowany związek pomiędzy białkiem a neurodegeneracją.	Russo, <i>et al.</i> 2017 Dasgupta, <i>et al.</i> 2012
		(-152):(-148)	cac <u>gugcu</u> accc		
		(-134):(-130)	aaagu <u>ucugu</u> agc		
		(-107):(-103)	acca <u>uccug</u> gcug		
		(-103):(-99)	uccu <u>ggcugu</u> agg		
		122:126	gauc <u>uguugcug</u> c		
		125:129	cugu <u>ugcug</u> cccc		
DAZAPI	uagkwrr	(-98):(-92)	gcugu <u>agguagcga</u>	Bierze udział we wczesnych etapach inicjacji translacji mRNA. Niezbędne w prawidłowym rozwoju i spermatogenezie u myszy. Regulator alternatywnego splicingu. Wpływa na lokalizację mRNA. Ulega translokacji z jądra do cytoplazmy i mitochondrium.	Smith, <i>et al.</i> 2011 Choudhury, <i>et al.</i> 2014

FXR1	aygacr	(-10):(-5)	acug gaugac ugcc	Bierze udział w: - wiązaniu RNA, - regulacji translacji mRNA. Moduluje ekspresję p53. Może być transportowane pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Odpowiada za plastyczność synaptyczną. Może odgrywać rolę w rozwoju mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych.	Fan, <i>et al.</i> 2017
G3BP2	aggaur	(-12):(-6)	agac uggaugac ug	Bierze udział w: - regulacji translacji mRNA, - kontroli stabilności RNA - regulacji komórkowych szlaków sygnałowych - odpowiedzi na stres. Wykazuje działanie przeciwwirusowe skierowane przeciwko wirusom polio i alfa.	Bidet, <i>et al.</i> 2014
HNRNPA1	duagggw	(-99):(-93) (-82):(-76)	gcu guagguag cgca acagu uagggg gca	Bierze udział w: - regulacji transkrypcji, - splicingu mRNA, - eksporcie z jądra komórkowego, - translacji i degradacji RNA, - biogenezie miRNA, - utrzymaniu telomerów (ang. <i>telomeres maintenance</i>).	Zhang, <i>et al.</i> 2017
HNRNPA1L2	duagggw	(-99):(-93) (-82):(-76)	gcu guagguag cgca acagu uagggg gca	Bierze udział w: - wiązaniu mRNA, - obróbce mRNA (ang. <i>mRNA processing</i>), - transporcie mRNA, - splicingu mRNA	www.uniprot.org Q32P51 (RA1L2_HUMAN)
HNRNPA2B1	duagggw	(-82):(-76)	acagu uagggg gca	Bierze udział w: - rozwoju nowotworu, - ekspresji genów, - transdukcji sygnałów. Wiąże motywy mRNA zawierające m ⁶ A	Hu, <i>et al.</i> 2017 Alarcón, <i>et al.</i> 2015
HNRNPF	gugkau gukgykg	(-13):(-8) 123:129	aagac uggaugac u aucu guugcug ccc	Bierze udział w: - regulacji alternatywnego splicingu, - poliadenylacji. Rozpoznaje sekwencje poli(G).	Dominguez & Allain, 2006
HNRNPH1	gargag	4:9	caug gaggag ucac	Bierze udział w: - splicingu pre-mRNA, - zmianie lokalizacji mRNA (ang. <i>mRNA trafficking</i>) - rozwoju nowotworów. Wpływa na stabilność mRNA.	Li, <i>et al.</i> 2018

HNRNPM	gguugguu	(-184):(-177)	ggggguugcugggga	Bierze udział w: - translacji zależnej od elementów IRES, - regulacji alternatywnego splicingu.	Ainaoui, <i>et al.</i> 2015 Passacantilli, <i>et al.</i> 2017
MBNL1	ygucy	(-209):(-204) (-134):(-129) (-128):(-123) (-103):(-98) (-47):(-42) (-27):(-22) 74:79 92:97 106:111 122:127 125:130	auccagcuuuguc aaaguucuguagcu cuguagcucaguu uccuggcuguaggu cuccuccuuccag guacgcuucuccg aaacuacuuccucc gauauccugcgauc accucacugcaugg gaucuguugcugcc cuguugcugcccca	Bierze udział w: - alternatywnym splicingu, - biogenezie pre-miRNA, - lokalizacji mRNA, - alternatywnej poliadenylacji, - powstawaniu cyrkularnych RNA. Ulega sekwestracji w dystrofii miotonicznej typu I i II	deLorimier, <i>et al.</i> 2017 Konieczny, <i>et al.</i> 2017
MSI1	uaguwrg	(-98):(-92) (-85):(-79)	gcuguagguagcga acuacaguuagggg	Ulega nadekspresji w licznych nowotworach. Zmienia morfologię komórki. Wpływa na migrację komórek. Bierze udział w inhibicji translacji mRNA. Wpływa na różnicowanie komórek z neuronalnych komórek macierzystych lub komórek progenitorowych.	Chen, <i>et al.</i> 2017 Niu, <i>et al.</i> 2017
NOVA1	ycay	97:100 100:103 105:108	ccugccaucacc gccaucaccuca caccuacugca	Ulega wysokiej ekspresji w komórkach nerwowych. Reguluje alternatywny splicing mRNA istotnych w aktywności synaptycznej. Zaburzony poziom białka w licznych nowotworach, np. raku żołądka.	Li, <i>et al.</i> 2017 Yu, <i>et al.</i> 2018
PCBP2	ccyyech	(-167):(-161) (-162):(-156) (-46):(-40)	gggacuuccccuc uuucccuccacg uccuccuuccagca	Wiąże się do elementów IRES wirusowych RNA. Bierze udział w: - splicingu mRNA, - obróbce mRNA (ang. <i>mRNA processing</i>), - kontroli stabilizacji mRNA.	Asnani, <i>et al.</i> 2016 Ghanem, <i>et al.</i> 2015
PTBP1	cucucu	34:39 36:41 38:43 104:109 117:122 119:124	cgaguccucuga agcucccugagc cuccucugagcca ucaccuacugcau uggacgaucuguug gacgaucuguugcu	Wpływa na: - strukturę i ruchliwość komórek, - metabolizm i modyfikacje białek, - cykl komórkowy, - regulację alternatywnego splicingu, - stabilizację i transport mRNA, Wiąże się do elementów IRES. Podwyższony poziom w licznych nowotworach, np. raku piersi, jajnika, mózgu.	Wang, <i>et al.</i> 2017

RBFOX1 (A2BP1)	wgcaugm	109:115	ucac <u>ugcaugg</u> acg	Bierze udział w alternatywnym splicingu. Wpływa na: - stabilność mRNA, - translację, - alternatywną poliadenylację, - stabilność mRNA, - lokalizację mRNA. Pełni istotną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu serca i mięśni szkieletowych.	Chen, <i>et al.</i> 2016 Gao, <i>et al.</i> 2016
RBM4	gcgcgss	(-191):(-185) (-189):(-183)	aguc <u>ucg</u> cggggguu ucuc <u>g</u> cgggggguug	Wpływa na: - alternatywny splicing, - translację, - różnicowanie komórek trzustki i mięśniowych. Występuje głównie w plamkach jądrowych (ang. <i>nuclear speckles</i>). Działa antagonistycznie w stosunku do białka SRSF1. Działa antagonistycznie w stosunku do białka PTB.	Wang, <i>et al.</i> 2014 Su, <i>et al.</i> 2017
SRSF1 (ASF/SF2)	gragga ugrwgvh	(-11):(-6) 3:8 2:8	gac <u>uggaug</u> acugc cca <u>uggagg</u> aguca gcca <u>uggagg</u> aguc	Bierze udział w: - splicingu, - alternatywnym splicingu, - transkrypcji, - translacji, - eksporcie mRNA z jądra komórkowego. Zwiększenie poziomu białka w licznych nowotworach ludzkich.	Xie, <i>et al.</i> 2017
SRSF2	ugcygyy	92:98 95:101 122:128 125:131	gaua <u>uccugcc</u> auc aucc <u>ugcca</u> accu gauc <u>uguugcu</u> gcc cugu <u>ugcugcc</u> cca	Bierze udział w: - splicingu, - aktywacji transkrypcji, - stabilności RNA, - transporcie mRNA - translacji.	Luo, <i>et al.</i> 2017
SRSF3 (SRp20, SFRS3)	cuckucy	(-167):(-161) (-163):(-157) (-162):(-156) (-156):(-150) (-150):(-144) (-57):(-51) (-54):(-48) (-51):(-46) (-48):(-42) (-47):(-41) (-27):(-21) (-25):(-19) 74:80	ggga <u>cuuucc</u> ccuc cuu <u>ucccucc</u> cacg uu <u>ucccucc</u> cacg cu <u>ccacguc</u> gucac cgug <u>cucacc</u> ugg ggcc <u>cuaucc</u> ucc ccuc <u>auccucc</u> uccu cau <u>ccuccucc</u> uucc ccu <u>ccuccucc</u> ccag cucc <u>uccucc</u> cagc guca <u>cgcuuc</u> ccg cacg <u>cuucc</u> gaa aaacu <u>acuucc</u> cca	Bierze udział w: - alternatywnym splicingu, - naprawie DNA, - eksporcie RNA, - alternatywnej poliadenylacji, - translacji. Ulega nadekspresji w licznych nowotworach ludzkich.	Peiqi, <i>et al.</i> 2016

	wcwwc	77:83 (-56):(-52) 72:76 75:79	cuacu <u>uccucc</u> agaa gccc <u>caucc</u> ucc ggaa <u>acuacu</u> ucc aacu <u>acuucc</u> ucc		
SRSF5 (SRp40, SFRS5)	yywewsg	(-193):(-187) (-182):(-176) (-159):(-153) (-126):(-120) (-119):(-113) (-88):(-82) (-66):(-60) (-32):(-26) (-25):(-19) 10:16 37:43 56:62 63:69 103:109 105:111 130:136	ggag <u>ucucgc</u> gggg gggg <u>uugcugg</u> gau cccc <u>uccacg</u> ugcu guag <u>cuucagu</u> uca cagu <u>ucauugg</u> gac gcga <u>cuacagu</u> uag uag <u>cauucagg</u> ccc aggg <u>ugucagc</u> uu cacg <u>cuuccg</u> aa ggag <u>ucacaguc</u> gg gcuc <u>ccucugag</u> cc acau <u>uuucagg</u> cuu cagg <u>cuuauugg</u> aaa auc <u>accucacu</u> gcau cacc <u>ucacugca</u> ug gcug <u>ccccagg</u> aug	Czynnik splicingowy. Ulega indukcji przez insulinę w regenerującej się wątrobie. Główny regulator splicingu mRNA wirusa HIV. Ulega indukcji pod wpływem: - światła UV, - doksorubicyny, - cykloheksymidu, - w warunkach hipoksji. Wzmacnia splicing pre-mRNA w namnażających się komórkach, ale nie w różnicujących się.	Fujita, <i>et al.</i> 2017 Breig, <i>et al.</i> 2013
SRSF7 (9G8)	acgacg wggacra	(-220):(-215) (-90):(-85) (-18):(-13) (-10):(-5) 113:119	uuau <u>ggcgacu</u> auc uagc <u>gacuacagu</u> u cucc <u>gaagacug</u> ga acug <u>gaugacug</u> cc ugca <u>uggacga</u> ucu	Czynnik splicingowy. Regulator alternatywnego splicingu. Bierze udział w: - transporcie mRNA, - translacji. Podwyższony poziom w rakach płuc i okrężnicy.	Fu & Wang, 2018
TARDBP	ugugug	(-206):(-201)	cagc <u>uuugug</u> ccag	Bierze udział w: - transkrypcji, - splicingu pre-mRNA, - transporcie mRNA, - stabilności mRNA. Ulega agregacji w mózгах pacjentów z demencją oraz ze stwardnieniem zanikowym bocznym (ALS, ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i>).	Ying, <i>et al.</i> 2016
ZNF638	bguusku	122:128	gauc <u>uguugcu</u> gcc	Czynnik transkrypcyjny. Bierze udział w: - rozwoju szkieletowym, - różnicowaniu adipocytów.	Lin, <i>et al.</i> 2017

5. Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono kompleksową analizę strukturalną i funkcjonalną regionu terminalnego 5' mRNA p53 u myszy:

- określono długość regionu niekodującego 5' mRNA p53 myszy;
- zaproponowano modele struktur drugorzędowych regionów terminalnych 5' mRNA(-122), mRNA(-247) i mRNA(-166);
- zaproponowano model struktury trzeciorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA (-122) oraz spinki C(-51):G9 i fragmentu U41:U140;
- określono wpływ długości regionu niekodującego 5' mRNA p53 na proces inicjacji translacji;
- przeprowadzono analizę porównawczą względnych ilości mRNA i białka p53 w komórkach mysich w warunkach normalnych i stresowych;
- zbadano, od którego z dwóch potencjalnych kodonów inicjacyjnych AUG rozpoczyna się synteza białka p53 w komórkach mysich;
- przeprowadzono analizę zachowawczości elementów strukturalnych oraz identyfikację *in silico* białek potencjalnie oddziałujących z mRNA p53 myszy.

W pierwszym etapie badań określono długość regionu niekodującego 5' mRNA p53 myszy wykonując eksperyment 5'RACE (rys. 15). Analizowano materiał pochodzący z trzech różnych źródeł: 11-dniowych embrionów, grasicy i wątroby. Okazuje się, że w komórkach mysich region ten nie jest jednorodny: jego długość może wahać się od 58 do 247 nukleotydów, jednak najwięcej transkryptów zawierało 5'UTR o długości 122 nukleotydów. Do dalszych analiz wybrano mRNA zawierający najczęściej występujący, 122-nukleotydowy 5'UTR (mRNA(-122)) oraz mRNA obejmujący najdłuższy zidentyfikowany, 247-nukleotydowy region niekodujący 5' (mRNA(-247)). Cząsteczki mRNA(-122) i mRNA(-247) najprawdopodobniej są homologami ludzkich transkryptów mRNA inicjowanych od miejsc P1 i P0.

W kolejnym kroku przeprowadzono mapowanie struktury drugorzędowej mRNA (-122) i mRNA(-247) z wykorzystaniem metody cięć indukowanych w obecności jonów Pb^{2+} , SHAPE oraz modyfikacji siarczanem dimetylu. Na podstawie uzyskanych wyników

zaproponowano model struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-122), składający się z pięciu elementów strukturalnych typu spinki do włosów (rys. 19). Przeprowadzono również mapowanie struktury badanego regionu mRNA za pomocą DMS w transfekowanej linii komórkowej fibroblastów mysich. Okazało się, że wzór mapowania w warunkach *in vitro* i *in cellulo* jest bardzo podobny, co potwierdza występowanie zaproponowanej struktury również w warunkach komórkowych. Struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA(-247) (rys. 22) zawierała siedem elementów strukturalnych typu spinki do włosów, spośród których pięć zaobserwowano w mRNA(-122). Dwie dodatkowe spinki znajdują się na końcu 5' mRNA(-247). Występowanie spinek C(-200):G (-102), C(-51):G9 oraz A89:U140 potwierdzono tzw. metodą domenową (rys.23), czyli poprzez mapowanie struktury elementów izolowanych oraz porównanie uzyskanego wzoru mapowań do wzoru otrzymanego dla analogicznego fragmentu w mRNA pełnej długości.

Dodatkowych badań wymagało wyjaśnienie sposobu zwinienia odcinka mRNA U41:U81. Jest to fragment silnie zachowawczy ewolucyjnie, który w mRNA ludzkim przyjmuje strukturę typu spinki, do której wiążą się białka HDM2 i HDMX. Na podstawie zachowawczości można przypuszczać, że podobna spinka będzie występowała w mRNA mysim. Jednak analiza *in silico* wykazała, że struktura termodynamicznie najstabilniejsza tego fragmentu to dwa małe elementy typu spinki do włosów U41:A66 i G68:C80. Pośród zaproponowanych, mniej stabilnych termodynamicznie struktur występowała również spinka podobna do zaobserwowanej w mRNA ludzkim. Aby określić, który element występuje w mRNA mysim przeprowadzono mapowanie dostępności mRNA do hybrydyzacji sześci nukleotydowych oligomerów DNA oraz cięcia RNazą H. Uzyskane wyniki wskazują, że w mRNA mysim z większym prawdopodobieństwem występuje struktura pojedynczej spinki, analogicznej do obecnej w ludzkim mRNA (rys. 25).

Dodatkowo, przeprowadzono mapowanie struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA(-166). Transkrypt ten nie został zidentyfikowany w eksperymencie 5'RACE, jednak w literaturze opisano wyniki analizy mRNA zawierającego 5'UTR odpowiadający temu mRNA. Zaproponowany model składa się z siedmiu elementów strukturalnych typu spinki do włosów (rys. 28). Część z nich jest bardzo zbliżona do elementów występujących w mRNA(-122), a w strukturach występują jedynie niewielkie

rearanżacje. Niemniej jednak, spinki G18:C37 i U(-159):A(-111) zostały zaproponowane jedynie w modelu regionu terminalnego 5' mRNA(-166).

Celem zaproponowania modeli struktur trzeciorzędowych i określenia właściwości termodynamicznych wybranych fragmentów mysiego mRNA p53 przeprowadzono modelowanie przy użyciu programu RNA Composer, wykorzystano także technikę SAXS oraz spektroskopię dichroizmu kołowego. Parametry termodynamiczne obliczone na podstawie eksperymentu są zgodne z parametrami teoretycznymi wyznaczonymi dla danych cząsteczek (tab. 6). Ponadto zaobserwowano, że modele wygenerowane za pomocą programu RNA Composer dobrze korespondują z kulkowymi modelami *ab initio* dla badanych cząsteczek (rys. 33). Jedynie w przypadku fragmentu mRNA U41:U140, pomimo zgodności parametrów strukturalnych, nie obserwujemy prawidłowej korelacji modeli. Najprawdopodobniej jest to spowodowane występowaniem krótkiego fragmentu RNA o dużej giętkości, powodującym zgięcie struktury. Na podstawie badań SAXS można sądzić, że badana cząsteczka w roztworze przyjmuje kształt wydłużonej pałeczki. Dopasowanie modelu do struktury *ab initio* wymaga dalszej analizy. Ponadto, przeprowadzono pomiary spektroskopii dichroizmu kołowego w szerokim zakresie temperatur. Umożliwiło to wyznaczenie parametrów termodynamicznych dla badanych cząsteczek, takich jak temperatura topnienia (T_m), entalpia swobodna (ΔG), entalpia (ΔH) i entropia (ΔS).

W kolejnym etapie badań określono, w jaki sposób długość regionu niekodującego 5' mRNA p53 myszy wpływa na proces inicjacji translacji. Przeprowadzono translację wybranych mRNA w warunkach *in vitro*, w obecności wzrastającego stężenia analogu kapu $m^7G(5')ppp(5')G$ (rys. 38). Analog ten powoduje inhibicję inicjacji procesu translacji zależnego od obecności kapu na końcu 5' mRNA. W przypadku mRNA(-122) zaobserwowano spadek ilości syntezowanego białka wraz ze wzrostem stężenia analogu. Na tej podstawie można wnioskować, że inicjacja translacji mRNA(-122) jest procesem zależnym od obecności kapu na końcu 5' mRNA. W przypadku mRNA(-247) nie zaobserwowano silnego zahamowania syntezy białka, co więcej, przy niskich stężeniach analogu kapu odnotowano znaczny wzrost efektywności jego syntezy. Otrzymane wyniki sugerują, że dla mRNA(-247) inicjacja translacji zachodzi w sposób niezależny od kapu. Analizie poddano również mRNA(-166) i wykazano, że w tym przypadku inicjacja translacji jest procesem kap-zależnym (rys. 39).

Zbadano także, jak zmienia się poziom białka i mRNA p53 pod wpływem stresów genotoksycznego i siateczki śródplazmatycznej. Komórki linii NIH3T3 hodowano w pożywce zawierającej jeden z czynników stresowych: tunikamycynę, tapsigarginę lub doksorubicynę. Następnie, przy użyciu metod Western blot i cytometrii przepływową sprawdzano, jak zmieniał się poziom białka p53. Po zastosowaniu stresu siateczki śródplazmatycznej widoczny był spadek ilości białka, natomiast w warunkach stresu genotoksycznego zaobserwowano znaczny wzrost ilości syntetyzowanego białka p53. Poziom mRNA sprawdzono wykorzystując metodę RT-PCR. Zauważono, że pomimo zastosowanych czynników stresowych poziom mRNA nie zmieniał się (rys. 40). Widoczna zmiana w ilości białka, przy zachowanym poziomie mRNA sugeruje, że regulacja aktywności p53 w odpowiedzi na stres zachodzi na poziomie translacji.

W trakcie badań zauważono, że w mysim mRNA p53 w odległości 6 nt, w otwartej ramce odczytu, znajdują się dwa potencjalne kodony inicjacyjne AUG. Jednak tylko jeden z nich, zlokalizowany niżej w sekwencji, znajduje się w obrębie optymalnej sekwencji nukleotydowej 'Kozak'. Aby sprawdzić od którego kodonu AUG inicjowana jest translacja, przeprowadzono mutagenezę ukierunkowaną. Otrzymano modelowe mRNA(-122), w których jeden z kodonów AUG został zamieniony na kodon GCG. Powstałe mRNA poddano translacji *in vitro*. Okazało się, że żadna z wprowadzonych mutacji nie blokuje całkowicie syntezy białka p53, w związku z czym można przypuszczać, że synteza białka może rozpoczynać się od obu kodonów. Zauważono, że po zmutowaniu kodonu inicjacyjnego zlokalizowanego niżej w sekwencji ilość powstającego białka spada do 60% i jest to spadek większy o 20% niż w przypadku zmutowania kodonu pierwszego (rys. 43A). Sugeruje to, że to drugi kodon AUG jest kodonem wiodącym w procesie inicjacji translacji mysiego mRNA p53. Uzyskane modelowe mRNA wprowadzono również do komórek MB352, fibroblastów pozbawionych endogennego p53 i sprawdzono, w jaki sposób przebiega translacja. W każdej analizowanej próbie zidentyfikowano białko p53, co wskazuje na możliwość syntezy białka od obu kodonów inicjacyjnych również w warunkach *in cellulo* (rys. 43B).

W ostatniej części pracy przeprowadzono analizę zachowawczości ewolucyjnej poszczególnych nukleotydów w mysim mRNA p53, celem wskazania elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' o potencjalnie istotnym znaczeniu (rys. 44). Przeprowadzono także analizę *in silico*, umożliwiającą zaproponowanie białek potencjalnie

oddziałujących z regionem terminalnym 5' mRNA(-247). Do tego celu wykorzystano program RBPmap. Zidentyfikowano 24 białka, których sekwencje docelowe zlokalizowano w obrębie regionu terminalnego 5' badanego mRNA (tab. 7). Białka te potencjalnie mogą oddziaływać z badanym regionem mRNA p53, lecz w każdym indywidualnym przypadku oddziaływania te wymagają eksperymentalnej weryfikacji.

6. Materiały i metody

6.1. Reakcja szybkiej amplifikacji końców 5' mRNA - 5'RACE (ang. *Rapid Amplification of 5' cDNA Ends*) oraz analiza uzyskanych produktów

W reakcji 5'RACE wykorzystano dostępne komercyjnie RNA wyizolowane z wątroby, grasicy oraz jedenastodniowych embrionów (Clontech; Mouse total RNA master panel). Reakcję przeprowadzono za pomocą zestawu 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen). W pierwszym etapie eksperymentu wykonano reakcję odwrotnej transkrypcji. Przeprowadzono denaturację RNA poprzez inkubację 1 µg RNA z 2,5 pmol startera GSP1 (5'-GTCTTCCAGTGTGATGATGGT-3') w temperaturze 70°C przez 10 minut, po czym próbkę schładzano przez 1 minutę poprzez umieszczenie w lodzie. Następnie dodano bufor PCR (200 mM Tris-HCl (pH=8,4), 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 10 mM miks dNTP (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP) oraz 0,1 M DTT). Tak przygotowaną próbkę inkubowano przez 1 minutę w 42°C, po czym dodano 200 jednostek (U, ang. *unit*) enzymu SuperScript II RT. Reakcję przeprowadzono w 42°C przez 50 minut i zakończono inkubacją w 70°C przez 15 minut. Końcowe stężenia poszczególnych składników w reakcji wynosiły: 20 mM Tris-HCl (pH=8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 nM startera GSP1, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, 1 µg RNA, 200 U SuperScript II RT. Następnie, próbkę umieszczono w temperaturze 37 °C i dodano mieszaninę RNaz, celem degradacji oryginalnego RNA. cDNA oczyszczono wykorzystując kolumnienki S.N.A.P. W następnym etapie uzyskany cDNA wydłużano na końcu 3' o sekwencję reszt cytydyny, za pomocą terminalnej deoksyrybonukleotydylotransferazy (TdT). 10 µl oczyszczonego cDNA zmieszano z 2 mM dCTP oraz buforem do wydłużania sekwencji nukleotydowej (ang. *tailing buffer*) (50 mM Tris-HCl (pH=8,4), 125 mM KCl, 7,5 mM MgCl₂) i inkubowano przez 3 minuty w 94°C a następnie przez minutę na lodzie. Następnie, do próbki dodano 1 µl TdT i prowadzono reakcję przez 10 minut w temperaturze 37°C i zakończono inkubacją w 65°C przez 10 minut. Końcowe stężenia poszczególnych składników w reakcji wynosiły: 10 mM Tris-HCl (pH=8,4), 25 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dCTP, cDNA, TdT. Aby sprawdzić, czy reakcja przebiegła poprawnie przeprowadzono również reakcję kontrolną bez enzymu TdT. W ostatnim etapie eksperymentu powstały cDNA amplifikowano w reakcji PCR, która zawierała 20 mM Tris-HCl (pH=8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM

dCTP, 200 μ M dATP, 200 μ M dUTP, 200 μ M dGTP, 5 μ l cDNA wydłużonego o ciąg C, 400 nM startera GSP2 (5'-CAAAAAACTTACCAGGGCAACT-3'), 400 nM startera AAP (5'-GGCCACGCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3', dołączony do zestawu) oraz 2,5 U polimerazy DNA *Taq*. Sekwencje starterów GSP1 i GSP2 są odwrotnie komplementarne do starterów p53-1165R i p53-411R, zastosowanych przez Chaing i wsp. w 2012 roku [Chiang *et al.* 2012]. Reakcje rozpoczęto od 3 minut denaturacji w 94°C, a następnie prowadzono przez 30 cykli: 30 sekund w 94°C, 30 sekund w trzech różnych temperaturach 58°C/62°C/64°C, 2 minuty w 72°C, po czym następowało końcowe wydłużanie przez 10 minut w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano wykorzystując 1% żel agarozowy i wizualizowano za pomocą odczynnika SimplySafe (EurX).

W następnym etapie, w celu analizy długości regionu niekodującego 5' mRNA p53, produkty uzyskane w eksperymencie 5'RACE wklonowano w wektor TOPO z systemu TOPO TA Cloning (Invitrogen). W tym celu przygotowano reakcję zawierającą 2 μ l dsDNA otrzymanego w reakcji PCR, 10 ng wektora pCRTM2.1-TOPO®, 200 mM NaCl i 10 mM MgCl₂, którą inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej (23°C). Produkty reakcji wykorzystano do transformacji bakterii kompetentnych TOP10 (One Shot TOP10 Competent Cells, Invitrogen) (rozdział 6.16. Transformacja bakterii *E. coli*). Wybrane klonów poddano sekwencjonowaniu (firma Genomed S.A.), odpowiednio: 29 klonów powstałych z wykorzystaniem mRNA pochodzącym z embrionów oraz po 20 klonów powstałych z wykorzystaniem mRNA pochodzącym z wątroby i grasicy.

6.2 Otrzymywanie matrycowych dsDNA do reakcji transkrypcji *in vitro*

Wszystkie otrzymane matrycowe dsDNA stanowiły matrycę do syntezy cząsteczek RNA, niezbędnych w dalszych etapach badań.

6.2.1. Konstrukty dsDNA zawierające warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 122 i 247 nukleotydów

Konstrukty dsDNA zawierające warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 122 i 247 nukleotydów otrzymywano w dwóch etapach.

W pierwszym z nich, wektor pCMV6, zawierający sekwencję mRNA p53 wraz z regionami niekodującymi (p53 True Clone, Origene), trawiono enzymami restrykcyjnymi SacI i Psp5II (Invitrogen). W tym celu przygotowano reakcję zawierającą 1 µg plazmidowego DNA, 2 µl buforu FastDigest oraz 1 µl enzymu restrykcyjnego Psp5II. Trawienie prowadzono przez 5 minut w 37°C, po czym inaktywowano enzym poprzez inkubację w 80°C przez 5 minut. Następnie do próbki dodano 1 µl enzymu restrykcyjnego SacI i inkubowano reakcję przez 5 minut w 37°C i inaktywowano enzym poprzez inkubację w 80°C przez 5 minut. Produkty reakcji rozdzielano na 1% żelu agarozowym przygotowanym z agarozy niskotopliwej, wycinano prążek o długości ok. 6200 pz a następnie przeprowadzono Lucję z żelu poprzez inkubację wycinka żelu z wodą w stosunku 1:1, w temperaturze 65°C przez 15 minut z wytrząsaniem. Otrzymane produkty oczyszczano wykorzystując zestaw Gene MATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (Eurx).

W drugim etapie syntetyzowano segment dsDNA zawierający brakujący fragment części kodującej mRNA, region niekodujący 5' mRNA o odpowiedniej długości 122 lub 247 nukleotydów, promotor dla polimerazy T7 RNA oraz sekwencję rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny SacI. Syntezę matrycy przeprowadzono za pomocą reakcji PCR, w której jako matrycę wykorzystano plazmid z sekwencją p53 zawierającą odpowiednią długość regionu niekodującego 5' (uzyskany w eksperymencie 5'RACE) oraz następujące startery:

Tabela 8. Lista starterów wykorzystanych do otrzymania konstruktów dsDNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 122 i 247 nt.

Nazwa startera	Sekwencja 5' → 3'
122_F	AAGCAGAGCTCTAATACGACTCACTATAGGAGTTCATTGGG ACCATCCTG
122_R	GGTGACAGGGTCCTGTGCTGCA
247_F	AAGCAGAGCTCTAATACGACTCACTATAGGACGGAAGGACTTGCCCTTACTT GTTATGGCGACTAT
247_R	GGTGACAGGGTCCTGTGCTGCA

Reakcja PCR zawierała: 40 ng matrycowego dsDNA, 100 mM startera F i R, 0,2 mM każdego dNTP, 1,66 U polimerazy *Pfu*, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 1% (v/v) Triton-X100, 20 mM MgSO₄. Reakcję rozpoczęto od 3 minut denaturacji w 95°C, a następnie prowadzono przez 35 cykli: 30 sekund w 95°C,

30 sekund w 58°C, 1 minuta w 72°C, po czym następowało końcowe wydłużanie przez 10 minut w 72°C. Produkty reakcji PCR poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi SacI i Psp5II analogicznie jak w przypadku plazmidowego DNA. Następnie, za pomocą ligazy DNA T4 (Thermo Fisher Scientific) wprowadzono do plazmidu przygotowanego w pierwszym etapie. Reakcja ligacji zawierała: produkty PCR i plazmidowy DNA trawione enzymami restrykcyjnymi zmieszane w stosunku 3:1, 1,5 U ligazy DNA T4 oraz 2 µl dziesięciokrotnie stężonego buforu do ligacji. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym jej produktami transformowano baterie kompetentne TOP10 (One Shot TOP10 Competent Cells, Invitrogen), (rozdział 6.16. Transformacja bakterii *E. coli*), a następnie poddano sekwencjonowaniu (firma Genomed S.A.).

Przed wykorzystaniem w reakcji transkrypcji *in vitro*, uzyskane konstrukty linearyzowano wykorzystując enzym restrykcyjny NotI.

6.2.2. Konstrukty dsDNA zawierający wariant regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 166 nukleotydów

Konstrukty dsDNA, zawierający wariant regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 166 nukleotydów otrzymywano wieloetapowo, w reakcjach PCR. W pierwszej, z nich za pomocą starterów Fm409 i RmORF namnożono sekwencję odpowiadającą sekwencji kodującej mRNA p53 oraz 138 nukleotydowy 5'UTR, stanowiącą insert wektora pCMV6. Reakcja PCR zawierała: 5 ng plazmidu pCMV6, 0,2 mM każdego dNTP, 0,5 µM startera Fm409, 0,5 µM startera RmORF, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl. Reakcję rozpoczęto od 3 minut denaturacji w 95°C, a następnie prowadzono przez 30 cykli: 30 sekund w 95°C, 30 sekund w 58°C, 1 minuta w 72°C, po czym następowało końcowe wydłużanie przez 10 minut w 72°C.

W następnym etapie dodano fragment dsDNA brakujący do uzyskania 166-nukleotydowego fragmentu 5'UTR. Do wydajnej transkrypcji *in vitro* z promotora dla polimerazy T7 RNA wskazana jest reszta guanozyny na końcu 5' transkryptu. W związku z powyższym, zdecydowano się na wydłużenie sekwencji o 4 nt tak, aby powstały produkt PCR na końcu 5' zawierał dwie, naturalnie występujące reszty guanozynowe. Reakcję PCR przeprowadzono wykorzystując produkt PCR uzyskany w pierwszym etapie oraz startery

Fm376-2G i RmORF. Reakcję przeprowadzono w warunkach takich samych jak w przypadku namnażania pierwszego fragmentu 409-ORF.

W ostatnim etapie syntezy matrycy przeprowadzono reakcję PCR, w której dodano sekwencję promotora dla polimerazy T7 RNA do fragmentu DNA powstałego w drugiej reakcji PCR. W reakcji wykorzystano startery FmT7zakl i RmORF. Reakcję przeprowadzono w warunkach takich samych jak w przypadku namnażania pierwszego fragmentu 409-ORF.

Po każdej reakcji PCR uzyskany produkt oczyszczano wykorzystując zestaw do oczyszczania produktów reakcji PCR Gene MATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EurX). Sekwencje wykorzystanych starterów zaprezentowano w tabeli 9.

Tabela 9. Lista starterów wykorzystanych do wytworzenia konstrukt dsDNA zawierającego wariant regionu terminalnego 5' mRNA p53 o długości 166 nt.

Nazwa startera	Sekwencja 5'→3'
Fm409	AAGTTCTGTAGCTTCAGTTCATT
Fm376-2G	GGACTTCCCCTCCCACGTGCTCACCTGGCTAAAGTTCTGTAGCTT
FmT7zakl	TAATACGACTCACTATAGGACTTCCCCT
RmORF	TCAGTCTGAGTCAGGCCCACT

6.2.3. Cząsteczki dsDNA stanowiące matryce do syntezy izolowanych elementów strukturalnych zlokalizowanych w regionie terminalnym 5' mRNA p53

Syntezę dsDNA przeprowadzono za pomocą reakcji PCR, wykorzystując wymienione w tabeli 10 startery F (ang. *primer forward*) oraz R (ang. *primer reverse*). Startery F zawierały również na końcu 5' sekwencję promotora dla polimerazy T7 RNA. Cząsteczki syntetyzowano wykorzystując reakcję PCR, składającą się z następujących komponentów: 3 mM MgCl₂, 0,2 mM każdego dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 150 pmoli odpowiedniego stratera F i R oraz 5 U polimerazy DNA *Taq*. Matrycę do syntezy cząsteczki U41:U140 stanowił plazmid zawierający sekwencję nukleotydową p53 z 122-nukleotydowym

regionem 5'UTR. Reakcję rozpoczęto od minuty denaturacji w 95°C, następnie prowadzono przez 30 cykli: 30 sekund w 95°C, 30 sekund w 60°C, minutę w 72°C, po czym następowało końcowe wydłużanie przez 10 minut w 72°C. Produkty PCR rozdzielano na 1% żelu agarozowym i wycinano niższy prążek, celem oddzielenia pożądanego produktu od matrycy. Produkt reakcji odzyskiwano z żelu wykorzystując kolumnienki Gel extraction kit Ultrafree® DA (ROTH), po czym ponownie namnażano w reakcji PCR stosując te same warunki temperaturowe. Syntezę cząsteczek C(-200):G(-102), C(-51):G9 i A89:U140 rozpoczęto od 2 minut denaturacji w 94°C, a następnie prowadzono przez 8 cykli: 30 sekund w 94°C, 90 sekund w 72°C, po czym następowało końcowe wydłużanie przez 5 minut w 72°C.

Tabela 10. Lista starterów do syntezy izolowanych elementów strukturalnych

Nazwa startera	Sekwencja 5'→3'	Otrzymywana cząsteczka dsDNA
FmT7C(-200):G(-102)	TAATACGACTCACTATAGCCAGGAGTCTCGCGG GGGTTGCTGGGATTGGGACTTTCCCCTCCCACGT	C(-200): G(-102)
RmT7C(-200):G(-102)	GCCAGGATGGTCCCAATGAACTGAAGCTACAGAACTTT AGCCAGGGTGAGCACGTGGGAGGGGAAAAGTCCCAATCC	C(-200): G(-102)
FmT7C(-51):G9	TAATACGACTCACTATAGCTCCTCCTTCCCAGCAGGGTG TCACGCTTCTCCGAAGA	C(-51):G9
RmT7C(-51):G9	CTCCTCCATGGCAGTCATCCAGTCTTCGGAGAAGCGTGA CACCTGC	C(-51):G9
FmT7A89:U140	TAATACGACTCACTATAGATATCCTGCCATCACCTCACT GCATGGACG	A89:U140
RmT7A89:U140	AACATCCTGGGGCAGCAACAGATCGTCCATGCAGTGAG GTGATGGC	A89:U140
FmT7U41:U140	TAATACGACTCACTATAGGTGAGCCAGGAGACATTTTCA GGCTTA	U41:U140
RmT7U41:U140	ACATCCTGGGGCAGCAACAGAT	U41:U140;

Wszystkie otrzymane cząsteczki oczyszczano wykorzystując zestaw do oczyszczania produktów reakcji PCR Gene MATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EurX) oraz rozdzielano na 1% żelu agarozowym w celu analizy jakościowej.

Cząsteczkę DNA stanowiącą matrycę do syntezy RNA składającego się z 122-nukleotydowego 5'UTR i 201 nt sekwencji kodującej otrzymywano poprzez trawienie restrykcyjne enzymem Psp5II plazmidu zawierającego sekwencję mRNA(-122).

RNA powstałe na matrycy zaprojektowanych dsDNA wykorzystano w dalszych etapach pracy do analizy struktury trzeciorzędowej metodami małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS, ang. *small-angle X-ray scattering*) oraz dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*). Ponadto, fragmenty C(-200):G(-102), C(-51):G9 oraz A89:U140 wykorzystano do analizy struktury drugorzędowej stosując mapowanie za pomocą cięć indukowanych w obecności jonów Pb²⁺.

6.3. Transkrypcja *in vitro*

Cząsteczki RNA otrzymywano wykorzystując zestaw do transkrypcji TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (firmy Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Jako matryce wykorzystywano przygotowane wcześniej cząsteczki dsDNA lub zlinearyzowany plazmid w ilości 0,4-2 µg. Reakcja transkrypcji zawierała: 4 µl pięciokrotnie stężonego buforu TranscriptAid, 10 mM każdego NTP, matrycę oraz 2 µl enzymu TranscriptAid. Reakcję prowadzono przez 2-5 godzin w temperaturze 37 °C. Następnie, do reakcji dodawano 1U DNazy I i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 10 minut. Otrzymane transkrypty oczyszczano z wykorzystaniem zestawu GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Scientific). W celu analizy jakościowej, uzyskane produkty rozdzielano na 1% żelu agarozowym.

W reakcjach, których celem było uzyskanie RNA z wbudowanym na końcu 5' analogiem kapu ARCA dodawano analog do końcowego stężenia 2 mM, obniżając jednocześnie stężenie GTP do 1,5 mM.

W reakcjach, których celem było uzyskanie RNA zawierającego na końcu 5' wolną grupę hydroksylową dodawano guanozynę do końcowego stężenia 2 mM.

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

Do znakowania wykorzystywano 14 pmoli RNA zawierającego wolną grupę hydroksylową na końcu 5' lub 100 pmoli oligomeru DNA. Przed reakcją RNA denaturowano przez 2 minuty w 100°C, a następnie schładzano w lodzie przez 10 minut. Reakcja znakowania zawierała: kwas nukleinowy, 1 µl [γ -³²P] ATP o aktywności 4000/5000 Ci/mmol, 10 U kinazy polinukleotydowej T4 (ThermoFisher Scientific) oraz bufor A PNK (ThermoFisher Scientific); 500 mM Tris-HCl (pH 7.6 w 25°C), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM spermidyna). Reakcję prowadzono przez 30 minut w 37 °C. Produkty reakcji oczyszczano z wykorzystaniem zestawu GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (firmy Thermo Scientific) lub poprzez rozdział w 8% żelu PAA w warunkach denaturujących. Częsteczki wizualizowano poprzez autoradiografię, a następnie wycinano z żelu, przeprowadzono elucję 0,3 M octanem sodu przez 3 godziny w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 850 rpm przez 1 minutę co 3 minuty, strącanie 96% etanolem wirowanie i suszenie. Poziom radioaktywności otrzymanych cząsteczek mierzono za pomocą licznika scyntylacyjnego.

6.5. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA

6.5.1. Cięcia RNA indukowane w obecności jonów Pb^{2+}

Około 14 pmoli RNA poddano denaturacji w buforze denaturującym (40 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 10 mM $MgCl_2$) w 65 °C przez minutę, a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze 37°C. Mieszaninę reakcyjną podzielono na cztery próbki, a następnie dodano świeżo przygotowany roztwór octanu ołowiu do końcowego stężenia 0,25, 0,5 i 1 mM. Do reakcji kontrolnej zamiast roztworu octanu ołowiu dodano wodę. Reakcję prowadzono przez 2 minuty w temperaturze 37°C, a następnie zatrzymano poprzez dodanie w stosunku 1:1 roztworu „stop”, złożonego z 8 M mocznika i 20 mM EDTA. W kolejnym kroku przeprowadzono strącanie 96% etanolem w obecności 0,3 M octanu sodu (pH 5,2) i 20 µg/ml glikogenu, wirowanie i suszenie. Osad rozpuszczono w 10 µl wody.

W przypadku, gdy badano RNA znakowany na końcu 5' izotopem ^{32}P stosowano także powyższą procedurę, jednak do reakcji oprócz nieznakowanego RNA dodawano również RNA znakowany na końcu 5' (230 000 cpm).

6.5.2. Reakcja acylacji grup 2'-hydroksylowych analizowana za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji (SHAPE)

20 pmoli RNA inkubowano w buforze denaturującym (100 mM Tris (pH 8,0), 1 M KCl, 1 mM EDTA) przez 3 minuty w 90°C, a następnie stopniowo schładzano do temperatury 4°C z prędkością 0,1°C/sekundę. Po schłodzeniu, do mieszaniny reakcyjnej dodano bufor do zwijania RNA (ang. *folding buffer*; 200 mM Tris pH 8,0, 25 mM $MgCl_2$, 2,5 mM EDTA, 650 mM KCl, 40 U inhibitora RNaz), po czym próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 minut. Mieszaninę reakcyjną podzielono na dwie równe części. Do pierwszej, stanowiącej właściwą reakcję, dodano NMIA rozpuszczony w DMSO do końcowego stężenia 5 mM. Do drugiej, stanowiącej reakcję kontrolną, dodano taką samą ilość DMSO. Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 50 minut, a następnie RNA strącano 96% etanolem w obecności 0,3 mM octanu sodu i 20 µg/ml glikogenu, wirowano i suszono. Osad rozpuszczono w 10 µl wody.

6.5.3. Modyfikacja chemiczna RNA z wykorzystaniem siarczanu dimetylu (DMS) w warunkach *in vitro*

40 pmoli mRNA(-122) ogrzewano przez 5 minut w 65 °C w buforze o składzie: 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM HEPES (pH 7,8). Następnie próbkę inkubowano przez 10 minut w temperaturze 25 °C. Przygotowaną w ten sposób mieszaninę reakcyjną rozdzielono na cztery próbki. Do trzech dodano roztwór siarczanu dimetylu (DMS, w etanolu 1:11) do końcowego stężenia 0,4%, a następnie próbki inkubowano w temperaturze 37 °C przez 3, 5 i 10 minut. Reakcję kontrolną przygotowano poprzez dodanie do czwartej próbki odpowiedniej ilości etanolu, a następnie inkubację przez 10 minut w 37°C. Bezpośrednio po przeprowadzonej reakcji RNA strącano 96% etanolem w obecności 300 mM octanu sodu i 20 µg/ml glikogenu, wirowano i suszono. Osad zawieszano w 10 µl wody.

6.5.4. Modyfikacja chemiczna RNA z wykorzystaniem siarczanu dimetylu (DMS) w transfekowanej linii komórkowej

Modyfikację mRNA(-122) w transfekowanej linii komórkowej przeprowadzono bazując na opisanych wcześniej eksperymentach [Kwok *et al.* 2013]. Badania przeprowadzono wykorzystując linię komórkową fibroblastów mysich pozbawionych endogennego p53 (MB352) transfekowaną mRNA(-122). Po upływie 210 minut od transfekcji komórki przepłukano roztworem 1xPBS, zebrano, zawieszono w 1xPBS oraz rozdzielono na trzy części. Następnie do próbki dodano siarczan dimetylu (rozpuszczony w etanolu, 1:11) do stężenia końcowego 0,25%. Do reakcji kontrolnej dodano odpowiednią objętość etanolu. Próbki inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37 °C. Reakcję zakończono poprzez dodanie β-merkaptioetanolu (Sigma) do stężenia końcowego 0,7 M. Dodatkowo, komórki przepłukano dwukrotnie w 0,7 M roztworze β-merkaptioetanolu a następnie dodano odczynnik TRI Reagent (Molecular Research Centre lub Sigma). Izolację RNA przeprowadzono według standardowej procedury, opisanej w dalszej części pracy.

6.5.5. Mapowanie dostępności RNA do hybrydyzacji za pomocą bibliotek kombinatorycznych DNA oraz RNazy H

0,5 pmola mRNA(-122) inkubowano w buforze o składzie: 20 mM HEPES (pH 8,0), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 50 µg/ml BSA, 1 mM DTT. Inkubację prowadzono w temperaturze 65°C przez 2 minuty a następnie w temperaturze 37°C przez 10 minut. Następnie dodawano RNazę H (Promega) do końcowego stężenia 225 U/ml. Reakcję cięcia indukowano poprzez dodanie do oddzielnych mieszanin jednej z czterech bibliotek kombinatorycznych 6-merów DNA o stężeniu końcowym 185 µM. Reakcję prowadzono przez 10 i 30 minut w temperaturze 37°C, następnie zatrzymano poprzez dodanie 20 mM EDTA w stosunku 1:1. Natychmiast po zakończeniu reakcji przystępowano do oczyszczania produktów reakcji za pomocą metody fenol : chloroform według standardowej procedury.

6.6. Odwrotna transkrypcja

Reakcje odwrotnej transkrypcji wykorzystywano w dwóch przypadkach: do analizy produktów reakcji mapowania struktury drugorzędowej RNA oraz do półilościowej analizy poziomu mRNA. Odwrotną transkrypcję przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu SuperScriptIII (Thermo Fisher Scientific).

- Analiza produktów reakcji mapowania struktury drugorzędowej RNA: przygotowano mieszaninę składającą się z 2 µl RNA po reakcji mapowania, 2 pmoli startera DNA znakowanego radioizotopowo ³²P na końcu 5' oraz wody, końcowa objętość wynosiła 12 µl. Przeprowadzono denaturację w 95°C przez minutę, po czym schładzano na lodzie przez 10 minut. Przygotowaną mieszaninę wykorzystano do reakcji odwrotnej transkrypcji, składającej się z następujących komponentów: RNA, 2 pmole startera DNA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0,5 mM każdego z dNTP oraz 50 U odwrotnej transkryptazy SuperScript III (Invitrogen). Reakcję prowadzono w następujących warunkach temperaturowych: przez minutę w 45°C, następnie przez 60 minut w temperaturze 52°C i 5 minut w 65°C. Aby otrzymać produkty sekwencjonowania, dNTP zastąpiono mieszaniną ddNTP:dNTP w stosunku 4:1 (końcowe stężenia wynosiły 0,2 mM ddNTP oraz 0,05 mM dNTP). Otrzymane cDNA strącano przez noc w temperaturze -20°C w mieszaninie składającej

się z następujących komponentów: 133 mM Trizma, 300 mM octanu sodu (pH 5,2), 20 µg/ml glikogenu (RNA grade, Thermo Scientific) oraz 3 objętości 96% etanolu, następnie wirowano i suszono. Produkty rozdzielano na 8% lub 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Przed nałożeniem na żel próbki denaturowano przez 2 minuty w 95°C w 7 M moczniku z barwnikami elektroforetycznymi. Produkty reakcji wizualizowano za pomocą ekranów odwzorowujących i skanera FLA-5100 z oprogramowaniem *MultiGauge* (FujiFilm).

Tabela 11. Lista starterów wykorzystanych w reakcji odwrotnej transkrypcji

Nazwa startera	Sekwencja 5'→3'
Rm679	TTCAAAAACTCCTCAACATCCT
Rm591	CCATAAGCCTGAAAATGTCTCCT
Rm508	TTCGGAGAAGCGTGACACCCTGC
Rm403	AAGCTACAGAACTTTAGCCA

- półilościowa analiza poziomu mRNA: do badań wykorzystano własnoręcznie wyizolowany RNA z linii komórkowej NIH3T3 oraz dostępny komercyjnie panel RNA wyizolowanych z poszczególnych narządów mysich (Clontech; Mouse total RNA master panel). 1 µg RNA zmieszano z 250 ng startera oligo(dT)₁₈ (Thermo Scientific) oraz 10 mM każdego dNTP, mieszaninę uzupełniono wodą do objętości końcowej 13 µl. Przeprowadzono denaturację w 65°C przez 5 min po czym próbkę schładzano na lodzie przez minutę. Przygotowaną mieszaninę wykorzystano do reakcji odwrotnej transkrypcji, składającej się z następujących komponentów: 1µg RNA, 250 ng startera oligo(dT)₁₈, 10 mM każdego dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 40 U inhibitora RNaz (RNase OUT, Invitrogen) oraz 50 U odwrotnej transkryptazy SuperScript III (Invitrogen). Reakcję prowadzono w następujących warunkach temperaturowych: przez 60 minut w temperaturze 50°C i 15 minut w 70°C. Celem usunięcia RNA, do próbki dodawano 2 U/µl RNazy H i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut. Produkty reakcji rozdzielano na 1% żelu agarozowym w celu analizy jakościowej.

6.7. Półilościowa analiza poziomu mRNA za pomocą RT-PCR

Analizę półilościową przeprowadzono w celu zbadania:

- zmian poziomu mRNA p53 w komórkach fibroblastów mysich NIH3T3 w warunkach fizjologicznych i warunkach stresowych,
- określenia ilości transkryptu mRNA(-247) w wybranych narządach mysich.

Tabela 12. Lista starterów wykorzystanych w reakcji RT-PCR

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'	Eksperyment
Fm_ddPCR_p53	GCCATCTACAAGAAGTCACAGCAC	Poziom mRNA p53 w komórkach linii NIH3T3 w warunkach fizjologicznych i stresowych.
Rm_ddPCR_p53	AGTCTGCCTGTCTTCCAGATACTC	
Fm_beta_actin	GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	Poziom mRNA(-247) w wybranych narządach mysich.
Rm_beta_actin	CTTCTGCATCCTGTCAGCAA	
F_5'end247	ACGGAAGGACTTGCCCTTACTTGTT	Poziom mRNA(-247) w wybranych narządach mysich.
Rm591	CCATAAGCCTGAAAATGTCTCCT	

1µl cDNA otrzymanego w reakcji odwrotnej transkrypcji (rozdział 6.6. Odwrotna transkrypcja) wykorzystano jako matrycę w reakcji łańcuchowej polimerazy sprzężonej z odwrotną transkrypcją (RT-PCR, ang. *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*). Mieszanina reakcyjna zawierała 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 0,2 mM każdego dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 30 U/ml polimerazy DNA Taq (Thermo Scientific) oraz 0,5 mM starterów, których zestawienie zaprezentowano w tabeli 12. Reakcję rozpoczęto od trzech minut denaturacji w 95°C, następnie prowadzono przez 30 cykli: 30 sekund w 95°C, 30 sekund w 55°C, 30 sekund w 72°C, po czym następowało końcowe wydłużanie przez 10 minut w 72°C. Produkty reakcji rozdzielano na 1% żelu agarozowym.

6.8. Mutageneza ukierunkowana

Mutagenezę ukierunkowaną przeprowadzono, aby uzyskać modelowe mRNA(-122) i mRNA(-247) zawierające zmieniony jeden z potencjalnych kodonów inicjacyjnych dla białka p53 (więcej w rozdziale „4.6. Określenie miejsca inicjacji translacji białka p53 u myszy”). Kodon AUG zmieniono na kodon CUG, kodujący walinę lub kodon GCG, kodujący alaninę (tylko dla mRNA(-122)).

Tabela 13. Lista starterów wykorzystanych w reakcji mutagenezy ukierunkowanej

Nazwa startera	Sekwencja 5'→3'
FmAUG1mutGCG	CCGAAGACTGGGCGACTGCCATGGAGG
RmAUG1mutGCG	CCTCCATGGCAGTCGCCAGTCTTCGG
FmAUG1_1mutGCG	CCGAAGACTGGATGACTGCCGCGGAGG
RmAUG1_1mutGCG	CCTCCGCGGCAGTCATCCAGTCTTCGG
FmAUG1mut_CUG	CCGAAGACTGGCTGACTGCCATGGAGG
RmAUG1mut_CUG	CCTCCATGGCAGTCAGCCAGTCTTCGG
FmAUG1.1mut_CUG	CCGAAGACTGGATGACTGCCCTGGAGG
RmAUG1.1mut_CUG	CCTCCAGGGCAGTCATCCAGTCTTCGG

W pierwszym etapie przygotowano dwie reakcje o następującym składzie: bufor Pfu (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% (v/v) TritonX-100, 0,1 mg/ml BSA), 0,25 mM dNTP, 75 pmoli jednego ze starterów zawierających mutację, 500 ng plazmidu i 2,5 U polimerazy Pfu. Reakcje prowadzono w następujących warunkach temperaturowych: 95°C – 2 minuty, 10 cykli złożonych z trzech etapów: 95°C – 30 sekund, 60°C – 30 sekund, 68°C – 16 minut, a następnie 68°C – 7 minut (wydłużanie końcowe). Reakcje mieszano ze sobą a następnie dzielono na dwie równe części, a do każdej z nich dodano 1 U polimerazy Pfu i prowadzono reakcje w następujących warunkach temperaturowych: 95°C – 2 minuty, 20 cykli złożonych z trzech etapów: 95°C – 30 sekund, 60°C – 30 sekund, 68°C – 16 minut, następnie 68°C – 7 minut (wydłużanie końcowe). Produkty reakcji połączono i oczyszczono na kolumnkach EurX. W następnym kroku wykorzystano enzym restrykcyjny DpnI, celem usunięcia plazmidu matrycowego.

Mieszanina reakcyjna składała się z następujących komponentów: 5 µg DNA, buforu Fast Digest dla DpnI dostępnego handlowo, 0,04 µg/µl BSA oraz 50 U enzymu restrykcyjnego DpnI Fast Digest. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 5 minut. Przeprowadzono analizę jakościową produktów reakcji poprzez rozdział na 1% żelu agarozowym. W następnym kroku plazmidem z wprowadzoną mutacją transformowano bakterie kompetentne *E. coli* TOP10 (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen). W eksperymencie wykorzystywano startery, których sekwencje zaprezentowano w tabeli 13 (powyżej).

6.9. Hodowla mysich fibroblastów

W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe fibroblastów mysich: NIH3T3, w której zachodzi ekspresja białka p53 oraz MB352, która pozbawiona jest endogennego p53. Linie komórkowe prowadzono w medium DMEM z wysoką zawartością glukozy 4,5 g/L, uzupełnionym o mieszaninę antybiotyków i antymykotyków zawierającą 100 U/ml penicyliny G, mieszaninę aminokwasów endogennych, 0,1 mg/ml siarczanu streptomycyny. Do medium DMEM dodawano glutaminę do końcowego stężenia 2 mM. Do medium dodawano również odpowiednią surowicę: bydlęcą (ang. *bovine calf serum*) w przypadku komórek NIH3T3 lub płodową surowicę bydlęcą (ang. *fetal bovine serum*, FBS) dla komórek MB352. Dla obu linii komórkowych końcowe stężenie surowicy w medium wynosiło 10%. Hodowle komórkowe prowadzono w temperaturze 37°C w 5% CO₂. Komórki pasażowano 2-3 razy w tygodniu w stosunku 1:2 lub 1:6. Hodowle prowadzono maksymalnie do 25 pasażu.

6.10. Indukcja warunków stresowych w linii komórkowej NIH3T3

Stres komórkowy indukowano w komórkach linii NIH3T3 celem sprawdzenia odpowiedzi komórki na poziomie ekspresji białka p53 na działanie wybranych odczynników: tunikamycyny, tapsigarginy oraz doksorubicyny. Wybrane stresse komórkowe indukowano poprzez dodanie do medium komórkowego odczynników o końcowych stężeniach: 1,2 µM tunikamycyny, 0,1 µM tapsigarginy i 0,1 µM doksorubicyny. Komórki utrzymywano w warunkach stresowych przez 16 godzin, po czym zbierano je do dalszej analizy.

6.11. Transfekcja komórek MB352 modelowymi konstruktami mRNA

Komórki MB352 transfekowano modelowymi konstruktami mRNA: mRNA(-122), oraz mRNA(-122) z wprowadzoną mutacją w obrębie pierwszego lub drugiego potencjalnego kodonu inicjacyjnego (AUG → GCG).

Do transfekcji wykorzystywano komórki poniżej 25 pasażu. Dzień przed transfekcją komórki wysiewano na płytce sześciodołkowej w ilości 200 000 komórek/dołek. Transfekcję przeprowadzano po 24 godzinach, gdy konfluencja komórek wynosiła ok. 80%.

3,5 pmola mRNA(-122) wprowadzano do komórek przy użyciu odczynnika TransMessenger Transfection Reagent (Qiagen), zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie: 4 µl odczynnika Enhancer R rozcieńczono w buforze EC, po czym dodano mRNA(-122), a następnie dokładnie zmieszano. Otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 4 µl odczynnika TransMessenger Transfection Reagent (TMTR) (stosunek RNA:TMTR wynosił 1:2). Mieszaninę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, co umożliwiło wytworzenie kompleksu gotowego do transfekcji. Po inkubacji otrzymany kompleks dodano do 900 µl pożywki DMEM pozbawionej FBS i antybiotyku. Przygotowaną w ten sposób pożywkę dodano do dołka z przygotowanymi komórkami. Transfekcję prowadzono przez 3 godziny. Po tym czasie komórki przepłukano 1xPBS, a następnie dodano 2 ml świeżego medium DMEM z 10% FBS. Komórki inkubowano przez 3,5 godziny, aby umożliwić syntezę białka p53. Po tym czasie komórki ze wszystkich dołków zebrano i połączono, a następnie rozdzielono do sześciu probówek. Celem powyższego zabiegu było usunięcie różnic wynikających z efektywności translacji. Tak przygotowane komórki wykorzystano w eksperymencie modyfikacji chemicznej RNA z użyciem DMS w transfekowanej linii komórkowej.

mRNA(-122) z wprowadzoną mutacją w obrębie potencjalnych kodonów inicjacyjnych transfekowano do komórek wykorzystując lipofektaminę (Lipofectamine MessengerMAX transfection reagent, Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Każde modelowe mRNA transfekowano do dwóch dołków. Do każdego modelowego mRNA zastosowano następującą procedurę: 3,75 µl lub 7,5 µl lipofektaminy MessengerMAX dodano do 125 µl medium Opti-MEM, zmieszano i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę przygotowywano w dwóch probówkach. Następnie, 2,5 µg RNA

zawieszono w 125 µl medium Opti-MEM, po czym dodano do przygotowanej wcześniej próbki zawierającej lipofektaminę. Otrzymaną mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, co umożliwiło powstanie kompleksu mRNA i lipofektaminy. Powstały kompleks dodano do komórek. Po 6 godzinach komórki zebrano w celu sprawdzenia poziomu powstałego białka p53 metodą Western blot.

6.12. Cytometria przepływowa

W eksperymencie wykorzystano komórki poddane stresom genotoksycznemu i siateczki śródplazmatycznej, których przygotowanie opisano w rozdziale „6.10. Indukcja warunków stresowych w linii komórkowej NIH3T3”. Wykorzystano protokół firmy Cell Signaling. Pojedyncze komórki zawieszono w 1xPBS, dodano formaldehyd do końcowego stężenia 4%, inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym przepłukano i zawieszono w 1xPBS. Następnie komórki poddano permeabilizacji (zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej) poprzez powolne dodanie zimnego metanolu do końcowego stężenia 90% i inkubowano przez 30 minut na lodzie. W kolejnym etapie komórki poddano barwieniu immunologicznemu (ang. *immunostaining*). Komórki przepłukano 1xPBS, celem usunięcia metanolu, a następnie zawieszono w 100 µl przeciwciała pierwszorzędowego 1C12 (Cell Signaling) rozcieńczonego w stosunku 1:3200 i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie, komórki przepłukano dwukrotnie buforem inkubacyjnym (0,5 g albuminy surowicy bydlęcej (BSA) zawieszono w 100 ml 1x PBS), po czym dodano przeciwciało drugorzędowe sprzężone z fluorochromem 4408 (Cell Signaling) w rozcieńczeniu 1:500 i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. W kolejnym kroku komórki przepłukano buforem inkubacyjnym, zawieszono w 1x PBS i poddano analizie w cytometrze przepływowym Becton Dickinson Accuri C6. Pomiarom poddano przynajmniej 10 000 komórek/próbkę, a wyniki analizowano w programie Accuri CFlow. Każdą próbę wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych. Cytometrię przepływową przeprowadzono w ramach współpracy z Pracownią Analiz Struktur Subkomórkowych IChB PAN, a pomiary w cytometrze przepływowym wykonała dr Dorota Gurda.

6.13. Izolacja RNA z wykorzystaniem odczynnika TRI Reagent

Odczynnik TRI Reagent (Sigma) stosowano do izolacji całkowitego RNA z komórek:

- NIH3T3 znajdujących się w warunkach fizjologicznych oraz poddanych traktowaniu wybranymi czynnikami stresowymi,
- MB352 z wprowadzonym mRNA(-122).

Do komórek dodawano 500 μ l odczynnika TRI Reagent i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 100 μ l chloroformu, wytrząsano przez 15 sekund, po czym inkubowano przez 8 minut w temperaturze pokojowej oraz wirowano przez 15 minut w 4°C z prędkością 12 000 x g. Zebrano fazę wodną, do której dodano 250 μ l izopropanolu. Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym poddano wirowaniu przez 8 minut w 4°C z prędkością 12 000 x g. W trakcie wirowania wytrącił się osad, który przepłukano 250 μ l 70% etanolu. Próbkę wirowano przez 5 minut w 4°C z prędkością 7 500 x g. Usunięto fazę wodną, osad wysuszono i zawieszono w wodzie.

6.14. Translacja *in vitro*

Translację *in vitro* przeprowadzano wykorzystując lizat z retikulocytów króliczych (RRL) (Promega), zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie: 2,5 pmola RNA inkubowano przez 3 minuty w temperaturze 65°C, a następnie przez 5 minut na lodzie. RNA dodano do mieszaniny translacyjnej złożonej z 17,5 μ l RRL, 20 μ M mieszaniny aminokwasów (bez metioniny), 1 μ l L-[³⁵S] metioniny (1000 Ci/mol) (Hartman Analytic) oraz 20 U inhibitora rybonukleaz (Promega). Reakcję prowadzono przez 90 minut w temperaturze 30°C, po czym natychmiast przenoszono na lód. Do 5 μ l mieszaniny dodano 20 μ l roztworu SSB. próbki denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 80°C i nakładano na żel w ilości 5 μ l. Produkty reakcji rozdzielano na 15% żelu poliakrylamidowym, a następnie wizualizowano na drodze autoradiografii, z wykorzystaniem skanera FLA 5100 (Fuji).

W przypadku eksperymentów translacji *in vitro* z analogiem kapu m⁷G(5')ppp(5')G, końcowe stężenie analogu w reakcji wynosiło od 0 do 750 μ M. Przed dodaniem mRNA mieszaninę reakcyjną poddano inkubacji w obecności analogu kapu oraz równomolowych

ilości octanu magnezu w 30°C przez 15 minut. Część wykorzystanego preparatu analogu kapu m⁷G(5')ppp(5')G uzyskano dzięki uprzejmości pana prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza.

6.15. Analiza białek metodą Western blot

W celu otrzymania lizatu komórkowego komórki linii MB352 transfekowane mRNA(-122) oraz komórki linii NIH3T3 poddawano lizie w buforze *Laemmli* (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 50 mM DTT, inhibitor proteaz). Lizaty inkubowano w temperaturze 95°C przez 5 minut, po czym nakładano na 15% poliakrylamidowy żel białkowy i poddawano elektroforezie w warunkach denaturujących. Przed przystąpieniem do transferu białek, żel płukano w buforze do transferu, a membranę PVDF (GE Healthcare) płukano przez 10 sekund w metanolu, przemywano wodą i płukano przez 5 minut w buforze do transferu. Następnie prowadzono transfer białek z żelu na membranę przez 1 godzinę przy natężeniu prądu 70 mA w aparacie Trans-blot SD Semi-Dry Transfer cell. W następnym kroku blokowano membranę przy użyciu buforu zawierającego 5% mleko, 0,1% Tween i 1x TBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, po czym płukano 3 razy w buforze 1x TBS przez 10 min. W następnym etapie membranę poddano nocnej inkubacji w temperaturze 4°C z przeciwciałem pierwszorzędowym:

- skierowanym przeciwko mysiemu białku p53 (1C12, Cell Signaling) rozcieńczonym w stosunku 1:1000 w roztworze zawierającym 5% mleko, 0,1% Tween i 1x TBS,
- skierowanym przeciwko GAPDH (Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, clone 6C5', Merck Millipore) rozcieńczonym w stosunku 1:10 000 w roztworze zawierającym 5% mleko, 0,1% Tween i 1x TBS.

Przeciwciało pierwszorzędowe wykrywano przy użyciu koziego przeciwciała IgG skierowanego przeciw białkom mysim (ang. *goat anti-mouse antibody*), rozcieńczonym w stosunku 1:10 000 (dla 1C12) lub 1:20 000 (dla GAPDH) w roztworze zawierającym 5% mleko, 0,1% Tween i 1x TBS. Inkubację prowadzono przez godzinę w temperaturze pokojowej, po czym czterokrotnie płukano w buforze 1x TBS przez 10 min. Wyniki eksperymentu wizualizowano za pomocą reakcji chemiluminescencji z odczynnikiem Pierce ECL Western Blotting, w celu wykonania autoradiografii.

6.16. Transformacji bakterii *E. coli*

Aby wprowadzić plazmidowy DNA do komórek kompetentnych TOP10 (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Thermo Fisher Scientific) wykorzystano metodę szoku cieplnego, zgodnie z zaleceniami producenta. Przed transformacją bakterie rozmrażano na lodzie przez 30 minut, po czym dodano 3 μ l mieszaniny ligacyjnej i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie bakterie poddano szokowi cieplnemu poprzez umieszczenie ich w temperaturze 42°C na 30 sekund oraz szybkie przeniesienie do lodu na 2 minuty. Do zawiesiny bakteryjnej dodano 250 μ l pożywki S.O.C. (zakupiona w zestawie z bakteriami TOP10), a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez godzinę z okresowym wytrząsaniem (300 rpm przez 2 minuty, co 5 minut). Bakterie rozprowadzano na powierzchni szalek z pożywką LB oraz odpowiednim antybiotykiem: kanamycyną lub ampiciliną, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 godzin. Bakterie z wybranej kolonii zawieszano w 8 ml pożywki LB z dodanym odpowiednim antybiotykiem i poddawano ośmiogodzinnej inkubacji w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (220 rpm). Plazmidowe DNA izolowano z wykorzystaniem zestawu firmy Qiagen a następnie sekwencjonowano w firmie Genomed S. A.

6.17. Przewidywanie oddziaływań białko-RNA

Białka, które potencjalnie mogą oddziaływać z regionem terminalnym 5' mRNA(-247) identyfikowano poprzez zastosowanie programu RBPmap, wersja 1.1 (<http://rbpmap.technion.ac.il/>). Zastosowano następujące filtry:

- genom myszy,
- wybrane motywy: Wszystkie motywy ludzkie / mysie,
- poziom dopasowania (ang. *stringency level*): wysoki,
- filtr konserwatywności (ang. *conservation filter*): włączony.

6.18. Generowanie struktur trzeciorzędowych fragmentów mRNA

Struktury trzeciorzędowe wybranych fragmentów mRNA generowano przy użyciu programu RNA Composer (<http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>) [Popenda *et al.* 2012]. Oprócz sekwencji nukleotydowej w programie wprowadzano również notację kropkowo-nawiasową (ang. *dot-bracket notation*) reprezentującą strukturę drugorzędową RNA.

6.19. Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS)

Dane SAXS zebrano na linii synchrotronowej P12 na synchrotronie PETRA III w Hamburgu. Do badań wykorzystano fragmenty RNA zawieszane w buforze o składzie: 20 mM Tris pH=7,5, 65 mM KCl, 0 mM/ 2,5 mM/ 5 mM MgCl₂, 0,25 mM EDTA, w objętości 20 μ l. Stężenia badanych fragmentów przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Stężenia fragmentów mRNA p53 wykorzystywanych w pomiarach SAXS

Cząsteczka	Stężenie (ng/ μ l)
Region terminalny 5' mRNA(-122)	1731
Spinka C(-51):G9	2690
Fragment U41:U140	3894

Przed pomiarem RNA inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, po czym denaturowano przez minutę w 95°C, po czym chłodzono przez 5 minut w temperaturze pokojowej. W następnym kroku dodawano bufor, próbkę inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej a następnie dokonywano pomiaru. Dane zostały zebrane w temperaturze 15°C. Dane SAXS zbierano w zakresie 0.0088-5 nm⁻¹. Wszystkie dane SAXS zostały przetworzone przy użyciu pakietu ATSAS. Integracja, skalowanie i odjęcie buforu wykonano przy użyciu programu PRIMUS. Uzyskane krzywe zastosowano do wszystkich dalszych obliczeń. Wartość masy molekularnej (MM) badanych fragmentów mRNA p53 obliczono przez porównanie ekstrapolowanych wartości I_0 ze standardową próbką albuminy surowicy bydlęcej za pomocą równania:

$$MM_p = \frac{I_{op}}{c_p} \frac{MM_{st}}{\frac{I_{ost}}{c_{st}}}$$

gdzie MM_p i MM_{st} są masami molekularnymi badanych kwasów nukleinowych lub białka i masą molekularną wzorca. I_{op} i I_{ost} są intensywnościami przy zerowym kącie badanego i wzorcowego białka, c_p i c_{st} są stężeniami białka badanego oraz wzorca.

Promień żyracji w zakresie przybliżenia Guiniera $s_{max R_g} < 1.3$ oceniono zgodnie

$$I_s = I_0 \exp\left(\frac{-s^2 R_g^2}{3}\right)$$

z równaniem:

R_g , D_{max} i funkcja $p(r)$ zostały obliczone za pomocą programu GNOM. Program DAMMIF został wykorzystany do obliczania struktur *ab initio*. Eksperymenty oraz analizę danych wykonywano we współpracy z doktorem Kamilem Szpotkowskim.

6.20. Spektrometria dichroizmu kołowego

Widma dichroizmu kołowego zostały zebrane na spektrometrze CD J-815 (JASCO) wyposażony w termostat Peltiera. Do pomiarów wykorzystano bufor o następującym składzie: 20 mM Tris pH=7,5, 65 mM KCl, 0 mM/ 2,5 mM/ 5 mM MgCl₂, 0,25 mM EDTA. Stężenia badanych fragmentów przedstawiono w tabeli 12. Badania prowadzono w kwarcowej kuwecie (Hellma 100-QS) o drodze optycznej wynoszącej 0,2 cm. Każde widmo akumulowano 9 razy, prędkość skanowania wynosiła 50 nm/min, szerokość pasma 1 nm. Dane zbierano w zakresie 205-350 nm i zakresie temperatur 5-90°C, co 5°C. Analizę danych wykonano w programie ORIGIN PRO 2020. Eksperymenty oraz analizę danych wykonywano we współpracy z doktorem Kamilem Szpotkowskim.

Tabela 15. Stężenia fragmentów mRNA p53 wykorzystywanych w pomiarach spektrometrii dichroizmu kołowego

Cząsteczka	Stężenie (ng/μl)
Region terminalny 5' mRNA(-122)	185
Spinka C(-51):G9	553
Fragment U41:U140	526

7. Literatura

- Ainaoui N., Hantelys F., Renaud-Gabardos E., Bunel M., Lopez F., Pujol F., Planes R., Bahraoui E., Pichereaux C., Burlet-Schiltz O., Parini A., Garmy-Susini B., Prats A.C. (2015) Promoter-dependent translation controlled by p54nrb and hnRNPM during myoblast differentiation. *PLoS One*. 10(9):e0136466.
- Alarcón C.R., Goodarzi H., Lee H., Liu X., Tavazoie S., Tavazoie S.F. (2015) HNRNPA2B1 is a mediator of m(6)A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*. 162(6):1299-308.
- Almog N., Li R., Peled A., Schwartz D., Wolkowicz R., Goldfinger N., Pei H., Rotter V. (1997) The murine C'-terminally alternatively spliced form of p53 induces attenuated apoptosis in myeloid cells. *Mol Cell Biol*. 17(2):713-22.
- Aloni-Grinstein R., Charni-Natan M., Solomon H., Rotter V. (2018) p53 and the Viral Connection: Back into the Future. *Cancers (Basel)*. 10(6). pii: E178.
- Anderson M.E., Woelker B., Reed M., Wang P., Tegtmeyer P. (1997) Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol*. 17(11):6255-64.
- Antczak M., Popena M., Zok T., Sarzynska J., Ratajczak, T., Tomczyk K., Adamiak R.W., Szachniuk M. (2016) New functionality of RNAComposer: an application to shape the axis of miR160 precursor structure, *Acta Biochim Pol*. 2016;63(4):737-744.
- Arai N., Nomura D., Yokota K., Wolf D., Brill E., Shohat O., Rotter V. (1986) Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol*. 6(9):3232-9.
- Asnani M., Pestova T.V., Hellen C.U. (2016) PCBP2 enables the cadicivirus IRES to exploit the function of a conserved GRNA tetraloop to enhance ribosomal initiation complex formation. *Nucleic Acids Res*. 44(20):9902-9917.
- Ayed A., Mulder F.A., Yi G.S., Lu Y., Kay L.E., Arrowsmith C.H. (2001) Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol*. 8(9):756-60.
- Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., Clark B.J. (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 21(3):389-95.
- Barboza J.A., Liu G., Ju Z., El-Naggar A.K., Lozano G. (2006) p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(52):19842-7.
- Bassik M.C., Kampmann M. (2011) Knocking out the door to tunicamycin entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(29):11731-2.

- Bayle J.H., Elenbaas B., Levine A.J. (1985) The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(12):5729-33.
- Bellodi C., Kopmar N., Ruggero D. (2010) Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. *EMBO J*. 29(11):1865-76.
- Bidet K., Dadlani D., Garcia-Blanco M.A. (2014) G3BP1, G3BP2 and CAPRIN1 are required for translation of interferon stimulated mRNAs and are targeted by a dengue virus non-coding RNA. *PLoS Pathog*. 10(7):e1004242.
- Bieging K.T., Mello S.S., Attardi L.D. (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 14(5):359-70.
- Bienz B., Zakut-Houri R., Givol D., Oren M. (1984) Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *EMBO J*. 3(9):2179-83.
- Biesiada M., Purzycka K.J., Szachniuk M., Blazewicz J., Adamiak R.W. (2016) Automated RNA 3D Structure Prediction with RNAComposer. *Methods Mol Biol*. 1490:199-215.
- Biktasova A., Hajek M., Sewell A., Gary C., Bellinger G., Deshpande H.A., Bhatia A., Burtneß B., Judson B., Mehra S., Yarbrough W.G., Issaeva N. (2017) Demethylation Therapy as a Targeted Treatment for Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 23(23):7276-7287.
- Błaszczuk L., Ciesiołka J. (2011) Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry*. 50(33):7080-92.
- Bourdon J.C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., Saville M.K., Lane D.P. (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*. 19(18):2122-37.
- Breig O., Baklouti F. (2013) Proteasome-mediated proteolysis of SRSF5 splicing factor intriguingly co-occurs with SRSF5 mRNA upregulation during late erythroid differentiation. *PLoS One*. 8(3):e59137.
- Brugarolas J., Chandrasekaran C., Gordon J.I., Beach D., Jacks T., Hannon G.J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*. 377(6549):552-7.
- Bruins W., Zwart E., Attardi L.D., Iwakuma T., Hoogervorst E.M., Beems R.B., Miranda B., van Oostrom C.T., van den Berg J., van den Aardweg G.J., Lozano G., van Steeg H., Jacks T., de Vries A. (2004) Increased sensitivity to UV radiation in mice with a p53 point mutation at Ser389. *Mol Cell Biol*. 24(20):8884-94.
- Bursac S., Brdovcak M.C., Pfannkuchen M., Orsolich I., Golomb L., Zhu Y., Katz C., Daftuar L., Grabusic K., Vukelic I., Filić V, Oren M, Prives C, Volarevic S. (2012) Mutual protection

of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109(50):20467-72.

Candeias M.M., Malbert-Colas L., Powell D.J., Daskalogianni C., Maslon M.M., Naski N., Bourougaa K., Calvo F., Fahraeus R. (2008) p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol*. 10(9):1098-105.

Candeias M.M., Powell D.J., Roubalova E., Apcher S., Bourougaa K., Vojtesek B., Bruzzoni-Giovanelli H., Fähræus R. (2006) Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene*. 25(52):6936-47.

Cantara W.A., Olson E.D., Musier-Forsyth K. (2017) Analysis of RNA structure using small-angle X-ray scattering. *Methods*. 113:46-55.

Chan J.Y.H., Chen T.C., Liu S.T., Chou W.Y., Ho C.L., Huang S.M. (2014) Characterization of a new mouse p53 variant: loss-of-function and gain-of-function. *J Biomed Sci*. 21:40.

Chang C.J., Chao C.H., Xia W., Yang J.Y., Xiong Y., Li C.W., Yu W.H., Rehman S.K., Hsu J.L., Lee H.H., Liu M., Chen C.T., Yu D., Hung M.C. (2011) p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol*. 13(3):317-23.

Charni M., Aloni-Grinstein R., Molchadsky A., Rotter V. (2017) p53 on the crossroad between regeneration and cancer. *Cell Death Differ*. 24(1):8-14.

Chen H.Y., Lin L.T., Wang M.L., Laurent B., Hsu C.H., Pan C.M., Jiang W.R., Chen P.Y., Ma H.I., Chen Y.W., Huang P.I., Chiou A., Chiou S.H. (2017) Musashi-1 enhances glioblastoma cell migration and cytoskeletal dynamics through translational inhibition of Tensin3. *Sci Rep*. 7(1):8710.

Chen P.F., Hsiao J.S., Sirois C.L., Chamberlain S.J. (2016) RBFOX1 and RBFOX2 are dispensable in iPSCs and iPSC-derived neurons and do not contribute to neural-specific paternal UBE3A silencing. *Sci Rep*. 6:25368.

Chen Y., Pollack L. (2016) SAXS studies of RNA: structures, dynamics, and interactions with partners. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 7(4):512-26.

Chene P. (2001) The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*. 20(21):2611-7.

Chiang Y.J., Difilippantonio M.J., Tessarollo L., Morse H.C., Hodes R.J. (2012) Exon 1 disruption alters tissue-specific expression of mouse p53 and results in selective development of B cell lymphomas. *PLoS One*. 7(11):e49305.

Choi Y.J., Lin C.P., Ho J.J., He X., Okada N., Bu P., Zhong Y., Kim S.Y., Bennett M.J., Chen C., Ozturk A., Hicks G.G., Hannon G.J., He L. (2011) miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol*. 13(11):1353-60.

- Choudhury R., Roy S.G., Tsai Y.S., Tripathy A., Graves L.M., Wang Z. (2014) The splicing activator DAZAP1 integrates splicing control into MEK/Erk-regulated cell proliferation and migration. *Nat Commun.* 5:3078.
- Christian K.J., Lang M.A., Raffalli-Mathieu F. (2008) Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment. *Mol Pharmacol.* 73(5):1558-67.
- Christian K.J., Lang M.A., Raffalli-Mathieu F. (2008) Interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 with a novel cis-regulatory element within p53 mRNA as a response to cytostatic drug treatment. *Mol Pharmacol.* 73(5):1558-67.
- Ciesiołka J., Michałowski D., Wrzesiński J., Krajewski J., Krzyżosiak W.J. (1998) Patterns of Cleavages Induced by Lead Ions in Defined RNA Secondary Structure Motifs. *J Mol Biol.* 275(2):211-20.
- Courtois S., Verhaegh G., North S., Luciani M.G., Lassus P., Hibner U., Oren M., Hainaut P. (2002) Δ N-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene.* 21(44):6722-8.
- Cox L.S., Midgley C.A., Lane D.P. (1994) Xenopus p53 is biochemically similar to the human tumour suppressor protein p53 and is induced upon DNA damage in somatic cells. *Oncogene.* 9(10):2951-9.
- Czosnek H.H., Bienz B., Givol D., Zakut-Houri R., Pravtcheva D.D., Ruddle F.H., Oren M. (1984) The gene and the pseudogene for mouse p53 Cellular tumor antigen are located on different chromosomes. *Mol Cell Biol.* 4(8): 1638–1640.
- Dasgupta T., Ladd A.N. (2012) The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 3(1):104-21.
- deLorimier E., Hinman M.N., Copperman J., Datta K., Guenza M., Berglund J.A. (2017) Pseudouridine modification inhibits Muscleblind-like 1 (MBNL1) binding to CCUG repeats and minimally structured RNA through reduced RNA flexibility. *J Biol Chem.* 292(10):4350-4357.
- D'erchia A.M., Pesole G., Tullo A., Saccone C., Sbisà E. (1999) Guinea pig p53 mRNA: identification of new elements in coding and untranslated regions and their functional and evolutionary implications. *Genomics.* 58(1):50-64.
- Dodero V.I., Quirolo Z.B., Sequeira M.A. (2011) Biomolecular studies by circular dichroism. *Front Biosci (Landmark Ed).* 16:61-73.
- Dohenover L.A. (1996) The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin Cancer Biol.* 7(5):269-78.

- Dominguez C., Allain F.H. (2006) NMR structure of the three quasi RNA recognition motifs (qRRMs) of human hnRNP F and interaction studies with Bcl-x G-tract RNA: a novel mode of RNA recognition. *Nucleic Acids Res.* 34(13):3634-45.
- Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A. Jr, Butel J.S., Bradley A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature.* 356(6366):215-21.
- Dzikiewicz A., Szweykowska-Kulińska Z. (2006) Degradacja mRNA niosących przedwczesny kodon stop (NMD) — na straży jakości mRNA. *Postępy Biochemii.* 52(4):390-398.
- Edwards S.J., Hananeia L., Eccles M.R., Zhang Y.F., Braithwaite A.W. (2003) The proline-rich region of mouse p53 influences transactivation and apoptosis but is largely dispensable for these functions. *Oncogene.* 22(29):4517-23.
- Fan Y., Yue J., Xiao M., Han-Zhang H., Wang Y.V., Ma C., Deng Z., Li Y., Yu Y., Wang X., Niu S., Hua Y., Weng Z., Atadja P., Li E., Xiang B. (2017) FXR1 regulates transcription and is required for growth of human cancer cells with *TP53/FXR2* homozygous deletion. *Elife.* 6. pii: e26129
- Farley-Barnes K.I., Ogawa L.M., Baserga S.J. (2019) Ribosomopathies: Old Concepts, New Controversies. *Trends Genet.* 35(10):754-767.
- Finlay C.A., Hinds P.W., Levine A.J. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 57(7):1083-93.
- Flaman J.M., Waridel F., Estreicher A., Vannier A., Limacher J.M., Gilbert D., Iggo R., Frebourg T. (1996) The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene.* 12(4):813-8.
- Fridman J.S., Lowe S.W. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 22(56):9030-40.
- Fu Y., Wang Y. (2018) SRSF7 knockdown promotes apoptosis of colon and lung cancer cells. *Oncol Lett.* 15(4):5545-5552.
- Fujita T., Higashitsuji H., Higashitsuji H., Liu Y., Itoh K., Sakurai T., Kojima T., Kandori S., Nishiyama H., Fukumoto M., Fukumoto M., Shibasaki K., Fujita J. (2017) TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well as CIRP and RBM3. *Sci Rep.* 7(1):2295.
- Gao C., Ren S., Lee J.H., Qiu J., Chapski D.J., Rau C.D., Zhou Y., Abdellatif M., Nakano A., Vondriska T.M., Xiao X., Fu X.D., Chen J.N., Wang Y. (2016) RBFox1-mediated RNA splicing regulates cardiac hypertrophy and heart failure. *J Clin Invest.* 126(1):195-206.
- Gao M., Monian P., Pan Q., Zhang W., Xiang J., Jiang X. (2016) Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res.* 26(9):1021-32.

- Ghanem L.R., Kromer A., Silverman I.M., Chatterji P., Traxler E., Penzo-Mendez A., Weiss M.J., Stanger B.Z., Liebhaber S.A. (2015) The Poly(C) Binding protein Pcbp2 and its retrotransposed derivative Pcbp1 are independently essential to mouse development. *Mol Cell Biol.* 36(2):304-19.
- Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. (2004) Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol.* 24(18):7987-97.
- Godley L.A., Kopp J.B., Eckhaus M, Paglino J.J., Owens J., Varmus H.E. (1996) Wild-type p53 transgenic mice exhibit altered differentiation of the ureteric bud and possess small kidneys. *Genes Dev.* 10(7):836-50.
- Gorska A., Błaszczyk L., Dutkiewicz M., Ciesiołka J. (2013) Length variants of the 5' untranslated region of p53 mRNA and their impact on the efficiency of translation initiation of p53 and its N-truncated isoform $\Delta Np53$. *RNA Biol.* 10(11):1726-40.
- Gorska A., Swiatkowska A., Dutkiewicz M., Ciesiolka J. (2013) Modulation of p53 Expression Using Antisense Oligonucleotides Complementary to the 5'-Terminal Region of p53 mRNA In Vitro and in the Living Cells. *PLoS One.* 8(11):e78863.
- Gräwert T.W. (2020) Structural Modeling Using Solution Small-Angle X-ray Scattering (SAXS). *J Mol Biol.* pii: S0022-2836(20)30094-2.
- Greenfield N.J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc.* 1(6): 2876–2890.
- Grover R., Ray P.S., Das S. (2008) Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell Cycle.* 7(14):2189-98.
- Halaby M.J., Harris B.R., Miskimins W.K., Cleary M.P., Yang D.Q. (2015) Deregulation of Internal Ribosome Entry Site-Mediated p53 Translation in Cancer Cells with Defective p53 Response to DNA Damage. *Mol Cell Biol.* 35(23):4006-17.
- Halazonetis T.D., Kandil A.N. (1993) Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J.* 12(13):5057-64.
- Hamard P.J., Barthelery N., Hogstad B., Mungamuri S.K., Tonnessen C.A., Carvajal L.A., Senturk E., Gillespie V., Aaronson S.A., Merad M., Manfredi J.J. (2013) The C terminus of p53 regulates gene expression by multiple mechanisms in a target- and tissue-specific manner in vivo. *Genes Dev.* 27(17):1868-85.
- Han K., Kulesz-Martin M.F. (1992) Altered expression of wild-type p53 tumor suppressor gene during murine epithelial cell transformation. *Cancer Res.* 52(3):749-53.
- Han K., Kulesz-Martin M.F. (1992) (2) Alternatively spliced p53 RNA in transformed and normal cells of different tissue types. *Nucleic Acids Res.* 20(8):1979-81.

Hanna J., Saha K., Pando B., van Zon J., Lengner C.J., Creyghton M.P., van Oudenaarden A., Jaenisch R. (2009) Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*. 462(7273):595-601.

Hansen S., Lane D.P., Midgley C.A. (1998) The N terminus of the murine p53 tumour suppressor is an independent regulatory domain affecting activation and thermostability. *J Mol Biol*. 275(4):575-88.

Harlow E., Williamson N.M., Ralston R., Helfman D.M., Adams T.E. (1985) Molecular Cloning and In Vitro Expression of a cDNA Clone for Human Cellular Tumor Antigen p53. *Mol Cell Biol*. 5(7):1601-10.

Harms H.L., Chen X. (2005) The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol Cell Biol*. 25(5):2014-30.

Haronikova L., Olivares-Illana V., Wang L., Karakostis K., Chen S., Fåhræus R. (2019) The p53 mRNA: an integral part of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res*. 47(7):3257–3271.

Haronikova L., Olivares-Illana V., Wang L., Karakostis K., Chen S., Fåhræus R. (2019) The p53 mRNA: an integral part of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res*. 47(7):3257-3271.

Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75(4):805-16.

Henderson E. (2011) The beginner's guide to SAXS data processing and analysis. <https://atheneum.libs.uga.edu/handle/10724/27473>

Hinault C., Kawamori D., Liew C.W., Maier B., Hu J., Keller S.R., Mirmira R.G., Scrabble H., Kulkarni R.N. (2011) $\Delta 40$ isoform of p53 controls b-cell proliferation and glucose homeostasis in mice. *Diabetes*. 60(4):1210-22.

Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*. 420(1):25-7.

Hong H., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Kanagawa O., Nakagawa M., Okita K., Yamanaka S. (2009) Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. 460(7259):1132-5.

Horn H.F., Vousden K.H. (2007) Coping with stress: Multiple ways to activate p53. *Oncogene*. 26(9):1306-16.

http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000059552;r=11:69580359-69591873

Hu Y., Sun Z., Deng J., Hu B., Yan W., Wei H., Jiang J. (2017) Splicing factor hnRNPA2B1 contributes to tumorigenic potential of breast cancer cells through STAT3 and ERK1/2 signaling pathway. *Tumour Biol*. 39(3):1010428317694318.

- Hupp T.R., Lane D.P. (1994) Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol.* 4(10):865-75.
- Jacques D.A., Trewella J. (2010) Small-angle scattering for structural biology-expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *Protein Sci.* 19(4):642-57.
- Jennis M., Kung C.P., Basu S., Budina-Kolomets A., Leu J.I., Khaku S., Scott J.P., Cai K.Q., Campbell M.R., Porter D.K., Wang X., Bell D.A., Li X., Garlick D.S., Liu Q., Hollstein M., George D.L., Murphy M.E. (2016) An African-specific polymorphism in the TP53 gene impairs p53 tumor suppressor function in a mouse model. *Genes Dev.* 30(8):918-30.
- Jiang L., Kon N., Li T., Wang S.J., Su T., Hibshoosh H., Baer R., Gu W. (2015) Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature.* 520(7545):57-62.
- Jin S., Martinek S., Joo W.S., Wortman J.R., Mirkovic N., Sali A., Yandell M.D., Pavletich N.P., Young M.W., Levine A.J. (2000) Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(13):7301-6.
- Jones S.N., Roe A.E., Donehower L.A., Bradley A. (1995) Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* 378(6553):206-8.
- Joruiz S.M., Bourdon J.C. (2016) p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6(8). pii: a026039.
- Kaiser A.M., Attardi L.D. (2018) Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death Differ.* 25(1):93-103.
- Kalluri R., Weinberg R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6):1420-8.
- Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.W. (1992) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51(23 Pt 1):6304-11.
- Kastenhuber E.R., Lowe S.W. (2017) Putting p53 in Context. *Cell.* 170(6):1062-1078.
- Kawamura T., Suzuki J., Wang Y.V., Menendez S., Morera L.B., Raya A., Wahl G.M., Izpisua Belmonte J.C. (2009) Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature.* 460(7259):1140-4.
- Kearse M.G., Wilusz J.E. (2017) Non-AUG translation: a new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev.* 31(17):1717-1731.
- Kessler H., Buchner J. (2012) The regulatory domain stabilizes the p53 tetramer by intersubunit contacts with the DNA binding domain. *J Mol Biol.* 425(1):144-55.

- Khan D., Katoch A., Das A., Sharathchandra A., Lal R., Roy P., Das S., Chattopadhyay S., Das S. (2015) Reversible induction of translational isoforms of p53 in glucose deprivation. *Cell Death Differ.* 22(7):1203-18.
- Khan D., Sharathchandra A., Ponnuswamy A., Grover R., Das S. (2013) Effect of a natural mutation in the 5' untranslated region on the translational control of p53 mRNA. *Oncogene.* 32(35):4148-59.
- Khochbin S., Lawrence J.J. (1989) An antisense RNA involved in p53 mRNA maturation in murine erythroleukemia cells induced to differentiate. *EMBO J.* 8(13):4107-14.
- Khoury M.P., Bourdon J.C. (2011) p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer.* 2(4):453-65.
- Kim D.Y., Kim W., Lee K.H., Kim S.H., Lee H.R., Kim H.J., Jung Y., Choi J.H., Kim K.T. (2013) hnRNP Q regulates translation of p53 in normal and stress conditions. *Cell Death Differ.* 20(2):226-34.
- Kim N.H., Kim H.S., Li X.Y., Lee I., Choi H.S., Kang S.E., Cha S.Y., Ryu J.K., Yoon D., Fearon E.R., Rowe R.G., Lee S., Maher C.A., Weiss S.J., Yook J.I. (2011) A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 195(3):417-33.
- Kim S., An S.S. (2016) Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)*, 95(26):e3993.
- Kirsebom L.A., Ciesiolka J. (2005) Pb²⁺-induced Cleavage of RNA. *Handbook of RNA Biochemistry*, ISBN: 3-527-30826-1.
- Kloek A.P., McCarter J.P., Setterquist R.A., Schedl T., Goldberg D.E. (1996) Caenorhabditis globin genes: Rapid intronic divergence contrasts with conservation of silent exonic sites. *J Mol Evol.* 43(2):101-108.
- Komar A.A., Hatzoglou M. (2011) Cellular IRES-mediated translation. The war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle.* 10(2):229-40.
- Konieczny P., Stepniak-Konieczna E., Taylor K., Sznajder L.J., Sobczak K. (2017) Autoregulation of MBNL1 function by exon 1 exclusion from MBNL1 transcript. *Nucleic Acids Res.* 45(4):1760-1775.
- Kozak M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* 234(2):187-208.
- Kruiswijk F., Labuschagne C.F., Vousden K.H. (2015) p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16(7):393-405.

- Kulesz-Martin M.F., Lisafeld B., Huang H., Kisiel N.D., Lee L. (1994) Endogenous p53 protein generated from wild-type alternatively spliced p53 rna in mouse epidermal cells. *Mol Cell Biol.* 14(3):1698-708.
- Kussie P.H., Gorina S., Marechal V., Elenbaas B., Moreau J., Levine A.J., Pavletich N.P. (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science.* 274(5289):948-53.
- Kwok C.K., Ding Y., Tang Y., Assmann S.M., Bevilacqua P.C. (2013) Determination of in vivo RNA structure in low-abundance transcripts. *Nat Commun.* 4:2971.
- Lamaa A., Le Bras M., Skuli N., Britton S., Frit P., Calsou P., Prats H., Cammas A., Millevoi S. (2016) A novel cytoprotective function for the DNA repair protein Ku in regulating p53 mRNA translation and function. *EMBO Rep.* 17(4):508-18.
- Lamb P., Crawford L. (1986) Characterization of the Human p53 Gene. *Mol Cell Biol.* 6(5):1379-85.
- Lane D., Levine A. (2010) p53 research: The past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(12):a000893.
- Lane D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358(6381):15-6
- Lane D.P., Crawford L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 15;278(5701):261-3.
- Langeveld-Voss B.M.W., Janssen R.A.J., Meijer E.W. (2000) On the origin of optical activity in polythiophenes. *Journal of Molecular Structure* 521(1–3): 285-301.
- Larsen A.T., Fahrenbach A.C., Sheng J., Pian J., Szostak J.W. (2015) Thermodynamic insights into 2-thiouridine-enhanced RNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* 43(16):7675-87.
- Lavigueur A., Maltby V., Mock D., Rossant J., Pawson T., Bernstein A. (1989) High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol.* 9(9):3982-91.
- Le Tonquèze O., Gschloessl B., Legagneux V., Paillard L., Audic Y. (2016) Identification of CELF1 RNA targets by CLIP-seq in human HeLa cells. *Genom Data.* 8:97-103.
- Lech K., Anderson K., Brent R. (1988) DNA-bound Fos proteins activate transcription in yeast. *Cell.* 52(2):179-84.
- Leppek K., Das R., Barna M. (2018) Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19(3):158-174.
- Li C., He Y., Ma H., Han S. (2017) NOVA1 acts as an oncogene in osteosarcoma. *Am J Transl Res.* 9(10):4450-4457.

- Li Y., Bakke J., Finkelstein D., Zeng H., Wu J., Chen T. (2018) HNRNPH1 is required for rhabdomyosarcoma cell growth and survival. *Oncogenesis*. 7(1):9.
- Lin T., Chao C., Saito S., Mazur S.J., Murphy M.E., Appella E., Xu Y. (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*. 7(2):165-71.
- Lin Y.J., Liao W.L., Wang C.H., Tsai L.P., Tang C.H., Chen C.H., Wu J.Y., Liang W.M., Hsieh A.R., Cheng C.F., Chen J.H., Chien W.K., Lin T.H., Wu C.M., Liao C.C., Huang S.M., Tsai F.J. (2017) Association of human height-related genetic variants with familial short stature in Han Chinese in Taiwan. *Sci Rep*. 7(1):6372.
- Liu G., Parant J.M., Lang G., Chau P., Chavez-Reyes A., El-Naggar A.K., Multani A., Chang S., Lozano G. (2004) Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat Genet*. 36(1):63-8.
- Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks T. (1983) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 362(6423):847-9.
- Lozano G. (2010) Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(4):a001115.
- Lozano G., Zambetti G.P. (2005) What have animal models taught us about the p53 pathway? *J Pathol*. 205(2):206-20.
- Lu X., Lane P. (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell*. 75(4):765-78.
- Ludwig R.L., Bates S., Vousden K.H. (1996) Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol*. 16(9):4952-60.
- Luo C., Cheng Y., Liu Y., Chen L., Liu L., Wei N., Xie Z., Wu W., Feng Y. (2017) SRSF2 regulates alternative splicing to drive hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res*. 77(5):1168-1178.
- Lüpertz R., Wätjen W., Kahl R., Chovolou Y. (2010) Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*. 271(3):115-21.
- Ma J., Ptashne M. (1987) Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*. 48(5):847-53.
- MacPherson D., Kim J., Kim T., Rhee B.K., Van Oostrom C.T., DiTullio R.A., Venere M., Halazonetis T.D., Bronson R., De Vries A., Fleming M., Jacks T. (2004) Defective apoptosis and B-cell lymphomas in mice with p53 point mutation at Ser 23. *EMBO J*. 23(18):3689-99.

- Mahmoudi S., Henriksson S., Corcoran M., Méndez-Vidal C., Wiman K.G., Farnebo M. (2009) Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell*. 33(4):462-71.
- Mahmoudi S., Henriksson S., Corcoran M., Méndez-Vidal C., Wiman K.G., Farnebo M. (2009) Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell*. 33(4):462-71.
- Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., Scrable H. (2003) Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev*. 18(3):306-19.
- Malbert-Colas L., Ponnuswamy A., Olivares-Illana V., Tournillon A.S., Naski N., Fahraeus R. (2014) HDMX folds the nascent p53 mRNA following activation by the ATM kinase. *Mol Cell*. 54(3):500-11.
- Maltzman W., Czyzyk L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol*. 4(9):1689-94.
- Marcel V., Dichtel-Danjou M.L., Sagne C., Hafsi H., Ma D., Ortiz-Cuaran S., Olivier M., Hall J., Mollereau B., Hainaut P., Bourdon J.C. (2011) Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ*. 18(12):1815-24.
- Marcel V., Nguyen Van Long F., Diaz J.J. (2018) 40 Years of Research Put p53 in Translation. *Cancers*. 10(5). pii: E152.
- Marcel V., Perrier S., Aoubala M., Ageorges S., Groves M.J., Diot A., Fernandes K., Tauro S., Bourdon J.C. (2010) $\Delta 160p53$ is a novel N-terminal p53 isoform encoded by $\Delta 133p53$ transcript. *FEBS Lett*. 584(21):4463-8.
- Marcel V., Vijayakumar V., Fernández-Cuesta L., Hafsi H., Sagne C., Hautefeuille A., Olivier M., Hainaut P. (2010) p53 regulates the transcription of its Delta133p53 isoform through specific response elements contained within the *TP53* P2 internal promoter. *Oncogene*. 29(18):2691-700
- Marión R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M.A. (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 460(7259):1149-53.
- Martin F.H., Castro M.M., Aboul-ela F., Tinoco I. Jr (1985) Base pairing involving deoxyinosine: implications for probe design. *Nucleic Acids Res*. 13(24):8927-38.
- Matlashewski G., Lamb P., Pim D., Peacock J., Crawford L., Benchimol S. (1984) Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*. 3(13):3257-3262.

- Matlashewski G., Pim D., Banks L., Crawford L. (1987) Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res.* 1(1):77-85.
- Michalak E.M., Jansen E.S., Happo L., Cragg M.S., Tai L., Smyth G.K., Strasser A., Adams J.M., Scott C.L. (2009) Puma and to a lesser extent Noxa are suppressors of Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ.* 16(5):684-96.
- Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 113(5):631-42.
- Mlynarczyk C., Fähræus R. (2014) Endoplasmic reticulum stress sensitizes cells to DNA damage-induced apoptosis through p53-dependent suppression of p21(CDKN1A). *Nat Commun.* 5:5067.
- Mohd Sobri S.N., Abdul Sani S.F., Sabtu S.N., Looi L.M., Chiew S.F., Pathmanathan D., Chio-Srichan S., Bradley D.A. (2020) Structural Studies of Epithelial Mesenchymal Transition Breast Tissues. *Sci Rep.* 10(1):1997.
- Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 69(7):1237-45.
- Montes de Oca Luna R., Wagner D.S., Lozano G. (1995) Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature.* 378(6553):203-6.
- Mosner J., Mummenbrauer T., Bauer C., Sczakiel G., Grosse F., Deppert W. (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 14(18):4442-9.
- Mosner J., Mummenbrauer T., Bauer C., Sczakiel G., Grosse F., Deppert W. (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 14(18):4442-9.
- Mowat M., Cheng A., Kimura N., Bernstein A., Benchimol S. (1985) Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature.* 314(6012):633-6.
- Niu J., Zhao X., Liu Q., Yang J. (2017) Knockdown of MSI1 inhibited the cell proliferation of human osteosarcoma cells by targeting p21 and p27. *Oncol Lett.* 14(5):5271-5278.
- Oliner J.D., Pietenpol J.A., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature.* 362(6423):857-60.
- Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. (2010) TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(1):a001008.

- Oren M., Bienz B., Givol D., Rechavi G., Zakut R. (1983), (2) Analysis of recombinant DNA clones specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *EMBO J.* 2(10): 1633–1639.
- Oren M., Levine A.J. (1983) Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(1): 56–59.
- Osowski C.M., Urano F. (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* 490:71-92.
- Ou Y., Wang S.J., Li D., Chu B., Gu W. (2016) Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(44):E6806-E6812.
- Pant V., Xiong S., Jackson J.G., Post S.M., Abbas H.A., Quintás-Cardama A., Hamir A.N., Lozano G. (2013) The p53-Mdm2 feedback loop protects against DNA damage by inhibiting p53 activity but is dispensable for p53 stability, development, and longevity. *Genes Dev.* 27(17):1857-67.
- Passacantilli I., Frisone P., De Paola E., Fidaleo M., Paronetto M.P. (2017) hnRNPM guides an alternative splicing program in response to inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway in Ewing sarcoma cells. *Nucleic Acids Res.* 45(21):12270-12284.
- Pavletich N.P., Chambers K.A., Pabo C.O. (1993) The DNA-binding domain of 53 contains the four conserved regions the major mutation hot spots. *Genes Dev*7(12B):2556-64.
- Paz I., Kosti I., Ares M., Cline M., Mandel-Gutfreund Y. (2014) RBPmap: a web server for mapping binding sites of RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 42(Web Server issue): W361–W367.
- Pehar M., O'Riordan K.J., Burns-Cusato M., Andrzejewski M.E., del Alcazar C.G., Burger C., Scrabble H., Puglielli L. (2010) Altered longevity-assurance activity of p53:p44 in the mouse causes memory loss, neurodegeneration and premature death. *Aging Cell.* 9(2):174-90.
- Peiqi L., Zhaozhong G., Yaotian Y., Jun J., Jihua G., Rong J. (2016) Expression of SRSF3 is correlated with carcinogenesis and progression of oral squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.* 13(7):533-9.
- Pérard J., Leyrat C., Baudin F., Drouet E., Jamin M. (2013) Structure of the full-length HCV IRES in solution. *Nat Commun.* 4:1612.
- Popenda M., Szachniuk M., Antczak M., Purzycka K.J., Lukasiak P., Bartol N., Blazewicz J., Adamiak R.W. (2012) Automated 3D structure composition for large RNAs, *Nucleic Acids Res.* 40(14):e112.
- Popenda M., Blazewicz M., Szachniuk M., Adamiak R.W. (2008) RNA FRABASE version 1.0: an engine with a database to search for the three-dimensional fragments within RNA structures (Database issue), *Nucleic Acids Res.* 36 D386–D391.

- Popenda M., Szachniuk M., Blazewicz M., Wasik S., Burke E.K., Blazewicz J., Adamiak R.W. (2010) RNA FRABASE 2.0: an advanced web-accessible database with the capacity to search the three-dimensional fragments within RNA structures, *BMC Bioinf.* 11:231.
- Putnam C.D., Hammel M., Hura G.L., Tainer J.A. (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys.* 40(3):191-285.
- Raj N., Attardi L.D. (2016) The Transactivation Domains of the p53 Protein. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 7(1).
- Ray P.S., Grover R., Das S. (2006) Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep.* 7(4):404-10.
- Reisman D., Greenberg M., Rotter V. (1988) Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(14):5146-50.
- Rogel A., Popliker M., Webb C.G., Oren M. (1985) p53 cellular tumor antigen: analysis of mrna levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol Cell Biol.* 5(10):2851-5.
- Rovinski B., Benchimol S. (1988) immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene.* 2(5):445-52.
- Rowan S., Ludwig R.L., Haupt Y., Bates S., Lu X., Oren M., Vousden K.H. (1996) Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J.* 15(4):827-38.
- Russo J., Lee J.E., López C.M., Anderson J., Nguyen T.P., Heck A.M., Wilusz J., Wilusz C.J. (2017) The CELF1 RNA-Binding Protein Regulates Decay of Signal Recognition Particle mRNAs and Limits Secretion in Mouse Myoblasts. *PLoS One.* 12(1):e0170680.
- Sawicka K., Bushell M., Spriggs K.A., Willis A.E. (2008) Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans.* 36(Pt 4):641-7.
- Scrable H., Sasaki T., Maier B. (2005) Δ Np53 or p44: priming the p53 pump. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(5):913-9.
- Senturk S., Yao Z., Camiolo M., Stiles B., Rathod T., Walsh A.M., Nemajerova A., Lazzara M.J., Altorki N.K., Krainer A., Moll U.M., Lowe S.W., Cartegni L., Sordella R. (2014) p53 Ψ is a transcriptionally inactive p53 isoform able to reprogram cells toward a metastatic-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(32):E3287-96.
- Seo J.Y., Kim D.Y., Kim S.H., Kim H.J., Ryu H.G., Lee J., Lee K.H., Kim K.T. (2017) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) L promotes DNA damage-induced cell apoptosis by enhancing the translation of p53. *Oncotarget.* 8(31):51108-51122.

- Serra M.J., Baird J.D., Dale T., Fey B.L., Retatagos K., Westhof E. (2002) Effects of magnesium ions on the stabilization of RNA oligomers of defined structures. *RNA*. 8(3):307-23.
- Sharathchandra A., Lal R., Khan D., Das S. (2012) Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biol*. 9(12):1429-39.
- Sharathchandra A., Lal R., Khan D., Das S. (2012) Annexin A2 and PSF proteins interact with p53 IRES and regulate translation of p53 mRNA. *RNA Biol*. 9(12):1429-39.
- Shaw P.H. (1996) The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract*. 192(7):669-75.
- Shin D., Han S., Lee S. (2016) Structure determination of biological macromolecular complexes by small-angle X-ray scattering (SAXS) combined with validating tools. *Biodesign*. pISSN 2288-6982 | eISSN 2288-7105.
- Sluss H.K., Armata H., Gallant J., Jones S.N. (2004) Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice. *Mol Cell Biol*. 24(3):976-84.
- Smith R.W., Anderson R.C., Smith J.W., Brook M., Richardson W.A., Gray N.K. (2011) DAZAP1, an RNA-binding protein required for development and spermatogenesis, can regulate mRNA translation. *RNA*. 17(7):1282-95.
- Sobell H. (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(16):5328-31.
- Sonenberg N., Hinnebusch A.G. (2009) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*. 136(4):731-45.
- Sonenberg N. (2008) eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol*. 86(2):178-83.
- Soussi T., Caron de Fromental C., Méchali M., May P., Kress M. (1987) Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene*. 1(1):71-8.
- Soussi T., May P. (1996) Structural Aspects of the p53 Protein in Relation to Gene Evolution: A Second Look. *J Mol Biol*. 260(5):623-37.
- Strudwick S., Carastro L.M., Stagg T., Lazarus P. (2003) Differential transcription-coupled translational inhibition of human p53 expression: a potentially important mechanism of regulating p53 expression in normal versus tumor tissue. *Mol Cancer Res*. 1(6):463-74.
- Su C.H., Hung K.Y., Hung S.C., Tarn W.Y. (2017) RBM4 regulates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells by modulating alternative splicing of pyruvate kinase M. *Mol Cell Biol*. 37(3). pii: e00466-16.

- Sulak M., Fong L., Mika K., Chigurupati S., Yon L., Mongan N.P., Emes R.D., Lynch V.J. (2016) *TP53* copy number expansion is associated with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. *eLife*. 5. pii: e11994.
- Sulima S.O., Kampen K.R., De Keersmaecker K. (2019) Cancer Biogenesis in Ribosomopathies. *Cells*. 8(3). pii: E229.
- Sullivan K.D., Palaniappan V.V., Espinosa J.M. (2015) ATM regulates cell fate choice upon p53 activation by modulating mitochondrial turnover and ROS levels. *Cell Cycle*. 14(1):56-63.
- Swiatkowska A., Dutkiewicz M., Zydowicz-Machtel P., Szpotkowska J., Janecki D.M., Ciesiołka J. (2019) Translational Control in *p53* Expression: The Role of 5'-Terminal Region of *p53* mRNA. *Int J Mol Sci*. 20(21). pii: E5382.
- Swiatkowska A., Zydowicz P., Sroka J., Ciesiołka J. (2016) The role of the 5' terminal region of *p53* mRNA in the *p53* gene expression. *Acta Biochim Pol*. 63(4):645-651.
- Tackmann N.R., Zhang Y. (2017) Mouse modelling of the MDM2/MDMX-p53 signalling axis. *J Mol Cell Biol*. 9(1):34-44.
- Takagi M., Absalon M.J., McLure K.G., Kastan M.B. (2005) Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin. *Cell*. 123(1):49-63.
- Takagi M., Ohashi K., Morimura T., Sugimoto C., Onuma M. (1998) Analysis of tumor suppressor gene p53 in chicken lymphoblastoid tumor cell lines and field tumors. *J Vet Med Sci*. 60(8):923-9.
- Tijerina P., Mohr S., Russell R. (2007) DMS footprinting of structured RNAs and RNA-protein complexes. *Nat Protoc*. 2(10):2608-23.
- Tuck S.P., Crawford L. (1989) Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol*. 9(5):2163-2172.
- Ungewitter E., Scrabble H. (2010) D40p53 controls the switch from pluripotency to differentiation by regulating IGF signaling in ESCs. *Genes Dev*. 24(21):2408-19.
- Utikal J., Polo J.M., Stadtfeld M., Maherali N., Kulalert W., Walsh R.M., Khalil A., Rheinwald J.G., Hochedlinger K. (2009) Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*. 460(7259):1145-8.
- Valkov E., Muthukumar S., Chang C.T., Jonas S., Weichenrieder O., Izaurralde E. (2016) Structure of the Dcp2-Dcp1 mRNA-decapping complex in the activated conformation. *Nat Struct Mol Biol*. 23(6):574-9.
- Vassilenko K.S., Alekhina O.M., Dmitriev S.E., Shatsky I.N., Spirin A.S. (2011) Unidirectional constant rate motion of the ribosomal scanning particle during eukaryotic translation initiation. *Nucleic Acids Res*. 39(13):5555-67.

- Végran F., Rebutti M., Chevrier S., Cadouot M., Boido R., Lizard-Nacol S. (2013) Only Missense Mutations Affecting the DNA Binding Domain of P53 Influence Outcomes in Patients with Breast Carcinoma. *PLoS One*. 8(1):e55103.
- Vorlíčková M., Kejnovská I., Bednářová K., Renčiuk D., Kypr J. (2012) Circular dichroism spectroscopy of DNA: from duplexes to quadruplexes. *Chirality*. 24(9):691-8.
- Walker K.K., Levine A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(26):15335-40.
- Wang S.J., Li D., Ou Y., Jiang L., Chen Y., Zhao Y., Gu W. (2016) Acetylation Is Crucial for p53-Mediated Ferroptosis and Tumor Suppression. *Cell Rep*. 17(2):366-373.
- Wang S.P., Wang W.L., Chang Y.L., Wu C.T., Chao Y.C., Kao S.H., Yuan A., Lin C.W., Yang S.C., Chan W.K., Li K.C., Hong T.M., Yang P.C. (2009) p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol*. 11(6):694-704.
- Wang Y., Chen D., Qian H., Tsai Y.S., Shao S., Liu Q., Dominguez D., Wang Z. (2014) The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer Cell*. 26(3):374-389.
- Wang Y., Farmer G., Soussi T., Prives C. (1995) *Xenopus laevis* p53 protein: sequence-specific DNA binding, transcriptional regulation and oligomerization are evolutionarily conserved. *Oncogene*. 10(4):779-84.
- Wang Z.N., Liu D., Yin B., Ju W.Y., Qiu H.Z., Xiao Y., Chen Y.J., Peng X.Z., Lu C.M. (2017) High expression of PTBP1 promote invasion of colorectal cancer by alternative splicing of cortactin. *Oncotarget*. 8(22):36185-36202.
- Wedeken L., Singh P., Klempnauer K.H. (2011) Tumor suppressor protein Pcd4 inhibits translation of p53 mRNA. *J Biol Chem*. 286(50):42855-62.
- Weingarten-Gabbay S., Khan D., Liberman N., Yoffe Y., Bialik S., Das S., Oren M., Kimchi A. (2014) The translation initiation factor DAP5 promotes IRES-driven translation of p53 mRNA. *Oncogene*. 33(5):611-8.
- Wilkinson K.A., Merino E.J., Weeks K.M. (2006) Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nat Protoc*. 1(3):1610-6.
- Will K., Warnecke G., Bergmann S., Deppert W. (1995) Species- and tissue-specific expression of the C-terminal alternatively spliced form of the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res*. 23(20):4023-8.
- Wolf D., Harris N., Goldfinger N., Rotter V. (1985) Isolation of a full-length mouse cDNA clone coding for an immunologically distinct p53 molecule. *Mol Cell Biol*. 5(1):127-32.

- Wolkowicz R., Peled A., Elkind N.B., Rotter V. (1995) Augmented DNA-binding activity of p53 protein encoded by a carboxyl-terminal alternatively spliced mRNA is blocked by p53 protein encoded by the regularly spliced form. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(15):6842-6.
- Wrzesinski J., Legiewicz M., Ciesiolka J. (2000) Mapping of accessible sites for oligonucleotide hybridization on hepatitis delta virus ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 28(8):1785–1793.
- Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J. (1993) The p53–mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7(7A):1126-32.
- Wu Y., Liu Y., Lee L., Miner Z., Kulesz-Martin M. (1994) Wild-type alternatively spliced p53: binding to DNA and interaction with the major p53 protein in vitro and in cells. *EMBO J.* 13(20):4823-30.
- Xie N., Chen M., Dai R., Zhang Y., Zhao H., Song Z., Zhang L., Li Z., Feng Y., Gao H., Wang L., Zhang T., Xiao R.P., Wu J., Cao C.M. (2017) SRSF1 promotes vascular smooth muscle cell proliferation through a $\Delta 133p53/EGR1/KLF5$ pathway. *Nat Commun.* 8:16016.
- Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R.A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., Lowe S.W. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 445(7128):656-60.
- Yamashita R., Wakaguri H., Sugano S., Suzuki Y., Nakai K. (2010) DBTSS provides a tissue specific dynamic view of Transcription Start Sites. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue):D98-104.
- Yang D.Q., Halaby M.J., Zhang Y. (2006) The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene.* 25(33):4613-9.
- Ying Z., Xia Q., Hao Z., Xu D., Wang M., Wang H., Wang G. (2016) TARDBP/TDP-43 regulates autophagy in both MTORC1-dependent and MTORC1-independent manners. *Autophagy.* 12(4):707-8.
- Yu H., Guo P., Xie X., Wang Y., Chen G. (2017) Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *J Cell Mol Med.* 21(4):648-657.
- Yu X., Zheng H., Chan M.T.V., Wu W.K.K. (2018) NOVA1 acts as an oncogene in melanoma via regulating FOXO3a expression. *J Cell Mol Med.* 22(5):2622-2630.
- Zakut-Houri R., Bienz-Tadmor B., Givol D., Oren M. (1985) Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J.* 4(5):1251-5.
- Zakut-Houri R., Oren M., Bienz B., Lavie V., Hazum S., Givol D. (1983) A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature* 306:594-597.

Zhang J., Cho S.J., Shu L., Yan W., Guerrero T., Kent M., Skorupski K., Chen H., Chen X. (2011) Translational repression of p53 by RNPC1, a p53 target overexpressed in lymphomas. *Genes Dev.* 25(14):1528-43.

Zhang J., Lucchesi C., Chen X. (2016) A new function for p53 tetramerization domain in cell fate control. *Cell Cycle.* 15(21):2854-2855.

Zhang L., Chen Q., An W., Yang F., Maguire E.M., Chen D., Zhang C., Wen G., Yang M., Dai B., Luong L.A., Zhu J., Xu Q., Xiao Q. (2017) Novel pathological role of hnRNPA1 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1) in vascular smooth muscle cell function and neointima hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37(11):2182-2194.

Zhang M., Zhang J., Chen X., Cho S.J., Chen X. (2013) Glycogen synthase kinase 3 promotes p53 mRNA translation via phosphorylation of RNPC1. *Genes Dev.* 27(20):2246-58.

Zhao K., Chai X., Johnston K., Clements A., Marmorstein R. (2001) Crystal Structure of the Mouse p53 Core DNA-binding Domain at 2.7 Å Resolution. *J Biol Chem.* 276(15):12120-7.

Zydowicz-Machtel P., Swiatkowska A., Popenda Ł., Gorska A., Ciesiołka J. (2018) Variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA influence the ribosomal scanning and translation efficiency. *Sci Rep.* 8(1):1533.