

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk

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

Agnieszka Górka

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

Poznań 2014

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

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

*dr Leszkowi Błaszczukowi
dr Marioli Dutkiewicz
dr Agacie Świątkowskiej
dr Katarzynie Purzyckiej
dr Agnieszce Kiliszek
dr Annie Kietrys
za owocne dyskusje naukowe*

*oraz współpracownikom
mgr inż. Dorocie Kowalczykiewicz
mgr inż. Aleksandrze Kasprowic
mgr Paulinie Żydowicz
mgr Barbarze Smólskiej
dr hab. Janowi Wrześnińskiemu
za miłą atmosferę i okazaną pomoc*

Pracę dedykuję mojej rodzinie i przyjaciołom

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

1. Projekt MNiSzW/NCN/NCBR Nr NN301272037. Temat: Rola regionu niekodującego 5' mRNA genu p53 w regulacji jego ekspresji na poziomie translacji. Kierownik tematu: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka.

2. Projekt MNiSzW/NCN/NCBR Nr 2013/09/B/NZ1/01884. Temat: Rola regionów niekodujących 5' mRNA genu p53 syntetyzowanych z różnych promotorów transkrypcyjnych i wykorzystujących alternatywne miejsca inicjacji translacji w generowaniu izoform białka p53. Kierownik tematu: prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka.

3. Grant badawczy w ramach zadania badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców lub uczestników studiów doktoranckich w roku 2012 (finansowanie MNiSzW). Temat: Wykorzystanie niestandardowych kodonów inicjacyjnych w translacji na przykładzie syntezy izoformy białka p53 w wybranych organizmach. Kierownik projektu: Agnieszka Górka.

4. Projekt HOMING PLUS Nr współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego Temat: Expression of p53 protein and its N-truncated form, $\Delta Np53$ – towards better understanding the mechanism of p53 IRES-mediated translation process. Kierownik projektu: dr Agata Świątkowska.

5. Projekt MNiSzW/NCN/NCBR Nr NN302385537. Temat: Racjonalne projektowanie małych interferujących RNA (siRNA) atakujących regiony RNA o wysoce uporządkowanej strukturze przestrzennej, na przykładzie regionu 5'UTR wirusa Coxsackie B3. Kierownik projektu: dr Mariola Dutkiewicz.

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

Agnieszka Górską, Leszek Błaszczuk, Mariola Dutkiewicz and Jerzy Ciesiołka „*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 Biology 2013, vol. 10(11) str. 1726–1740.

Agnieszka Górską, Agata Świątkowska, Mariola Dutkiewicz and Jerzy Ciesiołka „*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 2013 vol. 8(11) str. e78863.

Stokowa-Sołtys K., Gaggelli G., Nagaj J., Szczepanik W., Ciesiołka J., Wrześniński J., **Górską A.**, Valensin G., Jeżowska Bojczuk M. „*High affinity of copper(II) towards amoxicillin, apramycin and ristomycin. Effect of these complexes on the catalytic activity of HDV ribozyme*” Journal of Inorganic Biochemistry 2013, vol. 124, str. 26–34.

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

Leszek Błaszczuk, **Agnieszka Górską**, Jerzy Ciesiołka „*Secondary structure and the role in translation initiation of the 5' untranslated region of p53 mRNA*”. Frontiers in Structural Biology of RNAs and RNPs, 16–18.08.2010, Poznań, Polska.

Leszek Błaszczuk, **Agnieszka Górską**, Jerzy Ciesiołka „*Structural probing of the 5' untranslated region of p53 mRNA and its possible role in translation initiation*”. The modern RNA World, 13–16.09.2010, Murnau, Niemcy.

Agnieszka Górską, Leszek Błaszczuk, Jerzy Ciesiołka „*The role of different variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA in translation*”. The 2nd Congress of Biochemistry and Cell

Biology 46th Meeting of the Polish Biochemical Society and 11st Conference of the Polish Cell Biology Society, 5–9.09. 2011, Kraków, Polska.

Agnieszka Górka, Agata Świątkowska, Jerzy Ciesiołka „*The translational regulation of p53 protein and its $\Delta Np53$ isoform by antisense oligonucleotide strategy*”. Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 11–14.09.2012, Poznań, Polska.

Agnieszka Górka, Leszek Błaszczuk, Jerzy Ciesiołka „*Variable length sequence variants of the 5' untranslated region of p53 mRNA and their impact on efficiency of translation initiation*”. Structural Biology of Plants and Microbes, 22.05.2013, Poznań, Polska.

Agnieszka Górka, Agata Świątkowska, Mariola Dutkiewicz, Jerzy Ciesiołka „*The translational regulation of p53 and its $\Delta Np53$ isoform using antisense oligonucleotide strategy in vitro and in vivo*”. Protein Synthesis and Translational Control, 8–12.09.2013, Heidelberg, Niemcy.

Agata Świątkowska, **Agnieszka Górka**, Mariola Dutkiewicz, Jerzy Ciesiołka „*The p53 translation initiation and the role of potential IRES element in this process*”. Protein Synthesis and Translational Control, 8–12.09.2013, Heidelberg, Niemcy.

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	13
1. Wprowadzenie i cel pracy	19
2. Wstęp	23
2.1. Molekularny mechanizm translacji	23
2.1.1. Inicjacja translacji zależna od kapu.....	23
2.1.1.1. Tworzenie kompleksu preinicjacyjnego 43S	26
2.1.1.2. Przyłączanie kompleksu preinicjacyjnego 43S do mRNA.....	26
2.1.1.3. Skanowanie mRNA oraz tworzenie kompleksu inicjacyjnego 48S	27
2.1.1.4. Oddysocjowanie czynników inicjacyjnych i przyłączenie dużej podjednostki rybosomalnej 60S.....	27
2.1.2. Udział ogona poli(A) w inicjacji translacji	28
2.1.3. Wybór miejsca inicjacji translacji według mechanizmu skaningowego	29
2.1.4. Kontekst kodonu inicjacyjnego	30
2.1.5. Alternatywne mechanizmy inicjacji translacji zależnej od kapu	32
2.1.5.1. Skaning przeciekowy (ang. <i>leaky scanning</i>)	33
2.1.5.2. Wznowienie inicjacji translacji (reinicjacja)	35
2.1.5.3. Nieliniowa migracja rybosomu (ang. <i>discontinuous scanning, shunting</i>).....	38
2.2. Regulacja inicjacji translacji.....	41
2.2.1. Fosforylacja czynników inicjacyjnych.....	42
2.2.1.1. Fosforylacja eIF2.....	42
2.2.1.2. Oddziaływanie 4E-BP z eIF4E.....	44
2.2.2. Proteolityczne cięcie czynników inicjacyjnych.....	46
2.2.2.1. Proteolityczne cięcie eIF4G	46
2.2.2.2. Trawienie białka wiążącego ogon poli(A) PABC	47
2.2.3. Udział cząsteczek mikroRNA w regulacji translacji.....	47
2.3. Wewnętrzna inicjacja translacji – odkrycie elementów IRES	49
2.3.1. Rola struktury w funkcjonowaniu elementów IRES	52

2.3.2. Czynniki białkowe oddziałujące z IRES	54
2.3.3. Rola elementów IRES w regulacji ekspresji genów na poziomie translacji	56
2.3.3.1. Rola IRES-zależnej inicjacji translacji w cyklu komórkowym.....	58
2.3.3.2. IRES-zależna translacja podczas apoptozy	60
2.3.3.3. mRNA ulegające translacji zależnej od elementu IRES w warunkach stresowych	61
3. Wyniki i dyskusja	62
3.1. Organizacja genu p53 i jego ekspresja	62
3.2. Warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53	64
3.2.1. Translacja modelowych mRNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA oraz sekwencję kodującą białko reporterowe lucyferazy w lizacie z króliczych retikulocytów ...	65
3.2.1.1. Wpływ wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 różniących się miejscem startu transkrypcji P0 i P1 na wydajność translacji.....	65
3.2.1.2. Wpływ regionu terminalnego 5' mRNA p53 z zachowanym intronem 2 na wydajność translacji	68
3.2.1.2.1. Aktywność translacyjna kodonu AUG1 w mRNA ze zmutowanym kodonem STOP w intronie 2.....	68
3.2.1.2.2. Rola uORF w wariacie regionu terminalnego 5' mRNA p53 z zachowanym intronem 2, w inicjacji translacji z kodonu AUG2.....	70
3.2.2. Translacja inicjowana z kodonów AUG1 i AUG2 w modelowym mRNA P1-ΔNp53-Luc	72
3.2.2.1. Wpływ kapu na końcu 5' mRNA na aktywność translacyjną wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53	72
3.2.2.2. Wpływ wolnego analogu kapu na inicjację translacji z kodonów AUG1 i AUG2	74
3.2.2.3. Udział ogona poli(A) w inicjacji translacji z kodonu AUG1 i AUG2	76
3.2.3. Translacja modelowych mRNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 w komórkach HeLa i MCF-7	77
3.2.4. Analiza struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w modelowym konstrukcie mRNA kodującym lucyferazę <i>Renilla</i>	80
3.2.4.1. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA regionu P1-ΔNp53 w modelowym konstrukcie mRNA P1-ΔNp53-Luc w warunkach <i>in vitro</i>	82
3.2.4.1.1. Analiza struktury drugorzędowej regionu P1-ΔNp53 w modelowym konstrukcie mRNA w lizacie z króliczych retikulocytów za pomocą siarczanu dimetylu.....	87
3.2.4.2. Struktura drugorzędowa regionu P1-p53 w modelowym konstrukcie mRNA P1-p53-Luc.....	88

3.2.5. Analiza tworzenia się kompleksów rybosomalnych na mRNA P1-p53-Luc, P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc	93
3.2.5.1. Identyfikacja kompleksów rybosomalnych za pomocą odwrotnej transkryptazy AMV	94
3.2.5.2. Analiza tworzenia kompleksów rybosomalnych 48S i 80S kodonu AUG1 za pomocą odwrotnej transkryptazy SuperScript III	97
3.2.6. Czy niestandardowe kodony inicjacyjne mogą być wykorzystane w syntezie izoformy Δ Np53 ?.....	99
3.3. Dyskusja uzyskanych wyników.....	101
3.3.1. Mechanizm inicjacji translacji białka p53 i jego izoformy Δ Np53.....	101
3.3.1.1. Inicjacja translacji z kodonu AUG1 dla białka p53 zachodzi z udziałem kapu	102
3.3.1.2. Inicjacja translacji z kodonu AUG2 wykazuje cechy inicjacji wewnętrznej	105
3.3.1.3. Obecność ogonu poli(A) nie wpływa stymulująco na translację w lizacie z króliczych retikulocytów.....	110
3.3.2. Izoforma Δ Np53 może powstawać z transkryptu zawierającego intron 2 według mechanizmu wznowienia translacji.....	111
3.3.3. Wpływ struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na poziom translacji i rozpoznawanie kodonów inicjacyjnych AUG.....	116
3.3.3.1. Rola spinki G56-C169 w translacji inicjowanej z kodonu AUG1	117
3.3.3.2. Rola spinki G56-C169 i U180-A218 w translacji rozpoczynającej się z kodonu AUG2	120
3.3.3.3. Wpływ regionu międzypromotorowego P0-P1 na translację inicjowaną z kodonu AUG1 i AUG2	121
3.4. Regulacja translacji p53 oraz izoformy ΔNp53 za pomocą oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53.....	125
3.4.1. Mapowanie miejsc dostępnych do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów w regionie terminalnym 5'mRNA p53	125
3.4.2. Translacja modelowego mRNA P1- Δ Np53-Luc w lizacie z retikulocytów królika w obecności oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53	129
3.4.3. Analiza aktywności endogennej RNazy H w RRL w obecności oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53	135
3.4.3.1. Indukcja RNazy H pod wpływem niemodyfikowanych oligonukleotydów antysensowych w RRL.....	135

3.4.3.2. Wpływ oligonuleotydów antysensowych typu 2'- <i>O</i> -metylo i gapmer na aktywność RNazy H.....	137
3.4.4. Translacja modelowego mRNA P1- Δ Np53-Luc w RRL w obecności modyfikowanych oligomerów nr 1 i nr 7b.....	142
3.4.5. Wpływ oligonukleotydów antysensownych nr 1 i nr 7b typu 2'- <i>O</i> -metylo i gapmer na poziom białka p53 w komórkach MCF-7.....	144
3.5. Dyskusja uzyskanych wyników.....	149
3.5.1. Region terminalny 5' mRNA p53 jest dostępny do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów pomimo obecności stabilnych termodynamicznie motywów strukturalnych	149
3.5.2. Niemodyfikowane oligonukleotydy antysensowe komplementarne do regionu terminalnego 5' mRNA p53 regulują translację inicjowaną z AUG1 i AUG2 poprzez indukcję RNazy H w systemie bezkomórkowym.....	152
3.5.3. Oligonukleotydy antysensowe typu 2'- <i>O</i> -metylo i gapmer działają według dwóch różnych mechanizmów i wywierają zróżnicowany wpływ na translację inicjowaną z kodonów AUG1 i AUG2 w lizacie z króliczych retikulocytów	155
3.5.4. Oligonukleotydy antysensowe typu gapmer i 2'- <i>O</i> -metylo, które hybrydują do regionu terminalnego 5' mRNA p53 obniżają poziom białka p53 w komórkach raka piersi MCF-7	158
4. Podsumowanie	162
5. Materiały i metody.....	165
5.1. Aparatura.....	165
5.2. Odczynniki i materiały.....	166
5.2.1. Związki promieniotwórcze.....	166
5.2.2. Enzymy	166
5.2.3. Zestawy odczynników.....	167
5.2.4. Odczynniki do hodowli komórek ludzkich	167
5.2.5. Oligonukleotydy.....	168
5.2.6. Preparaty genomowego DNA i cDNA.....	168
5.2.7. Plazmidy.....	168
5.2.8. Szczepy bakteryjne.....	169
5.2.9. Linie komórkowe oraz tkanki zwierzęce.....	169
5.2.10. Przeciwciała	169
5.2.11. Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek	170

5.2.12. Bufory, roztwory i pożywki	170
5.3. Metody standardowe	172
5.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących	172
5.3.2. Elektroforeza cząsteczek DNA i RNA w żelu agarozowym.....	173
5.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.....	173
5.3.4. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego.....	174
5.3.5. Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu.....	174
5.3.6. Ekstrakcja fenolem.....	175
5.3.7. Znakowanie kwasów nukleinowych na końcu 5' izotopem ³² P.....	175
5.3.8. Izolacja RNA za pomocą odczynnika TriReagent	176
5.3.9. Izolacja całkowitego RNA z tkanek zwierzęcych.....	176
5.3.10. Hodowla ludzkich komórek nowotworowych.....	176
5.4. Metody stosowane w badaniach własnych	177
5.4.1. Klonowanie modelowych konstruktów dsDNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 człowieka	177
5.4.1.1. Otrzymywanie insertów dsDNA	177
5.4.1.2. Trawienie insertów dsDNA oraz wektora plazmidowego enzymami restrykcyjnymi	179
5.4.1.3. Ligacja insertów dsDNA z plazmidem	180
5.4.1.4. Ukierunkowana mutageneza	180
5.4.1.5. Transformacja komórek <i>E.coli</i>	181
5.4.2. Otrzymywanie modelowych mRNA p53 świni domowej, krowy oraz królika	182
5.4.3. Transkrypcja <i>in vitro</i>	183
5.4.4. Mapowanie miejsc w mRNA dostępnych do hybrydyzacji za pomocą bibliotek kombinatorycznych DNA i RNazy H	183
5.4.5. Cięcia indukowane przez RNazę H z <i>E.coli</i> w obecności oligonukleotydów antysensowych	184
5.4.6. Ograniczone trawienie RNA rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących	184
5.4.7. Doświadczenia wykonywane w lizacie z króliczych retikulocytów (RRL).....	184
4.5.7.1. Translacja <i>in vitro</i>	184

5.4.7.2. Analiza kompleksów rybosomalnych 48S i 80S w RRL tzw. „odcisk palca”	185
5.4.7.3. Analiza cięć RNazą H w obecności oligonukleotydów antysensowych w RRL.....	187
5.4.8. Odwrotna transkrypcja z radioaktywnie znakowanym starterem DNA.....	187
5.4.9. Transfekcja komórek HeLa i MCF-7 modelowymi mRNA i oligonukleotydami antysensowymi	188
5.4.10. Pomiar aktywności białek reporterowych lucyferazy <i>Renilla</i> i <i>Firefly</i>	188
5.4.11. Analiza białek metodą Western-blot	189
5.4.12. Półilościowa analiza poziomu mRNA metodą RT-PCR.....	190
5.4.13. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA	190
5.4.13.1. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem techniki SHAPE....	190
5.4.13.2. Cięcia RNA indukowane w obecności jonów Pb ²⁺	191
5.4.13.3. Modyfikacja chemiczna RNA za pomocą siarczanu dimetylu DMS	191
5.4.13.4. Modyfikacja chemiczna RNA w RRL za pomocą siarczanu dimetylu DMS	192
5.4.13.5. Odwrotna transkrypcja z fluorescencyjnie znakowanymi starterami DNA	192
6. Literatura.....	194

Wykaz stosowanych skrótów

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

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

A – adenozyna

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

C – cytydyna

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

Cx – cykloheksimid

DMS – siarczan dimetylu

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – trifosforan dowolnego deoksyrybonukleotydu

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

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

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

G – guanozyna

GDP – guanozynodifosforan

GMP-PNP – analog GTP nie ulegający hydrolizie

GTP – guanozynotrifosforan

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

kDa – kilodaltony

kpz – tysiące par zasad

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

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

nt – nukleotyd

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

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

RNA – kwas rybonukleinowy

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

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

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

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

T – tymidyna

U – urydyna

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

Abstract

Eukaryotic gene expression is mainly controlled at translational level. Compared with transcriptional regulation it allows for more rapid changes in cellular concentrations of proteins in response to stress events. The most regulated phase of translation is an initiation step. The initiation occurs by scanning of the 5'-terminal regions of mRNAs by the initiation complex or according to the cap-independent mechanism. The 5'-terminal regions of mRNAs modulate translation efficiency and together with protein factors participate in translation regulation. It has been observed that the 5'-terminal region of p53 mRNA is involved in regulation of expression of p53 protein and its major isoform Δ Np53 at translational level. This region may exist in several different sequence variants due to the presence of multiple transcription start sites, alternatively spliced intron sequences and alternative translation initiation codons. It has also been suggested that the 5'-terminal region of p53 mRNA exerts properties of an IRES element, which enables internal initiation of translation.

In this dissertation the impact of different variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA on translation of reporter protein has been investigated. The mechanism of translation initiation from AUG1 start codon for full-length p53 and AUG2 for Δ Np53 isoform has also been evaluated. The variants of the 5'-terminal region of p53 mRNA were followed by the luciferase coding sequence in model mRNA constructs. They were translated *in vitro* in rabbit reticulocyte lysate, as well as in HeLa and MCF-7 cells. Structural probing of the 5'-terminal region of p53 mRNA in the model mRNA construct confirmed that AUG1 codon is embedded within stable hairpin G56-C169. This hairpin might cause a steric hindrance for the moving ribosome, thus increasing translation efficiency from the AUG1 codon. This hypothesis was supported by toe-printing analysis, in which initiation complexes at AUG1 codon were hardly detected. The results of *in vitro* translation studies suggested that the translation initiation from AUG1 codon was mostly cap-dependent. However, translation initiation from AUG2 showed rather IRES-dependent character. It turned out that the region spanning two transcription start sites P0 and P1 strongly reduces the translation level from AUG1 codon. It seems to be a consequence of stable secondary structure of the cap-proximal mRNA region, which may interfere with scanning by the ribosome. In another mRNA construct, the presence of intron 2 resulted in translation initiation only from AUG2 codon. Moreover, mutation of UGA STOP codon present within intron 2 to GCG revealed that AUG1 codon is also active in translation. Thus, uORF is formed in this mRNA variant, which encodes 25-aminoacid-long peptide.

Therefore, Δ Np53 isoform might also be generated from not completely spliced p53 mRNA and its synthesis occurs according to reinitiation model after synthesis of a short peptide from AUG1 codon.

In order to modulate translation efficiency of p53 protein and Δ Np53 isoform, antisense oligonucleotides complementary to the 5'-terminal region of p53 mRNA were applied. These oligomers, which were able to bind to the most characteristic structural elements of 5'-terminal region, hairpin G56-C169 and U180-A218, induced changes in translation level from both the initiation codons during translation in rabbit reticulocyte lysate. This indicates, that both hairpins play a crucial role in translation initiation. Moreover, it turned out that the remaining RNase H activity in the lysate contributed to the effect of antisense oligomers on translation efficiency. The 2'-*O*-methylated and LNA-gamper derivatives of selected oligomers were also be used to reduced p53 protein level in MCF-7 cells. These oligomers are good candidates to be applied in the future to reduce p53 level in radio-resistant tumor cells.

Streszczenie

Ekspresja genów eukariotycznych jest kontrolowana głównie na poziomie translacji, co w przeciwieństwie do regulacji na poziomie transkrypcji pozwala na szybką zmianę poziomu białek w komórce w odpowiedzi na działanie czynników stresowych. Regulacja procesu translacji dotyczy przede wszystkim etapu inicjacji, który może zachodzić na drodze skanowania regionów terminalnych 5' mRNA przez kompleks rybosomalny lub na drodze mechanizmu niezależnego od kapu. Regiony terminalne 5' mRNA modulują wydajność translacji na skutek oddziaływania z czynnikami białkowymi. Zaobserwowano, że ekspresja białka p53 oraz jego izoformy Δ Np53 jest regulowana przez region terminalny 5' mRNA p53. Region ten może występować w postaci kilku wariantów sekwencyjnych, różniących się miejscem inicjacji transkrypcji, obecnością sekwencji intronów zachowanych w alternatywnym składaniu oraz obecnością alternatywnych kodonów inicjacyjnych. Dane literaturowe sugerują, że w obrębie regionu terminalnego 5' mRNA p53 występuje element IRES (ang. *internal ribosomal entry site*), który umożliwia wewnętrzną inicjację translacji bez konieczności skanowania mRNA przez kompleks rybosomalny.

W niniejszej pracy doktorskiej określono wpływ wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 na translację białka reporterowego. Zweryfikowano również mechanizm translacji inicjowanej z kodonu AUG1 dla białka p53 pełnej długości oraz z kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53. W tym celu stosowano modelowe konstrukty mRNA, w których warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 poprzedzały sekwencję kodującą białko reporterowe. Następnie, ulegały one translacji *in vitro* w lizacie z króliczych retikulocytów, a także w ludzkich komórkach HeLa i MCF-7. Analiza strukturalna regionu terminalnego 5' mRNA p53 w modelowym konstrukcie mRNA wykazała, że kodon AUG1 znajduje się w obrębie trwałej termodynamicznie spinki G56-C169. Istnieje możliwość, że spinka ta stanowi zawadę przestrzenną dla skanującego kompleksu rybosomalnego, dzięki czemu wzrasta wydajność translacji z kodonu AUG1. Hipotezę tą potwierdziły wyniki analizy „odcisku palca”, ponieważ identyfikacja kompleksów rybosomalnych w obrębie kodonu AUG1 była utrudniona. Wyniki uzyskane w reakcjach translacji *in vitro* sugerują, że inicjacja translacji z kodonu AUG1 jest w dużej mierze zależna od kapu na końcu 5' mRNA. Natomiast translacja z kodonu AUG2 wykazuje raczej charakter zależny od elementu IRES. Okazało się również, że region pomiędzy miejscami promotorowymi P0 i P1 silnie obniża wydajność translacji z kodonu AUG1. Prawdopodobnie, efekt ten jest związany ze strukturą

drugorzędową regionu w pobliżu końca 5' mRNA, która może zakłócać proces skanowania. Z kolei obecność intronu 2 w innym modelowym konstrukcie mRNA skutkowałą translacją jedynie z kodonu AUG2. Co więcej, mutacja kodonu STOP UGA obecnego w intronie 2 na kodon GCG pokazała, że translacja może być inicjowana również z kodonu AUG1. W związku z tym, wariant regionu terminalnego 5' mRNA p53 z zachowanym intronem 2 posiada uORF, która koduje 25-aminokwasowy peptyd. Tak więc, izoforma Δ Np53 może powstawać z mRNA zawierającym intron 2 według mechanizmu reinicjacji, po zakończeniu syntezy peptydu z kodonu AUG1.

W celu modulacji efektywności translacji białka p53 i izoformy Δ Np53 wykorzystano oligonukleotydy antysensowe komplementarne do regionu terminalnego 5' mRNA p53. Oligomery, które wiązały się do najbardziej charakterystycznych motywów strukturalnych, którymi są spinki G56-C169 i U180-A218 indukowały największe zmiany poziomie białek syntetyzowanych z obu kodonów AUG w lizacie z króliczych retikulocytów. Wynik ten wskazuje na kluczową rolę obu spinek w procesie inicjacji translacji. Ponadto, okazało się, że efekt oligonukleotydów antysensowych na wydajność translacji związany jest z aktywnością RNazy H, która jest obecna w lizacie. W celu obniżenia poziomu białka p53 w komórkach MCF-7 zastosowano wybrane oligomery w formie 2'-*O*-metylowanej oraz gamperów LNA. Modyfikowane oligomery wydają się być potencjalnymi terapeutykami obniżającym poziom białka p53 w liniach komórek nowotworowych poddawanych radioterapii.

1. Wprowadzenie i cel pracy

Podczas ekspresji materiału genetycznego w komórce eukariotycznej, kluczowe znaczenie mają takie procesy jak: transkrypcja, dojrzewanie pre-mRNA, eksport mRNA z jądra do cytoplazmy, translacja czy modyfikacje potranslacyjne. Ostatnim etapem ekspresji genów kodujących białka jest proces translacji, podczas którego zachodzi przepisanie informacji zawartej w mRNA na łańcuch polipeptydowy białka. Prowadzi on do powstania proteomu, czyli pełnego zestawu białek w komórce. Pomimo, iż tylko 2% genomu człowieka to sekwencje kodujące białka, to aż 30% suchej masy komórki stanowi aparat translacyjny, a 80% komórkowego RNA to rRNA wchodzący w skład rybosomów. Okazało się także, że proces translacji zwiększa zdolność kodującą genomu poprzez generowanie różnych białek z tego samego transkryptu [1].

W przeciwieństwie do organizmów prokariotycznych, u których ekspresja materiału genetycznego regulowana jest głównie na poziomie transkrypcji, u organizmów eukariotycznych najintensywniej regulowanym procesem jest translacja, o czym świadczy fakt, że aż 90% mRNA podlega regulacji na tym etapie. Regulacja na poziomie translacji, odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak wzrost i rozwój komórki czy odpowiedź na warunki stresowe [2]. Może to prowadzić do sytuacji, w której w danych warunkach dwa różne mRNA, będące w takiej samej ilości w cytoplazmie, mogą ulegać translacji z różną wydajnością, co wpływa na ilość kodowanych przez nie białek. Co ważne, regulacja na poziomie translacji umożliwia komórce znacznie szybszą odpowiedź na działanie czynników stresowych.

Chociaż proces translacji regulowany jest na każdym z trzech etapów: inicjacji, elongacji i terminacji, w największym stopniu dotyczy to etapu inicjacji, kiedy rybosom przyłącza się do mRNA i wybierany jest kodon inicjacyjny. Inicjacja translacji jest złożonym procesem, będącym pod kontrolą ponad 25 czynników białkowych, które oddziałują nie tylko z rybosomem ale również z elementami regulatorowymi w mRNA [3; 4].

Do elementów budowy eukariotycznych mRNA, które pełnią istotną funkcję w inicjacji translacji należą m. in., modyfikacje ich końców 5' i 3'. Inicjacja translacji mRNA jest silnie stymulowana obecnością kapu na jego końcu 5', który umożliwia związanie kompleksu rybosomalnego i skanowanie mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego. Taki sposób inicjacji translacji nosi nazwę mechanizmu skaningowego i dotyczy przeważnie

tych mRNA, z których w sposób ciągły powstają duże ilości białka w komórce [5]. Eukariotyczny mRNA posiada zazwyczaj jedną otwartą ramkę odczytu kodującą białko ORF (ang. *open reading frame*) i regiony niekodujące na końcach 5' i 3'. Niekiedy w mRNA mogą występować dodatkowe kodony inicjacyjne poprzedzające główną ramkę odczytu lub sekwencje intronowe zachowane podczas alternatywnego składania pre-mRNA. Prowadzi to do utworzenia krótkich otwartych ramek odczytu uORF (ang. *upstream open reading frame*) [6]. Wydajność inicjacji translacji zależy również od otoczenia kodonu inicjacyjnego oraz jego odległości od końca 5' mRNA, co ma istotne znaczenie dla jego rozpoznania przez kompleks rybosomalny [5; 7]. Ponadto, obecne w regionie terminalnym 5' mRNA elementy struktury drugo- i trzeciorzędowej stanowią miejsca wiązania wielu białek oraz krótkich niekodujących lub antysensowych RNA [8]. Długość oraz struktura regionu terminalnego 5' ma również znaczenie dla migracji rybosomu wzdłuż mRNA oraz selekcji kodonu inicjacyjnego.

Proces inicjacji translacji może zachodzić także bez udziału kapu na końcu 5' mRNA. W warunkach zaburzonej równowagi fizjologicznej w komórce, kiedy translacja zależna od kapu jest zahamowana, synteza białek odbywa się na drodze wewnętrznej inicjacji [9]. W tym alternatywnym sposobie inicjacji translacji, aktywny rybosom tworzy się dzięki występowaniu w regionie terminalnym 5' mRNA motywów struktury drugo- i trzeciorzędowej stanowiących tzw. element IRES (ang. *internal ribosomal entry site*). Sądzi się, że według tego mechanizmu inicjowana jest w szczególności synteza białek o kluczowym znaczeniu dla cyklu komórkowego, apoptozy, odpowiedzi komórki na warunki stresowe czy procesu nowotworzenia [10]. Do takich białek należy również białko p53, będące głównym supresorem nowotworzenia. Oprócz białka p53 z tego samego mRNA, aczkolwiek

z alternatywnego kodonu inicjacyjnego syntetyzowana jest jego izoforma Δ Np53 [11]. Izofорма Δ Np53 na skutek wiązania się do białka p53 pełnej długości, redukując jego ilość w komórce [12]. W literaturze pojawiła się też informacja, że translacja p53 i Δ Np53 przebiega przy udziale dwóch elementów IRES, zlokalizowanych w regionie terminalnym 5' mRNA [11]. Inne dane literaturowe sugerują, iż izoforma Δ Np53 może powstawać z transkryptu, w którym na skutek alternatywnego składania zachowana została sekwencja intronu 2, w obrębie której znajduje się kodon stop [13]. W tym przypadku, translacja z drugiego kodonu inicjacyjnego miałyby zachodzić według mechanizmu zależnego od kapu, na drodze reinicjacji. Jak dotąd, żaden z proponowanych mechanizmów nie został

ostatecznie potwierdzony. Ponadto, ważną rolę regulatorową w ekspresji białka p53 może odgrywać także obecność kilku miejsc promotorowych transkrypcji, głównie P0 i P1. W zależności od miejsca inicjacji transkrypcji obserwuje się różną aktywność translacyjną mRNA p53 oraz zróżnicowany poziom białka p53 w tkankach zdrowych i nowotworowych [14].

Celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie wpływu wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 na proces inicjacji translacji białka reporterowego w systemie bezkomórkowym oraz wybranych liniach komórek ludzkich. Postanowiono wykorzystać modelowe mRNA, które zawierały warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 oraz sekwencję kodującą białko reporterowe lucyferazy. Warianty te różniły się obecnością regionu międzypromotorowego P0-P1, intronu 2 oraz alternatywnego kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53. Planowano również zweryfikować mechanizm translacji białka p53 oraz jego izoformy Δ Np53, a także sposób identyfikacji kodonów inicjacyjnych AUG1 (dla pełnej długości białka p53) oraz AUG2 (dla izoformy Δ Np53). Badania w tym kierunku obejmowały również określenie roli struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA w procesie inicjacji translacji. W związku z tym, zamierzano zbadać sposobu zwinięcia regionu terminalnego 5' mRNA p53 w modelowej cząsteczce mRNA w warunkach *in vitro* oraz w lizacie z króliczych retikulocytów, w którym przeprowadzano większość testów funkcjonalnych. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe na temat braku kodonu AUG dla izoformy Δ Np53 u niektórych organizmów, postanowiono zbadać czy w przypadku mRNA p53 wybranych organizmów translacja tej izoformy może rozpoczynać się od niestandardowego kodonu inicjacyjnego.

Drugim kierunkiem badań było sprawdzenie możliwości modulacji translacji inicjowanej z kodonu AUG1 dla białka p53 oraz AUG2 dla izoformy Δ Np53 za pomocą oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53. Szczególnie pożądane było otrzymanie oligonukleotydów antysensowych, które inhibowałyby translację białka p53 lub stymulowały syntezę izoformy Δ Np53. Region terminalny 5' mRNA p53 charakteryzuje się stabilną strukturą drugorzędową, która może stanowić utrudnienie w planowaniu miejsc docelowych dla oligonukleotydów antysensowych. Z tego względu, w pierwszej kolejności postanowiono zidentyfikować miejsca dostępne do hybrydyzacji dla krótkich oligomerów DNA w tym regionie. Następnie, zaprojektowane oligonukleotydy antysensowe postanowiono przetestować

w systemie bezkomórkowym, w celu wyselekcjonowania najbardziej aktywnych oligomerów. Obniżenie poziomu białka p53 w wybranych liniach komórek ludzkich zamierzano osiągnąć stosując modyfikowane oligonukleotydy antysensowe typu gapmer, a także ich pochodne 2'-*O*-metylo.

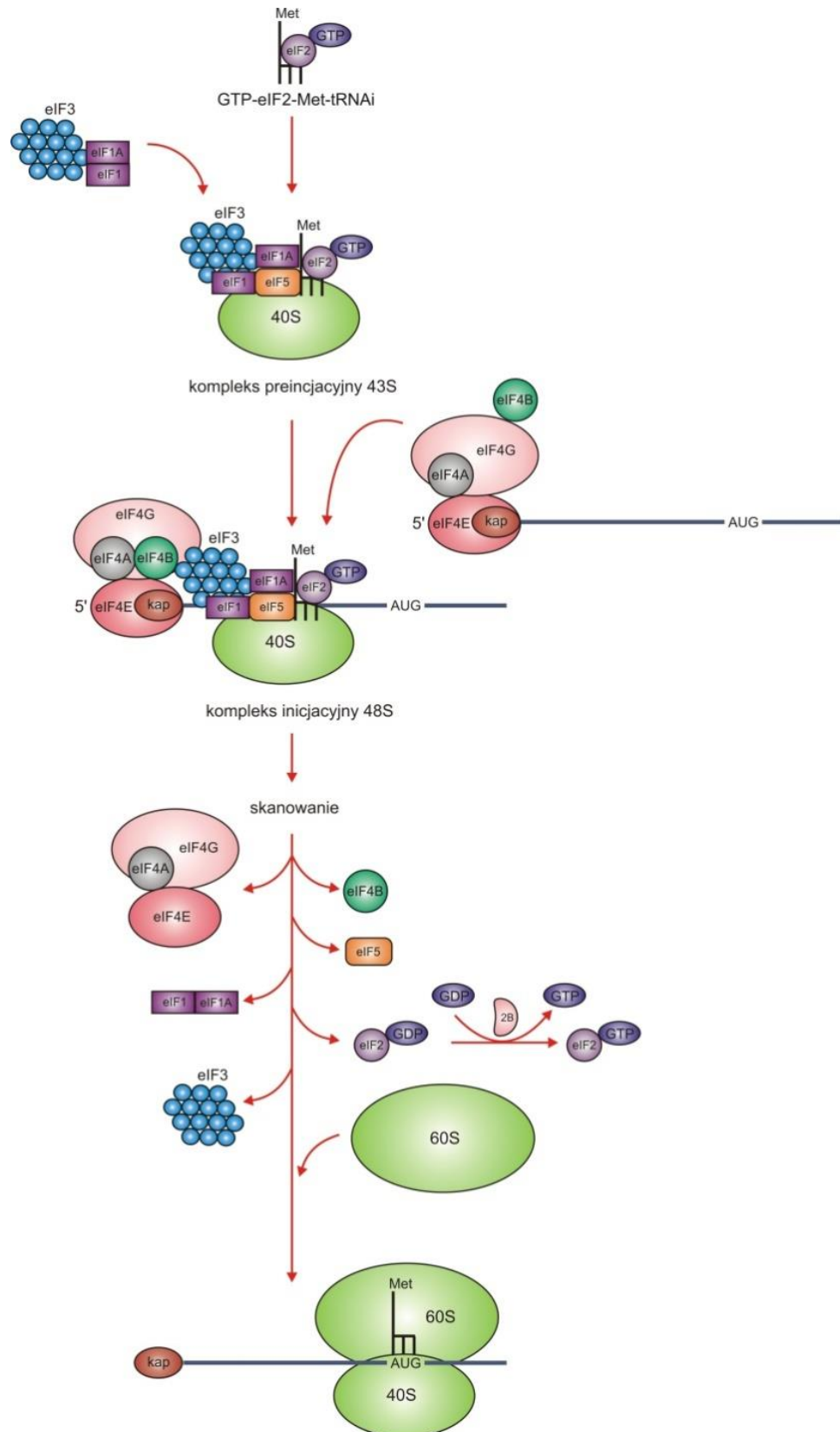
2. Wstęp

2.1. Molekularny mechanizm translacji

Proces translacji złożony jest z trzech etapów: inicjacji, elongacji i terminacji. Podczas gdy elongacja i terminacja zachodzą przy udziale ograniczonej liczby czynników białkowych, inicjacja translacji jest złożonym procesem, w którym uczestniczy ponad 25 różnych białek (Rys. 1 i Tabela 1.). Uważa się, że inicjacja jest też najbardziej limitującym etapem całego procesu translacji [3]. Podczas etapu inicjacji inicjatorowy Met-tRNA_i wraz z małą podjednostką rybosomalną 40S i eukariotycznymi czynnikami inicjacyjnymi eIF (ang. *eukaryotic initiation factors*) tworzą kompleks z mRNA [6]. Na tym etapie dochodzi również do wyboru miejsca inicjacji translacji, czemu towarzyszy przyłączenie dużej podjednostki rybosomalnej 60S i powstanie aktywnego translacyjnie rybosomu 80S [15]. Kolejnym etapem jest elongacja polegająca na wiązaniu do rybosomu kolejnych aminoacylo-tRNA na zasadzie komplementarności kodonu w mRNA z antykodonem w tRNA oraz tworzenia wiązania peptydowego pomiędzy aminokwasami. Reakcja ta katalizowana jest przez rybosomalny RNA posiadający aktywność peptydylotransferazy i kontrolowana jest przez czynniki elongacyjne eEF (ang. *eukaryotic elongation factors*) [16]. Etap terminacji następuje po napotkaniu przez rybosom kodonu terminacyjnego. Dochodzi wówczas do uwolnienia rybosomu od powstałego łańcucha polipeptydowego oraz dysocjacji rybosomu na podjednostki 40S i 60S, które biorą udział w kolejnej rundzie translacji [6].

2.1.1. Inicjacja translacji zależna od kapu

Wszystkie eukariotyczne mRNA posiadają na końcu 5' 7-metyloguanozynę tzw. kap, który przyłączany jest w jądrze komórkowym podczas dojrzewania mRNA [17]. Struktura kap odgrywa dużą rolę w składaniu pre-mRNA, transporcie mRNA do cytoplazmy oraz wpływa na jego stabilność chroniąc koniec 5' przed degradacją. Ponadto translacja większości komórkowych mRNA rozpoczyna się od rozpoznania struktury kap przez kompleks eIF4F, który stymuluje wiązanie małej podjednostki rybosomalnej 40S. Powstały w ten sposób kompleks preinicjacyjny 43S skanuje mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego AUG. Po jego napotkaniu do mRNA przyłącza się duża podjednostka rybosomalna 60S, dzięki hydrolizie GTP i powstaje aktywny translacyjnie rybosom 80S (Rys. 1).



Rys. 1 Inicjacja translacji u Eukariota według modelu skaningowego. W pierwszym etapie powstaje kompleks preinicjacyjny 43S, który składa się z małej podjednostki rybosomalnej 40S, czynników inicjacyjnych eIF1, eIF1A, eIF3 oraz kompleksu GTP-eIF2-Met-tRNA_i. Z mRNA wiąże się kompleks eIF4F, składający się z eIF4A, eIF4E i eIF4G. Czynnikiem eIF4A jest odpowiedzialny za rozplatanie

struktur drugorzędowych w regionie niekodującym 5' mRNA, czynnik eIF4E ma zdolność wiązania struktury kapu na końcu 5' mRNA, a czynnik eIF4G stanowi rusztowanie molekularne dla innych białek oraz małej podjednostki rybosomalnej 40S. Oddziaływanie czynnika eIF3 z eIF4G prowadzi do przyłączenia podjednostki 40S do kapu. Powstaje w ten sposób kompleks inicjacyjny 48S, który skanuje mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego AUG. Po identyfikacji kodonu AUG, eIF5 stymuluje hydrolizę GTP związanego z eIF2, a eIF5B promuje przyłączenie dużej podjednostki rybosomalnej 60S, czemu towarzyszy uwolnienie czynników inicjacyjnych. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [6]).

Tabela 1. Czynniki inicjacyjne biorące udział w inicjacji translacji zależnej od kapu oraz ich funkcja.

Czynnik inicjacyjny	Funkcja	Partner, z którym oddziałuje
eIF1	inhibuje hydrolizę GTP katalizowaną przez eIF5, wybór kodonu START	eIF5
eIF1A	katalizuje przyłączenie kompleksu GTP-eIF2-Met-tRNA _i do 40S, wybór kodonu START	eIF5
eIF2	GTPaza, przyłącza GTP oraz wiąże się z inicjatorowym Met-tRNA _i	eIF5, 40S
eIF2B	katalizuje wymianę GDP na GTP w eIF2	
eIF3	stabilizuje wiązanie kompleksu GTP-eIF2-Met-tRNA _i z 40S, zapobiega formowaniu rybosomu 80S	eIF5, eIF4G, eIF4B, eIF1, 40S
eIF4A	helikaza RNA, rozplata regiony dwuniciowe w 5'UTR	eIF4G
eIF4E	wiąże kap na końcu 5' mRNA	eIF4G, eIF4A, eIF3
eIF4G	pośredniczy w przyłączaniu 40S do kapu, stanowi rusztowanie dla innych czynników inicjacyjnych	
eIF4F	tworzy kompleks składający się z eIF4E, eIF4A i eIF4G	
eIF4B	stymuluje aktywność helikazową eIF4A	eIF3
eIF5	aktywuje aktywność GTPazową eIF2	eIF2, eIF1, eIF1A
eIF5B	GTPaza, przyłącza 60S	

2.1.1.1. Tworzenie kompleksu preinicjacyjnego 43S

Aby translacja mogła się rozpocząć musi utworzyć się kompleks preinicjacyjny, w którego skład wchodzi: Met-tRNAi zasocjowany z eIF2 i GTP, czynniki inicjacyjne eIF1, eIF1A, eIF3 i eIF5 oraz mała podjednostka rybosomalna 40S (Rys.1) [18; 19]. Etap ten wymaga obecności w cytoplazmie wolnych podjednostek rybosomalnych 40S. Składający się z wielu podjednostek czynnik eIF3 zapobiega ponownemu łączeniu się małej podjednostki rybosomalnej 40S i dużej 60S. Stabilizuje on również kompleks eIF2-Met-tRNAi-GTP z podjednostką 40S [20]. Czynniki inicjacyjne eIF2 zbudowany jest z trzech podjednostek α , β i γ . Podjednostki α i β odpowiadają za wiązanie Met-tRNAi, natomiast podjednostka γ wiąże GTP [21]. Ponadto podjednostka β oddziałuje z eIF5, który indukuje aktywność GTPazową podjednostki γ eIF2 [22]. Z kolei czynnik eIF1A katalizuje przeniesienie trójskładnikowego kompleksu eIF2-Met-tRNAi-GTP do podjednostki 40S [20]. Czynniki eIF1A wraz z czynnikiem eIF1 jest zaangażowany w identyfikację odpowiedniego kodonu START oraz bierze udział w odłączaniu kompleksu preinicjacyjnego od mRNA [17; 23].

2.1.1.2. Przyłączenie kompleksu preinicjacyjnego 43S do mRNA

Struktura kapu na końcu 5' mRNA stanowi molekularny znacznik do przyłączenia podjednostki rybosomalnej 40S [6] (Rys. 1). Podjednostka 40S jest przyłączana do kapu w formie kompleksu 43S. Proces ten jest możliwy dzięki obecności kompleksu eIF4F, który składa się z trzech czynników inicjacyjnych eIF4E, eIF4G i eIF4A [24]. Będący najmniejszą podjednostką kompleksu eIF4F czynnik eIF4E specyficznie rozpoznaje i wiąże bezpośrednio kap, w związku z czym jego obecność jest konieczna do zajścia inicjacji translacji zależnej od kapu [2; 17]. Czynniki inicjacyjne eIF4G jest największą podjednostką kompleksu eIF4F. Stanowi on rusztowanie dla czynników inicjacyjnych, dzięki czemu umożliwia połączenie mRNA z aparatem translacyjnym. Posiada on miejsce wiązania dla eIF4E [25] oraz oddziałuje z eIF3, dzięki czemu umożliwia oddziaływanie pomiędzy kapem i dużą podjednostką rybosomalną 60S [26; 27; 28]. Czynniki eIF4G posiada również dwa miejsca wiązania dla eIF4A. Czynniki inicjacyjne eIF4A należy do rodziny helikaz zawierających motyw typu DEA(D/H), które rozplatają drugorzędowe struktury RNA w regionie niekodującym 5' mRNA (5'UTR, ang. *5' untranslated region*), co ułatwia skanowanie mRNA przez podjednostkę 40S w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego. Ponieważ

sam eIF4A wykazuje słabą aktywność ATPazy i helikazy, jest stymulowany przez eIF4G i eIF4B [29]. Czynniki eIF4B i eIF4E są białkami wiążącymi RNA, które ułatwiają wiązanie rybosomu z mRNA poprzez oddziaływanie z 18S rRNA i kierowanie podjednostki rybosomalnej 40S do jednoniciowych regionów mRNA [22].

2.1.1.3. Skanowanie mRNA oraz tworzenie kompleksu inicjacyjnego 48S

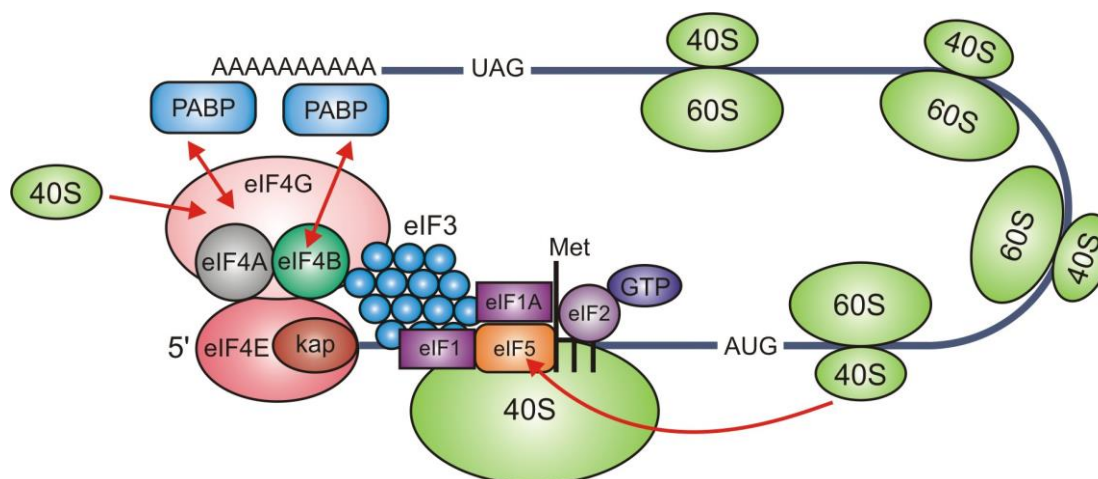
Oddziaływanie pomiędzy eIF3 i eIF4G powoduje, że kompleks preinicjacyjny 43S wiąże się do kapu na końcu 5' mRNA, co z prowadzi do powstania kompleksu inicjacyjnego 48S. W tworzeniu kompleksu 48S uczestniczy również eIF4B, który umożliwia wiązanie eIF3 z eIF4E [18] (Rys. 1). Kompleks inicjacyjny 48S rozpoczyna skanowanie regionu terminalnego 5' mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego w kierunku 5'→3' [30]. Proces ten wymaga dostarczenia energii, która pochodzi z hydrolizy ATP. W migracji rybosomu wzdłuż mRNA biorą udział eIF1A i eIF1, które wzmacniają wiązanie rybosomu z mRNA oraz promują powstawanie kompleksu 48S. Co więcej, eIF1A uczestniczy w rozpoznawaniu odpowiedniego kodonu inicjacyjnego poprzez oddziaływanie z eIF5. Z czynnikiem eIF5 wiąże się również eIF1, który zapobiega przedwczesnej hydrolizie GTP [19]. Mała podjednostka rybosomalna kontynuuje skanowanie do momentu napotkania kodonu inicjacyjnego. Jeżeli przerwa w skanowaniu wynikająca z utworzenia pary pomiędzy zasadami w kodonie i antykodonie jest wystarczająco długa, wówczas eIF5 aktywuje eIF2, wskutek czego dochodzi do hydrolizy GTP i uwolnienia eIF2 zasocjowanego z GDP [31].

2.1.1.4. Oddysocjowanie czynników inicjacyjnych i przyłączenie dużej podjednostki rybosomalnej 60S

Hydroliza GTP i uwolnienie eIF2 prowadzi do oddysocjowania eIF3 z kompleksu 48S [32] (Rys. 1). Czynniki eIF2B wymieniają GDP na GTP w eIF2, dzięki czemu może on brać udział w tworzeniu nowych kompleksów preinicjacyjnych [18; 22]. Po identyfikacji kodonu inicjacyjnego oddysocjowuje również eIF1 [32]. Sugeruje się, że w uwolnieniu eIF1 z kompleksu 48S kluczową rolę odgrywa nie sama hydroliza GTP, ale towarzyszące jej uwolnienie pirofosforanu [33]. Przyłączeniu dużej podjednostki rybosomalnej i utworzeniu funkcjonalnego rybosomu 80S towarzyszy uwolnienie eIF4B z kompleksu 48S.

2.1.2. Udział ogona poli(A) w inicjacji translacji

Wszystkie eukariotyczne mRNA z wyjątkiem mRNA histonów, posiadają na końcu 3' ogon poli(A) o długości od 50 do 300 nukleotydów. Ogon poli(A) jest dodawany do mRNA przez poli(A) polimerazę podczas jego dojrzewania w jądrze komórkowym [34]. Ogon poli(A) jest opłaszczony przez wiele kopii białka wiążącego się z poli(A) tzw. PABP (ang. *poly(A)-binding protein*) (Rys.2).



Rys. 2 Oddziaływanie PABC z kompleksem inicjacyjnym 48S. Strzałki wskazują wiązanie PABC z ogonem poli(A) oraz czynnikami inicjacyjnymi eIF4G i eIF4B, które prowadzi do przyłączenia małej podjednostki rybosomalnej 40S i cyrkularyzacji mRNA (na podstawie [6]).

Wiązanie białka PABP zapobiega deadenylacji ogona poli(A), a tym samym degradacji mRNA. Białko PABP na końcu aminowym posiada cztery konserwatywne motywy wiążące RNA - RRM (ang. *RNA recognition motif*), które odpowiadają za wiązanie z ogonem poli(A). Na końcu karboksylowym znajduje się domena PABC, która bierze udział w oddziaływaniu typu białko-białko [35]. Ludzki genom koduje trzy białka PABP: PAB1, PAB2 i PAB3. Białko PAB1 jest zaangażowane w translację i regulację stabilności mRNA w komórce, natomiast PAB2 uczestniczy w poliadenylacji. Wszystkie białka PABP oddziałują z czynnikiem inicjacyjnym eIF4G, wskutek czego dochodzi do zbliżenia końca 5' i 3' oraz cyrkularyzacji mRNA (Rys. 2) [36]. Oddziaływanie to stymuluje wiązanie podjednostki 40S oraz zwiększa wydajność translacji dzięki ponownemu wykorzystaniu podjednostek 40S, które po zakończeniu translacji znajdują się w pobliżu mRNA i jego końca 5' [37]. Białko PABP za pomocą domeny PABC wiąże się również z czynnikiem eIF4B, przez

co wzrasta powinowactwo kompleksu eIF4F do kapu oraz nasila aktywność eIF4A jako ATPazy i RNA helikazy w kompleksie z eIF4F i eIF4B [38; 39]. W komórkach ssaczych do domeny PABC wiążą się białka Paip1 i Paip2 (ang. *PABP-interacting protein 1 and 2*). Zaobserwowano stymulujący wpływ Paip1 na translację oraz na stabilność mRNA dzięki oddziaływaniu z eIF4A. Z kolei współzawodnictwo między Paip2 i Paip1 o miejsce wiązania do PABP, prowadzi do inhibicji translacji. Ponadto sugeruje się, że Paip2 i eIF4G mają to samo miejsce wiązania do PABP. Paip2 ma również zdolność odłączania PABP od ogona poli(A) [40]. W związku z powyższym, Paip2 zakłóca oddziaływanie PABP z ogonem poli(A) i eIF4G, co prowadzi do uwolnienia końca 5' i 3' mRNA.

2.1.3. Wybór miejsca inicjacji translacji według mechanizmu skaningowego

W 1978 roku Marilyn Kozak zaproponowała model skaningowy dla inicjacji translacji u Eukariota [41]. Doświadczenia, które do tego doprowadziły polegały na zastosowaniu edeiny – antybiotyku, który blokuje rozpoznanie kodonu inicjacyjnego AUG, przez co zapobiega zatrzymaniu się kompleksu preinicjacyjnego [41]. W obecności edeiny dochodziło do formowania wzdłuż mRNA kompleksów podobnych do polisomów. Następnie, analiza sedymentacji w gradiencie sacharozy ujawniła, że są to kompleksy rybosomalne. Okazało się również, że pomimo obecności edeiny rybosom wiąże się do mRNA poprzez jego koniec 5'. Na podstawie powyższych wyników wstępnie zaproponowano, że rybosom wiąże się do kapu na końcu 5' mRNA, a następnie migruje wzdłuż mRNA dopóki nie napotka na kodon inicjacyjny AUG. Kolejne eksperymenty udowodniły udział małej podjednostki rybosomalnej 40S w wiązaniu się do końca 5' mRNA.

Innym dowodem przemawiającym za tym, że podjednostka 40S nie umiejscawia się bezpośrednio w obrębie kodonu AUG tylko migruje liniowo skanując każdy nukleotyd w regionie 5'UTR, było wstawienie elementu strukturalnego RNA o stabilnej strukturze drugorzędowej pomiędzy końcem 5' a kodonem AUG, która w obecności edeiny zakłócała skanowanie [42; 43; 44]. Wspomniana powyżej inhibicja za pomocą stabilnej drugorzędowej struktury RNA pokazała również, że podjednostka 40S w kompleksie preinicjacyjnym podczas migracji ma ograniczoną zdolność do rozplatania niektórych struktur drugorzędowych, ponieważ stabilność takich elementów strukturalnych nie może być większa niż -50 kcal/mol.

Ostatecznie, model skaningowy potwierdziły doświadczenia polegające na dodawaniu lub usuwaniu kodonu AUG, co skutkowało oczekiwanym „przesunięciem” miejsca inicjacji translacji [45]. Wpływ pozycji na wybór kodonu AUG jest także widoczny, gdy znajdujący się powyżej kodonu AUG przypadkowy kodon nie będący inicjacyjnym zostaje zamieniony na AUG. Powoduje to, że translacja inicjowana jest ze zmutowanego kodonu AUG znajdującego się bliżej końca 5', nawet, gdy kolejny kodon AUG umiejscowiony jest w odległości zaledwie 3-5 nukleotydów i umiejscowiony jest w optymalnym kontekście [46].

Jak dotąd dokładnie nie wiadomo w jaki sposób odbywa się przesuwanie rybosomu wzdłuż mRNA. Analiza formowania kompleksu 48S w reakcji polegającej na odwzorowaniu układu translacyjnego w warunkach *in vitro* dowiodła, że skanowanie wymaga odpowiedniej konformacji kompleksu preinicjacyjnego 43S, którą zapewnia czynnik inicjacyjny eIF1 [47]. W przypadku słabo regionów niekodujących 5', które nie posiadają stabilnych termodynamicznie motywów strukturalnych, skanowanie nie wymaga hydrolizy ATP katalizowanej przez eIF4A, w kompleksie eIF4F, aczkolwiek obecność eIF4A, eIF4B i eIF4E wpływa stymulująco na migrację kompleksu reinicjacyjnego. Skanowanie regionów 5'UTR zawierających elementy struktury drugorzędowej nawet o małej stabilności termodynamicznej wymaga obecności eIF4F, która jest kluczowa dla migracji oraz stymuluje aktywność ATPazy i RNA helikazy.

2.1.4. Kontekst kodonu inicjacyjnego

Wieloletnie i rzetelne badania prowadzone przez Marilyn Kozak pokazały, że u organizmów eukariotycznych duży wpływ na rozpoznanie kodonu inicjacyjnego AUG przez kompleks reinicjacyjny 43S ma sekwencja otaczająca [7]. Określona przez nią sekwencja konsensusowa GCCRCCAUGG (gdzie R oznacza purynę) w obrębie której umiejscowiony jest kodon AUG nazywana jest „sekwencją Kozak”. Dalsze badania doprowadziły do wydłużenia zaproponowanej sekwencji Kozak o nukleotydy GCC w pozycjach -4, -5 i -6. Najbardziej konserwatywną jest reszta nukleotydowa w pozycji -3 (czyli 3 nukleotydy powyżej kodonu AUG gdzie reszta A oznaczana jest jako +1), którą zazwyczaj jest adenozyne lub guanozyna. Duże znaczenie dla inicjacji translacji ma także występowanie guanozyny w pozycji +4 (czyli bezpośrednio poniżej kodonu AUG). Wprowadzenie mutacji w pozycje -3 i +4 silnie osłabiały inicjację translacji [30; 48]. Na podstawie występowania reszt nukleotydowych w pozycjach -3 i +4 określa się kontekst

kodonu AUG jako silny lub optymalny (gdy są to reszty -3A/G i +4G) lub słaby (gdy we wspomnianych pozycjach znajdują się inne reszty nukleotydowe). Początkowo uważano, że sekwencja Kozak jest kluczowa dla zachodzenia wydajnej inicjacji translacji u wszystkich Eukariota. Jednakże, okazało się, że w przypadku mRNA kręgowców ograniczona liczba kodonów AUG umiejscowiona jest w obrębie sekwencji Kozak [49]. Spośród analizowanych 2595 mRNA zaledwie 0,2% zawierało sekwencję konsensusową GCCGCCA/GCCAAUGG [50]. Ponadto mRNA, w których kodon AUG umiejscowiony był w obrębie GCCGCCA/GCCAAUGG, kodowały białka występujące w komórce w dużej ilości. Z tego względu według niektórych badaczy nazywanie sekwencji konsensusowej optymalną jest mylące [51]. Również określenie „sekwencja optymalna” nie koniecznie oznacza maksymalną, tylko „najlepszą” dla danego mRNA, z którego może po wstawać białko będące na niskim poziomie w komórce [49]. Według Nakagawy i współautorów [51] podczas wcześniejszych badań nad preferowaną sekwencją wokół kodonu AUG, analizowano zbyt małą liczbę genów i gatunków oraz nie wzięto pod uwagę zróżnicowanej zawartości par G-C i A-T w genomach różnych gatunków. Opisywany wcześniej negatywny wpływ substytucji w pozycji -3 na inicjację translacji u Eukariota nie został potwierdzony w przypadku *Saccharomyces cerevisiae* [52]. W celu weryfikacji sekwencji Kozak, porównywali szereg sekwencji otaczających kodon AUG na podstawie informacji pochodzących z analizy całych genomów różnych gatunków ssaków, grzybów, roślin i Protista. Analiza sekwencji ponad 200 tysięcy genów u 47 gatunków pokazała, że preferowana sekwencja wokół kodonu AUG różni się w zależności od gatunku (Tabela 2.).

Tabela 2. Kontekst kodonu AUG u różnych organizmów (na podstawie [49; 51]).

Organizm	Kontekst kodonu AUG	Liczba analizowanych genów
Rośliny jednoliścienne	GCGGCA/CA/GA/CCA <u>AUGG</u> CU	1127
Rośliny dwuliścienne	AAAAAAAA/CA <u>AUGG</u> CU	3643
<i>Drosophilamelanogaster</i>	ACAACCAAAA <u>AUGG</u> C	192
Bezkręgowce	UAAAUA/CACCA <u>AUGA</u> /GC	155
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAAAAAAAAA <u>AUG</u> UC	461

Okazało się, że A/G w pozycji -3, A/C w pozycji -2 i C w pozycji +5 są konserwatywne dla różnych organizmów eukariotycznych oraz, że A/G w pozycji -3 ma największe znaczenie dla inicjacji translacji i zazwyczaj dotyczy genów ulegających wysokiej ekspresji [51]. Dodatkowym dowodem na istotne znaczenie G w pozycji -3 jest opisane przez Pisarev'a i współpracowników [53] oddziaływanie tej reszty z podjednostką α czynnika eIF2. Zaobserwowano znaczący wpływ reszt +5A lub +5C na inicjację translacji u ssaków i roślin. W przypadku kręgowców i grzybów w pozycji +4 występuje U zamiast G, co może oznaczać, że +4G nie jest charakterystyczną pozycją dla wszystkich Eukariota oraz że reszta ta ma mniejsze znaczenie dla inicjacji translacji. Nie tylko występowanie określonych reszt nukleotydowych w poszczególnych pozycjach wpływa na wydajność translacji, ale również obecność powtórzeń G lub A wokół kodonu AUG [51]. Na przykład, preferencja do występowania powtórzeń A u roślin dwuliściennych i *S.cerevisiae* jest skorelowana z dużą zawartością par AT w ich genomach. Różnice sekwencji otaczającej kodon inicjacyjny AUG odzwierciedlają ewolucyjne powiązania pomiędzy gatunkami oraz sugerują występowanie odmiennych mechanizmów rozpoznawania kodonu AUG w zależności od gatunku.

W rozpoznawaniu kodonu inicjacyjnego w zależności od otaczającego go kontekstu bierze udział czynnik eIF1, który wchodzi w skład kompleksu preinicjacyjnego 43S [47]. eIF1 odpowiada za zdolność kompleksu 43S do identyfikacji odpowiedniego kodonu inicjacyjnego oraz dyskryminowania AUG w otoczeniu słabego kontekstu. Kiedy kompleks 43S pozbawiony jest eIF1 traci zdolność inicjowania translacji z kodonu AUG, wskutek czego może zatrzymywać się w obrębie kodonów AUU lub GUG. Czynnik eIF1 ma zdolność oddysocjowania od kompleksu inicjacyjnego 48S, utworzonego w obrębie kodonu AUG znajdującego się w słabym kontekście i powyżej odpowiedniego kodonu AUG. Prowadzi to do powstania stabilnego kompleksu 48S po rozpoznaniu odpowiedniego kodonu AUG znajdującego się poniżej w sekwencji i będącego w silnym kontekście Kozak.

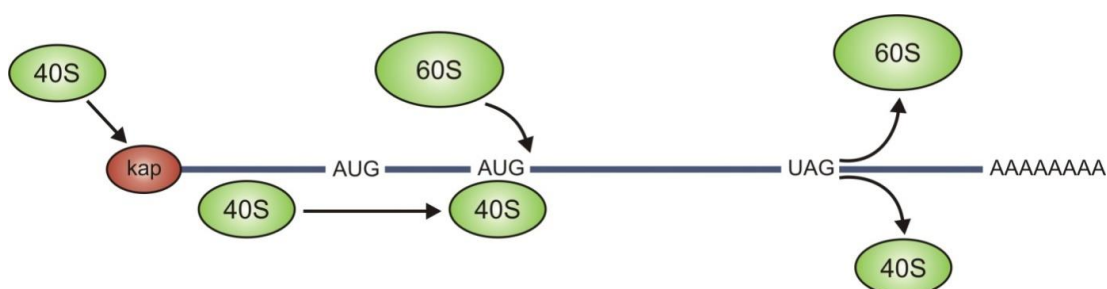
2.1.5. Alternatywne mechanizmy inicjacji translacji zależnej od kapu

W badaniach nad mechanizmem skaningowym wykorzystywano mRNA, które posiadały regiony 5'UTR nie tworzące stabilnych struktur drugorzędowych oraz o ograniczonej długości (do 150 nukleotydów) oraz kodon inicjacyjny AUG umiejscowiony w obrębie optymalnego kontekstu [5]. Powyższe cechy charakteryzują mRNA, z których w sposób ciągły powstają duże ilości białek w komórce. Niektóre mRNA,

szczególne te kodujące białka regulatorowe, np. cytokiny, kinazy czy czynniki wzrostu ulegają translacji na niskim poziomie, ponieważ ich zwiększona ekspresja może mieć szkodliwy wpływ na procesy komórkowe. Jest to możliwe dzięki występowaniu w ich regionach 5'UTR elementów strukturalnych, które naturalnie inhibują translację [54]. Regiony 5'UTR mRNA ulegających translacji na niskim poziomie, charakteryzują się wysoką zawartością par G-C, co prowadzi do formowania stabilnych termodynamicznie struktur drugorzędowych oraz zawierają dodatkowe kodony inicjacyjne AUG poprzedzające właściwy kodon AUG. W przypadku takich mRNA kompleks preinicjacyjny 43S również migruje wzdłuż mRNA w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego AUG, ale struktura drugorzędowa regionu 5'UTR i inne kodony AUG sprawiają, że mechanizm skaningowy różni się nieco od standardowego. Z tego względu, zaproponowano alternatywne mechanizmy inicjacji translacji zależnej od kapu na końcu 5' mRNA, do których zaliczamy: skaning przeciekowy, wznowienie inicjacji (reinicjacja) i nieliniową migrację rybosomu.

2.1.5.1. Skaning przeciekowy (ang. *leaky scanning*)

Model skaningowy zakłada, że kompleks rybosomalny 43S inicjuje translację od kodonu AUG zlokalizowanego najbliżej końca 5' [2]. Jeśli jednak kodon AUG znajduje się w słabym kontekście Kozak, może zostać pominięty przez kompleks 43S, który inicjuje translację z kolejnego kodonu AUG położonego w obrębie silniejszego kontekstu. W zależności od otoczenia AUG część lub wszystkie kompleksy rybosomalne 43S ignorują pierwszy od końca 5' kodon AUG. Gdy znajduje się on w kontekście suboptymalnym ANNAUGN lub GNNAUGG (gdzie N oznacza dowolny nukleotyd), wówczas część kompleksów rybosomalnych 43S inicjuje translację a reszta migruje dalej w poszukiwaniu kodonów AUG zlokalizowanych w silniejszym kontekście Kozak (Rys. 3).



Rys. 3 Inicjacja translacji według modelu skaningu przeciekowego. Kompleks rybosomalny podczas skanowania mRNA może pomijać niektóre kodony inicjacyjne AUG i inicjować translację z kodonów AUG położonych dalej w kierunku 3' końca mRNA (na podstawie [2]).

Całkowity skaninyg przeciekowy ma miejsce, gdy wszystkie kompleksy rybosomalne pomijają pierwszy od końca 5' mRNA kodon AUG, ponieważ jest on umiejscowiony w słabym kontekście Kozak, czyli takim, który nie posiada w pozycji -3 reszty puryny (R) ani guanozyny w pozycji +4. Zaobserwowano, że wprowadzenie stabilnego elementu struktury drugorzędowej poniżej pierwszego AUG, pomimo słabego kontekstu Kozak umożliwia inicjację translacji dzięki spowolnieniu migracji kompleksu rybosomalnego 43S i dokładniejszemu parowaniu zasad pomiędzy kodonem AUG i antykodonem w Met-tRNA_i. Translacja według mechanizmu skaninyg przeciekowego zachodzi również, gdy kompleks rybosomalny inicjuje syntezę białka z kodonów alternatywnych, czyli innych niż AUG, np. CUG, ACG czy GUG, które poprzedzają właściwy kodon inicjacyjny AUG. Dzieje się tak w przypadku drożdżowego mRNA kodującego syntetazę glicylo-tRNA, w którym pierwszym kodonem inicjacyjnym jest kodon UUG [55], [51]. Kodon ten umiejscowiony jest w silnym dla drożdży kontekście AAAAAUUGT, z którego syntetyzowana jest mitochondrialna izoforma syntetazy glicylo-tRNA. Natomiast, z poniżej położonego kodonu AUG znajdującego się w kontekście AAAAGAAUGA, powstaje izoforma cytoplazmatyczna [55]. Istnieją również rzadkie przypadki skaninyg przeciekowego, gdy pomimo silnego kontekstu wokół pierwszego kodonu AUG zostaje on pominięty przez kompleksy rybosomalne, ponieważ znajduje się zbyt blisko końca 5' mRNA [6].

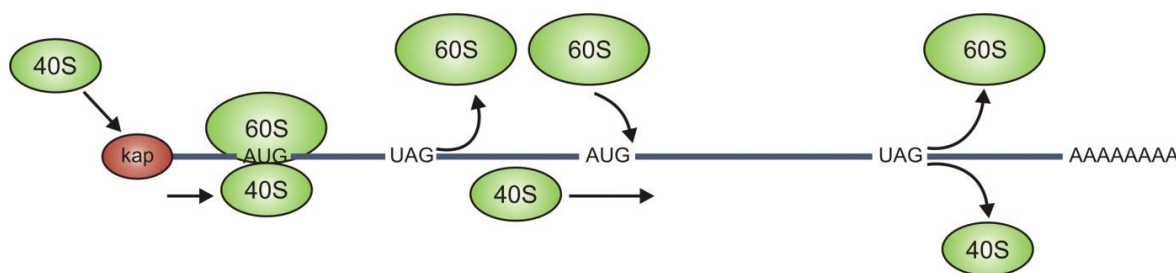
Inicjowanie translacji z kodonu AUG zlokalizowanego w słabym kontekście lub kodonu innego niż AUG w otoczeniu optymalnego kontekstu, prowadzi do syntezy dwóch białek z jednego mRNA. Jeżeli kodon, z którego rozpoczyna się translacja według mechanizmu przeciekowego znajduje się w tej samej ramce odczytu, co główny kodon AUG, z którego translację inicjuje większość rybosomów to powstające białka różnią się jedynie długością i zazwyczaj pełnią podobną funkcję w różnych organellach komórkowych. Dzieje się tak w przypadku białka p43, które wiąże tRNA w kompleksie MARS (ang. *multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex*) [56]. mRNA kodujący ludzkie białko p43 posiada dwa kodony AUG w tej samej ramce odczytu. Z pierwszego kodonu AUG syntetyzowana jest forma mitochondrialna białka p47. Ponieważ kodon ten umiejscowiony jest w słabym kontekście UUCAUGA (-3U, +4A), większość kompleksów rybosomalnych pomija go i rozpoczyna translację cytoplazmatycznej izoformy p43 z kolejnego kodonu AUG w silniejszym kontekście AAAAUGG (-3A, +4G) [57]. Wydajność inicjacji translacji z poszczególnych kodonów odzwierciedla poziom obu izoform w komórce, ponieważ p47 w mitochondrium stanowi 1-2% formy cytoplazmatycznej p43. Podobny przypadek

reprezentuje mRNA kodujący RNazę H1, który również zawiera dwa kodony AUG [58]. Na skutek translacji z pierwszego AUG powstaje dłuższe białko posiadające na końcu aminowym sygnał kierujący do mitochondrium. Natomiast z oddalonego o 83 nukleotydy kodonu AUG wydajniej syntetyzowana jest cytoplazmatyczna izoforma RNazy H1, która odpowiada za 90% aktywności RNazy H w komórce [58].

Również wiele białek wirusowych powstaje na drodze skaningu przeciekowego. Wiele wirusowych mRNA zawiera częściowo zachodzące na siebie ramki odczytu, które kodują białka pełniące odmienne funkcje. Na przykład, mRNA wirusa Andes koduje białko nukleokapsydu N oraz białka niestrukturalne biorące udział w patogenezie [59]. Ponieważ kodon AUG dla białka N otoczony jest suboptymalnym kontekstem GGAAUGA, większość rybosomów nie rozpoznaje go i inicjuje syntezę białka NS z kolejnego kodonu AUG zlokalizowanego również w suboptymalnym kontekście AGGAUGC. Z kolei segment genomowy S1 ptasiego reowirusa koduje tricistronowy mRNA, zawiera trzy otwarte ramki odczytu, które również częściowo się pokrywają [60]. Z położonego najbliżej końca 5' mRNA kodonu AUG powstaje białko transbłonowe p10, z drugiego kodonu AUG syntetyzowane jest jądrowo-cytoplazmatyczne białko p17, a z ostatniego kodonu AUG – białko strukturalne nukleokapsydu δ C. Ponieważ pierwszy i drugi kodon AUG znajdują się odpowiednio w otoczeniu sekwencyjnym UCGAUGC i ACAAUGC, są one pomijane przez część migrujących wzdłuż mRNA kompleksów rybosomalnych.

2.1.5.2. Wznowienie inicjacji translacji (reinicjacja)

Wznowienie inicjacji translacji (lub reinicjacja, ang. *reinitiation*) dotyczy mRNA zawierających krótką otwartą ramkę odczytu uORF (ang. *upstream open reading frame*) przy końcu 5', z której powstaje krótki peptyd. Kiedy kompleks rybosomalny napotka na kodon terminacyjny na końcu uORF duża podjednostka rybosomalna 60S oddysocjowuje, a mała podjednostka w kompleksie 43S pozostaje ciągle związana z mRNA. Kompleks preinicjacyjny 43S wznowia translację pełnej długości białka kodowanego przez główną ramkę odczytu ORF (Rys. 4) [6; 54].

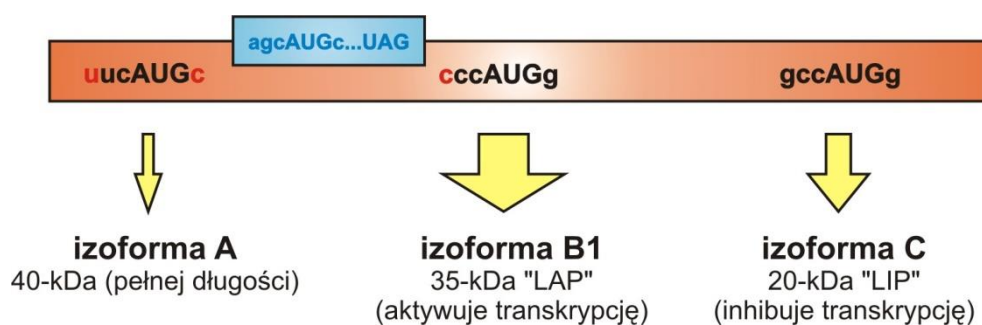


Rys. 4 Inicjacja translacji zależnej od kapu według modelu reinicjacji. Po ukończeniu syntezy peptydu kodowanego przez uORF kompleks rybosomalny wznowia translację głównej ramki odczytu kodującej białko pełnej długości (na podstawie [2]).

Zdolność eukariotycznego rybosomu do wznowienia translacji jest ograniczona przez długość uORF, która nie powinna przekraczać 30 nukleotydów [61]. Według danych literaturowych wznowienie translacji następuje najczęściej po translacji 10-12 kodonów, przy czym po wydłużeniu do 33 kodonów jej wydajność znacząco spada [62]. Prawdopodobnie jest to spowodowane utratą czynników inicjacyjnych wraz z ich stopniowym uwalnianiem z kompleksu podczas wydłużającej się fazy elongacji [62]. W przypadku niektórych transkryptów, krótkie otwarte ramki odczytu o długości przekraczającej 33 kodony silnie osłabiają reinicjację, a co za tym idzie translację białka z głównej ramki odczytu. Na przykład, myszy transkrypt dla Snurf-Snrpn posiada uORF o długości 71 kodonów, która inhibuje translację położonej poniżej ORF dla ANRPN [63]. Częstość reinicjacji wzrasta wraz ze zwiększającą się odległością między krótką, a główną ramką odczytu [50]. Zjawisko to jest związane z możliwością ponownego pozyskania przez małą podjednostkę 40S inicjatorowego Met-tRNA_i oraz wzrostem stężenia eIF2-GTP, bez których kodon AUG nie zostanie rozpoznany.

Rola krótkich otwartych ramek odczytu polega na zapobieganiu translacji pełnej długości białka, kodowanego przez główną ramkę odczytu. W przypadku wirusów uORF umożliwiają szybkie przestawienie z translacji na replikację, podczas której wirusowy RNA nie może pozostać związany z rybosomami. Natomiast w przypadku mRNA komórkowych chodzi o inhibicję translacji białek takich jak czynniki wzrostu czy onkogeny, których zbyt duża ilość mogłaby niekorzystnie wpływać na komórkę. Przykładem regulacji translacji za pomocą uORF jest translacja czynnika transkrypcyjnego C/EBP β , który bierze udział w regulacji różnicowania i podziałów wielu typów komórek (Rys. 5) [64]. mRNAC/EBP β posiada trzy kodony AUG, z których inicjowana jest translacja trzech izoform: najdłuższej

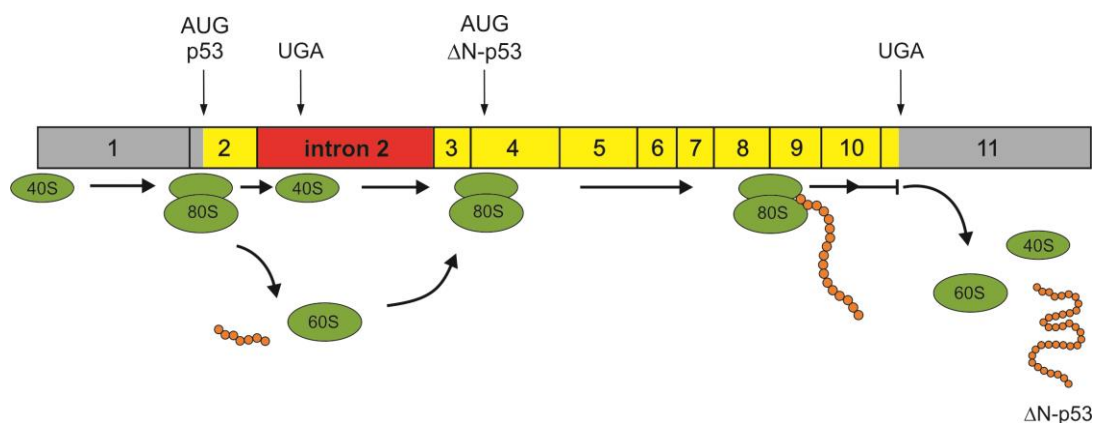
izoformy A, izoformy B1 o aktywności czynnika transkrypcyjnego i najkrótszej izoformy C, która inhibuje transkrypcję.



Rys. 5 W obrębie mRNA C/EBPβ znajdują się trzy kodony AUG umiejscowione w różnych kontekstach. Dodatkowo, uORF pomiędzy pierwszym i drugim kodonem AUG stanowi kolejny element regulujący translację C/EBPβ. Wielkość strzałek odpowiada wydajności inicjacji translacji z poszczególnych kodonów AUG. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [54]).

Pomiędzy pierwszym i drugim kodonem AUG obecna jest uORF, której kodon STOP znajduje się blisko drugiego kodonu AUG dla izoformy B1. Większość rybosomów kończy translację po napotkaniu na kodon STOP, co sprawia, że drugi kodon AUG zostaje pominięty a translacja zostaje wznowiona dopiero po rozpoznaniu kolejnego kodonu AUG dla izoformy C [64].

Przypuszcza się również, że w wyniku reinicjacji może powstawać krótsza izoforma białka p53 – ΔNp53 (Rys. 6) [13]. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który zaangażowany jest w naprawę DNA, indukcję apoptozy czy regulację cyklu komórkowego. Natomiast izoforma ΔNp53 stanowi negatywny regulator aktywności białka p53. Zidentyfikowano transkrypt, w którym na skutek alternatywnego składania został zachowany intron 2, i w którym dochodzi do powstania krótkiej ramki odczytu.

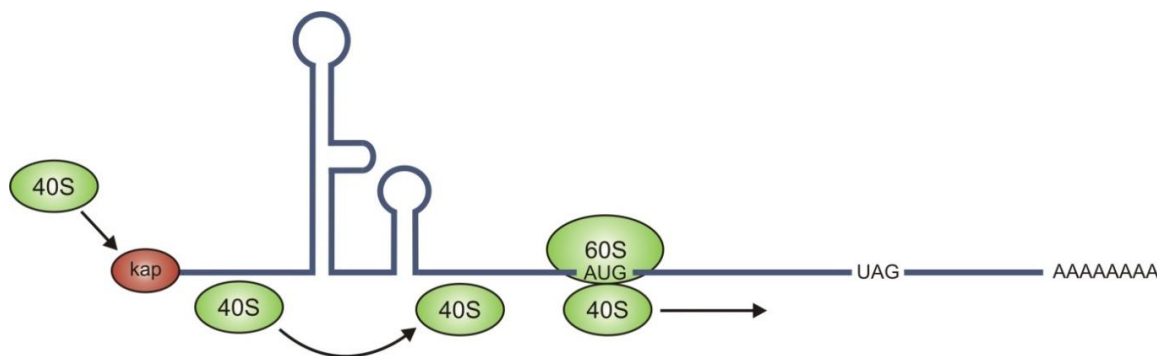


Rys. 6 Synteza izoformy $\Delta Np53$ z mRNA z zachowaną sekwencją intronu 2 według mechanizmu reinicjacji. Kolorem szarym oznaczono regiony 5' i 3' UTR. AUG – kodony inicjacyjne, UGA – kodony STOP. Szczegóły w tekście.

Obecność sekwencji intronu 2 zawierającego kodon STOP powoduje, że zamiast translacji pełnej długości białka p53 z uORF powstaje 25 aminokwasowy peptyd. Po jego zsyntetyzowaniu, duża podjednostka 60S odłącza się od mRNA na skutek obecności w obrębie intronu 2 kodonu STOP. Następnie, związany z mRNA kompleks 43S inicjuje translację izoformy $\Delta Np53$ z położonego poniżej kodonu AUG. Pomimo umiejscowienia kodonu AUG dla $\Delta Np53$ w optymalnym kontekście Kozak, wydajność syntezy tej izoformy białka p53 jest bardzo niska. Niekiedy powstające z uORF peptydy oddziałują z rybosomom i blokują hydrolizę peptydu z peptydylo-tRNA, wskutek czego rybosom zostaje uwięziony w miejscu kodonu STOP [4].

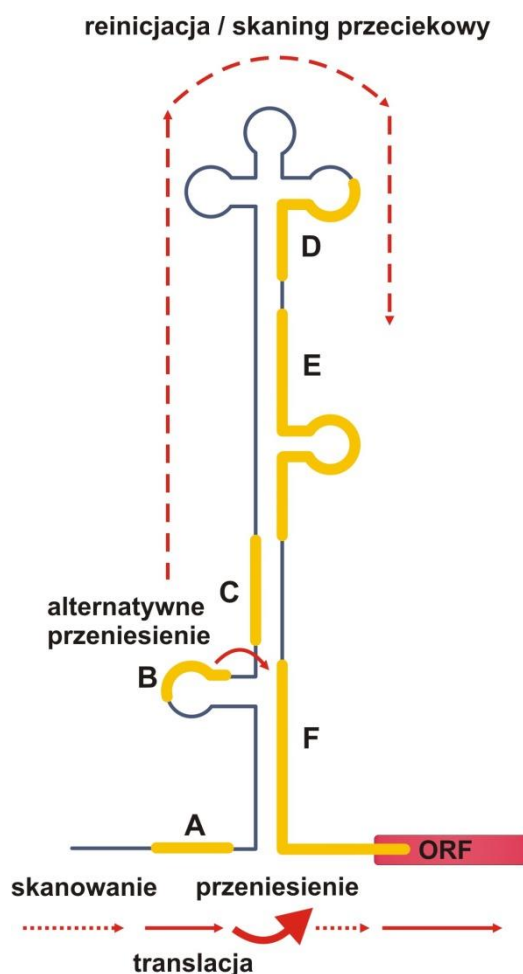
2.1.5.3. Nieliniowa migracja rybosomu (ang. *discontinuous scanning, shunting*)

Model skaningowy zakłada, że kompleks rybosomalny dzięki aktywności helikazowej ma zdolność rozplatania motywów struktury drugorzędowej w regionie 5'UTR. Jednak w przypadku niektórych transkryptów posiadających motywy strukturalne o dużej stabilności termodynamicznej rybosomy przerywają liniową migrację wzdłuż mRNA, omijając znaczną część regionu 5'UTR (Rys. 7) [15].



Rys. 7 Inicjacja translacji według modelu przeniesienia rybosomu. Kompleks rybosomalny pomija regiony tworzące stabilne struktury drugorzędowe w obrębie regionu 5'UTR bez ich rozplatania i inicjuje translację z położonej dalej w kierunku 3' RNA głównej ramki odczytu (na podstawie [2]).

Ten nietypowy mechanizm został odkryty u enterowirusów i większości roślinnych pararetrowirusów. Molekularny mechanizm nieliniowej migracji rybosomu był intensywnie badany na przykładzie rodziny *Caulimoviridae* należącej do roślinnych pararetrowirusów. *Caulimoviridae* posiadają genom w formie DNA, którego replikacja zachodzi w dwóch etapach. Najpierw w reakcji transkrypcji katalizowanej przez komórkową polimerazę RNA powstaje pregenomowe RNA, który następnie przepisywany jest na DNA w reakcji odwrotnej transkrypcji przez wirusową odwrotną transkryptazę. Jak wszystkie RNA *Caulimoviridae*, RNA wirusa mozaiki kalafiora CaMV posiada kap na końcu 5' oraz długi, zawierający motywy stabilne termodynamicznie motywy strukturalne region 5'UTR (Rys. 8). Posiada on także kilka otwartych ramek odczytu, z których jedna umiejscowiona jest blisko końca 5' i podlega kap-zależnej translacji według mechanizmu skaningowego. Centralna część regionu 5'UTR formuje złożoną strukturę drugorzędową typu spinki o długości ponad 400 nukleotydów. Ten fragment cząsteczki nie podlega skanowaniu i zostaje pominięty przez kompleks rybosomalny, który inicjuje translację z położonej dalej otwartej ramki odczytu [65]. Podstawa struktury typu spinki składa się z 138-nukleotydowego, dwuniciowego trzonu, który nadaje jej wysoką trwałość termodynamiczną, przez co ten fragment cząsteczki jest wykluczony z procesu translacji.



Rys. 8 Mechanizm przeniesienia rybosomu na przykładzie modelu struktury regionu 5' UTR RNA wirusa CaMV (na podstawie [66]).

Struktura spinkowa bierze natomiast udział w procesie replikacji, a jej koniec formuje motyw o kształcie podobnym do liścia koniczyny, który podczas enkapsydacji oddziałuje z wirusowym białkiem płaszczka. Dzięki temu dwa kluczowe dla cyklu życiowego wirusa procesy mogą zachodzić równolegle. Szczegółowe badania translacji wirusa CaMV pokazały, że kombinacja krótkich otwartych ramek odczytu oraz pozycja spinki warunkują wydajność nieliniowej migracji rybosomu. Krótka ramka odczytu na końcu 5' wirusowego RNA o długości 2-15 kodonów, położona w odległości 5-10 nukleotydów od struktury spinki silnie stymuluje jej omijanie przez rybosom. Analiza inhibicji odwrotnej transkrypcji przez kompleksy rybosomalne tzw. „odcisk palca” (ang. *toe-printing*) pokazała, że rybosom migruje na odcinku 12-13 nukleotydów za kodonem STOP na końcu uORF [67]. Dokładny mechanizm przeniesienia rybosomu na drugą stronę struktury spinkowej nie został dokładnie poznany. Sugeruje się, że po napotkaniu struktury typu spinki, duża podjednostka

rybosomalna oddysocjowuje od RNA (Rys. 7). Natomiast mała podjednostka 40S nie rozplatając struktury spinkowej, zostaje przeniesiona na jej drugą stronę, przy czym odcinek znajdujący się za spinką musi być położony w tej samej płaszczyźnie co region przed spinką [65]. Ponieważ przeniesienie rybosomu wymaga krótkiej otwartej ramki odczytu, niektórzy traktują nieliniową migrację rybosomu jako wyjątkowy przypadek reinicjacji [66]. Ten model inicjacji translacji jest spotykany nie tylko u wirusów, ale także w systemie roślinnym, drożdżowym i zwierzęcym [4].

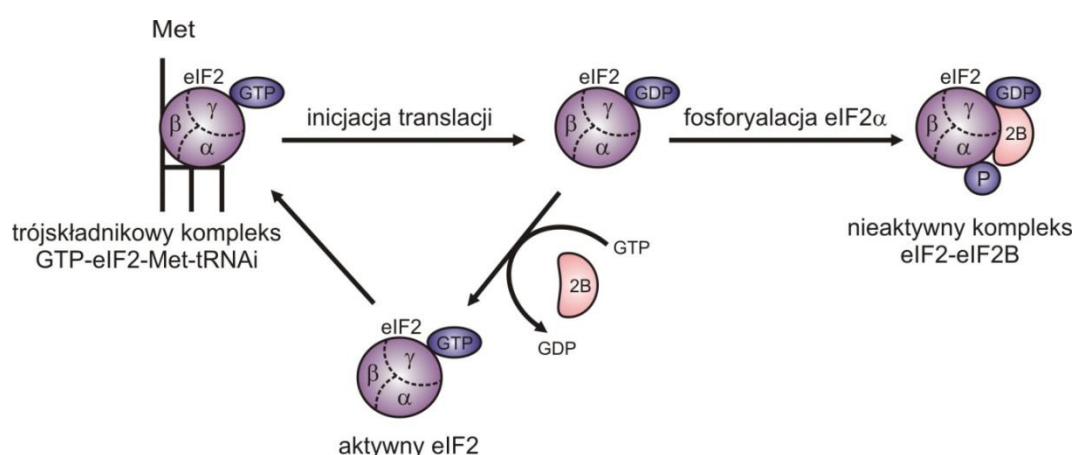
2.2. Regulacja inicjacji translacji

Proces translacji jest intensywnie kontrolowany i regulowany na każdym z etapów. Regulacja na poziomie translacji, szczególnie na wczesnych jej etapach umożliwia znacznie szybszą odpowiedź komórki na czynniki stresowe w porównaniu z regulacją na poziomie transkrypcji oraz pozwala dostosować się do zmiennych warunków. Czynniki stresowe takie jak: zmiany temperatury, promieniowanie, uszkodzenie DNA, infekcja wirusowa czy stres oksydacyjny powodują, że całkowita translacja w komórce zostaje zahamowana w ciągu kilku minut. Dzięki temu komórka oszczędza energię w postaci ATP i GTP, która w 50% wydatkowana jest na translację [68]. Nieprawidłowe funkcjonowanie elementów maszynerii translacyjnej, które uczestniczą w kontroli tego procesu, prowadzi do transformacji komórkowej oraz różnego rodzaju nowotworów [6]. Całkowita inhibicja translacji w komórce pozwala ograniczyć syntezę białek, które mogłyby utrudniać odpowiedź komórki na stres. Inhibicja translacji nie dotyczy wszystkich białek w komórce, jest jedynie silnie ograniczona do tych, które biorą udział w odpowiedzi komórki na zaistniałe warunki. Mechanizmy kontrolujące translację polegają na zmianie stanu ufosforylowania lub proteolitycznego cięcia czynników inicjacyjnych oraz oddziałujących z nimi białek regulatorowych [3].

2.2.1. Fosforylacja czynników inicjacyjnych

2.2.1.1. Fosforylacja eIF2

Czynnik inicjacyjny eIF2 zasocjowany z GTP poprzez wiązanie inicjatorowego Met-tRNA_i dostarcza go do małej podjednostki rybosomalnej 40S. Przyłączanie GTP do eIF2 jest etapem, który limituje szybkość powstawania kompleksu GTP-eIF2-Met-tRNA_i [68]. Po rozpoznaniu kodonu AUG GTP ulega hydrolizie, a eIF2 opuszcza małą podjednostkę rybosomalną 40S jako GDP-eIF2 [3]. Regeneracja eIF2 polegająca na wymianie GDP na GTP wymaga czynnika wymieniającego nukleotyd guaninowy eIF2B. W warunkach stresowych dochodzi do fosforylacji podjednostki α czynnika eIF2. Prowadzi to do wzrostu powinowactwa eIF2B do eIF2, przez co GDP nie zostaje wymieniony na GTP (Rys. 9). Powstanie nieaktywnego kompleksu eIF2B-eIF2 ostatecznie zapobiega formowaniu kompleksu GTP-eIF2-Met-tRNA_i i inhibuje translację większości komórkowych mRNA.

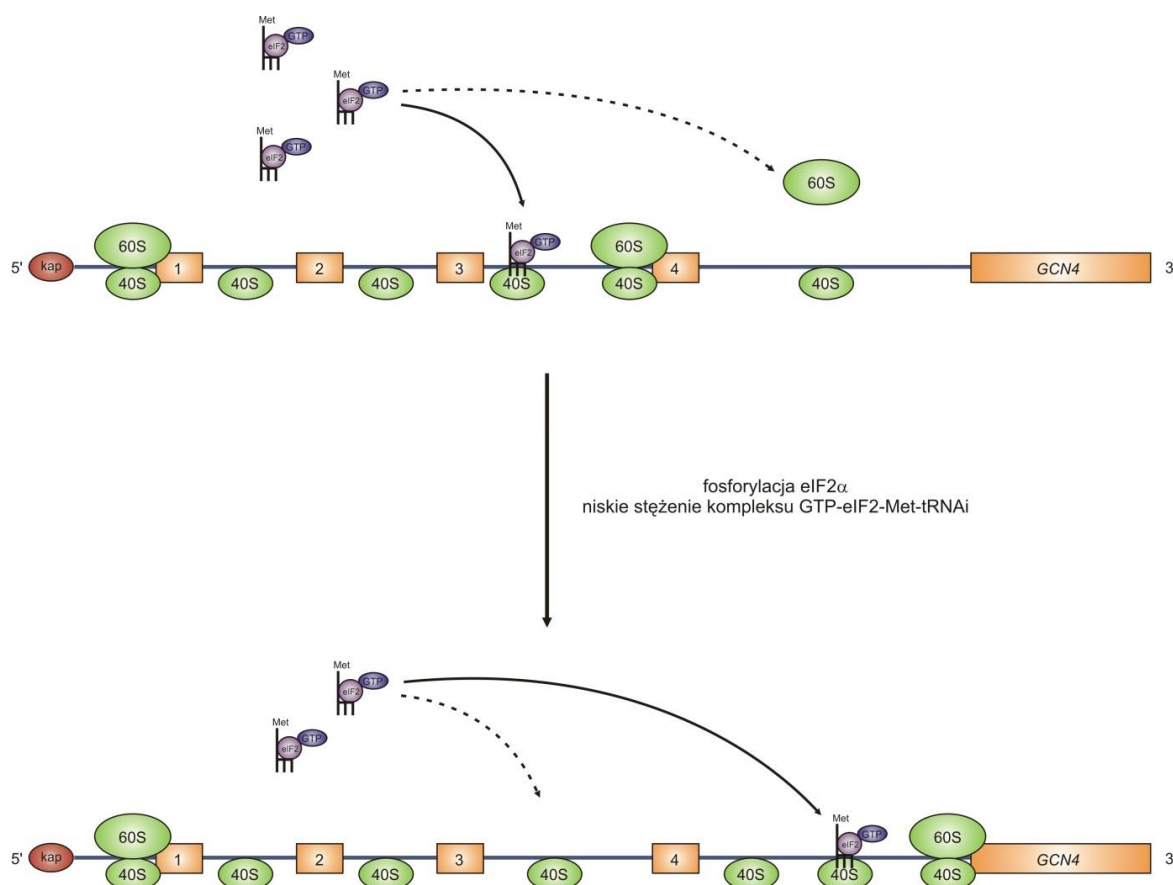


Rys. 9 Fosforylacja podjednostki α czynnika eIF2 prowadzi do silnego związania z białkiem eIF2B, wskutek czego wzrasta poziom eIF2-GDP w komórce, któremu towarzyszy zmniejszenie puli GTP-eIF2-Met-tRNA_i (na podstawie [3]).

Podczas stresu aktywowanych jest wiele kinaz, które fosforylują eIF2 α , m. in. aktywowana niedoborem hemu kinaza HRI, kinaza GCN2 aktywowana niedoborem aminokwasów, kinaza PKR aktywowana przez dwuniciowy RNA oraz kinaza PERK, która fosforyluje eIF2 podczas stresu w retikulum endoplazmatycznym. U ssaków i drożdży podczas niedoboru aminokwasów, kiedy dochodzi do akumulacji tRNA, aktywowana jest kinaza GCN4. Pomimo zahamowania całkowitej syntezy białek w komórce, translacja

mRNA GCN4 jest wówczas stymulowana. Tak więc, synteza GCN4 jest przykładem selektywnej translacji, podczas gdy eIF2 α jest fosforylowany (Rys. 10) [69].

W kontroli translacji mRNA kinazy GCN4 biorą udział cztery uORF zlokalizowane powyżej kodonu AUG dla białka GCN4 (Rys. 11). Kiedy poziom fosforylacji eIF2 α jest niski, kompleks rybosomalny reinicjuje translację z kolejnych uORF, jednak nie jest w stanie rozpocząć syntezy białka GCN4, kodowanego przez główną ramkę odczytu położoną dalej w kierunku 3' mRNA. Natomiast, gdy eIF2 α jest ufosforylowany, uORF 2, 3 i 4 są pomijane przez kompleksy rybosomalne, a translacja inicjowana jest z kodonu dla GCN4. Jest to spowodowane niskim poziomem GTP-eIF2-Met-tRNAⁱ oraz wolniejszym formowaniem kompleksów rybosomalnych po zakończeniu translacji pierwszej uORF [69].

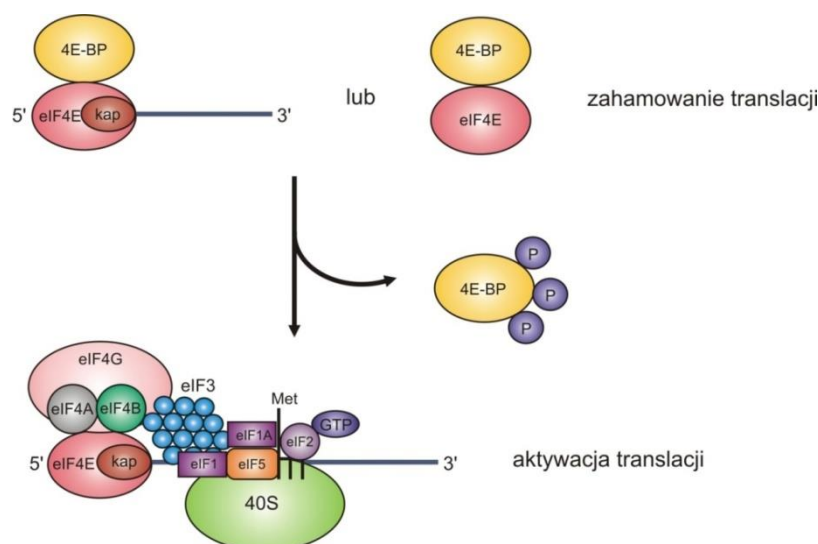


Rys. 10 Mechanizm regulacji translacji mRNA GCN4 w warunkach niedoboru aminokwasów. W normalnych warunkach translacja inicjowana jest z kolejnych uORF, natomiast nie z ramki odczytu dla GCN4. Podczas niedoboru aminokwasów, na skutek fosforylacji eIF2 α i niskiego poziomu GTP-eIF2-Met-tRNAⁱ, kompleksy rybosomalne pomijają uORF i inicjują translację z głównej ramki odczytu dla GCN4 (na podstawie [3]).

eIF2 α jest także fosforylowany przez kinazę PERK podczas nagromadzenia w retikulum endoplazmatycznym nieprawidłowo sfałdowanych białek. W tych warunkach nasila się translacja czynnika transkrypcyjnego ATF4, który aktywuje transkrypcję genów zaangażowanych w odpowiedź na pojawienie się niesfałdowanych białek. Region 5' UTR mRNA ATF4 zawiera również kilka uORF, z których jedna częściowo pokrywa się z ORF dla ATF4. Niski poziom GTP-eIF2-Met-tRNA_i na skutek fosforylacji eIF2 α powoduje, że kompleksy rybosomalne pomijają uORF i inicjują translację ATF4. W warunkach fizjologicznych, gdy eIF2a nie jest fosforylowany i tworzy aktywne kompleksy z GTP i Met-tRNA_i, kompleksy rybosomalne inicjują translację jedynie z uORF, wskutek czego nie powstaje czynnik ATF4.

2.2.1.2. Oddziaływanie 4E-BP z eIF4E

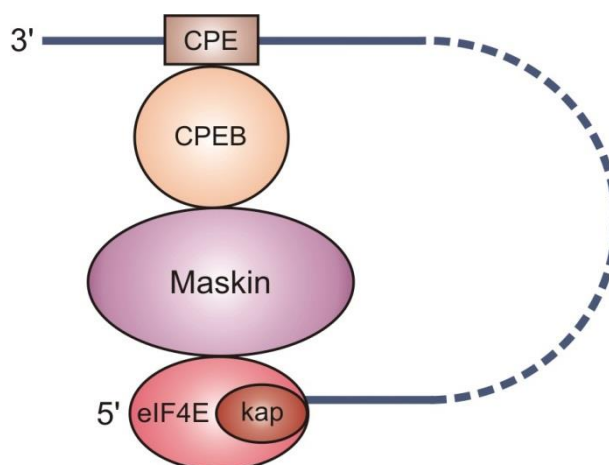
Wydajność translacji w komórce zależy także od dostępności czynnika inicjacyjnego eIF4E, który bierze udział w inicjacji translacji poprzez wiązanie kapu na końcu 5' mRNA. Podczas inicjacji translacji eIF4E wiąże się również z czynnikiem eIF4G. Wiązanie to zostaje zakłócone, kiedy z eIF4E oddziałują z białkami 4E-BP (białka wiążące eIF4E, ang. *eIF4E-binding proteins*) (Rys. 11).



Rys. 11 Rola białka wiążącego eIF4E, 4E-BP w regulacji translacji. Białko 4E-BP poprzez wiązanie eIF4E zapobiega jego oddziaływaniu z eIF4G, co prowadzi do zahamowania kap-zależnej inicjacji translacji. Z kolei, na skutek fosforylacji 4E-BP dochodzi do uwolnienia eIF4E, który może oddziaływać z eIF4G i tworzyć aktywny translacyjny kompleks inicjacyjny (na odstawie [3]).

Siła tego oddziaływania zależy od stopnia fosforylacji 4E-BP [70]. Białka 4E-BP są fosforylowane przez kinazę mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin kinase*) w obecności insuliny i czynników wzrostu [71]. Białka 4E-BP w formie hipofosforylowanej wykazują silne powinowactwo do eIF4E, co zapobiega oddziaływaniu eIF4E z eIF4G i ostatecznie inhibuje translację. Z kolei hiperfosforylacja białek 4E-BP prowadzi do uwolnienia czynnika eIF4E, który znowu może oddziaływać z eIF4G i uczestniczyć w inicjacji translacji (Rys. 11).

Oprócz 4E-BP zidentyfikowano również inne białka oddziałujące z eIF4E. Jednym z nich jest białko Maskin, które współzawodniczy z eIF4G o miejsce wiązania do eIF4E (Rys. 12) [3].



Rys. 12 Białko Maskin poprzez oddziaływanie z eIF4E zapobiega wiązaniu eIF4G i tworzeniu kompleksu wiążącego kap, eIF4F. Wiązanie białka Maskin do mRNA jest stymulowane przez białko CPEB, które specyficznym rozpoznaje cytoplazmatyczny sygnał poliadenylacji CPE w regionie 3'UTR mRNA (na podstawie [3]).

Białko Maskin oddziałuje również z białkiem CPEB (ang. *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*), które wiąże się do bogatych w reszty urydynowe elementów CPE obecnych w regionie 3'UTR. W ten sposób białko Maskin inhibuje translację mRNA, które zawierają elementy CPE podczas dojrzewania oocytów u kręgowców oraz na wczesnych etapach ich rozwoju.

2.2.2. Proteolityczne cięcie czynników inicjacyjnych

2.2.2.1. Proteolityczne cięcie eIF4G

Proces translacji może być regulowany nie tylko poprzez modyfikacje czynników inicjacyjnych, ale także na drodze proteolizy. Taka strategia spotykana jest bardzo często u wirusów, które dążą do maksymalnego wykorzystania elementów maszynery translacyjnej komórki, poprzez inhibicję translacji komórkowych mRNA. W przypadku niektórych RNA wirusów, takich jak *Picornaviridae* lub *Retroviridae*, translacja zachodzi według mechanizmu niezależnego od kapu i nie wymaga udziału niektórych czynników inicjacyjnych. Trawienie czynnika eIF4G przez proteazę 2A^{pro} wirusa Polio prowadzi do usunięcia miejsca wiążącego czynnik eIF4E. Jednak przecięty eIF4G, dzięki zachowanemu C-końcowemu fragmentowi nadal wykazuje zdolność wiązania czynnika eIF3 i eIF4A. Ponieważ RNA wirusa Polio nie posiada kapu na końcu 5' jego translacja zachodzi niezależnie od kapu, według mechanizmu wewnętrznej inicjacji. Jednakże, pozostawiona C-końcowa część białka eIF4G ułatwia translację wirusa Polio, ponieważ umożliwia oddziaływanie z małą podjednostką rybosomalną 40S [72]. Na skutek proteolizy eIF4G czynnik ten nie może uczestniczyć w tworzeniu aktywnego kompleksu eIF4E, co prowadzi do inhibicji kap-zależnej translacji komórkowych mRNA i osłabienia odpowiedzi komórki na infekcję wirusową. RNA wirusa HIV-1, pomimo obecności kapu na końcu 5' oraz ogona poli(A), ulega również kap-niezależnej translacji, która dodatkowo jest stymulowana po przecięciu eIF4G przez wirusową proteazę PR. Przecięcie eIF4G przez proteazę PR prowadzi również do zahamowania translacji komórkowych transkryptów, jednak, aby doszło do wyciszenia odpowiedzi komórki na infekcję wirusową, dodatkowo musi zostać przecięte białko oddziałujące z poli(A) czyli PABC [73].

Czynnik eIF4G jest również przecinany podczas apoptozy, kiedy translacja jest prawie całkowicie zahamowana. W takich warunkach czynnik eIF4G jest trawiony w kilku miejscach przez kaspazę 3, co prowadzi do powstania kilku jego fragmentów [74]. Jednym z produktów działania kaspazy 3 na eIF4G jest fragment M-FAG (ang. *middle fragment of apoptotic cleavage of eIF4G*), który wykazuje wiele cech eIF4G, m.in. oddziałuje z czynnikiem eIF4E, eIF4A, eIF3 oraz podjednostką rybosomalną 40S, aczkolwiek oddziaływania nie są tak silne jak w przypadku nieprzeciętego eIF4G. Dzięki temu, że fragment F-MAG zachowuje niektóre cechy eIF4G, podczas apoptozy translacja niektórych mRNA może nadal zachodzić.

2.2.2.2. Trawienie białka wiążącego ogon poli(A) PABC

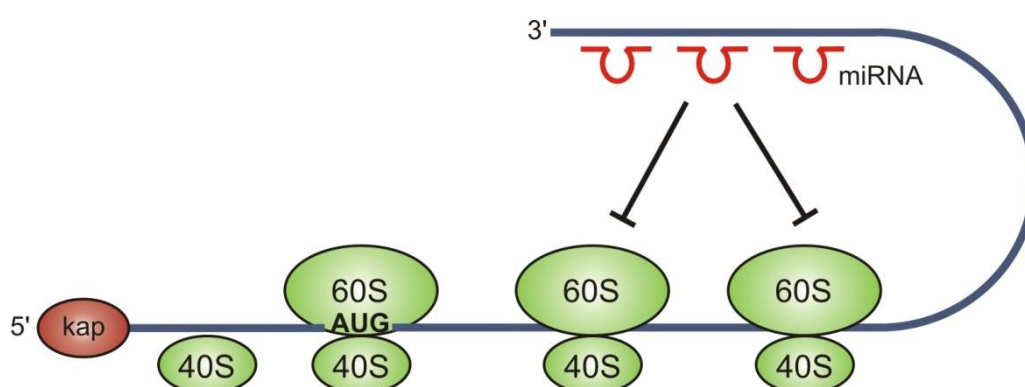
W przypadku niektórych wirusów samo trawienie eIF4G nie jest wystarczające do zahamowania odpowiedzi komórkowej. Wirusowe proteazy, takie jak proteazy 3C wirusa polio i Coxackie, trawią również białko PABC wiążące ogon poli(A) [75]. Wykazano, że miejsca cięcia w PABC różnią się w zależności od wirusowej proteazy. Zaobserwowano, że proteolityczne cięcie PABC nie zakłóca oddziaływania z ogonem poli(A) i cyrkularyzacji mRNA. Chociaż dokładny mechanizm inhibicji translacji poprzez trawienie PABC nie jest do końca jasny to wiadomo, że białko to jest trawione przez wirusowe proteazy wcześniej niż czynnik eIF4G. Ponadto, jedynie mała pula białka PABC związana z polirybosomami podlega cięciu. Doświadczenia na liniach komórkowych, w których apoptoza była indukowana za pomocą różnych czynników wykazały, że PABC ulega częściowej degradacji. Stopień degradacji PABC był podobny do trawienia eIF4G przez kaspazę 3, które miało miejsce podczas apoptozy oraz infekcji wirusowej. Sugeruje się, że w przeciwieństwie do eIF4G, białko PABC nie jest bezpośrednio trawione przez kaspazę 3, ale przez inne proteazy aktywowane obecnością kaspazy 3 podczas apoptozy.

2.2.3. Udział cząsteczek mikroRNA w regulacji translacji

Proces translacji jest regulowany nie tylko przez czynniki białkowe, ale również przez cząsteczki RNA, które ze względu na swoją długość nazywane są mikroRNA (miRNA). MikroRNA są niekodującymi cząsteczkami RNA o długości od 20 do 25 nukleotydów. Pierwsze mikroRNA, *lin-4* i *let-7* zidentyfikowano w organizmie nicienia *Caenorhabditis elegans* [76]. Zaobserwowano, że te krótkie RNA, które specyficznie zakłócają ekspresję genów u nicienia, pojawiają się w określonym stadium rozwoju organizmu. Obie cząsteczki regulują ekspresję białek kodowanych przez mRNA, które w swoich regionach niekodujących 3' zawierają dla nich miejsca docelowe o częściowej komplementarności [77].

Po odkryciu *lin-4* i *let-7*, nastąpił szybki postęp w identyfikacji nowych cząsteczek mikroRNA u wielu gatunków grzybów, roślin i zwierząt. Wykazano, że mikroRNA biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów na drodze interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) podczas różnych procesów komórkowych takich jak, podziały komórkowe, różnicowanie czy apoptoza [78; 79]. Szacuje się, że ekspresja połowy ludzkiego genomu regulowana jest przez około 1000 cząsteczek mikroRNA, z czego każda z nich może oddziaływać z kilkoma różnymi mRNA [8; 80]. Biogeneza mikroRNA obejmuje

przekształcanie pierwotnego transkryptu mikroRNA przez rybonukleazę Drosha do cząsteczek prekursorowych posiadających strukturę typu spinki. Następnie enzym Dicer docina prekursor, tworząc dojrzały dupleks mikroRNA [81]. Jedna z nici dupleksu mikroRNA oraz białka Argonaute tworzą rybonukleinowy kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). U zwierząt, mikroRNA hybrydują zazwyczaj do sekwencji docelowych w obrębie regionów 3'UTR, z zachowaniem częściowej komplementarności. W większości przypadków, wiązanie mikroRNA do regionów regulatorowych w mRNA, prowadzi do inhibicji translacji lub rzadziej do obniżenia stabilności transkryptu (Rys. 13).



Rys. 13 Kontrola translacji przez mikroRNA. Cząsteczki mikroRNA hybrydują do regionów 3'UTR mRNA na zasadzie częściowej komplementarności. Prowadzi to do blokowania rybosomów podczas etapu elongacji (na podstawie [3]).

MikroRNA hamują translację mRNA, których produkty białkowe biorą udział w wielu procesach komórkowych, takich jak: podziały komórkowe, odpowiedź na infekcje wirusowe, apoptoza czy nowotworzenie. Poziom antyapoptotycznego białka Bcl-2 regulowany jest przez kilka cząsteczek mikroRNA. Jednym z nich jest mikroRNA-34a, który wiąże się do regionu 3'UTR mRNA Bcl-2, przez co inhibuje jego translację [82]. Analiza Western blot potwierdziła spadek poziomu białka Bcl-2 w wyniku nadekspresji mikroRNA-134a co powodowało zmniejszoną przeżywalność komórek pierwotnego raka wątroby i ostatecznie prowadziło do apoptozy. Do regionu 3' UTR mRNA Bcl-2 hybrydują także mikroRNA-503, -15, -16 i -181b [83; 84; 85]. W komórkach nowotworowych odpornych na radioterapię oraz chemioterapię zaobserwowano korelację pomiędzy poziomem białka Bcl-2, a wymienionymi wyżej mikroRNA. Zwiększona przeżywalność komórek nowotworowych związana była z niskim poziomem mikroRNA oraz dużą ilością białka Bcl-2 w tych

komórkach. W przypadku nadekspresji każdego z mikroRNA obserwowano inhibicję translacji Bcl-2, co skutkowało indukcją apoptozy.

Do tej pory odkryto także pięć mikroRNA-125a, -125b, -504, -25 i -30d, które regulują ekspresję supresora nowotworzenia p53 [86; 87; 88; 89]. Miejsca docelowej hybrydyzacji dla wszystkich tych mikroRNA znajdują się w regionie 3'UTR mRNA p53. Wiązanie każdego z mikroRNA powoduje inhibicję translacji p53 i obniżenie poziomu tego białka w komórce, co zapobiega nadmiernej akumulacji p53 i niekontrolowanej apoptozie.

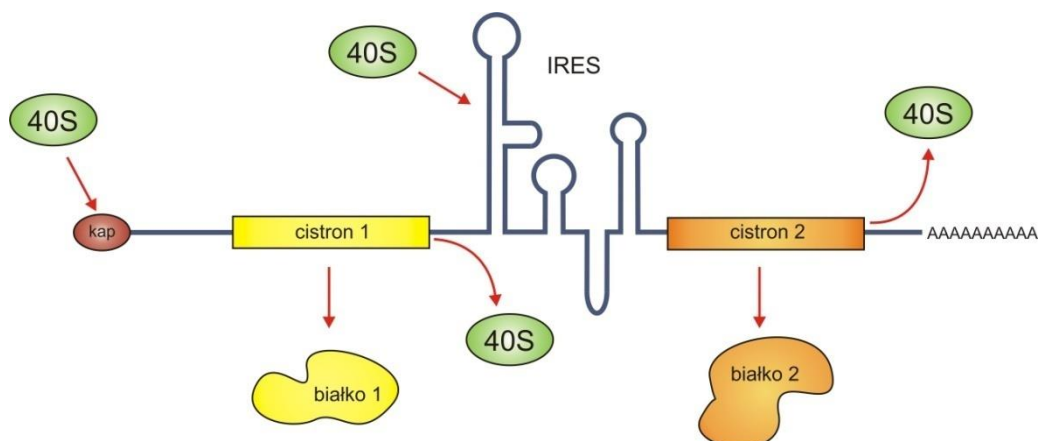
Komórkowe mikroRNA biorą również udział w odpowiedzi antywirusowej. Przykładem takiego mikroRNA jest komórkowy mikroRNA-32, którego sekwencje docelowe znajdują się w regionie 3'UTR oraz ORF2 wirusa PFV-1 (ang. *primate foamy virus*) [90]. MikroRNA-32 wydajnie ograniczało replikację wirusa PFV-1 w zakażonych komórkach HeLa. Z drugiej strony wirus ten koduje białko TAS, które ma zdolność inhibicji ekspresji komórkowych mikroRNA. Komórkowe mikroRNA-196, -296, -351, -431 i -438 wykryto w ludzkich komórkach, w których indukowana była ekspresja interferonu w odpowiedzi na zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*). Może to sugerować udział tych mikroRNA w odpowiedzi skierowanej przeciwko wirusowi HCV [91]. W przeciwieństwie do mikroRNA-32, mikroRNA-122, który występuje w wątrobie w dużej ilości stymuluje replikację tego wirusa. Sekwencje docelowe dla mikroRNA-122 znajdują się w regionie 5'UTR RNA wirusa HCV. Pomimo tego, że region ten uczestniczy w inicjacji translacji wirusowej poliproteiny, przyłączenie mikroRNA-122 nie wpływa na jej syntezę [92]. Komórkowe mRNA są również celem dla mikroRNA, kodowanych przez wirusy. Na przykład, należący do rodziny *Herpesviridae* wirus HSV-1 (ang. *herpes simple virus 1*) koduje mikroRNA-LAT, który wykazuje antyapoptotyczne właściwości, dzięki czemu wirus ten zdolny jest do wywoływania chronicznej infekcji [91; 93]. MikroRNA-LAT hybrydyzuje do mRNA TGF β , który ogranicza wzrost oraz indukuje apoptozę oraz do mRNA SMAD3, będącego modulatorem aktywności TGF β . Skutkiem hybrydyzacji mikroRNA-LAT jest zarówno obniżenie poziomu mRNA jak i białka TGF β i SMAD3, co sprzyja chronicznej infekcji wirusem HSV-1 [94].

2.3. Wewnętrzna inicjacja translacji – odkrycie elementów IRES

W latach 80-tych uważano, że tylko prokariotyczny rybosom jest zdolny do wiązania się do RNA w formie cyrkularnej, a rybosom eukariotyczny wymaga wolnego końca 5'

mRNA, aby rozpocząć translację [95; 96]. W 1998 zaobserwowano, że w komórkach zakażonych wirusem polio należącym do rodziny *Picornaviridae*, pomimo silnego zahamowania translacji komórkowych mRNA, wirusowy RNA nadal ulegał wydajnej translacji [97]. Ponieważ wirus polio nie posiada kapu na końcu 5' RNA, wykluczono udział mechanizmu nieliniowej migracji rybosomu. Kolejne doświadczenia ujawniły, że region 5' UTR RNA wirusa polio przyjmuje wysoce zorganizowaną strukturę drugo- i trzeciorzędową, która umożliwia bezpośrednie związanie rybosomu bez konieczności wiązania kapu i skanowania RNA. Od tej pory, regiony w obrębie 5'UTR, których struktura RNA stanowi bezpośrednie miejsce oddziaływania z rybosomem nazywano elementami IRES (ang. *internal ribosomal entry site*). Elementy IRES zostały także zidentyfikowane u innych wirusów posiadających genom w postaci RNA o polarności dodatniej, takich jak, należące do picornawirusów wirus zapalenia mięśnia sercowego EMCV (ang. *encephalomyocarditis virus*) i wirus zapalenia wątroby typu C HCV, następnie u retrowirusa niedoboru odporności HIV-1 (ang. *human immunodeficiency virus 1*), a także u DNA wirusów na przykład wirusa herpes związanego z mięsakiem Kaposiego KSHV (ang. *Kaposi's sarkoma associated herpesvirus*).

Element IRES wirusa EMCV został zidentyfikowany dzięki opracowaniu przez Pelletier'a i Sonenberg'a testu z wykorzystaniem mRNA bicistronowych. W przypadku elementu IRES EMCV, bicistronowy mRNA posiadał dwie otwarte ramki odczytu kodujące białka reporterowe zwane cistronami. Pierwszym cistronem od końca 5' był gen kodujący kinazę tymidyny TK, a drugi kodował acetylotransferazę chloramfenikolu CAT. Ponieważ bicistronowy RNA posiadał kap na końcu 5', pierwszy cistron ulegał translacji kap-zależnej. Pomiędzy cistronami umieszczona została sekwencja regionu 5'UTR wirusa EMCV zawierająca potencjalny element IRES (Rys. 14). Tak więc, jeśli z drugiego cistronu powstawało białko CAT, oznaczało to, że badany region 5'UTR posiadał właściwości elementu IRES. Zastosowanie bicistronowego mRNA udowodniło, że element IRES umożliwia rybosomowi bezpośrednio związać się z mRNA w pobliżu kodonu inicjacyjnego bez przyłączania do kapu na końcu 5' i skanowania. Bicistronowe mRNA stały się standardową metodą identyfikacji elementów IRES. Obecnie częściej zawierają one cistrony kodujące białka reporterowe lucyferazy *Renilla* i *Firefly*, dzięki którym możliwe jest wykrycie bardzo małych ilości powstającego białka, a także ilościowe określenie aktywności elementu IRES.



Rys. 14 Model bicystronowego konstrukt mRNA, wykorzystywanego do badań aktywności translacyjnej elementów IRES. Pierwszy cystron ulega translacji zależnej od kapu na końcu 5' mRNA. Natomiast drugi cystron ulega translacji tylko wtedy, gdy umieszczona pomiędzy cistronami sekwencja posiada aktywność elementu IRES (na podstawie [2]).

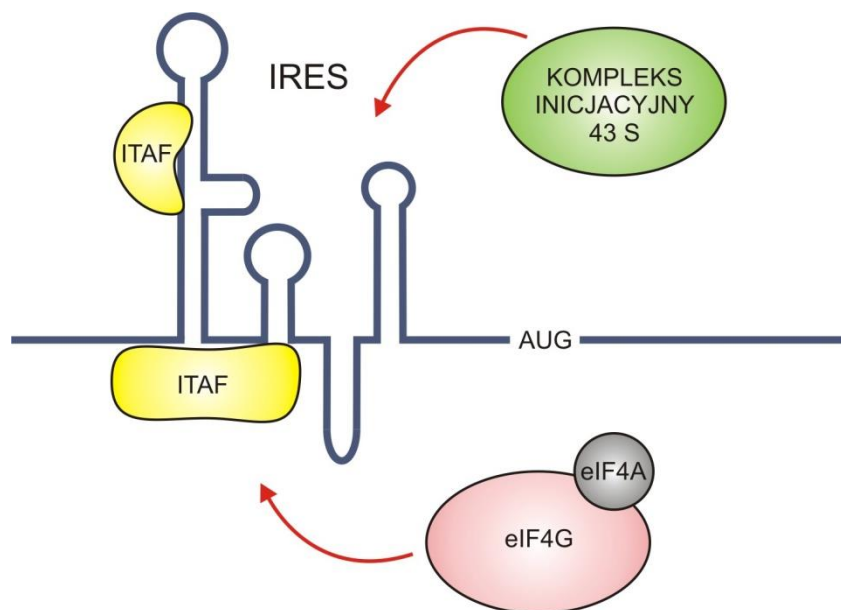
Dzięki elementom IRES translacja wirusowych RNA nie wymaga obecności niektórych czynników inicjacyjnych. Co więcej, wiele wirusów koduje proteazy, które trawią niektóre czynniki inicjacyjne. Na przykład, proteaza 2A wirusa polio trawi czynnik eIF4G, który wchodzi w skład kompleksu wiążącego kap - eIF4F, a proteaza 3C tnie białko PABC, które oddziałuje z kapem i ogonem poli(A) [98; 99]. Modyfikacje czynników translacyjnych przez wirusy prowadzą do inhibicji kap-zależnej translacji komórkowych mRNA, dzięki czemu wirusowy RNA ma pełen dostęp do potrzebnych mu czynników inicjacyjnych wchodzących w skład maszynierii translacyjnej gospodarza. Zestaw czynników inicjacyjnych wykorzystywanych przez wirusy różni się w zależności od typu oraz struktury elementu IRES [100]. Na przykład, wiązanie rybosomu do elementu IRES wirusa EMCV odbywa się jedynie przy udziale czynników eIF4G i eIF4A, które oddziałują z poszczególnymi domenami IRES i nie wymaga czynnika eIF4E [101]. Wiązanie rybosomu do RNA wirusa HCV odbywa się bez udziału eIF4F i jest stabilizowane poprzez oddziaływanie eIF3 z domenami elementu IRES [102]. Szczególnym przypadkiem translacji wirusowego RNA, jest RNA wirusa CrPV (ang. *cricket paralysis virus*), do którego rybosom przyłącza się niezależnie od jakichkolwiek czynników inicjacyjnych i tRNA [103]. Natomiast retrowirusy do zahamowania translacji komórkowych mRNA wykorzystują kodowane przez siebie białko NSP3, które wiążąc się do czynnika eIF4G uniemożliwia oddziaływanie z PABC i cyrkularyzację mRNA [104].

Występowanie elementów IRES w regionach 5'UTR nie jest ograniczone tylko do wirusowych RNA, ponieważ struktury te odkryto również w obrębie regionów 5'UTR komórkowych mRNA. Pierwszy komórkowy element IRES zidentyfikowano w regionie

5'UTR mRNA białka wiążącego się z łańcuchem ciężkim immunoglobulin BiP. mRNA BiP ulegał wydajnej translacji w komórkach zainfekowanych wirusem polio, kiedy translacja zależna od kapu jest silnie zahamowana poprzez cięcie eIF4G przez wirusową proteazę [105]. Ponadto, okazało się, że od 3% do 5% komórkowych mRNA jest związanych z polirybosomami podczas zakażenia wirusem polio, kiedy kap-zależna translacja jest zahamowana [106]. W ostatnich kilku latach nastąpił szybki postęp w identyfikacji elementów IRES w komórkowych mRNA. Jak dotąd, struktury typu IRES zostały odkryte w przypadku mRNA kodujących czynniki transkrypcyjne i translacyjne, hormony, czynniki wzrostu, onkogeny czy supresory nowotworzenia [10; 15]. Elementy IRES umożliwiają syntezę białek w warunkach, kiedy kap-zależna translacja jest silnie ograniczona, czyli podczas mitozy, hipoksji, apoptozy, promieniowania czy infekcji wirusowej [9; 107; 108]. Istotne znaczenie ma fakt, że struktury IRES komórkowych mRNA inicjują translację białek, które chronią komórkę w warunkach stresowych takich jak głód czy szok cieplny [100].

2.3.1. Rola struktury w funkcjonowaniu elementów IRES

Inicjacja translacji kierowana przez elementy IRES zależy od ich właściwości strukturalnych. Nawet niewielkie zmiany w strukturze IRES spowodowane pojedynczymi mutacjami mają istotny wpływ na ich aktywność [109]. Elementy IRES przyjmują określoną strukturę drugorzędową, która składa się z funkcjonalnych domen. Oddziaływania dalekiego zasięgu typu RNA-RNA między poszczególnymi domenami, a także ich oddziaływanie z białkami prowadzą do powstania trzeciorzędowej struktury IRES. Struktury te mogą oddziaływać z kanonicznymi czynnikami inicjacyjnymi eIF, małą podjednostką rybosomalną oraz z niekanonicznymi czynnikami białkowymi, specyficznymi dla danego elementu IRES [10; 15]. Oddziaływania te prowadzą do utworzenia aktywnego kompleksu inicjacyjnego oraz odpowiedniego umiejscowienia w obrębie kodonu inicjacyjnego (Rys. 15).



Rys. 15 Schematyczna prezentacja inicjacji translacji zależnej od elementu IRES. Wewnętrzna inicjacja umożliwia związanie małej podjednostki rybosomalnej 40S do mRNA w pobliżu kodonu AUG bez udziału kapu. Elementy IRES charakteryzują się różnymi wymaganiami co do kanonicznych czynników inicjacyjnych (na przykład eIF4G lub eIF4A), natomiast do swojej aktywności wymagają specyficznych komórkowych czynników ITAF (na podstawie [2]).

Większość komórkowych elementów IRES została zidentyfikowana w obrębie długich regionów 5'UTR, posiadających dużą ilość par G-C oraz złożoną strukturę. Niektóre mRNA na przykład, mRNA kinazy p58^{PITSLRE} czy drożdżowego białka URES2, posiadają elementy IRES w obrębie sekwencji kodującej białko [110; 111]. Analiza delecyjna wykazała, że długość elementów IRES wynosi zazwyczaj od 150 do 300 nukleotydów [106]. Najkrótszy element IRES zidentyfikowano w regionie 5'UTR mRNA homeodomenowego białka Gtx i miał on długość 9 nukleotydów [112]. Jak dotąd, nie wykazano znaczących podobieństw pomiędzy elementami IRES komórkowych mRNA, nawet w przypadku blisko spokrewnionych genów [10]. Wskazuje to na możliwość werbowania rybosomu przez różne elementy strukturalne w obrębie IRES. Początkowo sugerowano obecność motywów strukturalnych typu spinka w kształcie litery Y, jednak nie stwierdzono udziału takich struktur w procesie inicjacji translacji [113]. Mapowanie struktury drugorzędowej regionów 5'UTR mRNA c-Myc, L-myc czy Apaf-1 wykazała obecność złożonych struktur zawierających wiele motywów typu spinki i pseudowęzłów [106; 114]. Jak dotąd, pozostaje niejasne w jaki sposób powyższe motywy strukturalne werbują i ułatwiają wiązanie rybosomu.

Co ciekawe, niektóre komórkowe elementy IRES zawierają krótkie ramki odczytu uORF [115]. Początkowo sugerowano, że rola uORF w obrębie sekwencji IRES polega na inhibicji translacji zależnej od kapu. Jednak badania translacji mRNA *cat-1* pokazały, że syntetyza 28-aminokwasowego peptydu z uORF stymuluje translację zależną od IRES w warunkach stresu [115]. Zaproponowano wówczas koncepcję „dynamicznego IRES”, według której brak uORF powoduje, że element IRES przyjmuje nieaktywną strukturę, która uniemożliwia związanie rybosomu. Od tamtej pory wielu badaczy uważa, że komórkowe struktury IRES nie są „sztywnymi” elementami, ale mogą przyjmować kilka różnych struktur, które wpływają na wzrost aktywności IRES w danych warunkach [100].

2.3.2. Czynniki białkowe oddziałujące z IRES

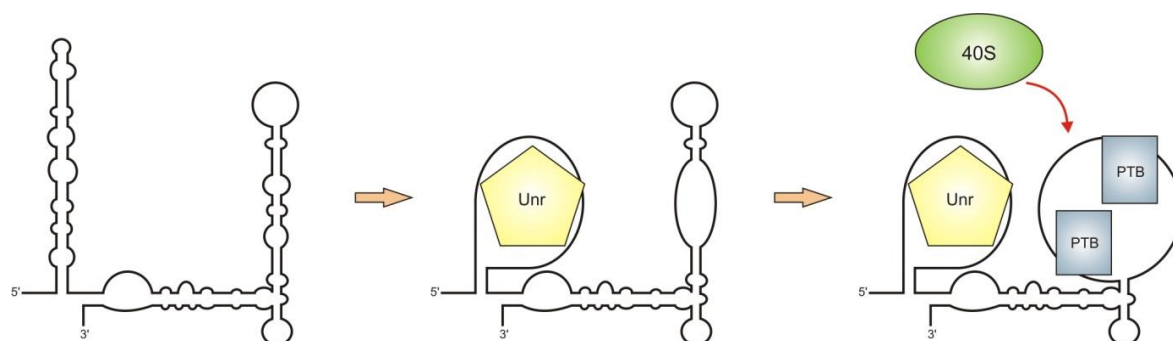
Niedługo po opisanu pierwszego wirusowego elementu IRES zidentyfikowano białka, które wiążą się do tych elementów [116; 117]. Okazało się, że niektóre wirusowe elementy IRES do swojej aktywności oprócz kanonicznych czynników inicjacyjnych wymagają specyficznych białek komórkowych tzw. ITAF (ang. *IRES trans acting factors*) [2]. Pierwsze doniesienia na temat możliwego udziału czynników ITAF pochodziły z badań nad IRES-zależną translacją niektórych wirusów [118; 119; 120]. Z badań tych wynikało, że elementy IRES wirusów EMCV, FMDV (ang. *foot and mouth disease virus*) i TMEV (ang. *Theiler's Marine encephalomyelitis virus*) są aktywne w lizacie z króliczych retikulocytów RRL, podczas gdy elementy IRES rinowirusa i wirusa polio wymagały dodatku ekstraktu z komórek HeLa. Podobnej obserwacji dokonano w przypadku komórkowego mRNA drugiego czynnika wzrostu fibroblastów FGF-2. Okazało się bowiem, że czynniki ITAF uczestniczą także w IRES-zależnej translacji komórkowych mRNA. Wśród najczęściej badanych czynników ITAF były: ludzki autoantygen La, białko PCBP2 (ang. *poly(C) binding protein 2*) i białko Unr (ang. *upstream of N-ras*). W ostatnich latach lista czynników ITAF oddziałujących z komórkowymi elementami IRES powiększa się (Tabela 3.).

Tabela 3. Przykłady czynników ITAF z przypisanymi elementami IRES

ITAF	IRES z którym oddziałuje
PTB/ nPTB	Apaf-1, Bag-1, IGF-IR, BiP, MTG8a, Unr, Mnt, Myb, p53
La	BiP, XIAP
Unr	Apaf-1, Unr, kinaza PITSLRE
DAP5	HIAP, XIAP, c-Myc, Apaf-1, DAP5
NSAP1	BiP
hnRNPC1/C2	XIAP, c-Myc, Unr
PCBP1/2	c-Myc
hnRNP A1	XIAP

Dokładny mechanizm, według którego czynniki ITAF ułatwiają wiązanie rybosomu do elementów IRES nie jest do końca poznany [2]. Jedną z hipotez zakłada, że czynniki ITAF posiadają aktywność białek opiekuńczych, dzięki której rozplatają niektóre domeny strukturalne w obrębie IRES i ułatwiają przyłączenie podjednostki rybosomalnej 40S. Tak więc, dzięki posiadaniu przez ITAF motywów wiążącym RNA (RRM, ang. *RNA recognition motif*) regulują aktywność IRES poprzez zmiany oraz stabilizację struktury mRNA. Niektóre z nich mogą bezpośrednio wiązać się do elementów IRES, podczas gdy inne pośredniczą w wiązaniu IRES z innymi czynnikami ITAF. Wiele czynników ITAF należy do grupy heterogennych jądrowych rybonukleoprotein hnRNP typu A1, C1/C2, I, E1/E2, K i L, które przemieszczają się między jądrem a cytoplazmą. W związku z tym, sugeruje się, że poziom czynników ITAF w cytoplazmie różni się w zależności od warunków stresowych. Ponadto, dla wydajności translacji zależnej od IRES duże znaczenie może mieć dystrybucja czynników ITAF w różnych komórkach lub tkankach [100].

Niektóre elementy IRES oddziałują z kilkoma czynnikami ITAF, na przykład IRES c-Myc wiąże białka PCBP1, PBCP2 oraz heterogenne jądrowe rybonukleoproteiny C i K (Evans i in. 2003, Kim JH 2003). Innym przykładem jest IRES proapoptotycznego czynnika aktywującego proteazy Apaf-1 (ang. *apoptotic protease activating factor 1*), który tworzy specyficzne rybonukleoproteinowe kompleksy z białkiem Unr oraz PTB (ang. *polypyrimidine tract binding protein*) (Rys. 16).



Rys. 16 Remodelowanie struktury IRES Apaf-1 poprzez wiązanie białek Unr i PTB. Rozplcenie oraz stabilizacja regionów jednoniciowych przez oba białka umożliwia wiązanie małej podjednostki rybosomalnej 40S (na podstawie [121]).

Kombinacja tych czynników stymuluje IRES-zależną translację Apaf-1 [121]. Białko Unr poprzez wiązanie się do jednej z domen IRES Apaf-1 rozplata strukturę RNA i stabilizuje powstałą w ten sposób jednoniciową pętlę. Białko Unr ma również zdolność do remodelowania domeny położonej bliżej końca 3' elementu IRES, co z kolei umożliwia oddziaływanie z białkiem PTB. Zmiany konformacyjne w IRES Apaf-1, wywołane przez oba białka umożliwiają wiązanie małej podjednostki rybosomalnej 40S. Podobny mechanizm regulacji translacji opisano w przypadku IRES Bag-1 [122]. Dzięki chaperonowej aktywności białka PTB i PCBP1 dochodzi do rozplatania specyficznych regionów w obrębie IRES Bag-1 i przyłączania podjednostki 40S. Białka z rodziny PCBP stymulują także translację c-Myc [123]. Tak więc, zmiany strukturalne wywołane aktywnością chaperonową takich białek jak PTB, Unr czy PCBP1 wskazują na podobny mechanizm regulacji aktywności elementów IRES [10]. Jednak czynniki te nie oddziałują ze wszystkimi komórkowymi elementami IRES. Co więcej, niektóre z czynników ITAF mogą mieć nie tylko stymulujący wpływ na aktywność IRES. Na przykład, białko PTB funkcjonuje jako represor translacji zależnej od IRES BiP [124]. Podobny wpływ na translację w warunkach stresowych ma jądrowe białko nukleolina, która oddziałuje z regionem 5'UTR mRNA p53 [125].

2.3.3. Rola elementów IRES w regulacji ekspresji genów na poziomie translacji

Regulacja ekspresji genów odbywa się głównie na etapie inicjacji translacji. W odpowiedzi na warunki stresowe takie jak szok cieplny, naświetlanie, hipoksja czy niedobór aminokwasów dochodzi w komórce do zahamowania kap-zależnej inicjacji translacji. Jednak nawet pomimo zaburzonej równowagi fizjologicznej w komórce, synteza białek jest możliwa dzięki występowaniu elementów IRES w regionach 5'UTR niektórych

mRNA. IRES-zależna translacja stanowi mechanizm zapewniający stan homeostazy w komórce w warunkach stresowych. Krótkotrwały stres stymuluje IRES-zależną translację białek takich jak XIAP czy Cat-1, które pozwalają przetrwać komórce w tych warunkach. Natomiast silny i długotrwały stres prowadzi do aktywacji elementów IRES mRNA kodujących białka proapoptotyczne na przykład Apaf-1 i DAP5 [68]. Tak więc, regulacja ekspresji genów poprzez wewnętrzną inicjację translacji zapewnia komórce przetrwanie w warunkach stresowych albo prowadzi do programowanej śmierci komórki.

Główną przyczyną zahamowania kap-zależnej translacji w warunkach stresowych są zmiany w aktywności czynników inicjacyjnych. Najczęściej dochodzi do zaburzenia funkcjonowania czynnika eIF2 na skutek fosforylacji jego podjednostki α . Ufosforylowany czynnik eIF2 α wykazuje większe powinowactwo w stosunku do białka eIF2B [100]. Powstanie trwałego kompleksu eIF2 α -eIF2B uniemożliwia wymianę GDP na GTP, co prowadzi do wzrostu eIF2-GDP i silnej inhibicji kap-zależnej translacji. Jednak elementy IRES niektórych mRNA są niewrażliwe na zmienny poziom GTP-eIF2-Met-tRNAi. Należą do nich mRNA kodujące czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), onkogen c-Myc czy kinaza PITSLRE. Ponadto, element IRES mRNA Cat-1 wymaga do swojej aktywności fosforylacji eIF2 α podczas stresu [115].

Do zahamowania inicjacji translacji zależnej od kapu dochodzi również podczas apoptozy, kiedy kaspazy tną czynnik inicjacyjny eIF4G i eIF4B. Jednak, istnieje grupa komórkowych mRNA, które dzięki elementom IRES ulegają wydajnej translacji w tych warunkach. Są to m. in. mRNA kodujące białko c-Myc, DAP5, XIAP, HIAP, Apaf-1 czy Hsp70. Również podczas infekcji wirusowej dochodzi do cięcia eIF4G przez wirusowe proteazy. Jednak proteolityczne cięcie tego czynnika nie wpływa na wydajność IRES-zależnej translacji mRNA kodujących białko BiP i c-Myc [126].

Niska wydajność syntezy białek zależnej od kapu ma również miejsce podczas cyklu komórkowego. W czasie przejścia z fazy G2 do fazy mitozy dochodzi do zmian ufosforylowania czynnika eIF4E lub jego wiązania z 4E-BP. Wydajność translacji zależnej od IRES jest niższa niż translacji z udziałem kapu. Aczkolwiek translacja z wykorzystaniem elementu IRES dotyczy syntezy białek, których nadmierna ilość w komórce w normalnych

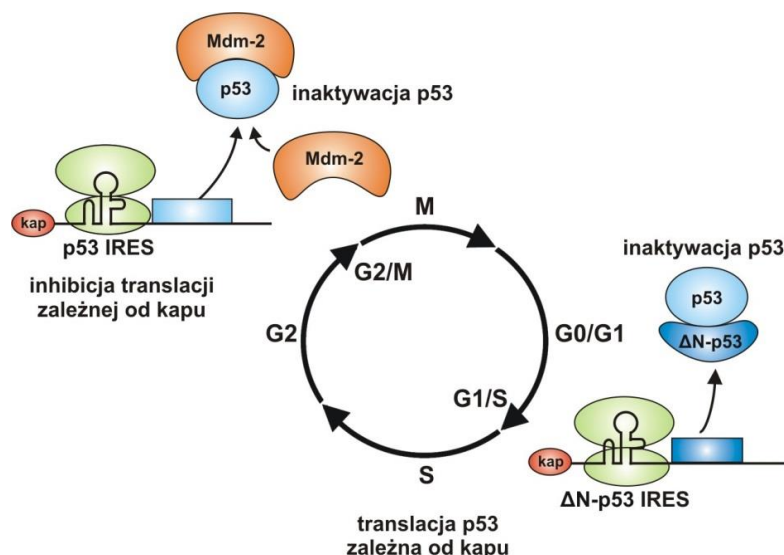
warunkach mogłaby być szkodliwa. Tak więc, mechanizm IRES-zależnej translacji zapewnia niski poziom ekspresji niektórych białek w warunkach fizjologicznych [10].

2.3.3.1. Rola IRES-zależnej inicjacji translacji w cyklu komórkowym

Doświadczenia na ssaczych liniach komórkowych wykazały spadek poziomu syntezy białek do 25% podczas mitozy [127]. Przejściu komórki z fazy G2 do fazy mitozy towarzyszą zmiany aktywności kanonicznych czynników inicjacyjnych eIF4E, eIF2 i 4E-BP. Ostatecznie, prowadzi to do zahamowania translacji zależnej od kapu. Jednak translacja niektórych białek jest wymagana dla przejścia z fazy G2 do mitozy. Analiza macierzowa wykazała, że około 3% komórkowych mRNA pozostaje związana z polirybosomami podczas przejścia do fazy mitozy [127]. Do ważnych dla cyklu komórkowego mRNA, które posiadają elementy IRES należą m. in., dekarboksylaza ornitynowa ODC, czynnik transkrypcyjny p53 oraz jego izoforma Δ Np53, kinaza p58^{PITSLRE} [11; 110; 128].

Dekarboksylaza ornityny ODC jest kluczowym enzymem w biosyntezie poliamin, które biorą udział w replikacji DNA podczas fazy syntezy, kondensacji chromosomów oraz tworzenia wrzeciona podziałowego podczas mitozy [129]. Region 5'UTR mRNA ODC jest długi, posiada stabilne termodynamicznie motywy struktury drugorzędowej oraz składa się z dwóch segmentów: bliższego końca 5', który zawiera stabilną strukturę typu spinki i pełni funkcję represora translacji uORF oraz dalszego segmentu zlokalizowanego powyżej kodonu inicjacyjnego, w którym umiejscowiony jest element IRES. Element IRES kontroluje translację ODC w zależności od fazy cyklu komórkowego. Zaobserwowano wysoki poziom białka ODC podczas przejścia z fazy G2 do mitozy oraz spadek syntezy tego białka podczas przejścia z fazy G1 do fazy syntezy, co ostatecznie potwierdziło, że translacja ODC jest niezależna od kapu [128; 130].

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym nie tylko w regulację cyklu komórkowego, ale również w naprawę DNA oraz indukcję apoptozy. Zidentyfikowano krótszą izoformę tego białka, Δ Np53, która hamuje aktywność pełnej długości p53 podczas cyklu komórkowego (Rys. 17) [12].



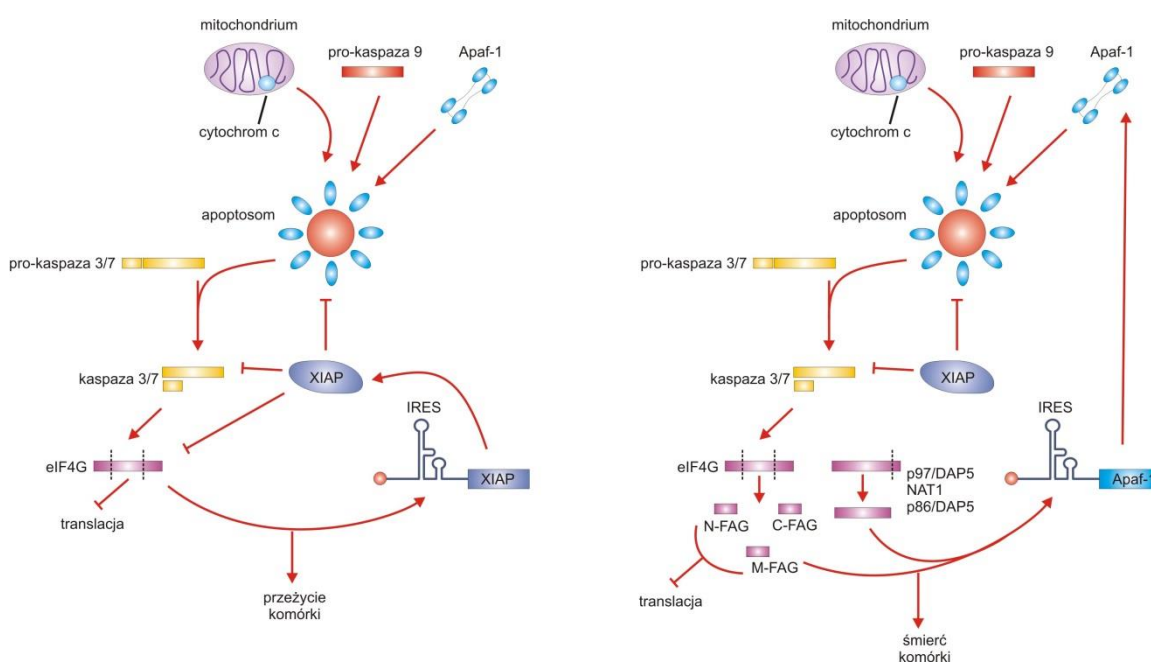
Rys. 17 Udział IRES-zależnej translacji p53 i ΔNp53 w regulacji cyklu komórkowego. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie [131]).

Wykazano, że oba białka powstają z tego samego mRNA, dzięki występowaniu w regionie 5'UTR elementu IRES, przy czym element ten jest dłuższy dla izoformy ΔNp53 i zawiera fragment sekwencji kodującej p53 [11]. Podczas przejścia z fazy G1 do fazy syntezy w translacji zależnej od elementu IRES powstaje izoforma ΔNp53. Isoforma ΔNp53 wiąże się do białka p53 pełnej długości i hamuje jego aktywność, co z kolei umożliwia rozpoczęcie fazy syntezy. Natomiast podczas przejścia z fazy G2 do fazy syntezy, kiedy kap-zależna translacja w komórce jest zahamowana, na drodze wewnętrznej inicjacji powstaje białko p53. Poziom białka p53 w komórce jest niski i dodatkowo kontrolowany przez ligazę ubikwitynową Hdm2, która inaktywuje białko p53, co z kolei umożliwia rozpoczęcie mitozy

Kinaza p110^{PITSLRE} i p58^{PITSLRE} pełnią ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Kinaza p110^{PITSLRE} jest zaangażowana w składanie pre-mRNA oraz regulację transkrypcji, natomiast p58^{PITSLRE} bierze udział w dojrzewaniu centrosomów oraz wrzeciona podziałowego podczas mitozy [132; 133]. Obie kinazy powstają z tego samego mRNA, przy czym p58^{PITSLRE} ulega translacji niezależnej od kapu, dzięki występowaniu elementu IRES w sekwencji kodującej. Kinaza p110^{PITSLRE} jest syntetyzowana w ciągu całego cyklu komórkowego, podczas gdy najwyższy poziom p58 obserwowano w komórkach zatrzymanych w fazie G2/M, kiedy kap-zależna translacja w komórce jest zahamowana [110].

2.3.3.2. IRES-zależna translacja podczas apoptozy

Podczas apoptozy ma miejsce silna inhibicja kap-zależnej translacji na skutek proteolitycznego cięcia kanonicznych czynników inicjacyjnych eIF4G, eIF4B i 4E-BP przez kaspazy oraz zmiany w fosforylacji eIF2 i 4E-BP. Jednak w takich warunkach mogą powstawać dwa antagonistycznie działające czynniki XIAP i Apaf-1. Wykazano, że oba białka powstają w procesie translacji zależnej od IRES [134; 135]. Oba elementy IRES nie wykazują żadnego podobieństwa pod względem sekwencji i struktury, a także wiążą się do nich inne czynniki ITAF. Aktywność IRES Apaf-1 jest regulowana przez białko PTB i Unr, podczas gdy do IRES XIAP wiążą się La i hnRNP1/C2. Podczas apoptozy dochodzi do uwolnienia z mitochondriów cytochromu c, który w cytoplazmie wiąże się z białkami Apaf-1 (Rys. 18). Prowadzi to do utworzenia apoptosomu, który aktywuje kluczowy enzym kaspazę 9. Z kolei białko XIAP wiąże się do różnych kaspaz i inhibuje ich aktywność.



Rys. 18 Rola IRES-zależnej translacji XIAP i Apaf-1 podczas apoptozy. Białko XIAP inaktywuje kaspazy, dzięki czemu komórka może przetrwać niekorzystne warunki stresowe. Z kolei białko Apaf-1 tworzy apoptosom, który aktywuje kaspazy i indukuje apoptozy (na podstawie [68]).

Wykazano, że nie wszystkie warunki stresowe prowadzą do wzrostu poziomu XIAP. Na przykład, traktowanie komórek etopozydem nie aktywowało IRES XIAP. Wysoki poziom białka XIAP nie ulega zmianie w warunkach krótkiego i silnego stresu, dzięki czemu możliwe jest ciągle blokowanie aktywności kaspaz, przez co nie dochodzi do

apoptozy [68]. Jednakże, apoptoza jest wynikiem antagonistycznego działania XIAP i Apaf-1. Podczas apoptozy, dzięki translacji zależnej od IRES poziom Apaf-1 nie ulega zmianie, co z kolei zapewnia stałą aktywację kaspaz. Ponieważ oba białka syntetyzowane są w tych samych warunkach według mechanizmu wewnętrznej inicjacji, o apoptozie decyduje rodzaj oraz czas działania czynników stresowych.

2.3.3.3. mRNA ulegające translacji zależnej od elementu IRES w warunkach stresowych

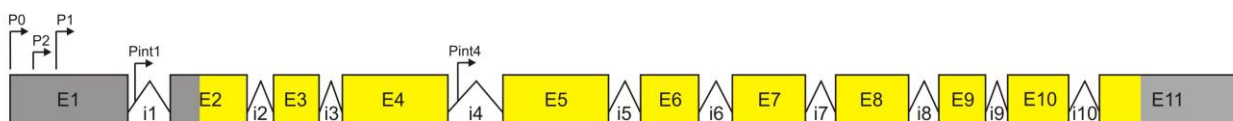
Zmiany warunków, takie jak: niedobór czynników wzrostu, aminokwasów, hipoksja, promieniowanie czy zmiany temperatury prowadzą do zahamowania w komórce translacji zależnej od kapu. Podczas szoku cieplnego obserwuje się wysoki poziom białek opiekuńczych Hsp (ang. *heat-shock proteins*), do których należy białko wiążące się z łańcuchem ciężkim immunoglobulin BiP. Białko BiP uczestniczy w fałdowaniu białek oraz kieruje nieprawidłowo sfałdowane białka do retikulum endoplazmatycznego [136]. Ekspresja białka BiP indukowana jest podczas szoku cieplnego, zarówno na poziomie transkrypcji jak i translacji. Translacja BiP zachodzi z udziałem elementu IRES i jest stymulowana poprzez oddziaływanie z czynnikami ITAF, na przykład NSPA1. Natomiast w warunkach niedoboru aminokwasów, na skutek fosforylacji eIF2 następuje wzrost ekspresji białka cat-1, które bierze udział w transporcie aminokwasów przez błonę komórkową [115]. mRNA cat-1 zawiera uORF, której translacja umożliwia przyjęcie przez element IRES aktywnej konformacji, która dodatkowo stymulowana jest poprzez fosforylację eIF2. Sugeruje się, że w czasie jaki upływa od fosforylacji eIF2 do translacji cat-1, zachodzi synteza czynnika inicjacyjnego specyficznego dla IRES cat-1, który dodatkowo wzmacnia translację cat-1.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Organizacja genu p53 i jego ekspresja

Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, które w odpowiedzi na różne czynniki stresowe działające na komórkę aktywuje transkrypcję genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, apoptozę i naprawę DNA. Nazywane jest głównym supresorem nowotworzenia oraz „strażnikiem genomu”, ponieważ zapewnia stabilność materiału genetycznego i zapobiega podziałom komórek z mutacjami, które mogą prowadzić do transformacji nowotworowych.

Gen *TP53*, kodujący ludzkie białko p53 występuje w ludzkim genomie w pojedynczej kopii, a jego *locus* znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 17. Składa się on z około 20 kpz i zbudowany jest z 11 egzonów i 10 intronów (Rys. 19). Egzon 1 i 28 nukleotydów egzonu 2 stanowi region 5' UTR. Natomiast większa część egzonu 11 obejmuje region 3'UTR, którego długość wynosi aż 1176 nukleotydów.

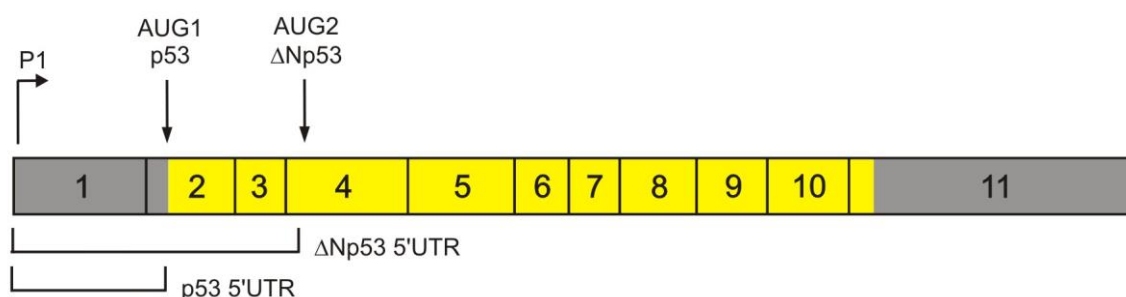


Rys. 19 Budowa genu *TP53*. Kolorem szarym zaznaczono regiony niekodujące 5' i 3', region kodujący oznaczony jest kolorem żółtym, E1-E11 - egzony, i1-i10 - introny, P0, P1, P2, Pint1, Pint4 - promotory transkrypcyjne.

Początkowo uważano, że gen *TP53* posiada jeden promotor transkrypcyjny P0, oddalony o 220 nukleotydów od końca 3' egzonu 1 (Rys. 19) [137]. Transkrypty syntetyzowane z promotora P0, posiadają region 5'UTR od długości 250 nukleotydów. Późniejsze badania wykazały, że w genie *TP53* znajduje się co najmniej pięć regionów promotorowych. W obrębie egzonu 1, w odległości 110 nukleotydów od promotora P0 zlokalizowany jest promotor P1 [138]. Nie jest on typowym promotorem, ponieważ nie posiada kasety „TATA”. Powstające z niego transkrypty posiadają region 5'UTR, którego długość wynosi 140 nukleotydów. Pomiędzy promotorem P0 i P1 zidentyfikowano kolejne miejsce startu transkrypcji, określane jako promotor P2 [14; 138]. Pozostałe dwa miejsca promotorowe zlokalizowane są w sekwencjach intronowych. Promotor

Pint1 znajduje się w obrębie intronu 1 i powstaje z niego transkrypt kodowany całkowicie przez sekwencję intronu 1 [139]. Z kolei, ze zlokalizowanego w intronie 4 promotora Pint4 syntetyzowany jest transkrypt zawierający część intronu 4 oraz egzony 5-11 [140]. Promotory transkrypcyjne genu *TP53* charakteryzują się aktywnością specyficzną tkankowo, która dodatkowo jest zróżnicowana w obrębie tkanek zdrowych i nowotworowych [14]. W przypadku tkanek zdrowych, częściej wykorzystywany jest promotor P0. Natomiast transkrypty rozpoczynające się w miejscu P1 wykryto w większości tkanek nowotworowych. Postulowano, że za obniżoną ekspresję białka p53 w komórkach, odpowiada stabilna struktura drugorzędowa RNA pomiędzy promotorami P0-P1 [14; 141].

Gen *TP53* wchodzi w skład wielogenowej rodziny, do której należą również *TP63* i *TP73*, i podobnie jak one, ulega ekspresji w postaci licznych izoform białkowych. Wykazano, że z dojrzałego mRNA p53 oprócz pełnej długości białka p53 powstaje skrócona z N-końca izoforma Δ Np53, której synteza inicjowana jest z alternatywnego kodonu inicjacyjnego AUG2 w egzonie 4 (Rys. 20) [12; 142]. Niedawno zidentyfikowano element IRES w obrębie regionu 5'UTR mRNA p53, dzięki któremu synteza białka p53 może zachodzić niezależnie od kapu na końcu 5' mRNA [11; 143]. Zaproponowano, że synteza izoformy Δ Np53 może również zachodzić w sposób zależny od elementu IRES, obecnego w regionie 5'UTR, który w przypadku Δ Np53 jest przedłużony o 120 nukleotydów sekwencji kodującej.



Rys. 20 Budowa mRNA p53 transkrybowanego z miejsca promotorowego P1.

Izoformy białka p53 powstają również z alternatywnych transkryptów, które w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA zawierają sekwencje intronowe. Do tej pory zidentyfikowano aż kilkadziesiąt alternatywnych mRNA p53. Jednym z nich jest

mRNA p53(EII) z zachowaną sekwencją intronu 2 (Rys. 6). Z takiego mRNA może być generowana jedynie izoforma Δ Np53, ponieważ za kodonem AUG1 dla pełnej długości białka znajduje się kodon STOP w obrębie intronu 2. W związku z identyfikacją transkryptu p53(EII), zaproponowano alternatywny mechanizm generowania izoformy Δ Np53 nazywany reinicjacją translacji. Według niego, zamiast pełnej długości białka p53 z kodonu AUG1 syntetyzowany jest 25-aminokwasowy peptyd. Po zakończeniu syntezy tego peptydu kompleksy rybosomalne, które nie oddysocjowały od mRNA wznawiają syntezę izoformy Δ Np53 z kodonu AUG2, położonego dalej w kierunku 3' mRNA [13].

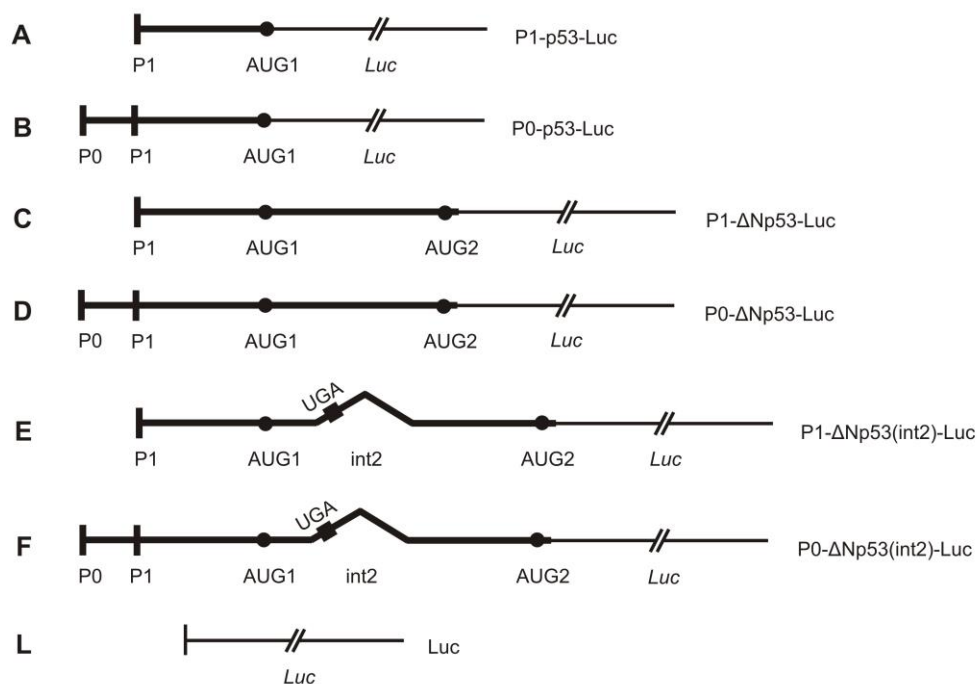
Niedawno zidentyfikowano izoformy białka p53 kodowane przez transkrypt rozpoczynający się w miejscu inicjacji transkrypcji Pint4 [144]. Isoformy te, Δ N133p53 oraz Δ N160p53 pozbawione są odpowiednio 133 i 160 aminokwasów z końca N, w porównaniu do białka p53 pełnej długości. Wskutek tego, obie izoformy pozbawione są domeny transaktywacyjnej, a przypadku izoformy Δ N160p53 części domeny wiążącej DNA.

3.2. Warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53

Pierwszy etap moich badań miał na celu określenie wpływu wariantów regionu niekodującego 5' mRNA p53 na proces translacji. Poszczególne warianty różniły się miejscem inicjacji transkrypcji (P0, P1), obecnością jednego lub dwóch kodonów inicjacyjnych (AUG1 - dla białka p53 i AUG2 - dla izoformy Δ Np53) oraz obecnością lub brakiem intronu 2 (Rys. 21).

Warianty P1-p53 oraz P0-p53 składały się jedynie z egzonu 1 i 28-nukleotydowego fragmentu egzonu 2 i zakończone były kodonem inicjacyjnym AUG1. Z kolei, warianty P1- Δ Np53 i P0- Δ Np53 zawierały całą sekwencję nukleotydową egzonu 2, egzon 3 oraz 26-nukleotydowy fragment egzonu 4 wraz z kodonem AUG2. W przypadku wariantów P1- Δ Np53(int2) i P0- Δ Np53(int2), kodony AUG1 i AUG2 zostały oddzielone przez intron 2, znajdujący się pomiędzy egzonem 1 i egzonem 2.

Wszystkie warianty wklonowano do wektora ekspresyjnego pRL-CMV powyżej genu reporterowego lucyferazy *Renilla*, tak aby kontrolowały one jego ekspresję. Sekwencje wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 poprzedzała sekwencja promotora dla polimerazy RNA T7, umożliwiającą otrzymanie modelowych konstruktów mRNA metodą transkrypcji *in vitro* (Rys. 21).



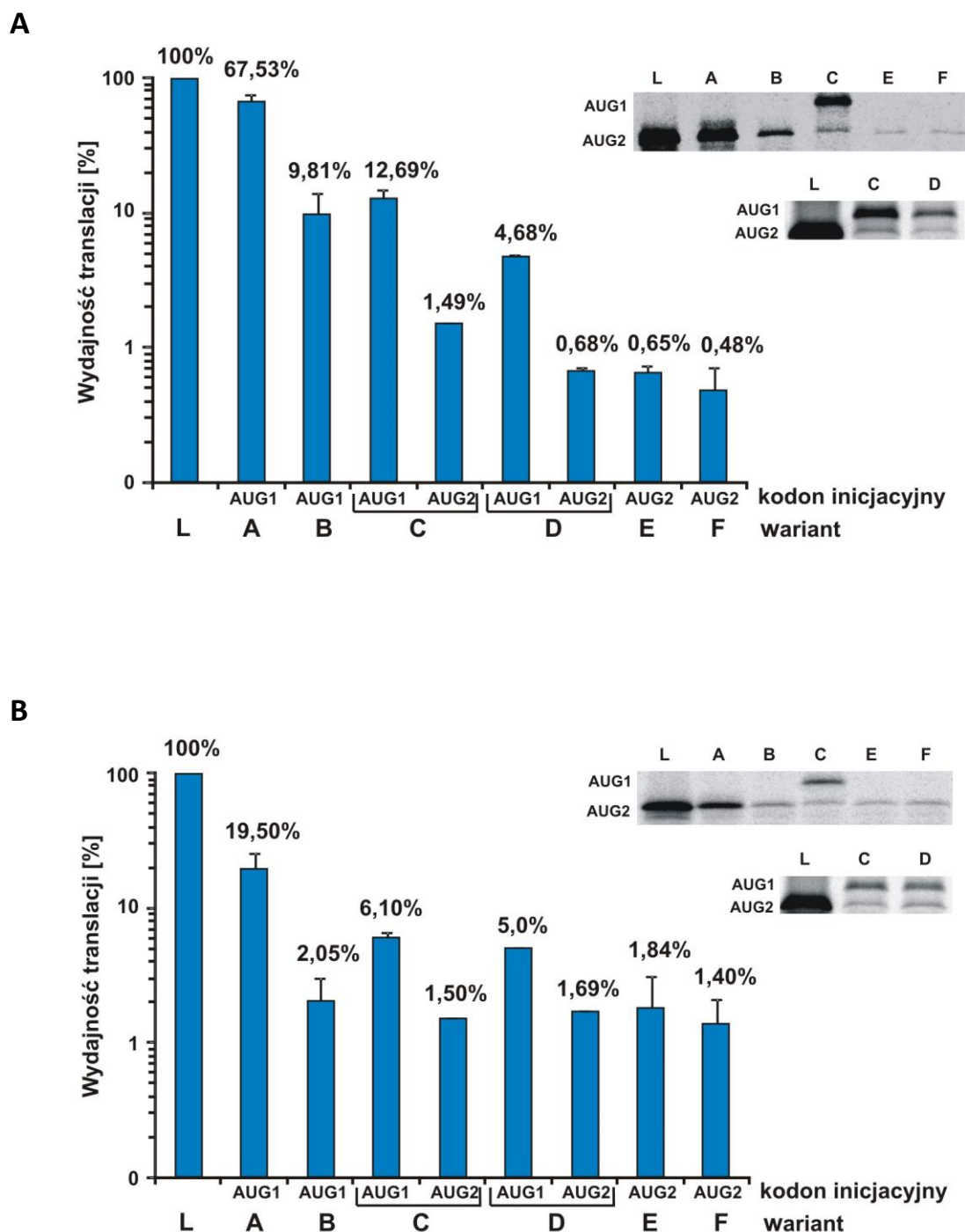
Rys. 21 Schematyczne przedstawienie modelowych konstruktów mRNA, zawierających poszczególne warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 oraz sekwencję kodującą białko reporterowe lucyferazy *Renilla*.

3.2.1. Translacja modelowych mRNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA oraz sekwencję kodującą białko reporterowe lucyferazy w lizacie z króliczych retikulocytów

3.2.1.1. Wpływ wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 różniących się miejscem startu transkrypcji P0 i P1 na wydajność translacji

W pierwszej kolejności postanowiłam zbadać wpływ regionu międzypromotorowego P0-P1 na translację białka reporterowego lucyferazy *Renilla* w systemie bezkomórkowym, którym był lizat z króliczych retikulocytów (RRL). W celu otrzymania modelowych mRNA w reakcji transkrypcji *in vitro*, konstrukty dsDNA zawierające warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 linearyzowałam za pomocą trawienia enzymem restrykcyjnym NotI, tuż za sekwencją kodującą białko reporterowe. Reakcję transkrypcji *in vitro* prowadziłam w obecności 3'-O-metylowanego analogu kapu ARCA (ang. *anti-reverse cap analog*), aby otrzymać transkrypty posiadające na końcu 5' kap wbudowany w odpowiedniej orientacji (rozdział 3.2.2.1) elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Detekcja produktów białkowych odbywała się na drodze autoradiografii, dzięki zastosowaniu w reakcji translacji metioniny znakowanej izotopem siarki [³⁵S]-Met. Autoradiogramy na rysunku 22 przedstawiają białkowe produkty translacji otrzymane

z modelowych mRNA posiadających kap na końcu 5' (panel A) oraz pozbawione kapu (panel B).



Rys. 22 Translacja *in vitro* modelowych konstruktów mRNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 oraz sekwencję kodującą białko reporterowe lucyferazy *Renilla*. Na autoradiogramach znajdują się produkty translacji *in vitro* prowadzonej w obecności [³⁵S]-Met. Wykresy przedstawiają wydajność translacyjną kodonu AUG1 i AUG2 w modelowych mRNA z kapem na końcu 5' (panel A) i bez kapu (panel B). Wszystkie wartości zostały przedstawione w skali logarytmicznej i są one wartościami średnimi uzyskanymi z co najmniej trzech powtórzeń.

W przypadku konstruktów P1-p53-Luc i P0-p53-Luc zawierających tylko kodon AUG1, na żelu widoczny jest jeden prążek, odpowiadający lucyferazie *Renilla*. Z mRNA P1-ΔNp53-Luc i P0-ΔNp53-Luc syntetyzowane były dwa białka, ponieważ zawierają one dwa kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2. W tym przypadku, z kodonu AUG1 powstawało białko fuzyjne składające się z pierwszych 39 aminokwasów białka p53 oraz lucyferazy *Renilla*, reprezentowane przez wolniej migrujący prążek na żelu. Natomiast szybciej migrujący prążek odpowiada lucyferazie *Renilla*, której translacja rozpoczynała się z kodonu AUG2. Ponieważ w mRNA P1-ΔNp53(int2)-Luc i P0-ΔNp53(int2)-Luc oba kodony inicjacyjne oddzielone były sekwencją intronu 2, w obrębie której znajduje się kodon STOP UGA, z tych mRNA syntetyzowane było tylko białko lucyferazy z kodonu AUG2. Na podstawie autoradiogramów pochodzących z co najmniej trzech powtórzeń doświadczeń, sporządziłam wykresy przedstawiające ilościowy wpływ poszczególnych wariantów regionu terminalnego 5' na translację białka reporterowego. Wydajność translacji została wyrażona w procentach w stosunku do poziomu białka otrzymanego z kontrolnego mRNA Luc, kodującego jedynie lucyferazę *Renilla*. W przypadku wszystkich modelowych mRNA, wydłużenie regionu terminalnego 5' o region powyżej promotora P1, miało inhibujący wpływ na translację białka reporterowego. W porównaniu z mRNAP1-p53-Luc, ilość lucyferazy powstającej z P0-p53-Luc spadła prawie siedmiokrotnie w przypadku mRNA kapowanego i dziewięciokrotnie dla niekapowanego mRNA (Rys. 22, warianty A i B). Wydłużenie mRNA P1-ΔNp53-Luc o region P0-P1 skutkowało dalszym spadkiem efektywności translacji, zarówno z kodonu AUG1 jak i AUG2 (Rys. 22, panel A, warianty B i C). W przypadku mRNA P1-ΔNp53-Luc i P0-ΔNp53-Luc, które nie posiadały kapu na końcu 5', różnice w wydajności białek syntetyzowanych z obu kodonów były mniejsze (Rys. 22, panel B, warianty B i C). Z kolei, obecność regionu P0-P1 w mRNA z zachowanym intronem 2, nie wpłynęła na wydajność translacji z kodonu AUG2, zarówno dla matrycy kapowanej jak i niekapowanej (Rys. 22, panel A i B, warianty E i F). Podsumowując, region P0-P1 obniżał głównie poziom białka fuzyjnego, którego translacja inicjowana była z kodonu AUG1. Spadek ten dotyczył zarówno mRNA zawierających jeden jak i dwa kodony inicjacyjne AUG.

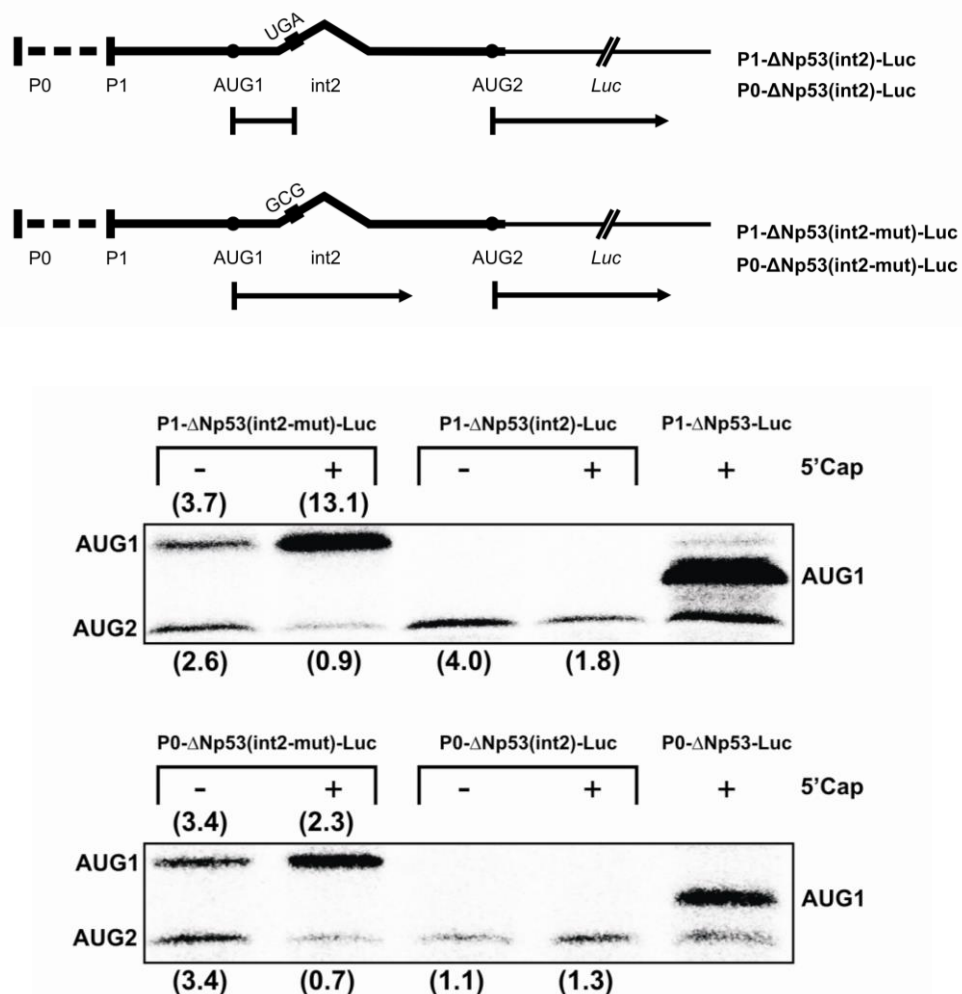
3.2.1.2. Wpływ regionu terminalnego 5' mRNA p53 z zachowanym intronem 2 na wydajność translacji

Oprócz w pełni dojrzałego mRNA p53, w kilku liniach komórek ludzkich zidentyfikowano również transkrypt p53(EII), w którym na skutek alternatywnego składania pre-mRNA p53 został zachowany intron 2 [13]. Analiza PCR w czasie rzeczywistym pokazała, że ilość transkryptu zawierającego intron 2 jest w komórkach dużo niższa, w porównaniu z ilością dojrzałego mRNA p53. Ponadto wykazano, że transkrypt p53(EII) związany był z polirybosomami co oznacza, że może powstawać z niego białko. Ponieważ w intronie 2 znajduje się kodon terminacyjny UGA zgodny z ramką odczytu dla białka p53 oraz poprzedza on kodon AUG2, to z takiego mRNA może powstawać jedynie izoforma Δ Np53. Zaproponowany został mechanizm generowania izoformy Δ Np53 z transkryptu z zachowanym intronem 2, według którego po zsyntetyzowaniu 25-aminokwasowego peptydu z kodonu AUG1, wznowiany był proces translacji z kodonu AUG2 (Rys. 20). W celu określenia wydajności translacyjnej regionu terminalnego 5' zawierającego intron 2, przeprowadziłam reakcję translacji *in vitro* w RRL z wykorzystaniem modelowych mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc oraz P0- Δ Np53(int2)-Luc (Rys. 22, warianty E i F). Z obu mRNA powstawało jedynie białko reporterowe, którego translacja inicjowana była z kodonu AUG2. W porównaniu z mRNA kontrolnym, poziom białka syntetyzowanego z mRNA zawierających intron 2 wynosił około 1%. Podobna ilość białka generowana była z kodonu AUG2 z mRNA P1- Δ Np53-Luc i P0- Δ Np53-Luc, nie zawierających intronu 2.

3.2.1.2.1. Aktywność translacyjna kodonu AUG1 w mRNA ze zmutowanym kodonem STOP w intronie 2

Aby sprawdzić, czy kodon AUG1 w transkryptach z intronem 2 jest również aktywny translacyjnie i inicjowana jest z niego synteza 25-aminokwasowego peptydu, postanowiłam zmutować kodon terminacyjny znajdujący w obrębie intronu 2. Na drodze ukierunkowanej mutagenезy konstruktów dsDNA P1- Δ Np53(int2)-Luc oraz P0- Δ Np53(int2)-Luc, uzyskałam pochodne konstrukty P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc oraz P0- Δ Np53(int2-mut)-Luc, w których kodon UGA zastąpiony był kodonem GCG, kodującym alaninę (Rys. 23). Następnie w reakcji transkrypcji *in vitro* otrzymałam mRNA ze zmutowanym kodonem STOP, które różniły się obecnością kapu na końcu 5'. W reakcjach kontrolnych wykorzystywałam mRNA z niezmutowanym kodonem terminacyjnym oraz mRNA, które nie zawierały intronu 2.

W reakcjach translacji *in vitro* z wykorzystaniem mRNA posiadających mutację UGA/GCG, oprócz białka lucyferazy powstawał produkt białkowy reprezentowany przez wolniej migrujący prążek w żelu. Wolniejsza migracja tego produktu, w porównaniu z białkiem fuzyjnym syntetyzowanym z mRNA bez intronu 2 (mRNA P1-ΔNp53-Luc), dowodzi że translacja inicjowana jest z kodonu AUG1. Na skutek zastąpienia kodonu UGA kodonem GCG, nie dochodziło do terminacji translacji, wobec czego proces inicjowany z kodonu AUG1 był kontynuowany do momentu napotkania kodonu STOP na końcu mRNA. W konsekwencji, białko było dłuższe o fragment odpowiadający sekwencji kodującej intron 2.



Rys. 23 Efekt mutacji kodonu STOP znajdującego się w obrębie intronu 2 na poziom translacji *in vitro* inicjowanej z kodonu AUG2. W konstrukcjach P1-ΔNp53(int2)-Luc i P0-ΔNp53(int2)-Luc kodon STOP UGA zastąpiono kodonem GCG. Autoradiogramy przedstawiają poziom syntezy białek inicjowanej z kodonów AUG1 i AUG2.

W przypadku mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc nie posiadającego kapu na końcu 5', oba białka były syntetyzowane w stosunku 1:1. Jednakże, brak kodonu STOP i związana z tym translacja z kodonu AUG1, nieznacznie obniżyły poziom białka z kodonu AUG2 z 4,0 do 2,6 (wartości znormalizowane w stosunku do translacji kontrolnego mRNA Luc). Z kolei, obecność analogu kapu na końcu 5' spowodowała wzrost efektywności translacji z kodonu AUG1, czemu towarzyszył silny spadek syntezy białka z kodonu AUG2 do poziomu 0,9. Ilość białka powstającego z kodonu AUG2 była mniejsza również w przypadku kapowanego mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc. Sugeruje to, że również w tych konstrukcjach kodon AUG1 jest aktywny translacyjnie. Podobne wyniki otrzymałam dla konstruktu P0- Δ Np53(int2-mut)-Luc. Tak jak poprzednio, z mRNA nie posiadającego kapu na końcu 5' ilość powstających białek z kodonów AUG1 i AUG2 była taka sama. Natomiast dodanie kapu do mRNA doprowadziło do stymulacji translacji z kodonu AUG1 oraz drastycznie obniżyło poziom białka z kodonu AUG2. Sugeruje to, że translacja z modelowych mRNA zawierających intron 2 jest inicjowana z obu kodonów AUG1 i AUG2 według mechanizmu zależnego od kapu na ich końcu 5'.

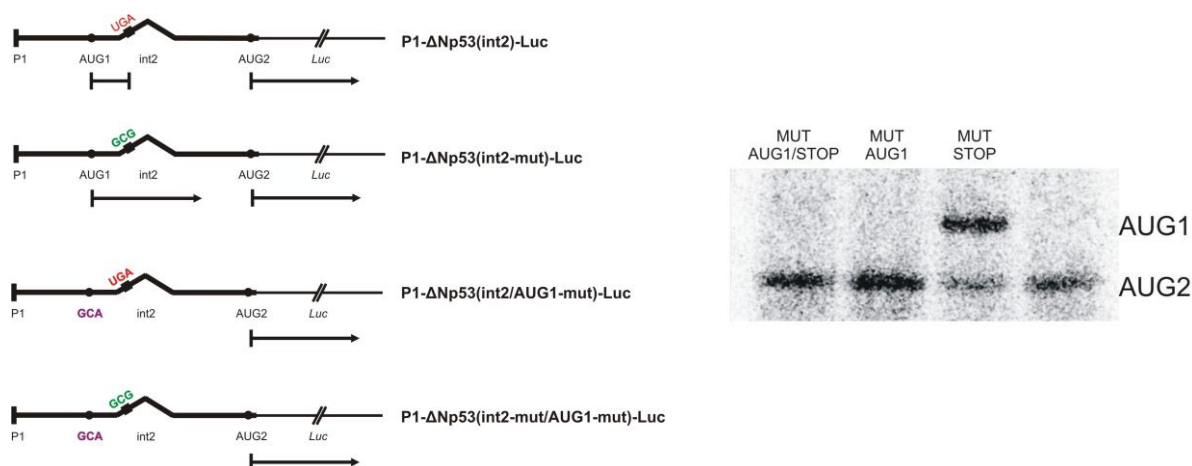
Wydłużenie mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc o region P0-P1 nie wpływało na poziom translacji z mRNA bez kapu na końcu 5'. Podobny wynik otrzymałam dla mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc i P0- Δ Np53(int2)-Luc. Inhibujący wpływ regionu P0-P1 zaobserwowałam jedynie dla mRNA P0- Δ Np53(int2)-Luc, lecz dopiero wtedy gdy matrycę w reakcji translacji stanowił mRNA z kapem na końcu 5'. Zmniejszoną ilość białka obserwowano tylko w przypadku translacji inicjowanej z kodonu AUG1. Sugeruje to, że struktura drugorzędowa regionu P0-P1 może utrudniać proces skanowania mRNA przez rybosom, w poszukiwaniu tego kodonu inicjacyjnego.

3.2.1.2.2. Rola uORF w wariacie regionu terminalnego 5' mRNA p53 z zachowanym intronem 2, w inicjacji translacji z kodonu AUG2

Regiony terminalne 5' niektórych mRNA zawierają dodatkowe kodony AUG, które mogą tworzyć krótkie otwarte ramki odczytu tzw. uORF (ang. *upstream open reading frames*) powyżej głównej ramki odczytu. Obecność uORF jest charakterystyczna dla frakcji mRNA posiadających długie regiony terminalne 5' oraz sekwencje intronowe, zachowane w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA [145]. Analiza transkryptomu ujawniła, że około 30-40% wszystkich mRNA posiada uORF, które poprzedzają główną ramkę odczytu [146; 147]. Gdy znajdują się one blisko końca 5' mRNA, uczestniczą w tzw. mechanizmie

reinicjacji translacji, który polega na syntezie peptydu kodowanego przez uORF, a następnie pełnej długości białka, ze znajdującej się poniżej w sekwencji mRNA głównej ramki odczytu. Uważa się, że rola uORF polega na hamowaniu translacji białka pełnej długości. Ghosh i współpracownicy [13] opisali alternatywny mechanizm powstawania izoformy Δ Np53 z transkryptu p53(EII) z zachowanym intronem 2. Zakłada on, że po syntezie krótkiego peptydu i oddysocjowaniu dużej podjednostki rybosomalnej w obrębie kodonu STOP, który znajduje się w intronie 2, mała podjednostka rybosomalna pozostaje związana z mRNA i translacja reinicjowana jest z kolejnego kodonu inicjacyjnego AUG2 (Rys. 6).

Wcześniejsze doświadczenia z mRNA ze zmutowanym kodonem terminacyjnym pokazały, że kodon AUG1 jest aktywny translacyjnie. Postanowiłam zatem sprawdzić czy w wyniku translacji inicjowanej z kodonu AUG1 może obniżyć się poziom białka, powstającego z kodonu AUG2. W tym celu kodon inicjacyjny AUG1 w mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc oraz P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc zastępowałam kodonem GCA dla alaniny. Na rysunku 24 schematycznie przedstawione są matrycowe mRNA, które testowałam w reakcji translacji w RRL.



Rys. 24 Translacja *in vitro* mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc ze zmutowanym kodonem AUG1. W reakcjach kontrolnych translacji poddano również mRNA niezmutowany, P1- Δ Np53(int2)-Luc oraz mRNA z mutacją kodonu STOP, a także mRNA zawierający oba zmutowane kodony AUG1 i STOP.

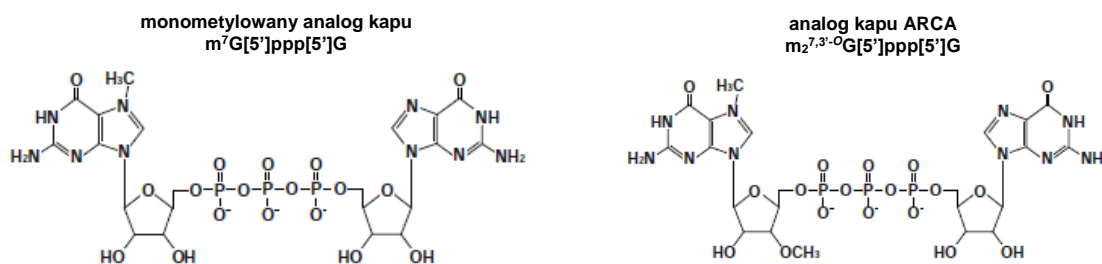
W reakcjach, w których translacji ulegały mRNA z mutacją AUG1/GCA syntetyzowane było tylko białko lucyferazy z kodonu AUG2, o czym świadczy brak górnego prążka na autoradiogramie, który był obecny w reakcji translacji mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc ze zmutowanym kodonem STOP. W przypadku niezmutowanego mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc, syntetyzowane było również tylko białko lucyferazy. W przypadku obu wariantów ze zmutowanym kodonem AUG1, ilość białka powstającego z kodonu AUG2 wzrosła w porównaniu z mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc oraz mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc. Sugeruje to, że translacja uORF, kodującej 25-aminokwasowy peptyd ma wpływ na poziom białka lucyferazy syntetyzowanej z kodonu AUG2.

3.2.2. Translacja inicjowana z kodonów AUG1 i AUG2 w modelowym mRNA P1- Δ Np53-Luc

3.2.2.1. Wpływ kapu na końcu 5' mRNA na aktywność translacyjną wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53

W kolejnym etapie moich badań postanowiłam sprawdzić w jaki sposób obecność kapu wpływa na wydajność translacji inicjowanej z kodonu AUG1 dla białka p53 i AUG2 dla izoformy Δ Np53.

Modelowe mRNA zawierające warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 (Rys. 21) z kapem na końcu 5', otrzymywałam w reakcji transkrypcji *in vitro* w obecności analogu kapu i obniżonego stężenia GTP. Syntetyczny analog kapu jest dinukleotydem guanozynowym, w którym jedna reszta guanozyny posiada grupę metylową w pozycji N7 zasady azotowej (Rys. 25). Obecność grup 3'OH w resztach rybozy powoduje, że nawet połowa mRNA, otrzymywanego w reakcji transkrypcji *in vitro* posiada kap na końcu 5' w odwrotnej orientacji [148]. Wówczas, reszta guanozyny na końcu 5' nie posiada grupy metylowej w pozycji N7, przez co nie może być wiązana przez czynnik eIF4E i w konsekwencji prowadzi to do obniżenia wydajności translacji mRNA. Aby uzyskać mRNA z kapem w odpowiedniej orientacji, zastosowałam analog kapu o nazwie ARCA (ang. *anti-reverse cap analog*) (Rys. 25). W analogu tym, jedna z grup OH w pozycji C3' rybozy zastąpiona jest metylowana, przez co niemożliwe jest utworzenie wiązania fosfodiesterowego z kolejnym nukleotydem.

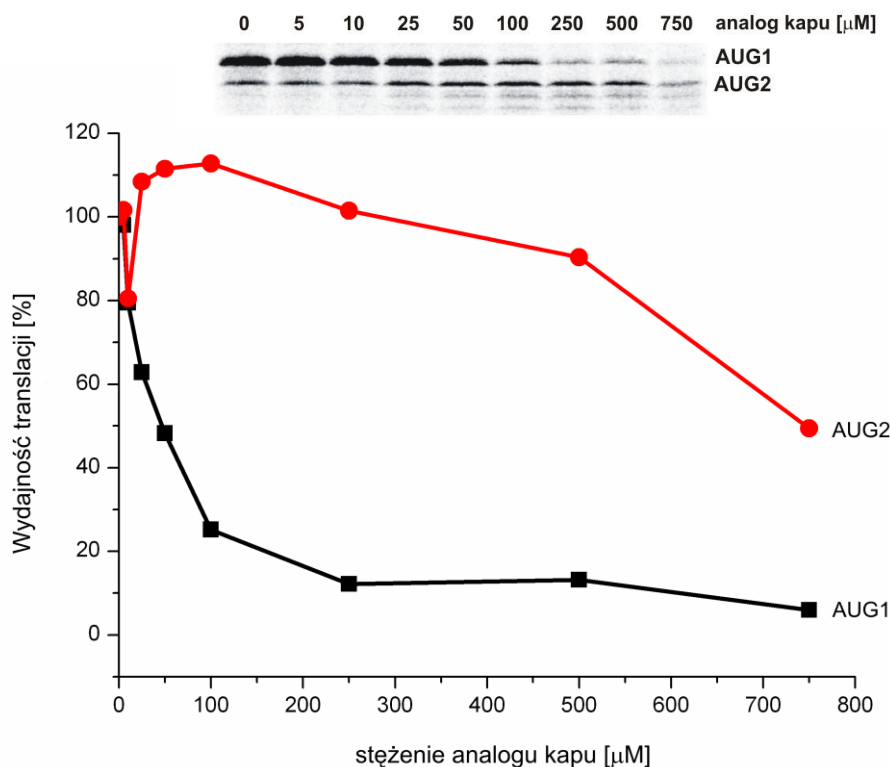


Rys. 25 Analogi kapu stosowane w transkrypcji *in vitro* w celu otrzymania mRNA kapowanego na końcu 5'.

Na rysunku 22A przedstawiłam wyniki translacji *in vitro* w RRL, w których matrycę stanowiły modelowe mRNA kapowane na końcu 5'. W przypadku mRNA P1-p53-Luc i P0-p53-Luc, w których kodon AUG1 jest jedynym kodonem inicjacyjnym, translacja wzrosła odpowiednio z 19,5% i 2,1% do 67,5% i 9,8%, w porównaniu do translacji kontrolnego mRNA Luc. Translacja zachodziła również wydajniej z kodonu AUG1 w mRNA P1-ΔNp53-Luc, który posiada oba kodony AUG1 i AUG2. Otrzymany wynik pozwala przypuszczać, że translacja inicjowana z kodonu AUG1 dla białka p53 jest zależna od obecności kapu na końcu 5' mRNA. Nieoczekiwanie, dodanie kapu do mRNA P0-ΔNp53-Luc nie zmieniło ilości syntetyzowanego białka z kodonu AUG1. Prawdopodobnie, jest to spowodowane inhibującym wpływem regionu P0-P1 na proces translacji. Co ciekawe, obecność kapu nie wpłynęła również na poziom białka z kodonu AUG2, powstającego w reakcji translacji z mRNA P1-ΔNp53-Luc. Wynik ten sugeruje, że translacja inicjowana z kodonu AUG2 zachodzi według mechanizmu niezależnego od kapu. Aczkolwiek, w przypadku kodonu AUG2 w mRNA z regionem P0-P1, po dodaniu kapu do końca 5' mRNA zaobserwowałam niższy poziom białka. Translacja rozpoczynająca się z kodonów AUG2 była również inhibowana w przypadku mRNA zawierających intron 2 (P1-ΔNp53(int2)-Luc i P0-ΔNp53(int2)-Luc) i osiągała poziom zaledwie 0,7% i 0,5%, w odniesieniu do translacji kontrolnego mRNA Luc. Według wcześniejszych informacji literaturowych dotyczących transkryptu p53(EII), translacja z kodonu AUG2 zachodzi prawdopodobnie na drodze reinicjacji, czyli według jednego z mechanizmów inicjacji translacji zależnej od kapu. Możliwe jest, że przyczyną zmniejszonej wydajności translacji z AUG2 po dodaniu kapu do końca 5' mRNA, jest zwiększenie efektywności translacji z kodonu AUG1.

3.2.2.2. Wpływ wolnego analogu kapu na inicjację translacji z kodonów AUG1 i AUG2

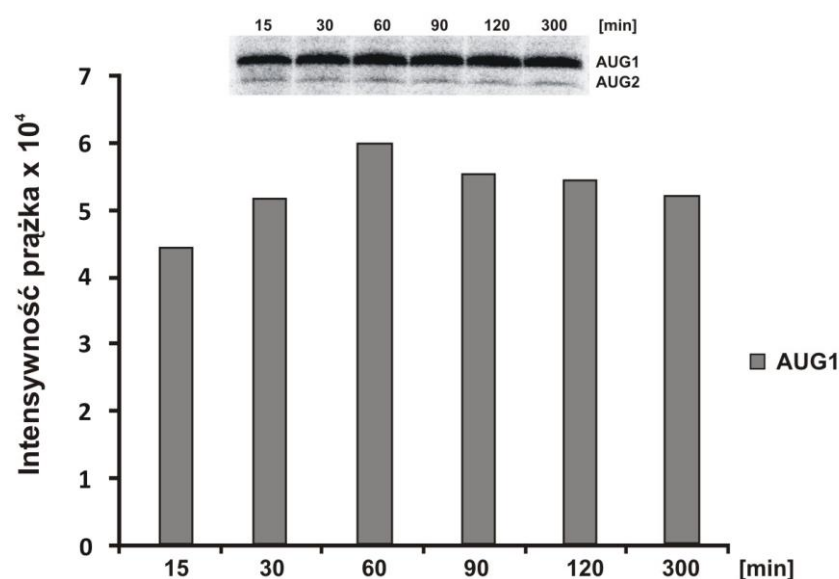
Aby uzyskać więcej informacji na temat mechanizmu inicjacji translacji z kodonów AUG1 i AUG2, przeprowadziłam reakcję translacji w RRL z wykorzystaniem kapowanego mRNA P1- Δ Np53-Luc, w obecności wolnego analogu kapu $m^7G(5')ppp(5')G$ (Rys. 25).



Rys. 26 Analiza ilościowa efektywności translacji kapowanego mRNA P1- Δ Np53-Luc, w obecności wzrastającego stężenia wolnego analogu kapu $m^7G(5')ppp(5')G$.

Zastosowanie w reakcji wolnego analogu kapu ma na celu związanie czynnika eIF4E obecnego w lizacie, tak aby nie mógł on wiązać się do kapu na końcu 5' mRNA. Takie same ilości RRL inkubowałam najpierw z analogiem kapu o wzrastającym stężeniu (0-750 μ M), po czym do każdej próby dodawałam taką samą ilość mRNA P1- Δ Np53-Luc. Następnie określiłam ilość produktów białkowych powstających z obu kodonów, w odniesieniu do reakcji kontrolnej prowadzonej bez dodatku wolnego analogu kapu, a oznaczonej jako stężenie 0 μ M na rysunku 26. Wolny analog kapu powodował inhibicję translacji inicjowanej z kodonu AUG1 już przy 50 μ M stężeniu. Przy 250 μ M stężeniu, ilość białka z AUG1 wynosiła tylko 10% wartości początkowej (bez dodania analogu kapu

do reakcji). Zwiększenie stężenia analogu prowadziło do dalszej inhibicji translacji z kodonu AUG1. W przeciwieństwie do translacji z kodonu AUG1, efektywność translacji inicjowanej z kodonu AUG2 wzrosła już przy 25 μM stężeniu analogu kapu, a przy jego stężeniu 100 μM osiągnęła wartość najwyższą, wynoszącą 110% wartości początkowej. Wyższe stężenie analogu kapu nie powodowało dalszego wzrostu ilości białka syntetyzowanego z AUG2. Przy jego stężeniu 250 μM ilość białka syntetyzowanego kodonu AUG2 była porównywalna do poziomu białka powstającego z kodonu AUG2 przy braku wolnego analogu kapu w reakcji.



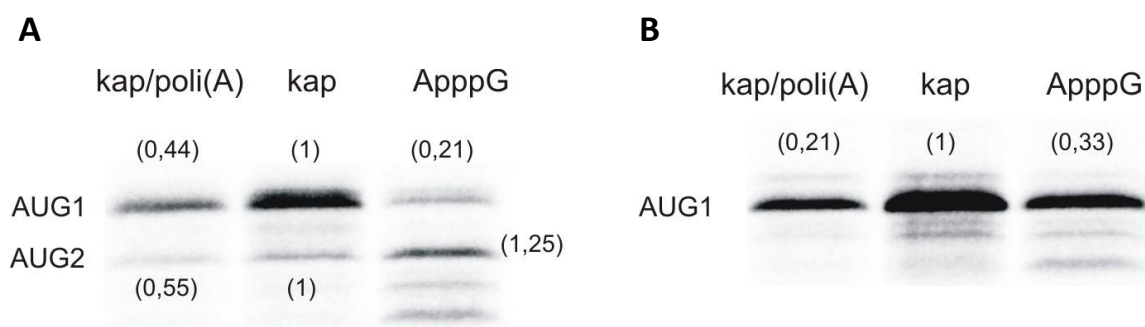
Rys. 27 Stabilność produktu białkowego powstającego w reakcji translacji *in vitro* z kodonu AUG1.

Aby sprawdzić, czy spadek poziomu białka syntetyzowanego z kodonu AUG1 w obecności wolnego analogu kapu nie jest spowodowany degradacją białka w środowisku lizatu, przeprowadziłam inkubację mRNA P1- ΔNp53 -Luc w RRL, wydłużając czas inkubacji (Rys. 27). Ilość białka powstającego z kodonu AUG1 wzrosła do wartości maksymalnej już po godzinnej inkubacji. Następnie, poziom białka zmniejszył się nieznacznie w czasie, jednak po pięciu godzinach ciągle wynosił on 85% wartości maksymalnej.

3.2.2.3. Udział ogona poli(A) w inicjacji translacji z kodonu AUG1 i AUG2

Przełomowe prace na temat stymulującego wpływu kapu i ogona poli(A) na translację mRNA zostały opublikowane w latach '90 przez Gallie'ego [149]. Okazuje się, że translacja większości eukariotycznych mRNA wymaga synergistycznego oddziaływania kapu z ogonem poli(A) na etapie inicjacji. Wykazano również pozytywny wpływ ogona poli(A) na IRES-zależną translację u picornawirusów [150].

Aby dowiedzieć się, czy ogon poli(A) uczestniczy w translacji inicjowanej z kodonów AUG1 i AUG2, za pomocą polimerazy poli(A) dodawałam ogon poli(A) o długości około 100 nukleotydów do końca 3' kapowanych mRNA P1-p53-Luc i P1-ΔNp53-Luc. Reakcję poliadenylacji przeprowadzałam zawsze w takich samych warunkach, aby uzyskać mRNA z ogonem poli(A) o stałej długości. Długość ogona poli(A) sprawdzałam za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym. Otrzymane mRNA posiadające kap na końcu 5' i ogon poli(A) na końcu 3' ulegały translacji w RRL. Doświadczenie obejmowało również reakcje translacji na matrycach mRNA P1-p53-Luc i P1-ΔNp53-Luc z niefunkcyjnym analogiem kapu ApppG wbudowanym na końcu 5', z którym nie wiąże się czynnik inicjacyjny eIF4E (Rys. 28). Wydajność translacji takich mRNA określałam w stosunku do mRNA posiadających funkcjonalny kap na końcu 5'. Zarówno w przypadku mRNA z jednym kodonem AUG1 (mRNA P1-p53-Luc) jak i dwoma kodonami AUG1 i AUG2 (mRNA P1-ΔNp53-Luc), obecność ogonu poli(A) inhibowała translację. Ilość białka syntetyzowanego z kodonu AUG1 w obu mRNA, spadła do poziomu 0,21 i 0,44. Podobny wynik otrzymałam w przypadku kodonu AUG2 w mRNA P1-ΔNp53-Luc, z którego poziom syntetyzowanego białka po dodaniu ogona poli(A) był niższy o około 50%.



Rys. 28 Wpływ ogonu poli(A) na końcu 3' mRNA P1-ΔNp53-Luc (A) i P1-p53-Luc (B) oraz niefunkcyjnego kapu ApppG na końcu 5' na translację *in vitro*. Wartości liczbowe w nawiasach oznaczają stopień inhibicji lub stymulacji reakcji, w porównaniu z poziomem białek otrzymywanych z mRNA z kapem na końcu 5'.

Również niefunkcjonalny kap, ApppG wpływał inhibująco na translację z kodonu AUG1, a jej poziom był porównywalny z efektem dodania do obu mRNA ogona poli(A). Zaskakujący wynik otrzymałam dla kodonu AUG2, z którego translacja była stymulowana po dodaniu niefunkcjonalnego analogu ApppG do końca 5'.

Aby sprawdzić jak ogon poli(A) wpływa na translację mRNA, który nie posiada trwałych termodynamicznie motywów strukturalnych w regionie terminalnym 5' mRNA, przeprowadziłam szereg reakcji translacji w RRL z kontrolnym mRNA Luc, który koduje białko reporterowe lucyferazy. Zastosowałam różne modyfikacje końca 5' i 3' mRNA, polegające na dodaniu kapu i ogona poli(A). Wpływ wszystkich modyfikacji odnosiłam do efektywności translacji mRNA z wbudowanym na końcu 5' funkcjonalnym kapem (Rys. 29).



Rys. 29 Translacja *in vitro* kontrolnego mRNA Luc oraz jego pochodnych posiadających analogi kapu na końcu 5' i ogon poli(A).

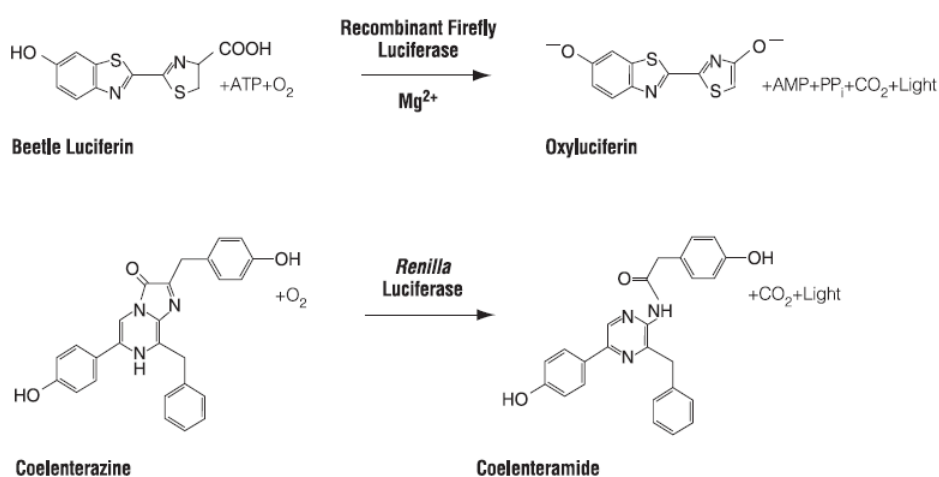
Synteza lucyferazy z mRNA Luc w RRL zachodziła na podobnym poziomie, gdy mRNA nie posiadał kapu na końcu 5' lub gdy był to kap niefunkcjonalny, ApppG. Widoczny jest również inhibujący wpływ ogona poli(A) na translację. Aczkolwiek mRNA Luc, który zawierał zarówno 5' kap jak i 3' poli(A), wykazywał zbliżoną aktywność translacyjną do kontrolnego mRNA z kapem na końcu 5'.

3.2.3. Translacja modelowych mRNA zawierających warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 w komórkach HeLa i MCF-7

Aby dowiedzieć się w jaki sposób warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 wpływają na efektywność translacji białka reporterowego lucyferazy *Renilla* w środowisku komórkowym, komórki raka szyjki macicy HeLa i raka piersi MCF-7 transfekowałam modelowymi konstruktami mRNA. Wszystkie mRNA posiadały kap na końcu 5', aby zwiększyć ich trwałość w komórce i zapobiec przedwczesnej degradacji. Równocześnie

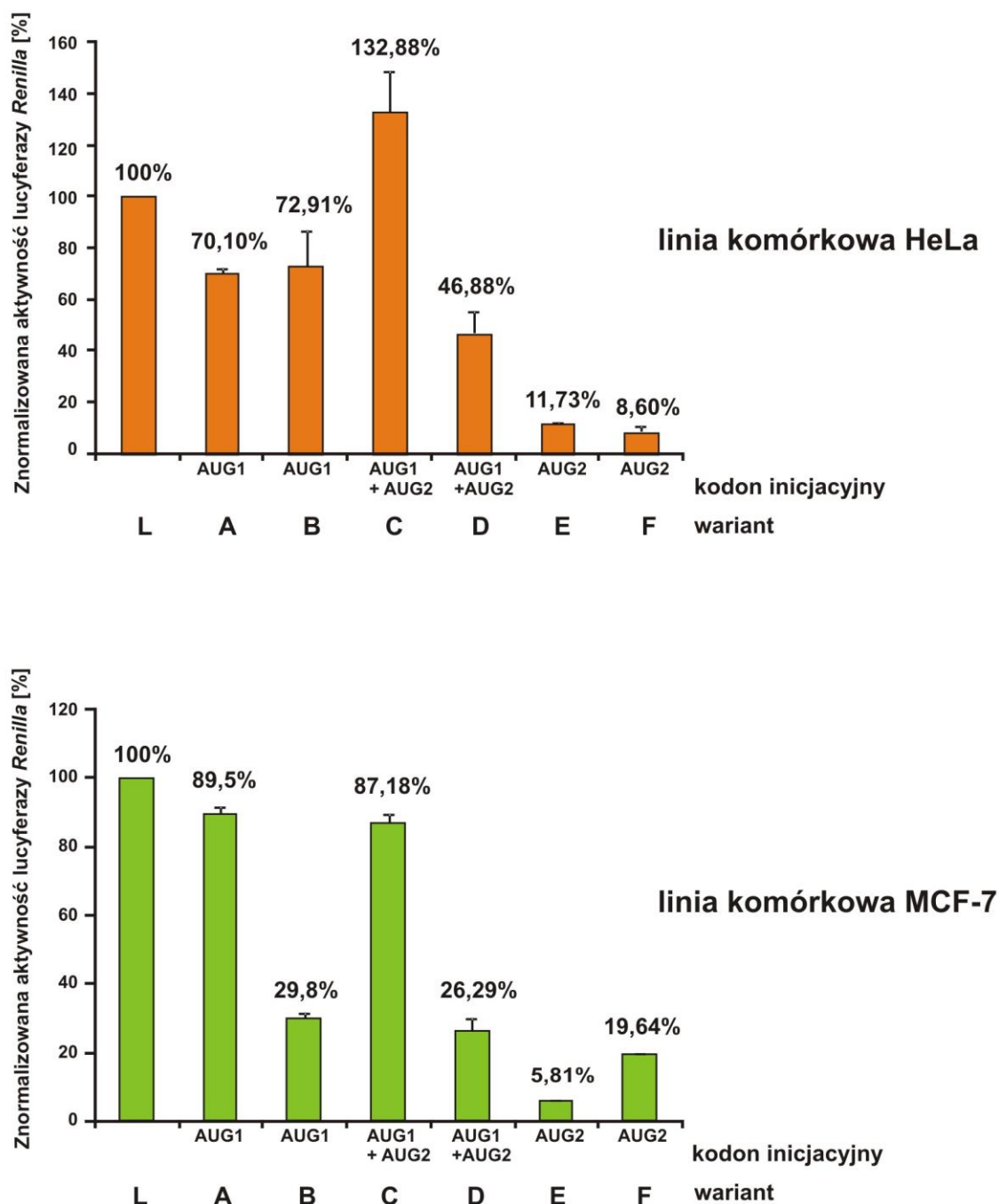
z każdym konstruktem mRNA kodującym lucyferazę *Renilla* (Rluc), wprowadzałam do komórek mRNA lucyferazy *Firefly* (Fluc), posiadający kap na końcu 5' i ogon poli(A) na końcu 3'. Wykorzystanie technologii podwójnego reportera opartej o dwa białka reporterowe, pozwala na normalizację różnic w wydajności transfekcji, która może wynikać ze zmiennej liczby komórek lub warunków transfekcji w kolejnych doświadczeniach.

Obie lucyferazy są enzymami katalizującymi utlenianie lucyferyny, w wyniku czego dochodzi do emisji fali świetlnej (Rys. 30). Jednak ze względu na odmienną strukturę, oba enzymy wykazują inne wymagania względem substratu, dzięki czemu możliwe jest określenie poziomu obydwu lucyferaz podczas jednego pomiaru luminescencji.



Rys. 30 Reakcje chemiluminescencji katalizowane przez enzymy: lucyferazę *Renilla* i *Firefly*.

Gdy komórki obu linii osiągnęły odpowiedni stopień konfluencji, kotransferowałam je równomolowymi ilościami mRNA za pomocą odczynnika TransMessenger (Qiagen). Po określonym czasie (w zakresie kilku godzin), komórki poddawałam lizie i przeprowadzałam pomiar aktywności obu lucyferaz. W tym celu wykorzystałam komercyjny zestaw zawierający substraty dla lucyferazy *Firefly* i *Renilla*. Następnie dokonywałam pomiaru chemiluminescencji. Otrzymane wartości dla lucyferazy *Renilla*, która powstawała pod kontrolą wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53, normalizowałam do wartości otrzymanej dla lucyferazy *Firefly*, która była syntetyzowana z kontrolnego mRNA Fluc. Następnie znormalizowane wartości odnosiłam do poziomu lucyferazy *Renilla* syntetyzowanej z kontrolnego mRNA Rluc.



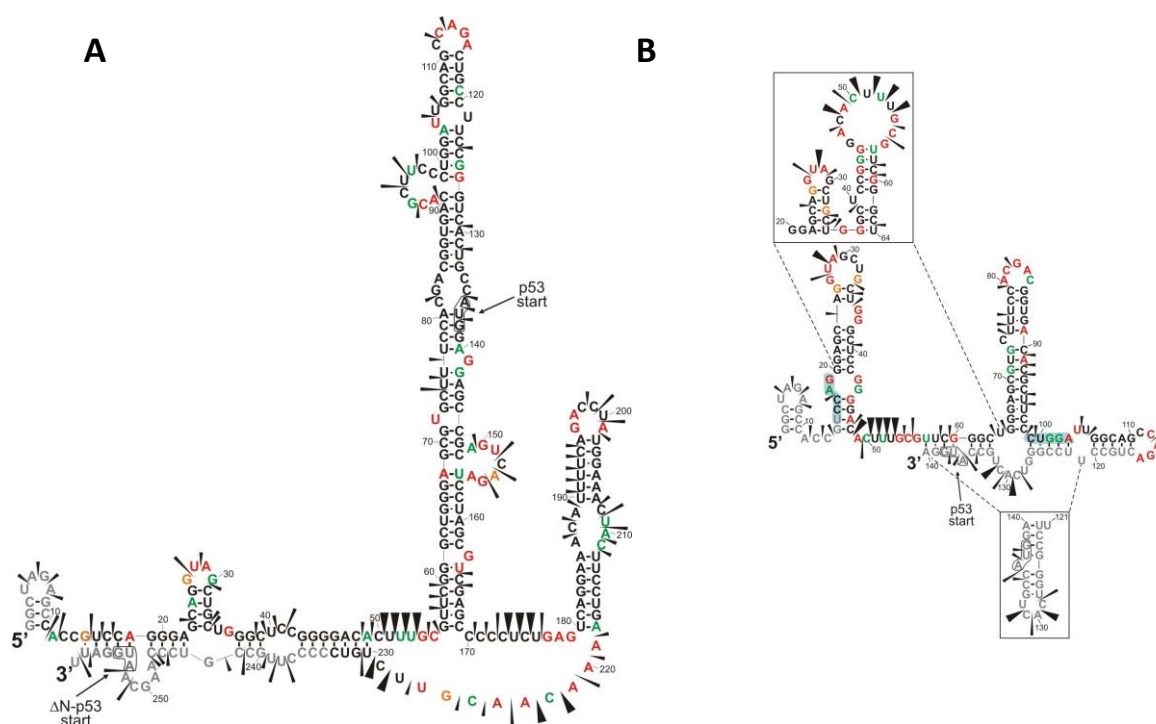
Rys. 31 Poziom białka reporterowego lucyferazy *Renilla* powstającego pod kontrolą wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 w komórkach HeLa i MCF-7.

Diagram na rysunku 31 ilustruje wpływ wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 na poziom białka lucyferazy *Renilla* w komórkach HeLa i MCF-7. W przypadku konstruktów mRNA zawierających jeden kodon inicjacyjny AUG1 (oznaczone jako A i B), ilość powstającego białka była niższa w obu liniach komórkowych, w porównaniu z kontrolnym mRNA Rluc (oznaczonym jako L). Przy czym mRNA P1-p53-Luc

i P0-p53-Luc ulegają translacji na podobnym poziomie w komórkach HeLa. Z kolei, obecność regionu P0-P1 powoduje 3-krotny spadek ilości syntetyzowanego białka w komórkach MCF-7. W przypadku konstruktów mRNA z dwoma kodonami inicjacyjnymi AUG, czyli P1- Δ Np53-Luc i P0- Δ Np53-Luc, rozróżnienie białek powstających z kodonu AUG1 i AUG2 za pomocą pomiaru aktywności lucyferazy było niemożliwe. Z tego powodu, aktywność translacyjna kodonów AUG1 i AUG2 podawana jest sumarycznie (warianty C i D). Wydłużenie mRNA P1- Δ Np53-Luc o region P0-P1 zredukowało ilość powstającego białka 2-krotnie w komórkach HeLa i 3-krotnie w komórkach MCF-7 (oznaczone jako C i D). Najniższą wydajność translacyjną wykazywały mRNA zawierające intron 2 w obrębie regionu terminalnego 5' (warianty E i F). Ilość syntetyzowanej lucyferazy w komórkach HeLa wynosiła około 10%, w stosunku do ilości białka powstającego z kontrolnego mRNA. Natomiast w komórkach MCF-7 obecność intronu 2 obniżała poziom białka lucyferazy do 6% powstającego z mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc i do 20% w przypadku mRNA P0- Δ Np53(int2)-Luc.

3.2.4. Analiza struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w modelowym konstrukcie mRNA kodującym lucyferazę *Renilla*

Struktura drugorzędowa RNA fragmentów mRNA p53, odpowiadających regionom P1-p53 i P1- Δ Np53 została określona w naszym Zakładzie wcześniej, za pomocą metod chemicznych i enzymatycznych [151] (Rys. 32). RNA P1- Δ Np53 składa się z 259 nukleotydów i zawiera pełnej długości region niekodujący 5' do pierwszego kodonu inicjacyjnego AUG1 (5'UTR) oraz część otwartej ramki odczytu pomiędzy dwoma kodonami AUG1 i AUG2. Struktura drugorzędowa tego regionu zostaje utworzona na skutek oddziaływania końca 5' i 3' cząsteczki RNA. Dochodzi wówczas do powstania dwóch charakterystycznych motywów strukturalnych typu spinki. Jednym z nich jest spinka utworzona przez reszty G56-C169, w obrębie której umiejscowiony jest kodon AUG1 dla białka p53. Druga spinka, U180-A218 jest mniejsza i tworzą ją liczne pary A-U, za którą w kierunku 3' mRNA znajduje się region jednoniciowy A219-C229. Z kolei, RNA P1-p53 przyjmuje odmienną strukturę. Fragment ten odpowiada izolowanemu regionowi 5' UTR o długości 140 nukleotydów, zakończonemu kodonem AUG1 i tworzy on kilka motywów typu spinki. Jedynym wspólnym motywem obu fragmentów jest spinka C99-G126, która w RNA P1- Δ Np53 tworzy apikalną część spinki G56-C169.



Rys. 32 Struktura drugorzędowa cząsteczek RNA P1- Δ Np53(A) i P1-p53 (B) [151].

Ponieważ użyte przeze mnie modelowe konstrukty mRNA zawierały znajdującą się poniżej w kierunku 3' sekwencję kodującą białko reporterowe lucyferazy *Renilla*, postanowiłam sprawdzić czy wpływa ona na strukturę regionu terminalnego 5' mRNA p53, w szczególności w transkryptach P1- Δ Np53-Luc i P1-p53-Luc. Do mapowania struktury drugorzędowej RNA zastosowałam metodę SHAPE, modyfikację chemiczną za pomocą siarczanu dimetylu (DMS) oraz metodę cięć indukowanych jonami Pb^{2+} . Metoda SHAPE (ang. *selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) polega na zastosowaniu bezwodnika *N*-metyloizatoicznego (NMIA), który acyluje grupy 2'OH reszt rybozy w regionach jednoniciowych RNA [152]. Modyfikacja przy użyciu siarczanu dimetylu polega na metylacji atomów azotu w pozycji 1 pierścienia adeniny i azotu w pozycji 3 pierścienia cytozyny. Natomiast cięcia indukowane w obecności jonów Pb^{2+} umożliwiają identyfikację reszt znajdujących się w regionach jednoniciowych i regionach o zaburzonej strukturze helikalnej. Chociaż metoda ta nie wykazuje specyficzności względem określonych zasad azotowych, to słabsze cięcia obserwuje się często za resztami guanozyny [153].

Zarówno miejsca cięć w RNA jak i miejsca modyfikacji chemicznej identyfikowałam za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji. W celu identyfikacji reszt modyfikowanych przez

NMIA i DMS w reakcji odwrotnej transkrypcji, stosowałam ten sam starter DNA wyznakowany na końcu 5' czterema różnymi barwnikami fluorescencyjnymi: FAM - dla reakcji kontrolnej bez odczynnika modyfikującego, VIC - dla reakcji modyfikacji, PET i NED - dla reakcji sekwencjonowania z ddA i ddT w przypadku metody SHAPE oraz ddT i ddG dla modyfikacji DMS [154]. Fragmenty cDNA były rozdzielane elektroforetycznie na pojedynczej kapilarze. Uzyskane wyniki analizowałam za pomocą programu komputerowego *ShapeFinder* [155], który pozwala uzyskać znormalizowane wartości, odpowiadające reaktywności poszczególnych reszt nukleotydowych. Na podstawie analizy ilościowej SHAPE i DMS otrzymałam wartości energii swobodnej ΔG (dla każdego nukleotydu w przypadku metody SHAPE i dla nukleotydów A i C w modyfikacji DMS), które następnie wykorzystywałam w funkcji programu *RNAstructure 5.2* w celu wygenerowania modelu struktury drugorzędowej RNA [156].

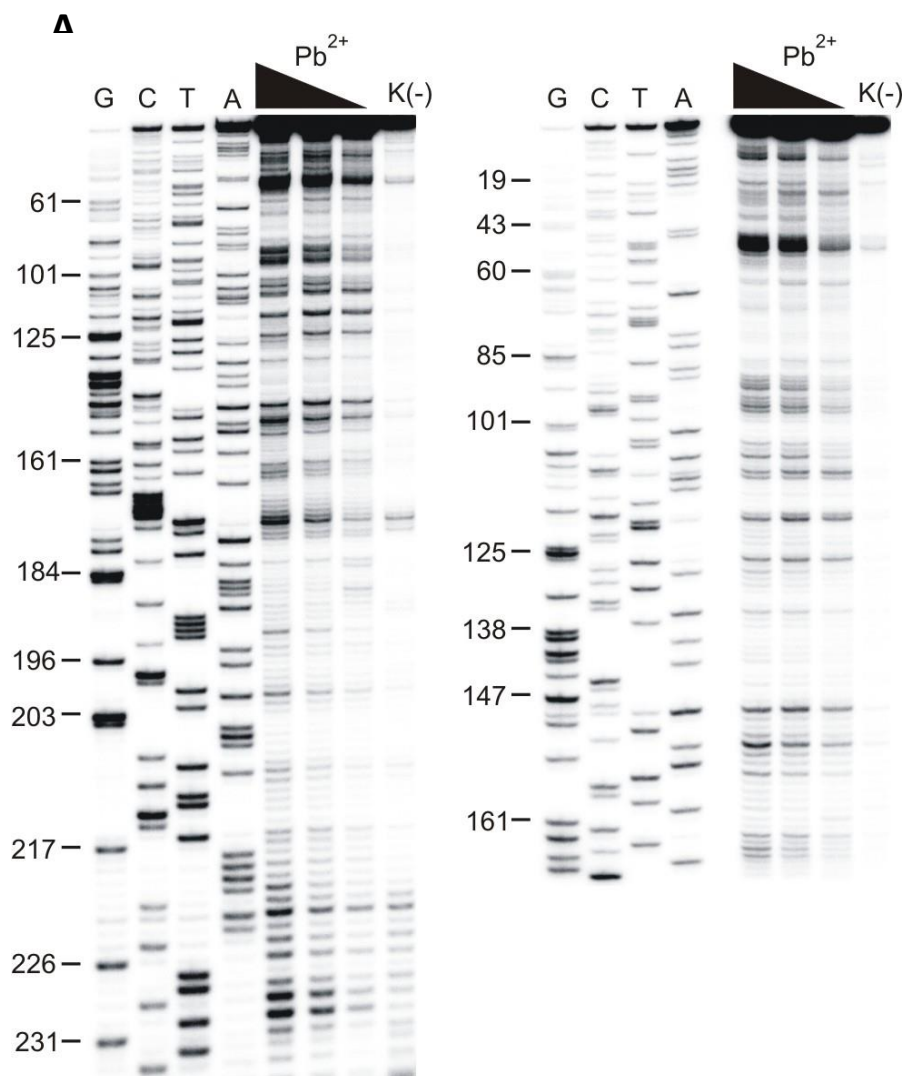
Cięcia indukowane w RNA w obecności jonów Pb^{2+} identyfikowałam również za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji, jednak do tego celu wykorzystywałam starter DNA znakowany na końcu 5' izotopem ^{32}P . Otrzymane fragmenty rozdzielalam w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

3.2.4.1. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA regionu P1- Δ Np53 w modelowym konstrukcie mRNA P1- Δ Np53-Luc w warunkach *in vitro*

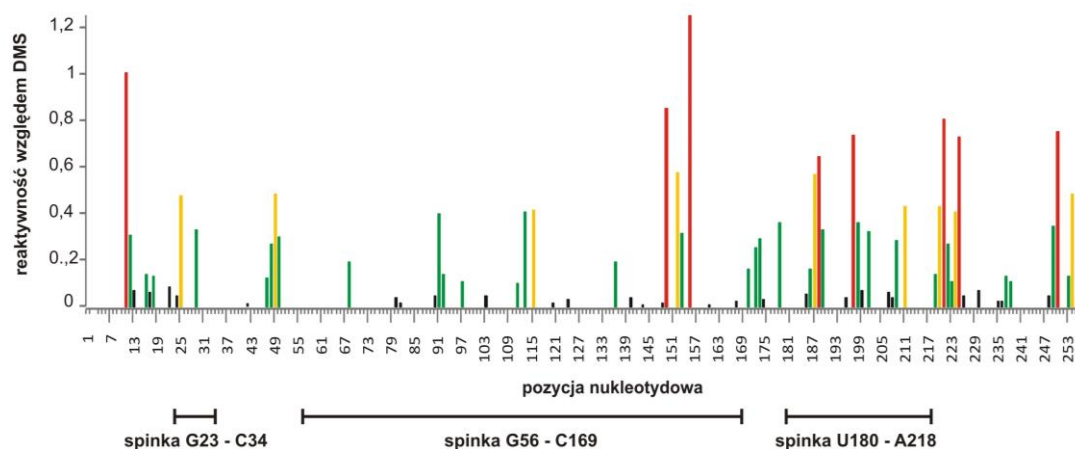
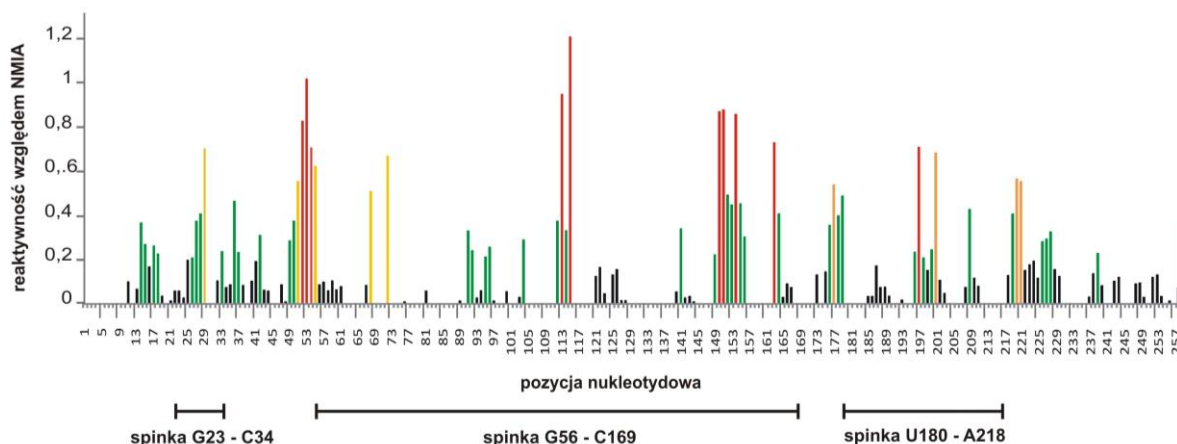
Na rysunku 33 przedstawiona jest struktura drugorzędowa regionu P1- Δ Np53 w konstrukcie mRNA zawierającym otwartą ramkę odczytu dla lucyferazy *Renilla*. Model struktury drugorzędowej został wygenerowany przez program *RNAstructure* z uwzględnieniem danych mapowania struktury, otrzymanych za pomocą metody SHAPE i modyfikacji DMS. Cięcia indukowane jonami Pb^{2+} naniosłam na model struktury drugorzędowej, po określeniu względnej intensywności cięć w odniesieniu do reakcji kontrolnej K(-).

Struktura drugorzędowa RNA regionu P1- Δ Np53 w konstrukcie z sekwencją kodującą lucyferazę jest wysoce zgodna ze strukturą izolowanego regionu P1- Δ Np53. Świadczy o tym obecność charakterystycznych motywów strukturalnych typu spinki G56-C169 i U180-A218. Zarówno DMS jak i NMIA modyfikowały jednonukleotydowe wybrzuszenia, reszty nukleotydowe w obrębie jedno- i dwustronnych wybrzuszeń oraz pętli apikalnych obu spinek. Za pomocą modyfikacji chemicznej dobrze określone zostały również regiony jednoniciowe

A49-G54 oraz A219-U227. Także kilka reszt w regionie C170-G179 było modyfikowanych przez NMIA. Obecna jest również mniejsza spinka G23-C34, o czym świadczą modyfikacje w pozycjach A25-A29. W regionach jednoniciowych indukowane są także cięcia RNA w obecności jonów Pb^{2+} . Szczególnie silne cięcia obserwowane są w obrębie reszt U50-U53, które cechują się także wysoką reaktywnością wobec NMIA. Do przecinania wiązań fosfodiesterowych dochodziło także w regionie C170-U176, w którym praktycznie nie występowały modyfikacje chemiczne. Cięcia o zróżnicowanej sile występowały w najdłuższym regionie jednoniciowym A219-C229. Za pomocą jonów Pb^{2+} dobrze określone zostały także regiony jednoniciowe w spince G56-C169. Jony Pb^{2+} słabo rozpoznawały reszty w obrębie pętli apikalnych obu spinek, prawdopodobnie ze względu na obecność reszt purynowych. Ponadto, jony Pb^{2+} indukowały słabe cięcia w regionach dwuniciowych u podstawy spinki G56-C169 oraz w obrębie spinki U180-A218.



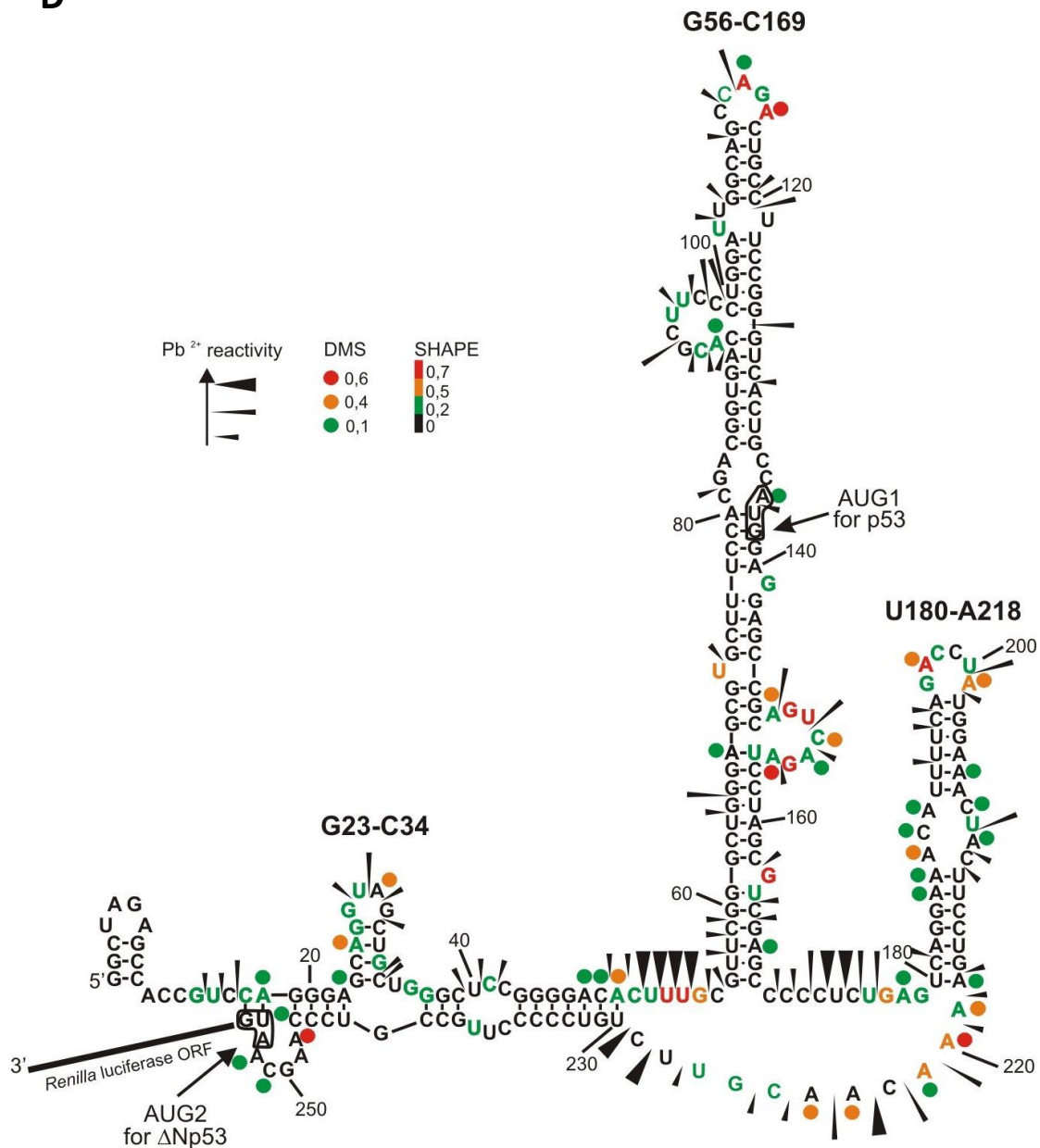
Rys. 33 A - Autoradiogramy przedstawiają rozkład cięć indukowanych jonami Pb^{2+} w RNA P1- Δ Np53-Luc, analizowanych za pomocą reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanym starterem hybrydującym poniżej kodonu AUG2 w obrębie sekwencji kodującej lucyferazę *Renilla*. K(-) - reakcja kontrolna, G, C, T, A - reakcje sekwencjonowania. Po lewej stronie długiego i krótkiego biegu elektroforetycznego zaznaczone są wybrane reszty guanozyny. Stężenie jonów Pb^{2+} w reakcjach wynosiło 1, 0,5 i 0,25 mM.

B**C**

Rys. 33 B - Histogram przedstawia znormalizowane reaktywności względem DMS. Modyfikacje reszt nukleotydowych identyfikowano w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem znakowanym fluorescencyjnie. Kolor słupków jest zgodny z legendą na panelu D.

C - znormalizowane reaktywności SHAPE w zależności od reszty nukleotydowej. Miejsca modyfikacji określano na podstawie wyników elektroforezy kapilarnej produktów cDNA znakowanych fluorescencyjnie. Kolor słupków odpowiada legendzie na panelu D.

D

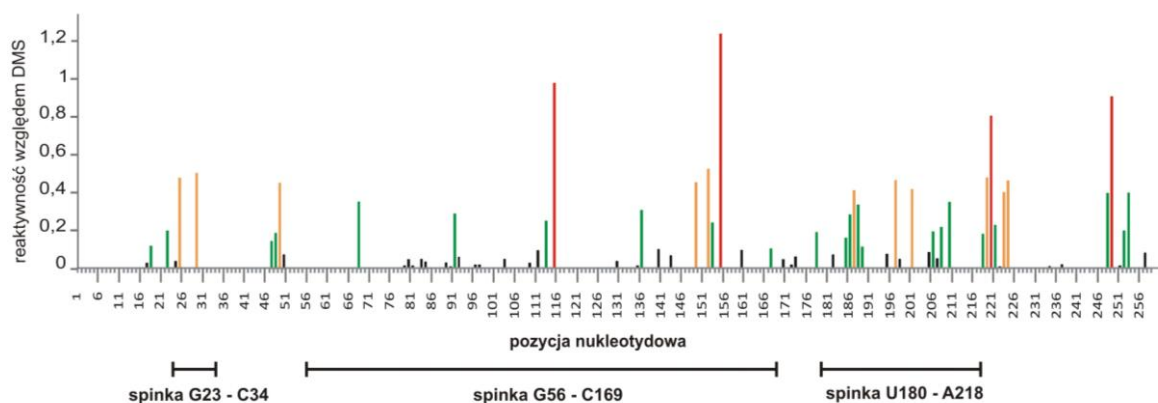


Rys. 33 D - model struktury drugorzędowej regionu P1-ΔNp53 w konstrukcie mRNA z lucyferazą *Renilla*, wygenerowany przez program *RNAstructure* z uwzględnieniem więzów strukturalnych, pochodzących z analizy SHAPE. Na modelu struktury zaznaczono miejsca modyfikacji i cięcia z uwzględnieniem kolorów opisanych w legendzie. Kolor nukleotydów oznacza intensywność modyfikacji SHAPE. Modyfikacje DMS oznaczone są kółkami. Cięcia w obecności jonów Pb²⁺ zaznaczone są na strukturze za pomocą strzałek.

3.2.4.1.1. Analiza struktury drugorzędowej regionu P1- Δ Np53 w modelowym konstrukcie mRNA w lizacie z króliczych retikulocytów za pomocą siarczanu dimetylu

Większość testów funkcjonalnych z wykorzystaniem modelowych mRNA przeprowadzałam w RRL. Z tego względu postanowiłam sprawdzić czy w tych warunkach struktura drugorzędowa RNA regionu P1- Δ Np53 w konstrukcie mRNA P1- Δ Np53-Luc zostaje zachowana. Uzyskanie informacji na temat aranżacji strukturalnej tego regionu w RRL było bardzo ważne, szczególnie w kontekście analizy tworzenia się kompleksów rybosomalnych na mRNA P1- Δ Np53-Luc, a także przy projektowaniu oligonukleotydów antysensowych w celu modulacji translacji inicjowanej z AUG1 i AUG2 (rozdział 3.4.). Strukturę drugorzędową regionu P1- Δ Np53 w warunkach RRL analizowałam za pomocą modyfikacji chemicznej siarczanem dimetylu (DMS). Metodę tą wybrałam ponieważ, stosuje się ją również do mapowania struktury RNA *in vivo* [157].

Wyniki otrzymane z mapowania struktury drugorzędowej regionu P1- Δ Np53 w konstrukcie mRNA z otwartą ramką odczytu dla lucyferazy w warunkach lizatu, dobrze korespondują z modelem struktury tego regionu, otrzymanym na podstawie badań *in vitro*. W warunkach lizatu dobrze rozpoznane przez DMS zostały reszty nukleotydowe w obrębie pętli apikalnych, jedno- i dwustronnych wybrzuszeń oraz dłuższych odcinków jednoniciowych (Rys. 34). Reszty nukleotydowe o największej reaktywności to: jednostronne wybrzuszenie w dolnej części spinki G56-C169, dwustronne wybrzuszenie i pętla apikalna w spince U180-A218 oraz jednoniciowy fragment A219-C229. Siarczan dimetylu modyfikował również pierwszy nukleotyd zarówno w kodonie AUG1 jak i AUG2, co wskazuje, że znajdują się one częściowo w regionach niesparowanych. Co więcej, metylowane są reszty C170-C173, które w warunkach *in vitro* nie były rozpoznawane przez DMS. Ogólny rozkład modyfikacji jest bardzo podobny w RRL i w warunkach *in vitro*, jednak występuje także kilka różnic, które dotyczą przede wszystkim zmiany względnej reaktywności nukleotydów. Na przykład reszty A113, A115 są silnie modyfikowane przez DMS *in vitro*, natomiast w RRL wykazują już mniejszą reaktywność. Prawdopodobnie, różnice te związane są z oddziaływaniem z białkami obecnymi w RRL, które mogą wiązać się do mRNA i w ten sposób ograniczać dostępność niektórych reszt dla DMS. Jednakże, najważniejsze elementy strukturalne regionu P1- Δ Np53 zostają zachowane w RRL. Można również stwierdzić, że w tych warunkach sekwencja kodująca lucyferazę znajdująca się poniżej w kierunku 3', nie wpływa zasadniczo na sposób związania się tego regionu.



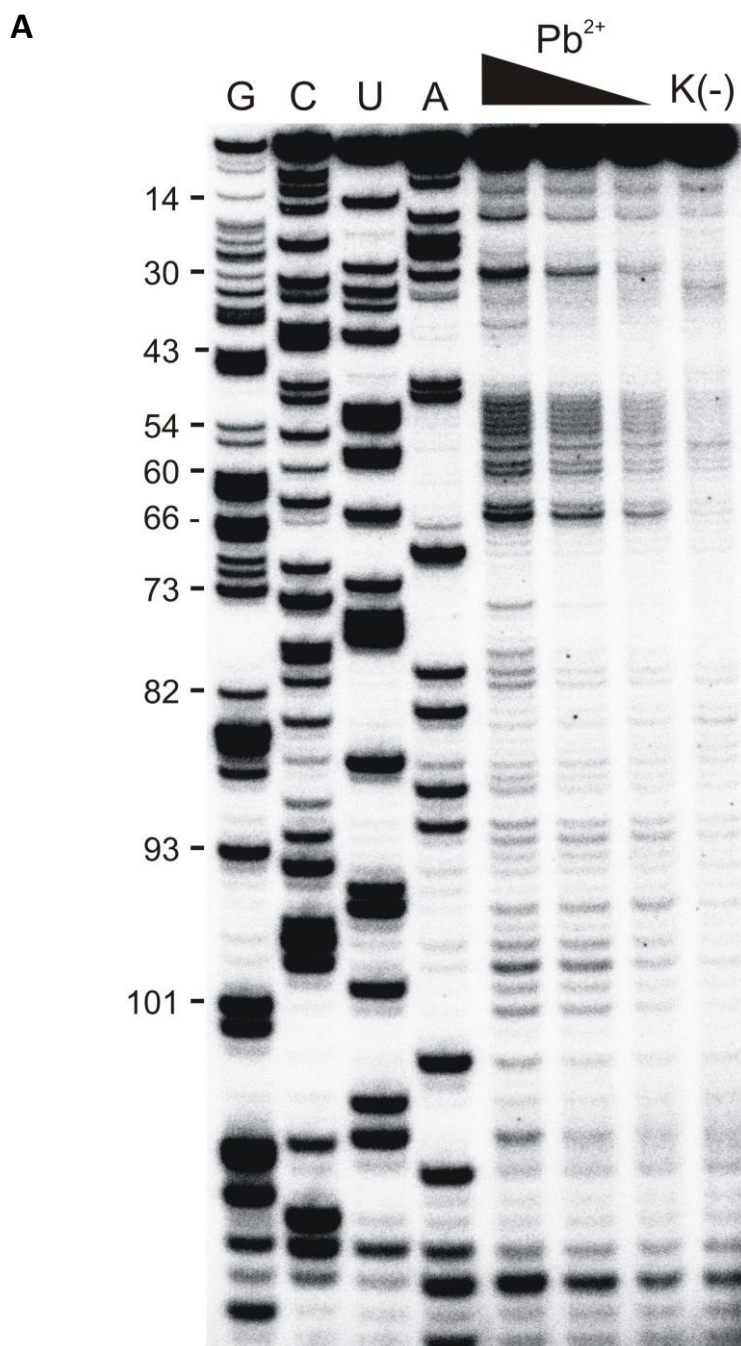
Rys. 34 Analiza struktury drugorzędowej regionu P1- Δ Np53 w modelowym konstrukcie mRNA w RRL. A - Histogram przedstawia reaktywność reszt nukleotydowych modyfikowanych przez DMS. B - model struktury drugorzędowej RNA P1- Δ Np53 wygenerowany przez program *RNAstructure* z naniesionymi miejscami modyfikacji DMS.

3.2.4.2. Struktura drugorzędowa regionu P1-p53 w modelowym konstrukcie mRNA P1-p53-Luc

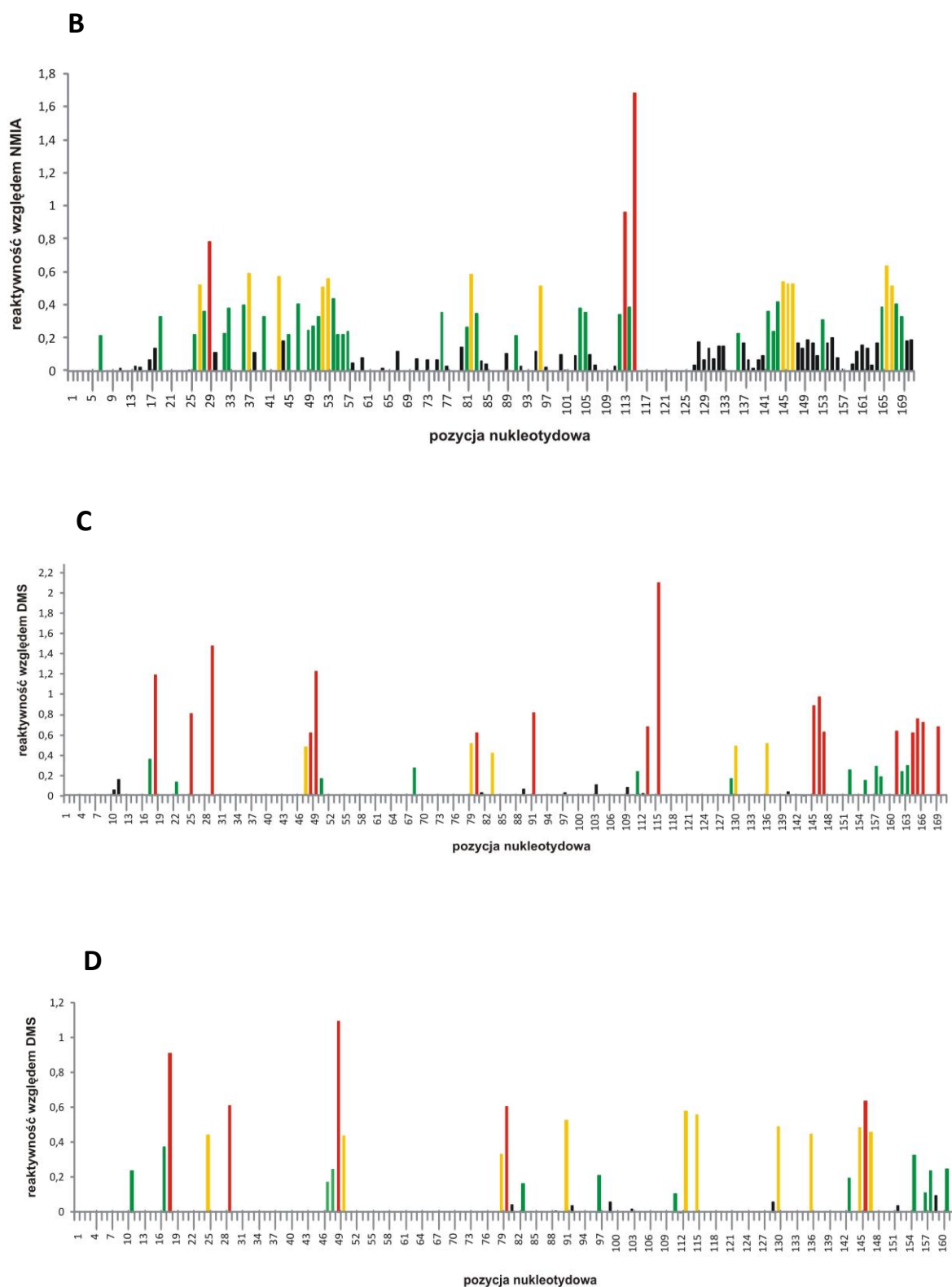
W kolejnym etapie badań postanowiłam zbadać strukturę drugorzędową regionu P1-p53, który posiada tylko kodon AUG1, w używanym konstrukcie mRNA P1-p53-Luc. Strukturę RNA mapowałam zarówno *in vitro* jak i w RRL, stosując tak jak poprzednio metodę SHAPE, modyfikację chemiczną DMS i metodę cięć indukowanych jonami Pb^{2+} . Modyfikacje chemiczne reszt nukleotydowych analizowałam stosując reakcję odwrotnej transkrypcji ze znakowanym fluorescencyjnie starterem DNA oraz rozdział fragmentów cDNA za pomocą wysokorozdzielczej elektroforezy kapilarnej. Natomiast cięcia indukowane w obecności jonów Pb^{2+} identyfikowałam, stosując radioaktywnie znakowany starter DNA w reakcji odwrotnej transkrypcji, a następnie autoradiografię produktów cDNA po rozdziale w żelu poliakrylamidowym.

Na rysunku 35 pokazany został model struktury drugorzędowej regionu P1-p53 wygenerowany przez program *RNAstructure* z uwzględnieniem wyników modyfikacji SHAPE. Następnie, na model ten naniosłam wyniki otrzymane z mapowania struktury pozostałymi metodami. Zarówno odczynnik NMIA jak i DMS, dobrze rozpoznawały pętle apikalne w obrębie utworzonych motywów typu spinki. Odczynnik NMIA modyfikował również niektóre nukleotydy w parach A-U, zlokalizowane w regionach dwuniciowych, na przykład pary w pozycjach 22-40, 15-45 czy 75-89, co może świadczyć o niskiej energii

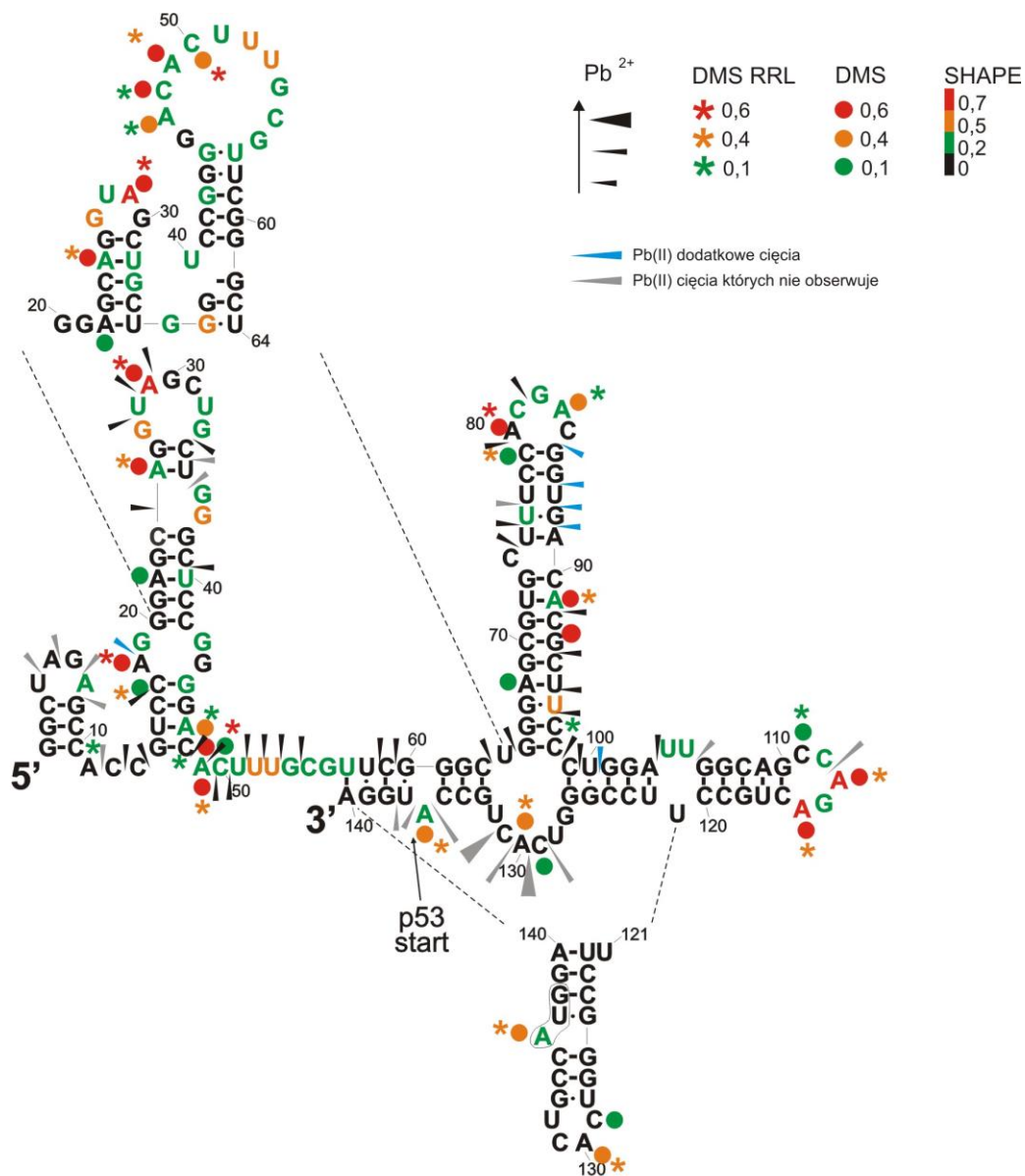
stabilizacji utworzonych elementów strukturalnych. Reaktywne względem NMIA były także nukleotydy tworzące jednostronne wybrzuszenia, a także w niestandardowych parach U·G, w pozycjach 67-96 i 76-88. Jednoniciowy region składający się z reszt A48-U57, który w alternatywnej strukturze wygenerowanej przez *RNAstructure* tworzy dużą pętlę apikalną został zmapowany jako dostępny za pomocą wszystkich stosowanych metod. Ponadto, wszystkie reszty modyfikowane przez DMS w warunkach *in vitro* były także modyfikowane w RRL. Zmieniała się tylko ich reaktywność względem tego odczynnika. Z podobną sytuacją miałam do czynienia w przypadku modyfikacji DMS konstruktu mRNA P1-ΔNp53-Luc. Nieoczekiwanie, jony Pb^{2+} nie indukowały cięć w niektórych regionach przewidzianych jako jednoniciowe, podobnie jak ma to miejsce w izolowanym RNA P1-p53. Dotyczy to szczególnie pętli apikalnej G110-C116 i regionu G127-U132. Ponadto, pojawiły się słabe cięcia za resztami nukleotydowymi 84, 86, 87, 88 i 89.



Rys. 35 A - Autoradiogram przedstawia rozdział produktów cDNA po mapowaniu regionu P1-p53 metodą cięć indukowanych jonami Pb^{2+} w konstrukcji mRNA z sekwencją kodującą lucyferazę. Stosowane stężenia jonów Pb^{2+} wynosiły 1, 0,5 i 0,25 mM. G, C, U, A - reakcje sekwencjonowania. Po lewej stronie zaznaczono wybrane reszty guanozyny.



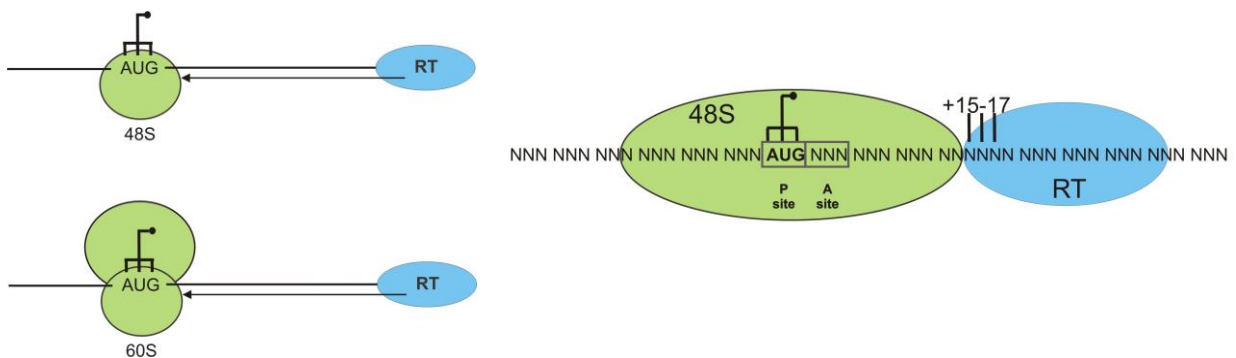
Rys. 35 Względna reaktywność poszczególnych reszt nukleotydowych względem NMIA (B), DMS *in vitro* (C) oraz DMS w RRL (D) w regionie P1-p53 w konstrukcie mRNA z sekwencją kodującą lucyferazę. Kolor czerwony oznacza silną, pomarańczowy - średnią, zielony - niską reaktywność poszczególnych reszt nukleotydowych.



Rys. 35 E - Model struktury drugorzędowej regionu P1-p53 w konstrukcie mRNA z sekwencją kodującą lucyferazę *Renilla* z naniesionymi modyfikacjami NMIA i DMS oraz miejscami cięć w obecności jonów Pb^{2+} . Na rysunku porównano wyniki mapowania struktury w warunkach *in vitro* oraz RRL.

3.2.5. Analiza tworzenia się kompleksów rybosomalnych na mRNA P1-p53-Luc, P1-ΔNp53-Luc i P1-ΔNp53(int2)-Luc

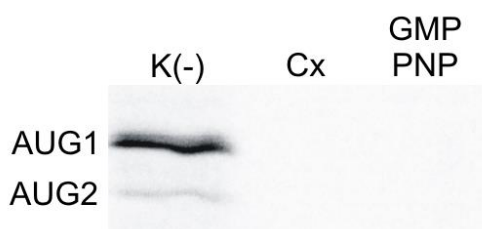
W RRL analizowałam powstawanie kompleksów rybosomalnych 48S i 80S w obrębie kodonów inicjacyjnych w mRNA P1-p53-Luc, P1-ΔNp53-Luc oraz mRNA P1-ΔNp53(int2)-Luc, w którym pomiędzy kodonami AUG znajdowała się sekwencja intronu 2. Tworzenie kompleksów rybosomalnych monitorowałam za pomocą reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji zwanej „odciskiem palca” (ang. *toe-printing*), która zachodzi na drodze blokowania odwrotnej transkryptazy przez kompleksy rybosomalne 48S i 80S (Rys. 36). W reakcji odwrotnej transkrypcji stosuje się starter DNA, który hybrydyzuje w odległości nie większej niż 100 nukleotydów w kierunku 3' od kodonu AUG. W zależności od rodzaju stosowanej odwrotnej transkryptazy, do zahamowania wydłużania startera dochodzi w określonej odległości od kodonu AUG. W przypadku odwrotnej transkryptazy AMV do zatrzymania elongacji startera dochodzi w odległości 15-17 nukleotydów od kodonu AUG. Aby zidentyfikować kompleksy rybosomalne 48S stosowałam nie ulegający hydrolizie analog GTP, GMP-PNP, który uniemożliwia przyłączenie dużej podjednostki rybosomalnej 60S. Z kolei, w celu zatrzymania kompletnego rybosomu 80S stosowałam cykloheksimid (Cx), inhibitor aktywności peptydylotransferazy.



Rys. 36 Schematyczne przedstawienie reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji przez kompleksy rybosomalne 48S i 80S. Kompleksy rybosomalne są blokowane na mRNA w obrębie kodonu AUG przez inhibitory reakcji translacji. Zahamowanie wydłużania startera DNA przez odwrotną transkryptazę AMV, następuje w odległości 15-17 nukleotydów od kodonu AUG.

3.2.5.1. Identyfikacja kompleksów rybosomalnych za pomocą odwrotnej transkryptazy AMV

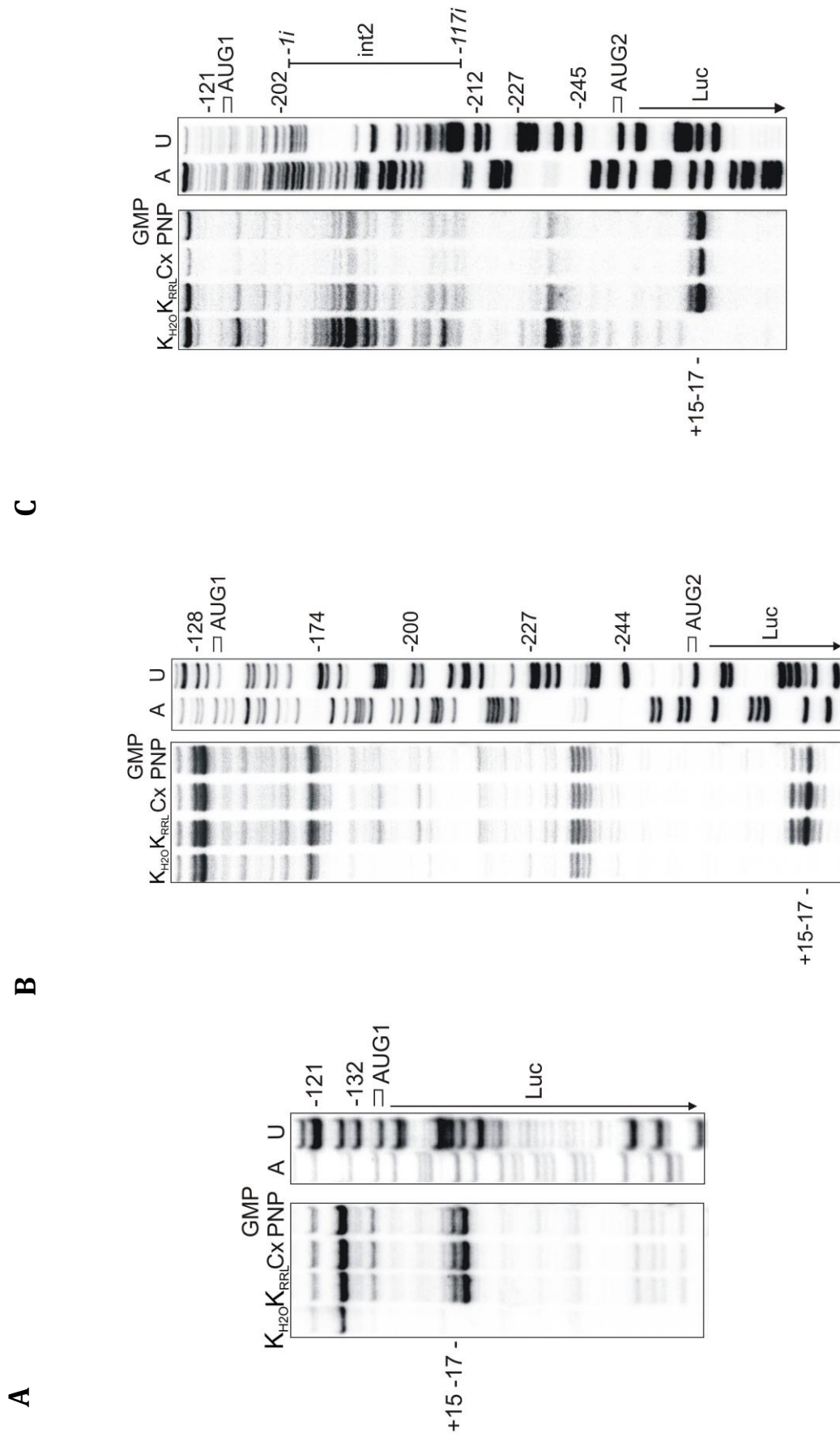
Początkowo tworzenie kompleksów rybosomalnych na mRNA P1-p53-Luc, P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc analizowałam przy użyciu odwrotnej transkryptazy AMV. W celu identyfikacji kompleksów 48S i 80S w obrębie kodonu AUG1 w mRNA P1-p53-Luc oraz AUG2 w mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc, zastosowałam znakowany radioaktywnie starter Rluc330, który jest komplementarny do sekwencji kodującej lucyferazę *Renilla*. Przed rozpoczęciem analizy metodą „odcisku palca”, sprawdziłam czy stosowane ilości inhibitorów GMP-PNP i Cx są w stanie zatrzymać kompleksy rybosomalne na mRNA. W tym celu przeprowadziłam reakcje translacji w RRL, stosując takie same stężenia końcowe GMP-PNP i Cx oraz taką samą ilość mRNA i lizatu, co w reakcjach inhibicji odwrotnej transkrypcji (Rys. 37). Okazało się, że końcowe stężenia obu inhibitorów blokują kompleksy rybosomalne na mRNA, czego dowodem był brak produktów białkowych syntetyzowanych z kodonów AUG1 i AUG2.



Rys. 37 Translacja *in vitro* mRNA P1- Δ Np53-Luc w obecności inhibitorów kompleksów rybosomalnych GMP-PNP i Cx. K(-) oznacza kontrolną reakcję translacji prowadzoną bez inhibitorów.

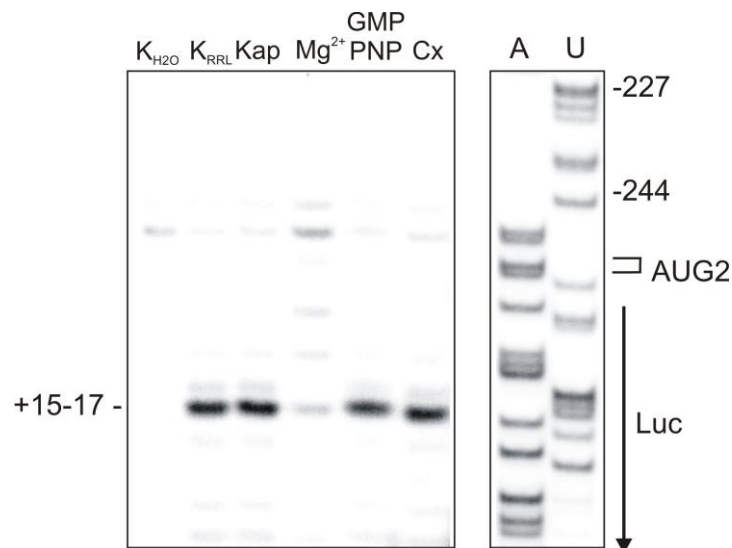
Pierwszym etapem reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL była preinkubacja takich samych ilości lizatu z GMP-PNP i Cx oraz wodą dla reakcji kontrolnej w lizacie, po czym dodawałam równe ilości mRNA. Wykonałam też drugą reakcję kontrolną, w której lizat zastąpiłam wodą. Wszystkie mRNA posiadały kap na końcu 5'. Po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej startera znakowanego izotopem ^{32}P , przeprowadzałam reakcję odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy AMV. Otrzymane fragmenty cDNA rozdzielałam w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (Rys. 38).

Dla wszystkich trzech badanych mRNA otrzymałam charakterystyczny układ prążków tzw. „odcisk palca” poniżej kodonu AUG2 w mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc oraz poniżej kodonu AUG1 w mRNA P1-p53-Luc, zarówno w reakcji z GMP-PNP jak i Cx. Co ciekawe, prążki w takich samych pozycjach były również obecne w linii z reakcją kontrolną w lizacie bez dodatku inhibitorów. Odwrotną transkryptazę AMV zastosowałam również w celu identyfikacji tzw. „odcisków palca” dla kodonu AUG1 w konstrukcjach mRNA posiadających dwa kodony inicjacyjne AUG, czyli P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc. Aby uzyskać lepszą rozdzielczość prążków w żelu, dla mRNA P1- Δ Np53-Luc zastosowałam starter Rdlug hybrydujący do nukleotydów 232-257 w regionie terminalnym 5' mRNA p53, a dla mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc starter E2R wiążący się do nukleotydów 63-84 w obrębie intronu 2. W reakcji z odwrotną transkryptazą AMV nie zaobserwowałam prążków poniżej kodonu AUG1 w obu mRNA, zarówno w obecności GMP-PNP jak i Cx. Trudności w identyfikacji kompleksów rybosomalnych dla tego kodonu mogą wynikać z faktu, iż kodon AUG1 w mRNA P1- Δ Np53 i P1- Δ Np53(int2) umiejscowiony jest w bardzo stabilnej termodynamicznie spinie G56-C169, której ΔG wynosi - 52,9 kcal/mol.



Rys. 38 Analiza kompleksów rybosomalnych 48S i 80S na mRNA P1-p53-Luc (A), P1- Δ Np53-Luc (B) i P1- Δ Np53(int2)-Luc (C) za pomocą odwrotnej transkryptazy AMV. K_{H_2O} - reakcja kontrolna w H_2O , K_{RRL} - reakcja kontrolna w RRL bez inhibitorów, Cx - reakcja w obecności cykloheksimidu, GMP-PNP - reakcja w obecności analogu GTP nie ulegającego hydrolizie, A i U - reakcje sekwencjonowania, +15-17 - odcisk palca dla kodonu AUG1 w mRNA P1-p53-Luc oraz AUG2 w mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc.

Prowadziłam również dodatkowe reakcje inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL z mRNA P1- Δ Np53-Luc, aby sprawdzić czy „odcisk palca” dla kodonu AUG2 powstaje w sposób specyficzny. W tym celu zamiast inhibitorów kompleksów rybosomalnych Cx i GMP-PNP, do reakcji dodawałam wolny analog kapu m⁷G(5')ppp(5')G oraz octan magnezu. Jak widać na autoradiogramie na rysunku 39, w obecności wolnego analogu kapu nie dochodziło do zaniku „odcisku palca” poniżej kodonu AUG2, tak jak miało to miejsce w przypadku kodonu AUG1. Sugeruje to, że pomimo wiązania czynnika inicjacyjnego eIF4E przez wolny analog kapu, i tak dochodzi do utworzenia kompleksów rybosomalnych w obrębie kodonu AUG2. Natomiast w reakcji w obecności jonów magnezu o wysokim stężeniu nie zaobserwowałam „odcisku palca” poniżej kodonu AUG2. Prawdopodobnie jony magnezu zaburzają strukturę rRNA wchodzących w skład podjednostek rybosomalnych, przez co utrudnione staje się utworzenie kompleksu rybosomalnego w obrębie kodonu AUG2.

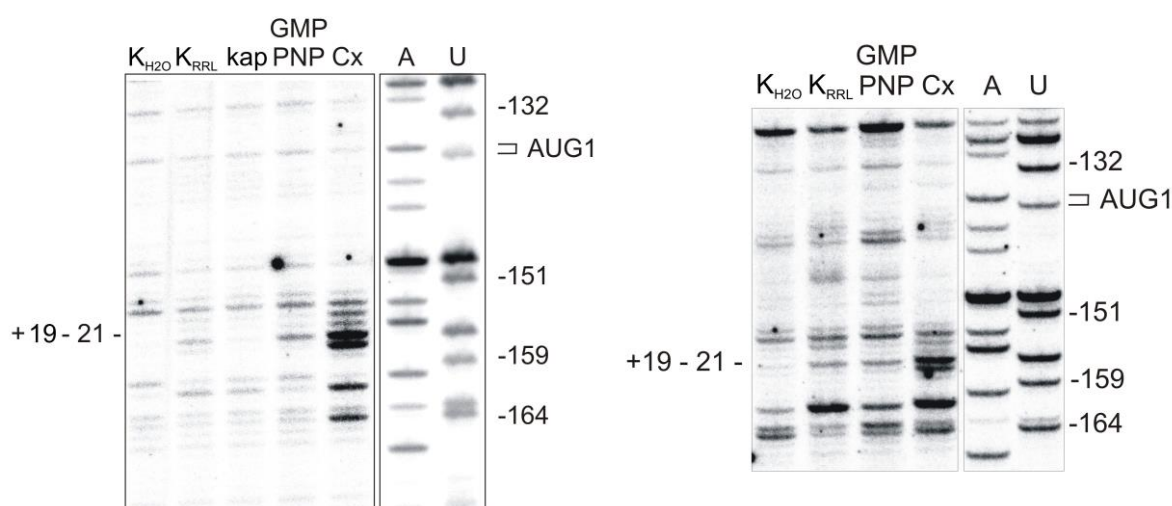


Rys. 39 Identyfikacja kompleksów rybosomalnych w obrębie kodonu AUG2 w mRNA P1- Δ Np53-Luc w obecności 2 mM wolnego analogu kapu (linia kap) oraz 30 mM octanu magnezu (linia Mg²⁺).

3.2.5.2. Analiza tworzenia kompleksów rybosomalnych 48S i 80S kodonu AUG1 za pomocą odwrotnej transkryptazy SuperScript III

Aby zidentyfikować kompleksy 48S i 80S w pobliżu kodonu AUG1 w mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc, zastosowałam starter Rdlug komplementarny poniżej kodonu AUG1 w regionie P1- Δ Np53 i starter E2R, który przyłącza się w odległości 134 nukleotydów poniżej kodonu AUG1 w obrębie intronu 2. Wszystkie reakcje odwrotnej transkrypcji w RRL prowadziłam w obecności odwrotnej transkryptazy SuperScript III, która

pozwała uzyskać silniejszy sygnał, pochodzący od zatrzymanych kompleksów rybosomalnych (Kozak 1998). W pierwszej kolejności, do kapowanych mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc przyłączałam odpowiednie startery znakowane izotopem 32 P na końcu 5'. Kolejnym etapem była reakcja translacji *in vitro* w obecności inhibitorów translacji, a także wolnego analogu kapu, która stanowiła reakcję kontrolną kapozależnej translacji. Tak jak poprzednio, wykonałam też dwie reakcje kontrolne, w wodzie oraz w lizacie, bez dodatku Cx i GMP-PNP. Następnie, do 1/5 objętości mieszaniny translacyjnej dodawałam mieszaninę reakcyjną zawierającą odwrotną transkryptazę SuperScript III. Rysunek 40 pokazuje rozdział produktów cDNA w żelu poliakrylamidowym, powstałych na skutek zatrzymania kompleksów 48S i 80S na mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc. Dla obu mRNA otrzymałam intensywny sygnał tzw. „odcisku palca” w obecności Cx. Ponieważ w reakcji stosowałam odwrotną transkryptazę SuperScript III, otrzymywałam charakterystyczny układ prążków w odległości 19-21 nukleotydów poniżej kodonu AUG1. W reakcji z GMP-PNP prążki w żelu były mniej intensywne. W reakcji kontrolnej w RRL bez inhibitorów również pojawił się prążek na żelu, którego szybkość migracji odpowiadała „odciskowi palca”. Do zaniku prążków w pozycji +19-21 dochodziło w reakcji z wolnym analogiem kapu, co oznacza że obserwowany układ prążków jest specyficzny dla kodonu AUG1 i dodatkowo potwierdza, że translacja z tego kodonu jest inicjowana według mechanizmu zależnego od kapu na końcu 5' mRNA.



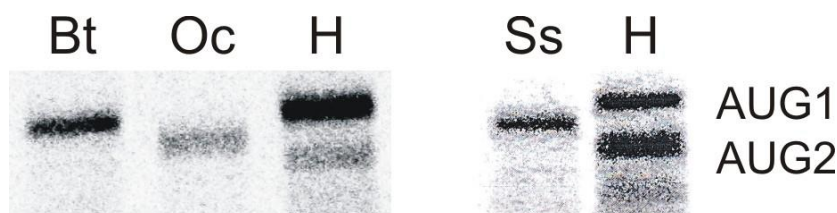
Rys. 40 Identyfikacja kompleksów rybosomalnych dla kodonu AUG1 w mRNA P1- Δ Np53-Luc (A) i P1- Δ Np53(int2)-Luc (B) za pomocą metody „odcisku palca” z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy SuperScript III.

3.2.6. Czy niestandardowe kodony inicjacyjne mogą być wykorzystane w syntezie izoformy Δ Np53 ?

Translacja izoformy Δ Np53 inicjowana jest z alternatywnego kodonu START AUG2 zlokalizowanego w pozycji +118 mRNA p53. W przypadku niektórych organizmów, takich jak: rezus, świnia, królik, owca czy krowa, kodon START dla Δ Np53 nie jest obecny w oczekiwanej pozycji mRNA p53. Doniesienia literaturowe sugerują, że w tych przypadkach ekspresja izoformy Δ Np53 nie zachodzi [12]. Jak wiadomo, translacja w komórkach eukariotycznych może zachodzić z niestandardowych kodonów inicjacyjnych, którymi najczęściej są tryplety CUG i ACG [158]. W związku z tym postanowiłam sprawdzić czy pomimo braku kodonu AUG dla Δ Np53 w oczekiwanej pozycji mRNA u niektórych organizmów, translacja może być inicjowana z kodonu START innego niż AUG i czy może to prowadzić do powstania izoformy białka p53 odpowiadającej Δ Np53.

W pierwszym etapie wyizolowałam całkowity RNA z wątroby świni domowej, krowy i królika, a następnie w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem oligo(dT) otrzymałam preparaty cDNA. Na matrycy cDNA w reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla p53 otrzymałam dsDNA o sekwencji odpowiadającej regionowi niekodującemu 5' (w obrębie którego znajduje się miejsce inicjacji translacji białka p53 pełnej długości) oraz otwartej ramce odczytu dla białka p53. W kolejnej reakcji PCR dodałam do końca 5' dsDNA region promotorowy dla RNA polimerazy faga T7, w celu otrzymania transkryptów p53 w reakcji transkrypcji *in vitro*. Wszystkie transkrypty migrowały w postaci pojedynczych prążków podczas elektroforezy w żelu agarozowym w warunkach denaturujących. Następnie przeprowadziłam reakcje translacji *in vitro* w RRL na matrycy mRNA p53 wybranych organizmów (Rys. 41). W reakcji kontrolnej użyłam otrzymany wcześniej przez dr Leszka Błaszczyka mRNA p53 człowieka. Na autoradiogramach na rysunku 41 widoczny jest tylko jeden wyraźny prążek dla reakcji translacji z mRNA p53 świni, krowy i królika. Migracja tych prążków w żelu sugeruje, że jest to pełnej długości białko p53, aczkolwiek wszystkie prążki migrują na różnych wysokościach. Może być to spowodowane różną liczbą aminokwasów oraz zawartością reszt proliny. Białko p53 wszystkich badanych organizmów posiada masę około 43 kDa. Jednak migrują one wolniej w żelu, w stosunku do innych białek ze względu na dużą zawartość reszt proliny, które zwiększają ich ładunek dodatni. Wolniej migrujący prążek w żelu reprezentuje pełnej długości ludzkie białko p53 zbudowane z 393 aminokwasów, z czego aż 49 to reszty proliny. Białko p53 krowy składa się z 386 aminokwasów spośród których 44 stanowią proliny i migruje ono szybciej niż białko p53

człowieka. Podobną ruchliwość elektroforetyczną wykazują białka p53 świni i królika. Prawdopodobnie odpowiada za to taka sama ilość 39 prolin w obu białkach, pomimo iż różnią się one długością. W przypadku świni, białko p53 posiada długość 386 aminokwasów (czyli tyle samo co p53 krowy), a u królika składa się aż z 391 aminokwasów. Na autoradiogramach szybciej migrujący prążek odpowiadający masie 47 kDa izoformie Δ Np53, której długość to 350 aminokwasów, z czego 42 to reszty proliny.



Rys. 41 Translacja *in vitro* mRNA p53 świni (*Sus scrofa* - Ss), krowy (*Bos taurus* - Bt), królika (*Oryctolagus cuniculus* - Oc) i człowieka (*Homo sapiens* - H).

W reakcji translacji *in vitro* mRNA p53 świni, krowy i królika nie zaobserwowano powstawania produktu białkowego odpowiadającego izoformie Δ Np53, o czym świadczy brak drugiego prążka na żelu. Gdyby izoforma Δ Np53, w przypadku wybranych organizmów, była syntetyzowana wówczas jej długość wynosiłaby 347-353 aminokwasy i musiałaby migrować poniżej izoformy Δ Np53 człowieka. Sugeruje to, że w zastosowanych warunkach translacja z niestandardowego kodonu GUG nie jest inicjowana w przypadku badanych organizmów.

Wydajność inicjacji translacji białka p53 różni się w zależności od organizmu, o czym świadczą różne intensywności prążków na autoradiogramach. Aby dowiedzieć się co jest tego przyczyną, porównałam sekwencję nukleotydów otaczających kodon AUG u krowy, świni i królika z sekwencją Kozak GCC RCC AUG G. Najbardziej zgodna z sekwencją konsensusową jest sekwencja otaczająca kodon AUG u królika. Najbardziej od sekwencji Kozak odbiega otoczenie nukleotydowe kodonu AUG w mRNA krowy. Aczkolwiek ilość białka p53 syntetyzowanego w tym przypadku jest wyższa niż u świni, pomimo, że kodon AUG dla p53 umiejscowiony jest w korzystniejszym kontekście (Rys. 42).

sekwencja Kozak: GCC RCC AUG G
Krowa: GCU ACA AUG G
Królik: GCC GCC AUG G
Świnia: GCU GCA AUG G

Rysunek 42. Sekwencje nukleotydowe otaczające kodon AUG dla p53 w mRNA p53 świni, krowy i królika.

3.3. Dyskusja uzyskanych wyników

3.3.1. Mechanizm inicjacji translacji białka p53 i jego izoformy $\Delta Np53$

Do niedawna sądzono, że większość eukariotycznych mRNA koduje jedno białko, a z alternatywnych kodonów inicjacyjnych translacja zachodzi raczej w rzadkich przypadkach. Na przełomie ostatnich kilku lat pojawiło się wiele informacji na temat możliwości rozpoznawania przez kompleks rybosomalny kilku kodonów inicjacyjnych w obrębie jednego mRNA. Inicjacja translacji eukariotycznych mRNA zazwyczaj zachodzi według mechanizmu skaningowego, jednak w przypadku wykorzystania kilku kodonów inicjacyjnych mechanizm ich rozpoznania może się różnić od standardowego. Dzięki alternatywnym mechanizmom inicjacji translacji takim jak, reinicjacja translacji, skaning przeciekowy czy nieliniowa migracja rybosomu, możliwa jest synteza kilku białek z tego samego mRNA. Zwiększa to istotnie potencjał kodujący eukariotycznych mRNA. Budowa mRNA oraz położenie kodonów inicjacyjnych determinuje sposób syntezy białek. Jeżeli kodony inicjacyjne nie znajdują się w tej samej ramce odczytu lub gdy sekwencje otwartych ramek odczytu zachodzą na siebie, powstają różne produkty białkowe [159]. Gdy translacja inicjowana jest również z alternatywnego kodonu, który jest zgodny z ramką odczytu, powstają wówczas izoformy różniące się końcem aminowym, a także często lokalizacją wewnątrzkomórkową. Ponieważ translacja inicjowana z kilku kodonów inicjacyjnych zachodzi z różną wydajnością, stanowi ona również mechanizm regulacji ilości syntetyzowanych izoform. W szczególności szereg mRNA genów regulatorowych zawiera alternatywne kodony inicjacyjne i kodują one izoformy, które odgrywają istotne funkcje w komórce.

Do białek o kluczowym znaczeniu dla wielu procesów zachodzących w komórce należy czynnik transkrypcyjny p53. Na skutek działania na komórkę czynników stresowych dochodzi do wzrostu poziomu oraz aktywacji białka p53, a także jego translokacji z cytoplazmy do jądra komórkowego. Tam, dzięki N-końcowej domenie transaktywacyjnej

białko p53 indukuje transkrypcję genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, apoptozę czy naprawę DNA [160; 161]. Gen *TP53* ulega ekspresji w postaci licznych izoform białkowych. Oprócz pełnej długości białka p53, syntetyzowana jest również izoforma Δ Np53, która nie posiada pierwszych 39 aminokwasów, wskutek czego pozbawiona jest pierwszej poddomeny transaktywacyjnej [162; 163]. W przeciwieństwie do białka p53, izoforma Δ Np53 zlokalizowana jest w jądrze komórkowym, a w odpowiedzi na stres zostaje eksportowana do cytoplazmy [13]. Izofoma Δ Np53 dzięki tworzeniu homo- i heterodimerów z białkiem p53 hamuje jego zdolność do aktywowania transkrypcji określonych genów. Obserwuje się także różnice we wzajemnym stosunku ilości obu białek, w zależności od fazy cyklu komórkowego, co może wynikać z działania izoformy Δ Np53 jako negatywnego regulatora białka p53 [11; 12].

Zarówno białko p53 pełnej długości jak i jego izoforma Δ Np53 powstają z tego samego transkryptu mRNA, dzięki obecności dwóch kodonów inicjacyjnych: AUG1 w egzonie 2 oraz alternatywnego kodonu AUG2 zlokalizowanego w obrębie egzonu 4 [12; 142]. Ostatnie doniesienia literaturowe sugerują, że oba białka syntetyzowane są w sposób niezależny od kapu, dzięki występowaniu elementu IRES w obrębie regionu terminalnego 5' mRNA, który stanowi wewnętrzne miejsce oddziaływania z rybosomem [11; 143]. W literaturze pojawiła się też informacja, że translacja p53 i Δ Np53 przebiega przy udziale dwóch elementów IRES [11].

Mając na uwadze powyższe informacje postanowiłam sprawdzić, w jaki sposób rozpoczyna się translacja pełnej długości białka p53 oraz izoformy Δ Np53. Wyjaśnieniu mechanizmów translacji inicjowanej z kodonu AUG1 i AUG2 miały posłużyć doświadczenia przeprowadzone w lizacie z króliczych retikulocytów, głównie z modelowym mRNA P1- Δ Np53-Luc.

3.3.1.1. Inicjacja translacji z kodonu AUG1 dla białka p53 zachodzi z udziałem kapu

Z doświadczeń translacji *in vitro*, przeprowadzonych w lizacie z króliczych retikulocytów wynika, że translacja z kodonu AUG1 dla pełnej długości białka p53 inicjowana jest według mechanizmu skaningowego, czyli z udziałem kapu na końcu 5' mRNA. Wskazują na to wyniki reakcji translacji *in vitro* z mRNA P1- Δ Np53-Luc, ponieważ obecność kapu na końcu 5' powodowała dwukrotny wzrost ilości białka fuzyjnego

powstającego z kodonu AUG1 (Rys. 22, panel A i B, wariant C). Stymulujący wpływ kapu na końcu 5' na translację inicjowaną z kodonu AUG1, jest prawdopodobnie związany ze zwiększonym powinowactwem czynnika inicjacyjnego eIF4E, a przez to wydajniejszym tworzeniem się kompleksu inicjacyjnego 43S. Podobny wpływ kapu na końcu 5' mRNA na syntezę białka obserwowano już wcześniej. Ilość białka reporterowego lucyferazy *Renilla* powstającego w RRL z mRNA zawierającego region 5'UTR β -globiny, wzrosła aż 6-krotnie po dodaniu kapu do końca 5' mRNA [164]. Natomiast obecność kapu na końcu 5' mRNA lucyferazy *Firefly* prowadziła do prawie 5-krotnego wzrostu poziomu tego białka w warunkach *in vitro* [165]. Do wzrostu wydajności translacji inicjowanej z kodonu AUG1 dochodziło również w przypadku mRNA P1-p53-Luc oraz P0-p53-Luc (Rys. 22, panel A i B, warianty A i B). Jednak w przypadku obu mRNA wzrost ten był większy, w porównaniu z mRNA P1- Δ Np53-Luc. Przyczyną tego może być zarówno mniejsza długość wariantów P1-p53 i P0-p53 oraz odmienna struktura drugorzędowa RNA, dzięki czemu translacja może być inicjowana szybciej i z większą efektywnością. Co ciekawe, ilość białka syntetyzowanego z kodonu AUG1 nie zmieniła się w przypadku mRNA P0- Δ Np53-Luc. Być może stymulujący wpływ kapu na końcu 5' mRNA jest maskowany przez obecność regionu P0-P1, w obrębie którego postulowano obecność stabilnej struktury drugorzędowej inhibującej proces translacji.

Za mechanizmem inicjacji translacji białka p53 zależnym od kapu przemawiają również wyniki translacji kapowanego mRNA P1- Δ Np53-Luc w obecności wzrastającego stężenia wolnego analogu kapu (Rys. 26). Dodanie wolnego analogu kapu do mieszaniny reakcyjnej ma na celu związanie czynnika inicjacyjnego eIF4E, wskutek czego nie może on wiązać się do kapu na końcu 5' mRNA. Już w obecności niewielkich ilości wolnego analogu kapu dochodziło do obniżenia poziomu translacji z kodonu AUG1. Do znaczącej inhibicji reakcji dochodziło przy stężeniu 100 μ M, przy którym wydajność translacji spadła do około 20%. Podobny spadek ilości białka, powstającego w tych warunkach zaobserwowano dla β -globiny, która syntetyzowana jest według mechanizmu inicjacji zależnego od kapu. W tym przypadku, wydajność syntezy spadła do około 30% przy 100 μ M stężeniu analogu kapu [166; 167]. W związku z tym można przypuszczać, że translacja rozpoczynająca się z kodonu AUG1 zależy od obecności czynnika eIF4E, który uczestniczy w formowaniu kompleksu inicjacyjnego z udziałem kapu na końcu 5' mRNA. Obserwowany efekt inhibicji nie był związany z degradacją powstającego białka w środowisku lizatu, o czym świadczy jego nieznacznie zmieniony poziom w warunkach wydłużonej inkubacji kapowanego mRNA

P1- Δ Np53-Luc (Rys. 27). Jednak, translacja inicjowana z kodonu AUG1 nie została zahamowana całkowicie, nawet przy najwyższym zastosowanym stężeniu wolnego analogu kapu, a jej wydajność wynosiła około 10% wartości początkowej. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku innego konstrukt mRNA RNA-554, który zawierał 1/3 sekwencji kodującej białko p53 [151]. Można przypuszczać, że jeśli kap-zależna translacja zostaje zahamowana poprzez inaktywację czynnika eIF4E to pozostała aktywność translacyjna kodonu AUG1 jest wynikiem występowania elementu IRES w regionie terminalnym 5' mRNA p53. Istnieje również możliwość, że IRES-zależna translacja jest maskowana poprzez mechanizm zależny od kapu, który w tym przypadku zachodzi wydajniej. Za tą hipotezą przemawiają wyniki translacji mRNA P1- Δ Np53-Luc, który na końcu 5' posiadał niefunkcjonalny kap ApppG (Rys. 28). Jego obecność skutkowałą około 80% inhibicją translacji, rozpoczynającą się z kodonu AUG1 w porównaniu do mRNA, który posiadał na końcu 5' funkcjonalny kap. Również w przypadku mRNA P1-p53-Luc, który zawiera tylko kodon AUG1 zaobserwowałam silny, bo aż 70% stopień inhibicji po zastąpieniu kapu niefunkcjonalnym analogiem ApppG. ApppG nie jest zdolny do oddziaływania z eIF4E, przez co nie może uczestniczyć w inicjacji translacji zależnej od kapu. Otrzymany przeze mnie wynik sugeruje, że translacja modelowego mRNA p53 inicjowana z kodonu AUG1 jest w dużym stopniu zależna od kapu. Potwierdzają to również dane literaturowe dotyczące translacji mRNA kodującego histon H4, w przypadku którego obecność analogu kapu ApppG na końcu 5' całkowicie hamowała powstawanie histonu H4, zarówno w lizacie z retikulocytów królika jak i lizacie z kielków pszenicy [168]. Jednak, w przeciwieństwie do syntezy histonu H4, translacja z kodonu AUG1 w mRNA P1- Δ Np53-Luc oraz P1-p53-Luc zachodziła jednak nadal na niskim poziomie, pomimo braku wiązania czynnika inicjacyjnego eIF4E. Możliwe zatem, że rybosom inicjuje translację z kodonu AUG1 bez konieczności skanowania mRNA. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że skład lizatu z króliczych retikulocytów jest optymalizowany w celu wydajnej syntezy białek, w związku z czym translacji ulegają nawet mRNA nie posiadające kapu ani regionu 5'UTR jak na przykład mRNA Luc, który stosowałam w swoich badaniach jako mRNA kontrolny (Rys. 21 i 22). Co więcej, translacja białka reporterowego z kontrolnego mRNA Luc zachodziła nadal pomimo obecności niefunkcjonalnego kapu ApppG na jego końcu 5' (Rys. 29). Nie jest to jednak przypadek odosobniony, ponieważ jak wykazały badania grupy Shatsky'ego, niefunkcjonalny kap ApppG nie jest w stanie całkowicie zahamować syntezy β -globiny i β -aktyny w lizacie z komórek Krebs-2 [169]. Niemniej jednak, nie można

wykluczyć, że za niski poziom translacji z kodonu AUG1 w warunkach gdy kap-zależny proces jest ograniczony przez niefunkcjonalny kap na końcu 5' mRNA, odpowiada element IRES. Być może obecny w regionie terminalnym 5' mRNA p53 element IRES cechuje się relatywnie niską aktywnością. Jest Doniesiono, że elementów IRES komórkowych mRNA LINE-1, Apaf-1, c-Myc i Hsp70 wykazywały niską aktywność translacyjną w porównaniu do wirusowych elementów IRES [169].

O kap-zależnym charakterze translacji inicjowanej z kodonu AUG1 można również wnioskować na podstawie analizy wyników reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL, tzw. „odcisku palca”, w obecności wysokiego stężenia wolnego analogu kapu (Rys. 40). Dodanie wolnego analogu kapu do lizatu miało na celu związanie czynnika eIF4E, tak aby nie mógł on oddziaływać z kapem na końcu 5' mRNA P1- Δ Np53-Luc. W takich warunkach najprawdopodobniej nie dochodziło do tworzenia kompleksów inicjacyjnych w obrębie kodonu AUG1, o czym świadczy zanik charakterystycznego układu prążków na żelu, który obserwowałam w obecności GMP-PNP czy cykloheksimidu. Można zatem stwierdzić, że synteza białka rozpoczynająca się z kodonu AUG1 wymaga obecności kanonicznego czynnika inicjacyjnego eIF4E, a więc jest zależna od kapu. Gdyby translacja z kodonu AUG1 zachodziła według mechanizmu wewnętrznej inicjacji, wówczas nie dochodziłoby do zaniku „odcisku palca” pomimo związania czynnika eIF4E przez wolny analog kapu. Wskazują na to również badania prowadzone przez grupę Shatsky'ego, którzy przeprowadzili reakcję inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL z mRNA β -globiny [170]. W obecności wolnego analogu kapu w RRL również nie powstawały kompleksy inicjacyjne w obrębie kodonu inicjacyjnego AUG. Dowodem tego był brak „odcisku palca” w obecności różnych antybiotyków oraz GMP-PNP. Autorzy efekt ten tłumaczą mechanizmem inicjacji translacji zależnej od kapu, według którego syntetyzowana jest β -globina. Natomiast w przypadku mRNA histonu H4 „odcisk palca” obserwowano pomimo związania czynnika eIF4E przez dodanie wolnego analogu kapu, ponieważ translacja mRNA H4 nie rozpoczyna się od bezpośredniego wiązania eIF4E z kapem na końcu 5' tego mRNA [168].

3.3.1.2. Inicjacja translacji z kodonu AUG2 wykazuje cechy inicjacji wewnętrznej

W reakcji translacji *in vitro* z modelowych mRNA P1- Δ Np53-Luc i P0- Δ Np53-Luc syntetyzowane było również białko reporterowe z kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53, czego dowodem jest wolniej migrujący prążek w żelu (Rys. 22, warianty C i D).

Jednak w porównaniu z ilością białka powstającego z kodonu AUG1, wydajność inicjacji z kodonu AUG2 była 3- i 9-krotnie niższa (odpowiednio, dla niekapowanego i kapowanego mRNA), w przypadku zarówno mRNA P1- Δ Np53-Luc jak i P0- Δ Np53-Luc. Podobny wynik otrzymano dla pełnej długości mRNA p53 posiadającego kap na końcu 5', z którego w reakcji translacji *in vitro* białka p53 i Δ Np53 syntetyzowane były w stosunku 5:1 [151]. Sugeruje to, że również *in vivo* synteza izoformy Δ Np53 z alternatywnego kodonu AUG2 w dojrzałym mRNA p53 zachodzi z mniejszą wydajnością niż pełnej długości białka p53. Potwierdza to także analiza poziomu białka p53 i Δ Np53 w różnych liniach komórkowych [143].

Translacja z alternatywnych kodonów inicjacyjnych jest zazwyczaj procesem o mniejszej wydajności i może ona zachodzić na drodze reinicjacji, skaningu przeciekowego lub wewnętrznej inicjacji. Mechanizm reinicjacji polega na wznowieniu translacji z alternatywnego kodonu inicjacyjnego, po zakończeniu translacji krótkiej otwartej ramki odczytu położonej bliżej końca 5' mRNA. Zatem, jeżeli izoforma Δ Np53 miałyby powstawać według tego mechanizmu, kodon AUG2 musiałby być poprzedzony kodonem STOP, który wraz z kodonem AUG1 tworzyłby krótką otwartą ramkę odczytu. Sytuacja taka ma miejsce jedynie w przypadku transkryptu p53, w którym na skutek alternatywnego składania został zachowany intron 2. Tak więc, w przypadku dojrzałego mRNA p53 oraz modelowych mRNA P1- Δ Np53-Luc i P0- Δ Np53-Luc, które pozbawione są intronu 2 translacja z kodonu AUG2 może być inicjowana według mechanizmu kap-zależnego skaningu przeciekowego lub wewnętrznej inicjacji z wykorzystaniem elementu IRES.

Skaning przeciekowy polega na pominięciu przez kompleks rybosomalny kodonu inicjacyjnego znajdującego się bliżej końca 5' mRNA, ze względu na jego umiejscowienie w słabym kontekście Kozak i inicjacji syntezy białka z kolejnego kodonu START. Kodon AUG1 jest zlokalizowany w obrębie sekwencji GCCAUGG, która odpowiada optymalnemu kontekstowi Kozak i jest raczej mało prawdopodobne aby był on pomijany przez skanujący kompleks inicjacyjny. Pomijanie kodonu AUG1 skutkowałoby spadkiem syntezy z tego kodonu oraz wiązałoby się ze wzrostem translacji z kodonu AUG2, do którego docierałaby większość kompleksów rybosomalnych. Taka zależność ma miejsce w przypadku białka p47 i białka p43 [57]. Ponieważ kodon AUG dla białka p47 umiejscowiony jest bliżej końca 5' i znajduje się on w słabym kontekście Kozak, to większość kompleksów rybosomalnych inicjuje translację z położonego dalej w kierunku 3' kodonu AUG dla białka p43, dzięki czemu ilość białka p43 jest o około 90% większa niż p47. Otrzymane przeze mnie

wyniki translacji *in vitro*, zarówno z mRNA P1- Δ Np53-Luc jak i P0- Δ Np53-Luc pokazują, że translacja z kodonu AUG1 jest inicjowana wydajniej niż z kodonu AUG2, co raczej wyklucza mechanizm skaningu przeciekowego (Rys. 22). Ponadto kodon AUG1 jest umiejscowiony w obrębie stabilnej termodynamicznie spinki G56-C169 (Rys. 32 i 33D). Wykazano wcześniej, że stabilne termodynamicznie motywy strukturalne położone poniżej kodonu inicjacyjnego spowalniają migrację rybosomu, co z kolei wpływa na dokładniejsze rozpoznanie kodonu inicjacyjnego oraz wydajniejszą syntezę białka [7].

Wydaje się, że mechanizmem, który odpowiada za syntezę izoformy Δ Np53 jest wewnętrzna inicjacja translacji. Dowodem na to jest brak wpływu kapu na końcu 5' mRNA P1- Δ Np53-Luc na poziom białka syntetyzowanego z kodonu AUG2, podczas gdy dodanie kapu do końca 5' skutkowało stymulacją translacji z kodonu AUG1 (Rys. 22, wariant C). Co więcej, obecność kapu na końcu 5' mRNA P0- Δ Np53-Luc hamowała translację inicjowaną z kodonu AUG2. Obserwacje te przeczą translacji według mechanizmu skaningu przeciekowego, ponieważ jest to mechanizm kap-zależny, w związku z czym obecność kapu powinna stymulować nie tylko translację z kodonu AUG1 ale i z kodonu AUG2.

Na udział elementu IRES w syntezie izoformy Δ Np53 wskazuje również analiza wyników translacji *in vitro* z mRNA P1- Δ Np53-Luc w obecności wolnego analogu kapu (Rys. 26). Translacja z kodonu AUG2 zachodziła pomimo zahamowania kap-zależnego procesu, na skutek związania czynnika eIF4E przez wolny analog kapu. Co więcej, wolny analog kapu w stężeniu 25 μ M powodował nawet 10% wzrost wydajności translacji. Oznacza to, że translacja z kodonu AUG2 może przebiegać bez udziału czynnika eIF4E. Według wcześniejszych doniesień, przy niskim stężeniu wolnego analogu kapu dochodziło również do wzrostu poziomu białka reporterowego, którego translacja zachodziła pod kontrolą regionu 5'UTR mRNA prekursora amyloidu APP oraz opóźnienia umysłowego zespołu łamliwego chromosomu X, FMRP [166; 167]. Dalsze zwiększanie stężenia wolnego analogu kapu do 100 μ M prowadziło do obniżenia wydajności translacji w obu przypadkach, aczkolwiek poziom białka był porównywalny z poziomem obserwowanym przy braku wolnego analogu kapu w reakcji. Wskazuje to na udział elementów IRES w syntezie białek APP i FMRP. Początkowy efekt stymulacji translacji autorzy tłumaczą współzawodnictwem o czynniki inicjacyjne pomiędzy kap- i IRES-zależnym procesem inicjacji. Z kolei, w przypadku mRNA P1- Δ Np53-Luc wolny analog kapu o stężeniu 100 μ M stymulował translację z kodonu AUG2. Dopiero 750 μ M stężenie wolnego analogu kapu

inhibowało translację białka reporterowego powstającego z kodonu AUG2 o 50%. Mając na uwadze efekt inhibicji translacji z kodonu AUG1 pod wpływem wolnego analogu kapu, opisany w poprzednim rozdziale można sądzić, że translacja z kodonu AUG2 zachodzi również według mechanizmu zależnego od kapu. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że inne grupy badawcze nie stosowały aż tak wysokiego stężenia wolnego analogu kapu. Kolejna różnica polegała na tym, że regiony 5'UTR mRNA APP i FMRP zawierały tylko jeden kodon AUG, w związku z tym wszystkie czynniki inicjacyjne oraz podjednostki rybosomalne wykorzystywane były do syntezy jednego białka. W przypadku mRNA P1- Δ Np53-Luc translacja inicjowana jest z dwóch kodonów AUG1 i AUG2 i można przypuszczać, że spadek wydajności translacji z kodonu AUG2 przy najwyższym stężeniu wolnego analogu kapu wynika ze współzawodnictwa o czynniki translacyjne pomiędzy inicjacją z kodonu AUG1 i AUG2. To z kolei może prowadzić do wyczerpania lub ograniczenia dostępności składników maszynery translacyjnej dla inicjacji z kodonu AUG2. Na podstawie opisanych powyżej wyników można stwierdzić, że w warunkach uniemożliwiających syntezę białka z udziałem kapu, translacja z kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53 zachodzi najprawdopodobniej dzięki występowaniu elementu IRES w regionie terminalnym 5' mRNA p53.

Na możliwość tworzenia się kompleksów rybosomalnych w obrębie AUG2 bez udziału kapu, wskazuje także obecność charakterystycznego „odcisku palca” na autoradiogramie, przedstawiającym produkty reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL w obecności wysokiego stężenia wolnego analogu kapu (Rys. 39). Przy takim samym stężeniu analogu kapu dochodziło do zaniku „odcisku palca” dla kodonu AUG1, z którego inicjacja w dużym stopniu zależy od kapu na końcu 5' mRNA (Rys. 40). Co więcej, prążki odpowiadające „odciskowi palca” w reakcjach z inhibitorami kompleksów rybosomalnych obserwowałam także w reakcji kontrolnej (Rys. 39). Pokazuje to, że do zatrzymania kompleksów rybosomalnych w obrębie kodonu AUG2 dochodzi już bez udziału cykloheksimidu i GMP-PNP. Prawdopodobnie, w przypadku kodonu AUG2 struktura drugorzędowa regionu terminalnego 5' mRNA p53 umożliwia bezpośrednie utworzenie kompleksu inicjacyjnego bez konieczności wcześniejszego oddziaływania z 5' kapem. Wyniki te są zgodne z danymi literaturowymi, ponieważ w przypadku elementów IRES wirusa EMCV czy CrPV, pomimo zastosowania wysokiego stężenia wolnego analogu kapu również nie dochodziło do zaniku „odcisku palca” oraz był on także obecny w reakcji kontrolnej, bez dodatku inhibitorów kompleksów rybosomalnych [170; 171].

Do zaniku „odcisku palca” charakterystycznego dla kodonu AUG2 dochodziło dopiero w wysokim stężeniu jonów magnezu (Rys. 39). Wcześniejsze badania pokazały, że wysokie stężenie jonów magnezu wpływa na strukturę 18S rRNA i zaburza formowanie kompleksu inicjacyjnego [172]. W takich warunkach, w reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL dochodziło do zaniku „odcisku palca” dla kodonu AUG w RNA wirusa EMCV, z którego translacja inicjowana jest w sposób zależny od IRES [170]. Podsumowując, można stwierdzić, że translacja z kodonu AUG2 w dużej mierze wykazuje charakter niezależny od kapu. Jednocześnie można wykluczyć skaniny przeciekowy jako mechanizm inicjacji translacji z tego kodonu, ponieważ zależy on od związania kompleksu inicjacyjnego z kapem na końcu 5' mRNA, co w reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL prowadzonej w obecności wolnego analogu kapu powinno objawiać się przede wszystkim zanikiem „odcisku palca”.

Dodatkowych informacji na temat mechanizmu inicjacji translacji z kodonu AUG2 dostarczyły doświadczenia z mRNA P1- Δ Np53-Luc, który na końcu 5' posiadał niezdolny do oddziaływania z czynnikiem eIF4E analog kapu ApppG (Rys. 28). Obserwowany 25% wzrost poziomu syntetyzowanego białka reporterowego z kodonu AUG2, wskazuje kolejny raz na niezależną od kapu drogę inicjacji translacji. Gdyby translacja z kodonu AUG2 miała zachodzić z udziałem kapu, wówczas inhibicji translacji z kodonu AUG1 towarzyszyłby również spadek poziomu białka syntetyzowanego z kodonu AUG2. Do równoczesnej stymulacji translacji z kodonu AUG2 i inhibicji z kodonu AUG1, dochodziło w reakcji translacji modelowego mRNA Hp53-554 [151]. W tym przypadku, kap-zależna translacja z kodonu AUG1 była hamowana przez obecność stabilnej termodynamicznie spinki, wprowadzonej blisko końca 5' mRNA. Brak inhibującego wpływu spinki na syntezę rozpoczynającą się z kodonu AUG2, wskazywał na mechanizm zależny od elementu IRES. Jak wykazano wcześniej, mRNA posiadające elementy IRES ulegają wydajnej translacji *in vivo*, nawet gdy na ich końcu 5' znajduje się нефunkcjonalny analog kapu. Na przykład, translacja modelowego mRNA składającego się z regionu 5'UTR mRNA prekursora amyloidu APP oraz sekwencji kodującej białko reporterowe lucyferazy, zachodziła z 3-krotnie większą wydajnością gdy kap na końcu 5' zastąpiono нефunkcjonalnym analogiem ApppG [166]. Również translacja szeregu komórkowych mRNA, w których postulowano obecność elementów IRES, zachodziła wydajniej pomimo ograniczenia kap-zależnego procesu za pomocą analogu kapu ApppG [169].

3.3.1.3. Obecność ogonu poli(A) nie wpływa stymulująco na translację w lizacie z króliczych retikulocytów

Doświadczenia z wykorzystaniem modelowych mRNA posiadających kap na końcu 5' i ogon poli(A) na końcu 3', nie wykazały stymulującego wpływu ogona poli(A) na syntezę białka reporterowego w warunkach *in vitro*. Świadczy o tym 40-50% inhibicja translacji z mRNA P1- Δ Np53-Luc oraz aż 80% spadek ilości białka syntetyzowanego z mRNA P1-p53-Luc (Rys. 28). Ponieważ spadek ten dotyczył translacji z obu kodonów AUG, można przypuszczać, że ogon poli(A) inhibuje zarówno inicjację zależną od kapu jak i od elementu IRES. Wynik ten jest niezgodny z oczekiwaniami, ponieważ już w latach '90 Gallie wykazał stymulujący wpływ ogona poli(A) na translację, który wynikał z cyrkularyzacji mRNA [149]. Ogon poli(A) wywiera również pozytywny efekt na translację zależną od IRES u picornawirusów [150; 173; 174]. Jednakże, większość doświadczeń opisujących stymulujący efekt synergistycznego oddziaływania kapu i ogona poli(A) na proces translacji była prowadzona na żywych komórkach ludzkich i drożdżowych oraz na roślinnych protoplastach. Zaobserwowanie efektu synergizmu okazało się niemożliwe w przypadku niektórych lizatów, takich jak lizat z retikulocytów królika, kielków pszenicy oraz komórek HeLa.

Rozwiązaniem tego problemu okazało się zastosowanie lizatów z komórek drożdży, które odzwierciedlały wpływ ogona poli(A), obserwowany w warunkach *in vivo* zarówno w przypadku kap-zależnej jak i IRES-zależnej translacji wirusowych oraz komórkowych mRNA [175]. Powyższe cechy wykazywał również lizat z komórek HeLa, który zastosowano w celu badania IRES-zależnej translacji picornawirusów [150]. Jeżeli chodzi o lizat z retikulocytów królika, to jedynie lizat nie traktowany mikrokokalną nukleazą, lizat traktowany nukleazą ale uzupełniony dużą ilością egzogennych RNA lub pozbawiony nadmiaru rybosomów i czynników inicjacyjnych jest wiarygodnym systemem bezkomórkowym do badania efektu poliadenylacji [164; 173]. W przypadku lizatu trawionego mikrokokalną nukleazą zauważono, że ogon poli(A) na końcu 3' mRNA (pomimo obecności kapu na końcu 5'), nie powoduje silnej stymulacji translacji, zarówno zależnej od kapu jak i od elementu IRES [164]. Co więcej, obecność ogona poli(A) na końcu 3' mRNA, który nie posiadał kapu osłabiała proces translacji. Ponieważ swoje badania prowadziłam w lizacie trawionym mikrokokalną nukleazą postanowiłam sprawdzić, czy inhibujący wpływ ogona poli(A) na translację inicjowaną z kodonów AUG1 i AUG2 wynika z opisanych wcześniej właściwości tego systemu. Wyniki translacji kontrolnego mRNA Luc (Rys. 29) są zgodne z danymi literaturowymi, ponieważ dodanie ogona poli(A)

do mRNA Luc, który posiadał kap na końcu 5' doprowadziło do obniżenia a nie wzrostu ilości syntetyzowanego białka, w porównaniu z translacją mRNA, który posiadał jedynie kap na końcu 5'. Zaobserwowałam również, że obecność ogona poli(A) w mRNA kontrolnym hamuje translację. Potwierdza to przypuszczenie, że trawiony mikrokokalną nukleazą lizat retikulocytów królika nie odzwierciedla synergistycznego oddziaływania kapu z ogonem poli(A) [164].

3.3.2. Izoforma Δ Np53 może powstawać z transkryptu zawierającego intron 2 według mechanizmu wznowienia translacji

Transkrypt p53, który zawierał intron 2 pierwotnie zidentyfikowano podczas klonowania genu *TP53* [176; 177]. Jednakże, wyizolowany z ludzkich fibroblastów klon cDNA nie posiadał pełnej sekwencji intronu 2 oraz kodonu AUG. Dopiero kontynuacja badań prowadzonych przez Ghosh'a i współpracowników [13] doprowadziła do zidentyfikowania transkryptu, zawierającego intron 2 (mRNA p53(EII)) zarówno w liniach ludzkich komórek nowotworowych jak i zdrowych. Przeprowadzona przez nich analiza PCR w czasie rzeczywistym pokazała, że ilość tego transkryptu jest około kilkaset razy niższa w porównaniu z mRNA p53. Wykazano również asocjację transkryptu p53(EII) z polirybosomami, co oznacza że w procesie translacji może powstawać z niego białko. Można spodziewać się, że z tego transkryptu nie będzie powstawało białko p53 pełnej długości, ponieważ za kodonem AUG1 znajduje się kodon terminacyjny UGA w obrębie intronu 2. Utworzona pomiędzy kodonami AUG1 i UGA krótka otwarta ramka odczytu uORF koduje jedynie 25-aminokwasowy peptyd. Z kolei, translacja białka Δ Np53 z mRNA p53(EII) wydaje się być możliwa. Zaproponowano alternatywny sposób generowania izoformy Δ Np53 z transkryptu z zachowanym intronem 2, według mechanizmu wznowienia translacji

z kodonu AUG2 po zakończeniu syntezy peptydu. Jednakże, analiza Western blot przeprowadzona przez Ghosh'a nie wskazuje jednoznacznie na to, że izoforma Δ Np53 powstaje z transkryptu p53(EII), ponieważ wprowadzali oni do komórek cDNA zawierający sekwencję intronu 2, który podlegał również alternatywnemu składaniu. W związku z tym nie można było rozróżnić, czy izoforma Δ Np53 powstaje z mRNA p53(EII) czy z mRNA p53 bez intronu 2. Ponadto, nie było wiadomo czy kodon AUG1 jest aktywny translacyjnie i czy tworzy on uORF, ponieważ nie zidentyfikowano 25-aminokwasowego peptydu. Aby sprawdzić, czy możliwa jest synteza izoformy Δ Np53 z transkryptu z zachowanym

intronem 2 według mechanizmu reinicjacji translacji, wykonałam szereg reakcji z modelowymi mRNA, zawierającymi wariant regionu terminalnego 5' mRNA p53 z intronem 2 oraz sekwencję kodującą białko reporterowe lucyferazy.

Otrzymane przeze mnie wyniki translacji w warunkach *in vitro* z użyciem mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc i P0- Δ Np53(int2)-Luc, przemawiają za możliwością powstawania izoformy Δ Np53 z mRNA p53 z zachowanym intronem 2. Świadczy o tym obecność jednego prążka na autoradiogramie, którego szybkość migracji w żelu odpowiada szybkości migracji produktu białkowego generowanego z kodonu AUG2 (Rys. 22). Dodatkowym potwierdzeniem są wyniki otrzymane z transfekcji komórek HeLa i MCF-7 (Rys. 31). W przeciwieństwie do grupy Ghosh'a, do komórek wprowadzałam modelowe konstrukty w formie mRNA a nie cDNA, co wyklucza możliwość generowania transkryptu p53 bez intronu 2. Określenie ilości białka powstającego w komórkach z mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc i P0- Δ Np53(int2)-Luc polegało w tym przypadku na pomiarze aktywności lucyferazy. Ponieważ w obu mRNA za kodonem AUG1 znajduje się kodon STOP, ilość powstającej lucyferazy dotyczyła wyłącznie translacji inicjowanej z kodonu AUG2 (Rys. 31). Generowanie izoformy Δ Np53 z transkryptu, który posiada intron 2 jest tym bardziej możliwe, gdyż kodon AUG2 umiejscowiony jest w optymalnym kontekście Kozak.

Stosowane przeze mnie metody detekcji białek uniemożliwiały identyfikację 25-aminokwasowego peptydu, którego synteza miałaby zaczynać się z kodonu AUG1. Kodon AUG1 również znajduje się w silnym kontekście Kozak. Aby sprawdzić czy kodon AUG1 jest aktywny translacyjnie, kodon STOP UGA w intronie 2 zastąpiłam kodonem GCG dla alaniny, aby zapobiec terminacji translacji (Rys. 23). Wyniki translacji *in vitro* z mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc oraz P0- Δ Np53(int2-mut)-Luc pokazały, że z kodonu AUG1 również inicjowany jest proces translacji. Świadczy o tym pojawienie się dodatkowego górnego prążka na autoradiogramach. Białko to migrowało wolniej w porównaniu do białka fuzyjnym syntetyzowanego z kodonu AUG1 z mRNA P1- Δ Np53-Luc, który pozbawiony jest intronu 2. Ponieważ kodon UGA w intronie 2 zastąpiłam kodonem GCG, translacja była kontynuowana do momentu napotkania kodonu STOP na końcu mRNA, przez co białko to było dłuższe o fragment kodowany przez intron 2. W związku z powyższym można przyjąć, że w mRNA p53 zawierającym intron 2, kodon AUG1 wraz z kodonem STOP formuje uORF, z której powstaje krótki peptyd, natomiast znajdujący się poniżej kodon AUG2 rozpoczyna główną ramkę odczytu kodującą izoformę Δ Np53.

W przypadku obu mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc oraz P0- Δ Np53(int2-mut)-Luc, posiadających zmutowany kodon STOP, translacja z obu kodonów AUG była inicjowana z podobną wydajnością, kiedy nie posiadały kapu na końcu 5' (Rys. 23). Następnie w reakcji transkrypcji *in vitro* dodałam kap do końca 5' obu mRNA i poddałam je reakcji translacji *in vitro*. Zwiększona wydajność translacji z kodonu AUG1, spowodowana obecnością kapu na końcu 5' obu mRNA, sugeruje że krótki peptyd powstaje według modelu skaningowego. Co więcej, w reakcji inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL w obecności wolnego analogu kapu nie dochodziło do powstawania kompleksów rybosomalnych w obrębie kodonu AUG1, co dodatkowo potwierdza udział kapu na końcu 5' w inicjacji translacji (Rys. 40).

Większa ilość białka powstającego z kodonu AUG1 niż od AUG2 sugeruje, że translacja peptydu jest inicjowana z większą wydajnością (Rys. 22). Prawdopodobnie związane jest to zarówno z kontekstem kodonu AUG1 oraz jego odległością od końca 5' mRNA. W procesie inicjacji translacji małe podjednostki rybosomalne wiążą się do mRNA poprzez oddziaływanie z kapem na końcu 5' i zazwyczaj translacja inicjowana jest po napotkaniu pierwszego kodonu AUG [7]. W mRNA p53 kodon AUG1 jest pierwszym kodonem od końca 5', którego otoczenie sekwencyjne spełnia kryteria kontekstu Kozak. Niekiedy, pomimo optymalnego kontekstu, kodon inicjacyjny AUG może zostać nie rozpoznany przez kompleks inicjacyjny, gdy znajduje się zbyt blisko końca 5' mRNA [178]. Zaobserwowano, że kodony inicjacyjne znajdujące się w odległości 12 nukleotydów od kapu są pomijane przez małą podjednostkę rybosomalną [178]. Z kolei, zwiększanie długości regionu niekodującego 5' do ponad 20 nukleotydów prowadziło do wzrostu wydajności inicjacji translacji. W związku z powyższym, wydaje się że odległość kodonu AUG1 od końca 5' mRNA, która wynosi 122 nukleotydy, ma również wpływ na jego dokładną identyfikację przez kompleks inicjacyjny.

Translacja białka reporterowego inicjowana z kodonu AUG2 w mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc i P0- Δ Np53(int2-mut)-Luc, które posiadały analog kapu na końcu 5' była niższa niż ilość białka powstającego z kodonu AUG1 (Rys. 23). Niższy poziom białka kodowanego przez główną ramkę odczytu spowodowany wydajną translacją uORF jest charakterystyczny dla mechanizmu wznowienia translacji [50; 145; 179; 180]. W przypadku mRNA kodującego proteazę BACE1, translacja wszystkich czterech uORF prowadziła do inhibicji translacji BACE1 [179]. Wydajna translacja uORF1 również inhibowała syntezę koneksyny 41 *Xenopus laevis* [145]. W szczególności kodony inicjacyjne AUG rozpoczynające uORF, które umiejscowione są w optymalnym kontekście Kozak

inhibują translację głównej ramki odczytu. Powyższe przykłady sugerują, że w przypadku mRNA p53 z zachowanym intronem 2, przyczyną niskiej efektywności translacji z kodonu AUG2 może być wydajna translacja z kodonu AUG1. Ponadto, spadek ilości białka syntetyzowanego z kodonu AUG2, po dodaniu analogu kapu do końca 5' mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc i P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc sugeruje, że translacja izoformy Δ Np53 jest prawdopodobnie zależna od kapu i białko to może powstawać w procesie reinicjacji (Rys. 22 i 23).

Dodatkowym potwierdzeniem wpływu uORF rozpoczynającej się z kodonu AUG1 na translację z kodonu AUG2 są wyniki translacji *in vitro* z mRNA P1- Δ Np53(int2/AUG1-mut)-Luc oraz P1- Δ Np53(int2-mut/AUG1-mut)-Luc (Rys. 24). Oba mRNA zamiast kodonu AUG1 posiadały kodon GCA, w związku z czym nie dochodziło do translacji białka z kodonu AUG1 (Rys. 24). Świadczy o tym brak górnego prążka na autoradiogramie w reakcji z mRNA, który dodatkowo posiadał zmutowany kodon STOP. W reakcjach tych ilość białka syntetyzowanego z kodonu AUG2 była wyższa niż w reakcjach z mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc. Silny wzrost translacji inicjowanej z głównej ramki odczytu zaobserwowano również w P1- Δ Np53(int2-mut/AUG1-mut)-Luc przypadku koneksyny 41, gdy nie dochodziło do syntezy z kodonu AUG1 na skutek zastąpienia go kodonem AAG [145]. Na podstawie tych obserwacji można sądzić, że gdy 25-aminokwasowy peptyd nie jest syntetyzowany z kodonu AUG1, translacja izoformy Δ Np53 z kodonu AUG2 zachodzi wydajniej. Sugeruje to również, że w przypadku niezmutowanego mRNA z intronem 2, kodon AUG1 jest rozpoznawany przez kompleks inicjacyjny, a po napotkaniu kodonu STOP dochodzi do jego oddysocjowania.

Mniejsza ilość białek powstających z głównych ramek odczytu jest charakterystyczna dla mechanizmu reinicjacji translacji i jest związana z faktem, że nie wszystkie kompleksy rybosomalne są zdolne do ponownego rozpoczęcia translacji po ukończeniu syntezy z uORF. Wznowienie translacji jest możliwe tylko wtedy gdy uORF jest krótka i ma to związek z długością trwania etapu elongacji [61; 62; 159]. Im krócej zachodzi translacja uORF tym większe prawdopodobieństwo, że nie dojdzie do oddysocjowania niektórych czynników inicjacyjnych, które są niezbędne do wznowienia translacji z kolejnego kodonu AUG. Według danych literaturowych, reinicjacja może zachodzić gdy uORF posiada długość 72 nukleotydów i nie może przekraczać 120 nukleotydów [61]. Kluczowe znaczenie ma także odległość między kodonem STOP a kolejnym kodonem AUG. Zaobserwowano, że częstość

zachodzenia reinicjacji wzrasta z 16% do 38%, gdy odległość między tymi kodonami wydłuża się z 16 do 64 nukleotydów [62]. W przypadku mRNA kodującego proteazę BACE1 dochodziło do spadku wydajności reinicjacji, gdy usunięto 11-nukleotydowy fragment pomiędzy uORF a główną ORF [179]. Stymulujący wpływ wzrostu odległości pomiędzy otwartymi ramkami odczytu na translację związany jest z możliwością ponownego nabycia czynników, niezbędnych do ponownego rozpoczęcia translacji. Długość uORF w mRNA p53 zawierającym intron 2 wynosi 100 nukleotydów, natomiast fragment pomiędzy kodonem STOP a kodonem AUG2 ma długość 156 nukleotydów. Istnieje zatem możliwość, że zarówno długość uORF i regionu pomiędzy kodonem STOP i AUG2 zapobiega nadmiernej utracie czynników inicjacyjnych lub umożliwia ich ponowne nabycie, co w konsekwencji sprzyja zachodzeniu reinicjacji z kodonu AUG2. Ponieważ reinicjacja jest procesem o niskiej wydajności, ilość białka powstającego z głównej ramki odczytu jest zawsze niższa w porównaniu z wydajnością translacji uORF (Kozak 2001). Tłumaczy to niski poziom białka powstającego z kodonu AUG2 w modelowych mRNA z intronem 2, zarówno w RRL jak i komórkach HeLa i MCF-7 (Rys. 22 i 31).

Analiza transkryptomu ujawniła, że około 40% komórkowych mRNA posiada dodatkowe kodony inicjacyjne w swoich regionach niekodujących 5', które tworzą uORF [146; 147; 181]. uORF występują szczególnie często w mRNA kodujących czynniki wzrostu, cytokiny, kinazy oraz czynniki transkrypcyjne [178]. Główną rolą uORF jest hamowanie translacji białek, których zbyt duże ilości mogłyby być szkodliwe dla komórki. W świetle tych informacji, mechanizm generowania 25-aminokwasowego peptydu z transkryptu p53 z intronem 2 mógłby stanowić mechanizm ograniczający ilość białka p53 w komórce. Z drugiej strony, synteza izoformy Δ Np53 z tego samego transkryptu prowadziłaby do zwiększenia ilości tej izoformy w komórce, ponieważ generowana jest ona również z mRNA p53 nie zawierającego intronu 2. W konsekwencji prowadziłoby to do obniżenia poziomu białka p53, ponieważ izoforma Δ Np53 tworzy homo- i heterodimery z białkiem p53, przez co funkcjonuje jako negatywny regulator jego aktywności [11; 12]. Ponadto, ekspresja izoformy Δ Np53 z mRNA zawierającego intron 2 może być specyficzna tkankowo, gdyż transkrypt ten zidentyfikowano tylko w niektórych liniach komórkowych [13; 143]. Nie wykluczone, że obecność dodatkowych kopii izoformy Δ Np53 może być związana z zaburzeniami ekspresji białka p53 w tych komórkach.

3.3.3. Wpływ struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 na poziom translacji i rozpoznawanie kodonów inicjacyjnych AUG

Regiony terminalne 5' mRNA odgrywają kluczową rolę w regulacji syntezy białek w komórce. W przypadku 90% mRNA kręgowców, długość regionów terminalnych 5' wynosi od 10 do 200 nukleotydów [182]. Pozostałe 10% mRNA posiada regiony terminalne 5', których długość przekracza 200 nukleotydów [50]. Ponadto, charakteryzują się one dużą zawartością par G-C oraz występowaniem kilku kodonów inicjacyjnych AUG [50; 178]. Długie regiony terminalne 5', bogate w pary G-C umożliwiają tworzenie trwałych termodynamicznie motywów struktury drugorzędowej RNA, które uczestniczą w regulacji inicjacji translacji [183]. W przypadku translacji zależnej od kapu, stabilna struktura drugorzędowa w obrębie regionu terminalnego 5' mRNA może utrudniać wiązanie kompleksu preinicjacyjnego lub skanowanie mRNA, i w konsekwencji hamować syntezę białka [3; 178]. Inhibujący wpływ struktury drugorzędowej RNA na inicjację translacji zaobserwowano w przypadku mRNA kodujących czynniki wzrostu czy proto-onkogeny [178; 182; 184]. Motywy struktury drugorzędowej RNA mogą również tworzyć elementy IRES, które umożliwiają syntezę białka w warunkach gdy translacja zależna od kapu jest zahamowana. Elementy IRES zidentyfikowano w obrębie regionów terminalnych 5' mRNA czynników transkrypcyjnych i translacyjnych, hormonów, czynników wzrostu, onkogenów czy supresorów nowotworzenia [10; 15].

Celem doświadczeń opisanych w niniejszym rozdziale było sprawdzenie w jaki sposób struktura drugorzędowa RNA regionu terminalnego 5' mRNA p53 wpływa na efektywność translacji inicjowanej z kodonu AUG1 i AUG2 oraz na tworzenie kompleksów rybosomalnych w ich obrębie. W tym celu wykorzystałam warianty regionu terminalnego 5' mRNA różniące się długością, które kontrolowały translację białka reporterowego lucyferazy *Renilla*.

Regionowi terminalnemu 5' mRNA p53 odpowiadał wariant P1- Δ Np53, który oprócz regionu 5'UTR posiadał fragment sekwencji kodującej białko p53 (Rys. 21). Analiza struktury drugorzędowej tego regionu wykazała, że w wyniku oddziaływania fragmentu sekwencji kodującej pomiędzy kodonami AUG1 i AUG2 z regionem 5' UTR powstają dwa charakterystyczne motywy typu spinki: G56-C169, w obrębie której umiejscowiony jest kodon AUG1 oraz U180-A218, z którą oddziałuje białko Mdm2 [151] (Rys. 32). Struktura drugorzędowa tego regionu była również zachowana w dłuższej cząsteczce mRNA, zawierającej połowę sekwencji kodującej białko p53 oraz w pełnej

długości mRNA p53 [151]. Te dwa motywy strukturalne typu spinki były również obecne w modelowym mRNA P1- Δ Np53-Luc, który wykorzystywałam w badaniach procesu translacji (Rys. 33). Wskazuje na to rozkład cięć RNA indukowanych w obecności jonów Pb^{2+} oraz miejsca modyfikacji chemicznych za pomocą odczynnika NMIA i siarczanu dimetylu, które dobrze korespondują do modelu struktury drugorzędowej izolowanego regionu P1- Δ Np53 (Rys. 33 i 32). Obecność spinki G56-C169 oraz U180-A218 pomimo dodatkowej sekwencji kodującej białko lucyferazy, świadczy o wysokiej zachowawczości struktury tego regionu. Co więcej, struktura regionu P1- Δ Np53 w modelowym konstrukcie mRNA nie zmieniła się również w środowisku lizatu, co świadczy o wysokiej stabilności formowanych motywów strukturalnych w warunkach, w których zachodzi proces translacji (Rys. 34).

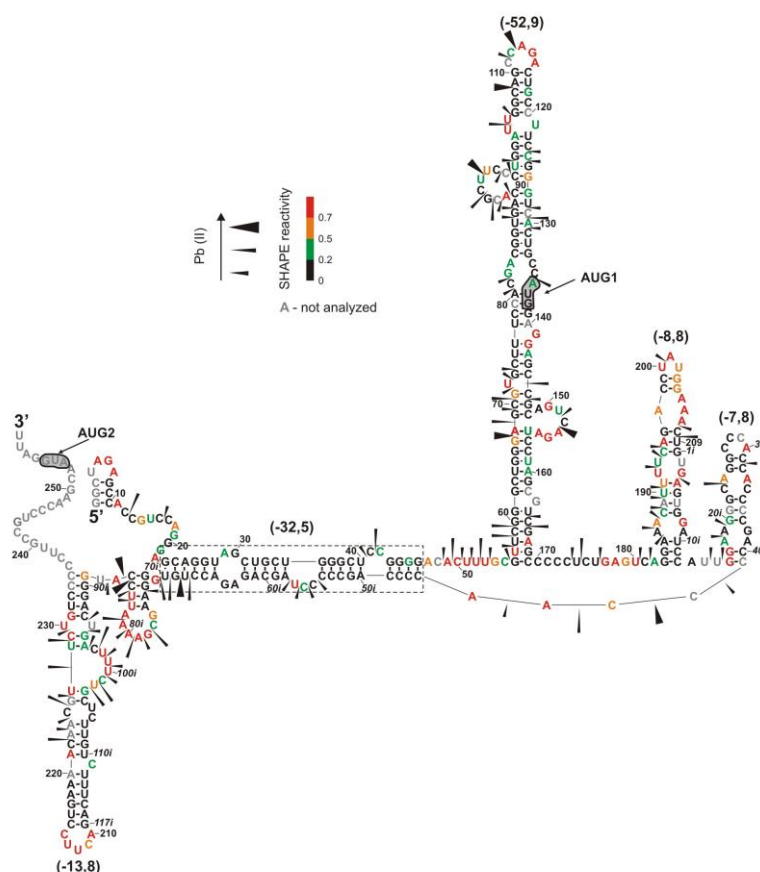
3.3.3.1. Rola spinki G56-C169 w translacji inicjowanej z kodonu AUG1

Według danych literaturowych stabilne motywy strukturalne obecne w regionach terminalnych 5' mRNA stanowią barierę dla kompleksów rybosomalnych i hamują syntezę szczególnie tych białek, których nadmierna ilość mogłaby być szkodliwa dla funkcjonowania komórki. Natomiast białka, które syntetyzowane są w komórce w dużych ilościach, kodowane są zazwyczaj przez mRNA nie posiadające stabilnych termodynamicznie motywów strukturalnych w obrębie regionu terminalnego 5'. Zważywszy na fakt, iż kodon inicjacyjny dla białka p53 umiejscowiony jest w obrębie trwałej termodynamicznie spinki G56-C169, której $\Delta G = -52,9$ kcal/mol można sądzić, że dużą rolę w utrzymaniu niskiego poziomu tego białka w komórce odgrywa struktura regionu terminalnego 5' mRNA p53. W reakcji translacji *in vitro* modelowego mRNA P1- Δ Np53-Luc zaobserwowałam około 90% inhibicję syntezy białka reporterowego powstającego z kodonu AUG1, w porównaniu do mRNA kontrolnego Luc (Rys. 22).

Dowodem na inhibujący wpływ spinki G56-C169 na translację inicjowaną z kodonu AUG1 są wyniki otrzymane z wykorzystaniem mRNA P1-p53-Luc (Rys. 22). Region P1-p53 posiada tylko kodon inicjacyjny AUG1 i odpowiada regionowi 5'UTR mRNA p53 (Rys. 20). Ponieważ ten fragment mRNA nie obejmuje sekwencji między kodonami AUG1 i AUG2, przyjmuje on odmienną strukturę od regionu P1- Δ Np53 i związa się w kilka krótkich motywów typu spinki o niskiej stabilności termodynamicznej (Rys. 32). Struktura tego regionu jest również zachowana w modelowym mRNA, zawierającym sekwencję kodującą lucyferazę,

zarówno *in vitro* jak i w środowisku RRL (Rys. 35). W przypadku mRNA P1-p53-Luc ilość białka syntetyzowanego z kodonu AUG1 była wyższa około 5-6 krotnie w porównaniu z mRNA P1-ΔNp53-Luc (Rys. 22). Można zatem przypuszczać, że obecne w regionie P1-p53 motywy typu spinki stanowią mniejszą przeszkodę do pokonania dla skanującego kompleksu inicjacyjnego niż spinka G56-C169 obecna w regionie P1-ΔNp53, co skutkuje wydajniejszą inicjacją translacji. W komórce eukariotycznej bardzo często z tego samego genu powstaje kilka transkryptów, które różnią się pod względem długości regionu terminalnego 5' [182]. Taka strategia umożliwia regulację syntezy białka za pomocą struktury regionu terminalnego 5'. Na przykład obecność stabilnej struktury 300-nukleotydowego regionu 5'UTR mRNA Mdm2 skutkuje obniżeniem poziomu tego białka w komórce [142]. Natomiast transkrypt skrócony o 232 nukleotydy od końca 5' pozwala na wydajniejszą syntezę białka Mdm2, ponieważ jego region 5'UTR przyjmuje mniej stabilną strukturę.

Mapowanie struktury drugorzędowej regionu P1-ΔNp53(int2) ujawniło, że spinka G56-C169 również może tworzyć się w regionie terminalnym 5' mRNA p53, pomimo znajdującego się poniżej w kierunku 3' intronu 2 [185] (Rys. 43). Sugeruje to, że translacja 25-aminokwasowego peptydu z kodonu AUG1 w mRNA p53 z zachowanym intronem 2 może być inicjowana w podobny sposób co translacja z tego kodonu w dojrzałym mRNA p53. W celu określenia efektywności translacji z kodonu AUG1 w mRNA p53 zawierającym intron 2, zastosowałam modelowy mRNA P1-ΔNp53(int2-mut)-Luc (Rys. 23). W konstrukcie tym kodon STOP w intronie 2 został zastąpiony kodonem GCG kodującym aminokwas alaninę, co umożliwiło identyfikację produktu białkowego powstającego z kodonu AUG1. Ilość białka powstającego z kodonu AUG1 w mRNA z intronem 2, który posiadał kap na końcu 5' wynosiła 13,1%. Wartość ta była porównywalna z wydajnością translacji z kodonu AUG1 w kapowanym mRNA P1-ΔNp53-Luc, która wynosiła 12,7% (Rys. 23 i 22). Wyniki otrzymane z wykorzystaniem modelowego mRNA P1-ΔNp53(int2-mut)-Luc pokazują, że spinka G56-C169 jest kluczowym elementem strukturalnym, który uczestniczy w regulacji poziomu białka generowanego z kodonu AUG1.



Rys. 43 Model struktury drugorzędowej RNA P1- Δ Np53(int2) wygenerowany na podstawie mapowania za pomocą cięć indukowanych w obecności jonów Pb²⁺ oraz metody SHAPE. W nawiasach podano stabilność termodynamiczną poszczególnych motywów strukturalnych wyrażonych za pomocą parametru ΔG [185].

Według danych literaturowych, obecne w regionach terminalnych 5' mRNA motywy strukturalne typu spinki, których ΔG wynosi od -30 do -40 kcal/mol mogą stanowić zawadę przestrzenną dla skanującego rybosomu lub utrudniać wiązanie kompleksu preinicjacyjnego do końca 5' mRNA, nawet gdy są one zlokalizowane w znacznej odległości od niego [186]. Sugeruje to, że tworzenie kompleksu inicjacyjnego w obrębie kodonu AUG1 może zachodzić wolniej, ze względu na jego umiejscowienie w stabilnej spince G56-C169. Wydaje się więc, że spinka G56-C169 znacznie redukuje ilość białka powstającego z kodonu AUG1, pomimo tego iż znajduje się on w optymalnym kontekście Kozak. Wskazuje na to brak prążków poniżej kodonu AUG1, odpowiadających kompleksom inicjacyjnym w reakcji „odcisku palca” z odwrotną transkryptazą AMV na matrycy modelowych mRNA z dwoma kodonami AUG (Rys. 38). Natomiast w przypadku mRNA P1-p53-Luc, zastosowanie odwrotnej transkryptazy AMV umożliwiło identyfikację kompleksów rybosomalnych dla

kodonu AUG1 (Rys. 38). Jednakże, region P1-p53 przyjmuje mniej stabilną strukturę drugorzędową, w której motyw spinki G56-C169 jest nieobecny. Dopiero zastosowanie odwrotnej transkryptazy SuperScript III pozwoliło na identyfikację kompleksów rybosomalnych, formowanych w obrębie kodonu AUG1 w mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc (Rys. 40). Uważa się, że odwrotna transkryptaza SuperScript III posiada większą zdolność do rozplatania stabilnych struktur typu spinka niż odwrotna transkryptaza AMV [43]. W związku z powyższym można sądzić, że do rozpoczęcia syntezy z kodonu AUG1 wymagany jest udział czynników o aktywności helikazy RNA. Według danych literaturowych, do utworzenia kompleksu inicjacyjnego 48S w obrębie regionu terminalnego 5' mRNA, zawierającego stabilne struktury spinkowe, dochodzi dopiero w obecności białek z rodziny DEAD/DEXX-box, które wykazują wysoką aktywność helikazową [187].

3.3.3.2. Rola spinki G56-C169 i U180-A218 w translacji rozpoczynającej się z kodonu AUG2

W przypadku kodonu AUG2, zarówno w mRNA P1- Δ Np53-Luc jak i P1- Δ Np53(int2)-Luc translacja była inicjowana z podobną wydajnością, która wynosiła około 1,5% w stosunku do translacji kontrolnego mRNA Luc (Rys. 22). Jednakże, w przypadku tych dwóch mRNA, translacja zachodzi prawdopodobnie według dwóch różnych mechanizmów. Wcześniejsze badania pokazały, że synteza białka z kodonu AUG2 w modelowym mRNA, który zawiera intron 2 zachodzi na drodze wznowienia translacji zależnej od kapu (rozdział 3.2.1.2.). Natomiast translacja inicjowana z tego samego kodonu w mRNA P1- Δ Np53-Luc, wykazuje raczej charakter kap-niezależny (Rys. 22 i 26). Postuluje się, że w regionie terminalnym 5' mRNA p53 występuje element IRES, który umożliwia bezpośrednie związanie kompleksu inicjacyjnego bez konieczności skanowania mRNA od końca 5' [11].

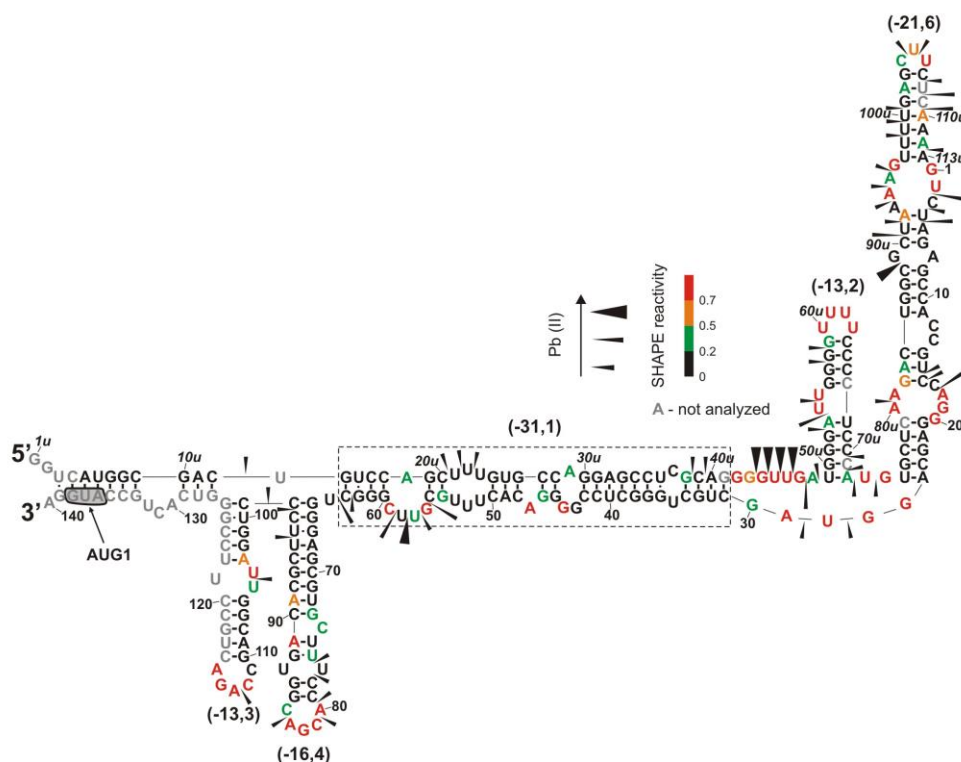
Pomimo znacznego oddalenia spinki G56-C169 od kodonu AUG2, ma ona również wpływ na translację z tego kodonu. Świadczy o tym inhibicja translacji z kodonu AUG2, pod wpływem oligonukleotydu antysensowego nr 1, komplementarnego do podstawy spinki G56-C169 po jej stronie 5' (rozdział 3.4. rys. 48 i 49). Silnie inhibujący wpływ na inicjację translacji z kodonu AUG2 miały również oligomery nr 7, 7a i 7b, które hybrydyzowały do spinki U180-A218 oraz sąsiadujących z nią regionów jednoniciowych. Odcięcie przez RNazę H motywów typu spinka pod wpływem oligonukleotydów typu gapmer,

lub zablokowanie ich dostępności przez oligomery metylowane, prawdopodobnie uniemożliwia oddziaływanie tych struktur z białkami lub czynnikami inicjacyjnymi, co w konsekwencji prowadzi do spadku wydajności translacji z kodonu AUG2. Można zatem przypuszczać, że spinka G56-C169 oraz U180-A218 stanowią ważne motywy strukturalne, wpływające na efektywność translacji inicjowanej z kodonu AUG2.

3.3.3.3. Wpływ regionu międzypromotorowego P0-P1 na translację inicjowaną z kodonu AUG1 i AUG2

Inhibujący wpływ na translację białka w stosowanym systemie reporterowym, miała również obecność regionu międzypromotorowego P0-P1 (Rys. 22, 23 i 31). Efekt ten obserwowałam zarówno w RRL jak i liniach komórkowych HeLa i MCF7 i dotyczył on wszystkich wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53. Jednakże, region P0-P1 hamował głównie translację inicjowaną z kodonu AUG1. Obniżona ekspresja białka p53 z transkryptów rozpoczynających się w miejscu promotorowym P0, była obserwowana już wcześniej przez inne grupy badawcze [137; 141]. Natomiast efektywność translacji inicjowanej z kodonu AUG2, zmniejszyła się jedynie 1-3-krotnie. Sugerowano wcześniej, że za obniżoną ekspresję białka p53 odpowiada stabilna struktura pomiędzy promotorami P0 i P1 [137; 141]. Region P0-P1 wykazywał negatywny wpływ na translację białka reporterowego zarówno w RRL jak i w kilku liniach komórkowych [14].

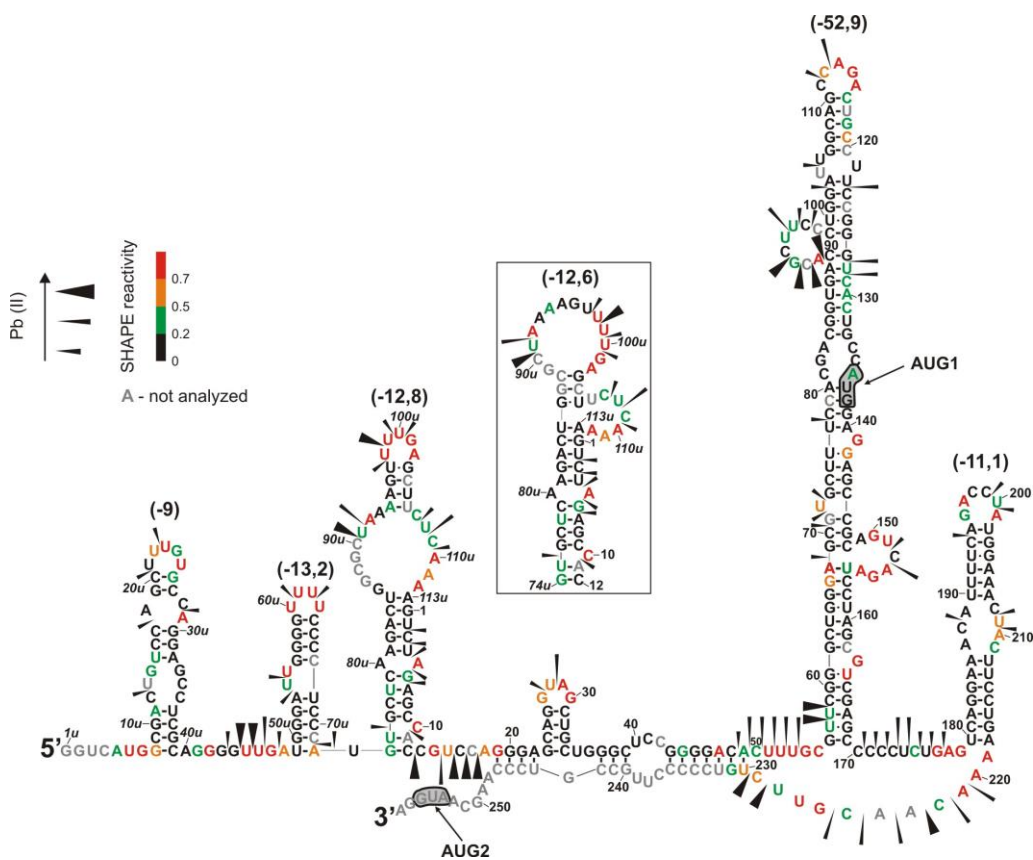
Największy stopień inhibicji translacji zaobserwowałam w przypadku wydłużenia o region P0-P1 mRNA P1-p53-Luc, który zawiera jedynie kodon AUG1 (Rys. 22, warianty A i B). Ilość białka syntetyzowanego z mRNA P0-p53-Luc w reakcji translacji *in vitro* była aż 7-9 krotnie niższa, w porównaniu z mRNA P1-p53-Luc. Natomiast w linii komórkowej MCF-7 zaobserwowałam już tylko 3-krotny spadek ilości białka, podczas gdy dodanie regionu P0-P1 nie wpływało na translację w komórkach HeLa (Rys. 31). Dane literaturowe sugerują, że efekt inhibicji translacji przez elementy struktury drugorzędowej RNA jest mniejszy w warunkach *in vivo* niż *in vitro*, co może być związane z modyfikacjami maszynery translacyjnej lub obecnością helikaz [54; 188]. Otrzymane przez nas wcześniej wyniki mapowania struktury drugorzędowej regionu P1-p53 i P0-p53 pokazują, że obecność regionu międzypromotorowego P0-P1 prowadzi do drastycznych zmian w strukturze regionu terminalnego 5' mRNA p53, kończącego się kodonem AUG1 [151; 185].



Rys. 44 Struktura drugorzędowa RNA regionu P0-p53. W nawiasach podano wartość parametru ΔG dla poszczególnych motywów strukturalnych [185].

Na skutek oddziaływania fragmentu regionu P0-P1, utworzonego przez nukleotydy U3u-G41u, z nukleotydami C31-G139 powstaje długi dwuniciowy odcinek, który zawiera wybrzuszenia, pętle wewnętrzne oraz dwie spinki G65-C98 i C99-G126 (Rys. 44). Obie struktury typu spinki są jedynymi wspólnymi elementami strukturalnymi dla regionu P1-p53 oraz P0-p53. W pozostałej części regionu P0-p53 tworzą się dodatkowo dwie struktury typu spinki U49u-A72u oraz U75u-A25. Bardziej stabilna struktura regionu P0-p53, w porównaniu z regionem P1-p53 może stanowić większą przeszkodę do rozplecenia dla kompleksu rybosomalnego i być przyczyną zmniejszonej wydajności translacji z kodonu AUG1. Wydaje się, że największy wpływ na translację inicjowaną z AUG1 może mieć część dwuniciowego odcinka charakteryzująca się wysoką stabilnością termodynamiczną, której ΔG wynosi - 31,1 kcal/mol oraz spinka U75u-A25, której $\Delta G = -21,6$ kcal/mol. Jest to zgodne z wcześniejszym doniesieniem, że struktury drugorzędowe typu spinki, których ΔG wynosi około - 30 kcal/mol i które znajdują się blisko końca 5' mRNA, są w stanie hamować proces inicjacji translacji [42].

W przeciwieństwie do modelowego mRNA P0-p53-Luc z jednym kodonem inicjacyjnym AUG1, obecność regionu P0-P1 w mRNA z dwoma kodonami inicjacyjnymi w mniejszym stopniu wpływała na translację z kodonu AUG1 (Rys. 22, warianty C i D). Aczkolwiek spadek ten dotyczył jedynie mRNA, posiadającego kap na końcu 5'. Różnice w wydajności translacji inicjowanej z kodonu AUG1 wynikają najprawdopodobniej z odmiennej struktury jaką przyjmuje region P0-P1, w zależności od wariantu regionu terminalnego 5' mRNA p53. W przeciwieństwie do wcześniejszych danych literaturowych odnośnie istnienia stabilnej struktury drugorzędowej w regionie P0-P1, z przeprowadzonych w naszym laboratorium badań wynika, że struktura taka nie powstaje [185] (Rys. 45).



Rys. 45 Model struktury drugorzędowej RNA regionu P0- Δ Np53. Stabilność termodynamiczna poszczególnych motywów strukturalnych podana jest w nawiasach jako parametr ΔG [185].

W regionie P0- Δ Np53, powyżej miejsca promotorowego P1 obecne są trzy motywy typu spinki, z których jedna U49u-A72u występuje również w regionie P0-p53. Wszystkie trzy motywy odznaczają się niską trwałością termodynamiczną, a dodatkowo oddzielone są fragmentami jednoniciowymi. W przeciwieństwie do regionu P0-p53, pierwsze siedem nukleotydów regionu P0-P1 występuje w RNA P0- Δ Np53 jako fragment

jednoniciowy. Wydaje się, że taka aranżacja strukturalna regionu P0-P1 nie powinna w znaczący sposób zakłócać skanowania regionu terminalnego 5' przez kompleks rybosomalny, tak jak miało to miejsce w przypadku regionu P0-p53. Dowodem na to może być całkowity brak wpływu regionu P0-P1 na translację *in vitro* niekapowanych mRNA P1- Δ Np53-Luc i P0- Δ Np53-Luc (Rys. 22, panel dolny, warianty C i D). Również w przypadku kapowanych mRNA, wydajność translacji spadła jedynie 2,7-krotnie (Rys. 22, panel górny, warianty C i D). Podobny spadek efektywności translacji obserwowałam w warunkach *in vivo*. Obecność regionu P0-P1 spowodowała zmniejszenie efektywności translacji 2,8-krotnie w komórkach HeLa i 3,3-krotnie w komórkach MCF-7 (Rys. 31, warianty C i D). Należy zauważyć, że struktura regionu P0-P1 nie wpływa na formowanie spinek G56-C169 oraz U180-A218. Zatem, translacja z kodonu AUG1, który umiejscowiony jest w obrębie spinki G56-C169 może być inicjowana z podobną wydajnością co z mRNA P1- Δ Np53-Luc. Chociaż wydaje się, że struktura regionu P0-P1 nie zakłóca procesu skanowania mRNA, to obniżony poziom białka powstającego z kapowanego mRNA P0- Δ Np53-Luc, może mieć związek z obecnością spinki G8u-C41u, dla której $\Delta G = -9$ kcal/mol. Jej bliskie położenie względem końca 5' mRNA może utrudniać oddziaływanie kompleksu preinicjacyjnego z kapem. Jednak dane literaturowe pokazują, że dopiero wprowadzenie spinki, której parametr $\Delta G = -30$ kcal/mol w odległości 12 nukleotydów od kapu silnie hamowało proces translacji [7].

Region P0-P1 hamował również translację, rozpoczynającą się z kodonu AUG1 z mRNA z zachowanym intronem 2. Efekt ten mogłam obserwować jedynie w przypadku mRNA P0- Δ Np53(int2-mut)-Luc, który posiadał zmutowany kodon STOP w intronie 2 (Rys. 23). Co ciekawe, stopień inhibicji był bardzo zbliżony do obserwowanego z mRNA P0- Δ Np53-Luc, który nie zawierał intronu 2 i dotyczył on tylko kapowanego mRNA. Pomimo braku danych na temat struktury drugorzędowej regionu P0-P1 w mRNA p53 z intronem 2, można przypuszczać, że struktura tego regionu nie wpływa ani na proces skanowania mRNA, ani na wiązanie kompleksu preinicjacyjnego do kapu na jego końcu 5'. Wskazuje na to niezmienny poziom białka powstającego z kodonu AUG1 z niekapowanych mRNA P1- Δ Np53(int2-mut)-Luc i P0- Δ Np53(int2-mut)-Luc (Rys. 23).

Brak znaczącego wpływu regionu P0-P1 na translację inicjowaną z kodonu AUG2 może wynikać z faktu, iż translacja z tego kodonu zachodzi prawdopodobnie z wykorzystaniem elementu IRES. Region P0-P1 nie zaburza formowania ważnych dla tego

elementu motywów strukturalnych, którymi są spinki G56-C169 i U180-A218 (Rys. 22 i 45). Z kolei, niewielki stopień inhibicji translacji z kodonu AUG2, spowodowany obecnością regionu P0-P1, może mieć związek z odległością regionu P0-P1 od kodonu AUG2. W przypadku mRNA zawierającego intron 2, synteza z kodonu AUG2 inicjowana jest prawdopodobnie na skutek wznowienia translacji, czyli według mechanizmu skaningowego. Ponieważ kompleks inicjacyjny rozpoczyna skanowanie mRNA od końca 5', musi on pokonać region P0-P1 aby dotrzeć do kodonu AUG1, a następnie do kodonu AUG2, który znajduje się aż 367 nukleotydów od regionu P0-P1. W związku z powyższym można przypuszczać, że z powodu znacznej odległości pomiędzy regionem P0-P1 a kodonem AUG2, jego struktura drugorzędowa nie ma większego znaczenia dla rozpoczęcia ponownej syntezy z kodonu AUG2.

3.4. Regulacja translacji p53 oraz izoformy Δ Np53 za pomocą oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53

3.4.1. Mapowanie miejsc dostępnych do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów w regionie terminalnym 5' mRNA p53

Kolejnym etapem mojej pracy doktorskiej było sprawdzenie, czy za pomocą oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53 można regulować efektywność translacji inicjowanej z kodonu AUG1 dla białka p53 oraz AUG2 dla izoformy Δ Np53.

W pierwszej kolejności postanowiłam określić miejsca dostępne do hybrydyzacji krótkich oligomerów DNA w regionie terminalnym 5' mRNA p53. Do tego celu wykorzystałam modelowy konstrukt mRNA P1- Δ Np53-Luc, składający się z sekwencji kodującej białko reporterowe lucyferazy oraz poprzedzającej ją regionu terminalnego 5' mRNA p53 P1- Δ Np53, który zawiera kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2. Badanie dostępności do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów przeprowadziłam przy użyciu bibliotek kombinatorycznych, składających się z 6-merów DNA oraz RNazy H z *Escherichia coli* [189]. RNaza H hydrolizuje preferencyjnie wiązanie fosfodiesterowe w obrębie duplesu RNA-DNA w odległości co najmniej 5 nukleotydów od końca 3' oligomeru DNA (Rys. 46). Cięcia mogą także występować bezpośrednio za dupleksem RNA-DNA, czyli w regionie jednoniciowym RNA. W każdej bibliotece 6-merów stały jest

trzeci nukleotyd od końca 5', co umożliwia identyfikację nukleotydu znajdującego się naprzeciw w cząsteczce RNA.



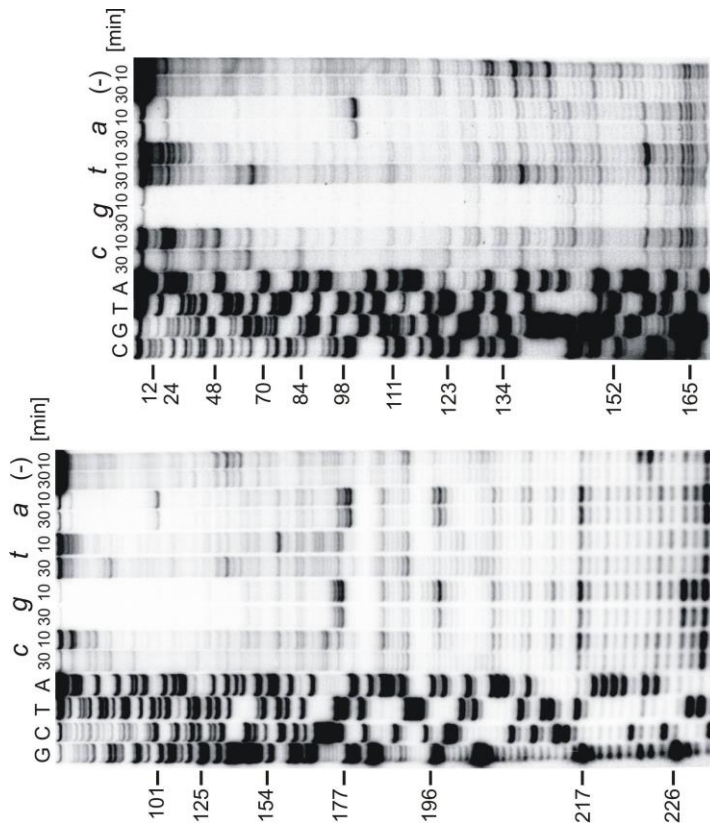
Rys. 46 (A) Biblioteki kombinatoryczne 6-merów DNA: *a*, *g*, *c*, *t* - trzeci deoksyrybonukleotyd od końca 5' jest zawsze stały, *n* - dowolny deoksyrybonukleotyd. (B) Preferencyjne cięcia heterodupleksu RNA-DNA przez RNazę H zostały oznaczone jako I, II i III; N-n - para zasad typu Watson-Crick, Y-x - trzecia para od końca 5' oligomeru DNA jest określona przez rodzaj biblioteki kombinatorycznej, w której w pozycji *x* występuje *a*, *g*, *c* lub *t*.

Każdą z bibliotek kombinatorycznych *a*, *g*, *c*, *t* poddawałam oddzielnie hybrydyzacji z mRNA P1-ΔNp53-Luc w temperaturze 37°C, po czym dodawałam RNazę H i kontynuowałam inkubację przez 10 i 30 minut. Aby zidentyfikować miejsca cięcia przez RNazę H, wykonałam reakcje odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanym oligonukleotydowym starterem DNA, który hybrydyzował do nukleotydów 237-257 w regionie terminalnym 5' mRNA p53. Ostatnim etapem mapowania miejsc dostępnych do hybrydyzacji był rozdział elektroforetyczny otrzymanych fragmentów cDNA w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (Rys. 47 A). Na podstawie autoradiogramu, fragmenty cDNA przyporządkowałam poszczególnym pozycjom nukleotydowym i naniosałam jako cięcia na model struktury drugorzędowej regionu P1-ΔNp53 oraz określiłam najbardziej prawdopodobne miejsca hybrydyzacji 6-merów DNA (Rys. 47 B).

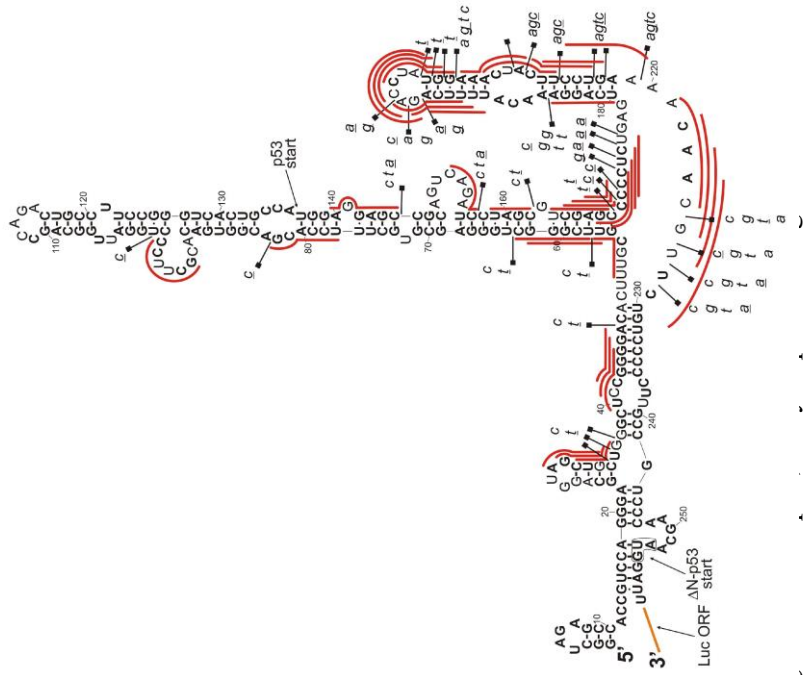
Rozkład cięć RNazą H w obrębie regionu terminalnego 5' mRNA p53 pokazuje, że region ten jest dostępny do hybrydyzacji krótkich oligomerów DNA, pomimo iż składa się on z wielu fragmentów dwuniciowych. Najwięcej cięć pojawiło się w obrębie spinki U180-A210, zbudowanej głównie z par A-U, a także w jednoniciowym regionie A218-C229, który składa się w większości z reszt A. Wyjątkowo dostępna okazała się pętla apikalna spinki U180-A218, ponieważ hybrydyzowała do niej największa ilość 6-merów DNA. Widoczne są również liczne cięcia w obrębie jednoniciowego regionu, pomiędzy spinkami G56-C169 i U180-A218. Z kolei, region bliżej końca 5' cząsteczki wykazuje mniejszą dostępność do hybrydyzacji. W tej części mRNA, cięcia obecne są tylko po stronie 3' spinki

G23-C34 oraz w przyległym regionie w kierunku 3'. Cięcia indukowane są również w obrębie spinki G56-C169, pomimo jej wysokiej stabilności termodynamicznej wynoszącej -52,9 kcal/mol. Są to pojedyncze cięcia za resztami U57, C63, G82, C99, C146, C158 oraz G163 i pojawiają się one w miejscach gdzie struktura spinki jest zaburzona przez jedno- i dwustronne wybrzuszenia. Krótkie oligomery DNA hybrydowały także do podstawy spinki G56-C169, gdzie obecne są niestandardowe pary G·U. Podstawa spinki po jej stronie 3' oraz znajdujący się za nią trakt bogaty w reszty C, wykazywały większą dostępność, na co wskazuje większa liczba przyłączających się tam oligomerów DNA. Nieoczekiwanie, spośród wszystkich jednoniciowych fragmentów w regionie terminalnym 5', pętla apikalna spinki G56-C169 była całkowicie niedostępna do hybrydyzacji komplementarnych oligomerów DNA, gdyż nie zidentyfikowano w jej obrębie żadnego cięcia RNazą H.

A



B



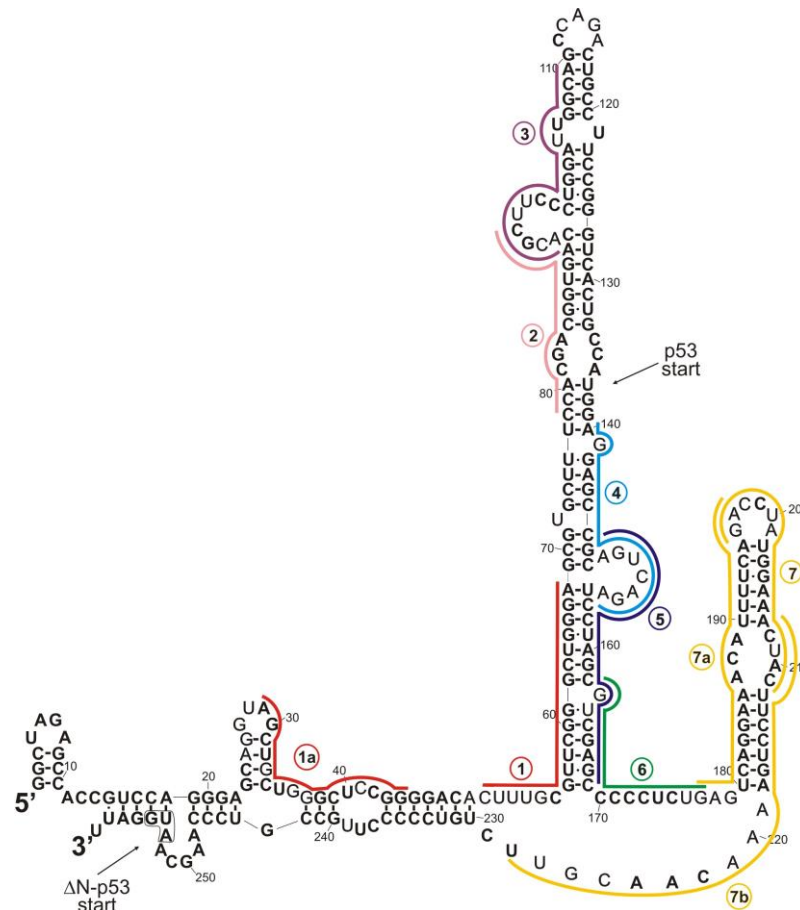
Rys. 47 Mapowanie miejsc dostępnych do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów w 1 u 5' mRNA p53. (A) Autoradiogramy przedstawiają długi i krótki bieg rozdziálu elektroforytycznego fragmentów cDNA w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. Fragmenty cDNA otrzymano w reakcji odwrotnej transkrypcji na matrycy mRNA P1-ΔNp53-Luc, który wcześniej poddany został cięciu za pomocą RNazy H w obecności biblioteki kombinatorycznej 6-merów DNA. C, G, T, A – reakcje sekwencjonowania z dideoksyrybonukleotydami ddG, ddC, ddA i ddT; c, g, t, a – biblioteki kombinatoryczne 6-merów. Po lewej stronie każdego autoradiogramu znajdują się wybrane reszty cytozyny lub guanozyny. (B) Na modelu struktury drugorzędowej RNA regionu terminalnego 5' mRNA p53 za pomocą czarnych wskaźników zaznaczono cięcia RNazą H, generowane w obecności bibliotek kombinatorycznych a, c, g, t 6-merów DNA. Czerwone linie wzdłuż struktury drugorzędowej RNA oznaczają najbardziej prawdopodobne miejsca hybrydyzacji oligomerów.

3.4.2. Translacja modelowego mRNA P1- Δ Np53-Luc w lizacie z retikulocytów królika w obecności oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53

Informacje uzyskane z mapowania dostępności do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów DNA w regionie terminalnym 5' mRNA p53 stanowiły podstawę do racjonalnego zaprojektowania oligonukleotydów antysensowych, komplementarnych do tego regionu. W tym celu przeprowadziłam również analizę *in silico* z wykorzystaniem programu *RNAstructure* - OligoWalk, który oblicza parametry termodynamiczne wiązania oligomeru DNA, uwzględniając strukturę drugorzędową cząsteczki RNA [156]. Podczas projektowania sekwencji oligonukleotydowych za pomocą funkcji OligoWalk, brałam pod uwagę wyłącznie miejsca w RNA P1- Δ Np53, które zostały precyzyjnie określone podczas mapowania dostępności. Ważnym kryterium podczas projektowania oligomerów była zbliżona wartość parametru $\Delta G_{\text{overall}}$, który opisuje siłę wiązania danego oligomeru z docelową cząsteczką RNA. Początkowo, zaplanowałam 7 oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do RNA P1- Δ Np53, które oznaczyłam jako nr 1 - nr 7. Ponieważ okazało się, że dwa z nich wpływały znacząco na efektywność translacji, zaprojektowałam dodatkowo trzy oligonukleotydy antysensowe, oznaczone jako nr 1a, nr 7a i nr 7b. Sekwencje nukleotydowe, długości oraz wartości $\Delta G_{\text{overall}}$ dla wszystkich oligonukleotydów antysensowych przedstawione są w Tabeli 4. Miejsca docelowej hybrydyzacji dla wszystkich oligonukleotydów zostały również zaznaczone na modelu struktury drugorzędowej RNA P1- Δ Np53 przedstawionej na rysunku 48.

Tabela 4. Oligonukleotydy antysensowe oraz ich miejsca docelowe w regionie terminalnym 5' mRNA p53.

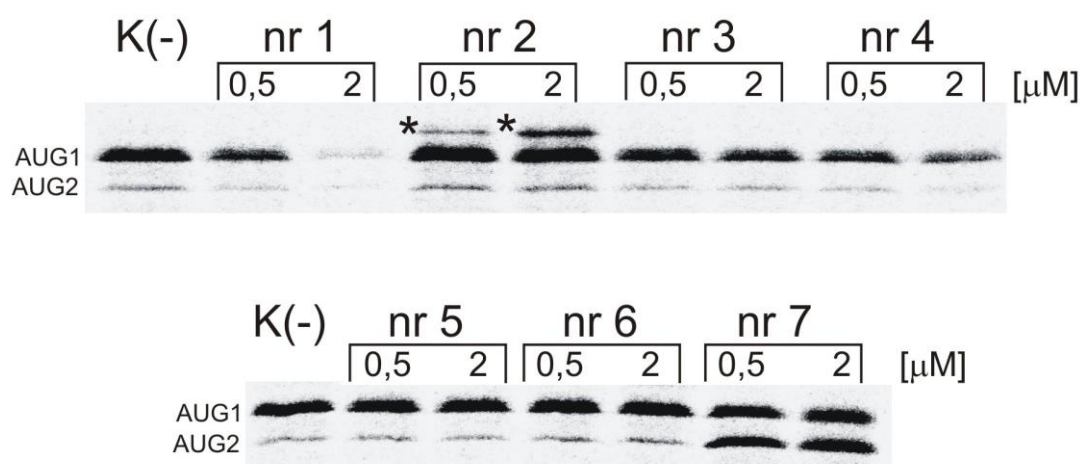
Oligonukleotyd antysensowy	Długość	Sekwencja (5'-3')	Miejsce docelowe w regionie terminalnym 5' (5'-3')	$\Delta G_{\text{overall}}$ [kcal/mol]
nr 1a	16 nt	CCGGAGCCCAGCAGCT	28-44	-8,5
nr 1	19 nt	TCCAGCCCGAACGCAAAG	50-68	-8,5
nr 2	17 nt	GCGTGTCACCGTCGTGG	78-94	-8,8
nr 3	18 nt	CTGCCAATCCAGGGAAGC	93-110	-8,7
nr 4	17 nt	TCCTCGGCGTCAGTCTA	140-156	-8,5
nr 5	21 nt	TCAGTCTAGGATCGCAGCTCG	150-169	-8,5
nr 6	15 nt	CAGAGGGGGCTCGAC	163-177	-8,5
nr 7a	21 nt	TCTGAAAATGTTTCCTGACTC	177-197	-8,3
nr 7	19 nt	GAAGTAGTTTCCATAGGTC	186-214	-9,7
nr 7b	21 nt	AACGTTGTTTCAGGAAGTAG	208-228	-7,5



Rys. 48 Na modelu struktury drugorzędowej RNA P1- Δ Np53 za pomocą kolorowych linii zostały zaznaczone miejsca docelowe dla 10 oligonukleotydów antysensowych.

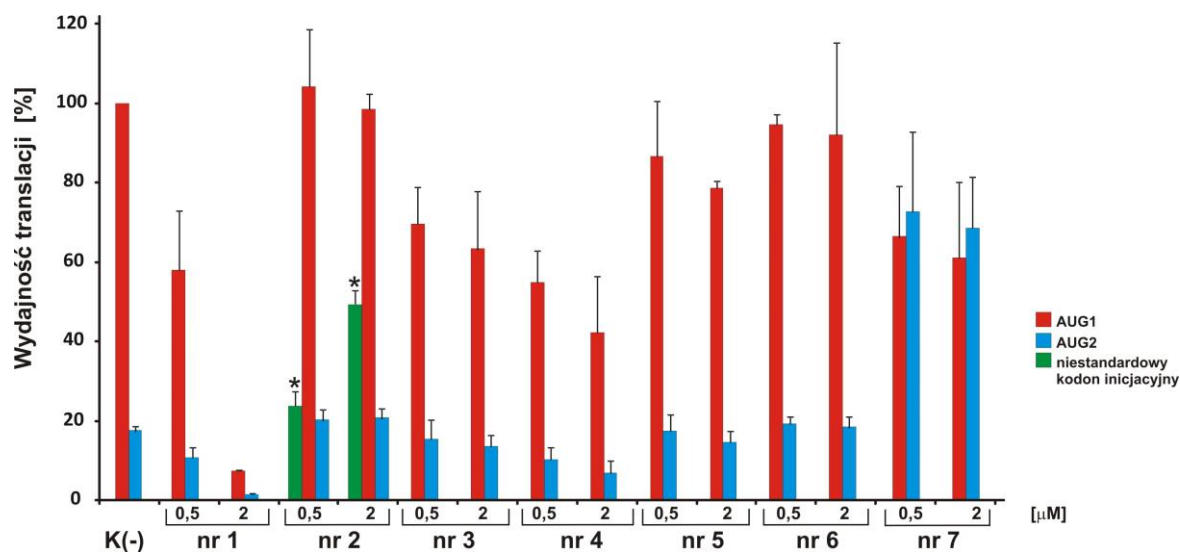
Określiłam zdolność zaprojektowanych oligonukleotydów antysensowych nr 1 - nr 7 do modulacji translacji inicjowanej z obu kodonów AUG1 i AUG2 w lizacie z króliczych retikulocytów. W reakcjach translacji wykorzystałam matrycowy mRNA P1- Δ Np53-Luc posiadający kap na końcu 5'. Oligonukleotydy antysensowe dodawane były oddzielnie do RRL, w którym znajdował się już mRNA P1- Δ Np53-Luc. Stężenie końcowe oligonukleotydów antysensowych w reakcji wynosiło 0,5 i 2 μ M. Równolegle prowadzono reakcję kontrolną bez oligonukleotydu antysensowego. Zastosowana kolejność dodawania komponentów reakcji do mieszaniny (najpierw mRNA a następnie oligonukleotydy), miała na celu odzwierciedlić warunki panujące w komórce, do której wprowadzane egzogennie oligomery hybrydują do znajdującego się wewnątrz komórki mRNA. Detekcja produktów białkowych otrzymanych w reakcjach translacji była możliwa dzięki zastosowaniu aminokwasu metioniny, zawierającej izotop siarki ^{35}S . Autoradiogramy na rysunku 49 przedstawiają rozdział elektroforetyczny produktów reakcji translacji *in vitro* prowadzonej w obecności oligonukleotydów antysensowych. Autoradiogramy poddawałam analizie

ilościowej z wykorzystaniem programu *MultiGauge* (Fuji Film). Zmiany poziomu białek, powstających z kodonów AUG1 i AUG2 pod wpływem oligonukleotydów antysensowych, odnosiłam do poziomu białka powstającego z kodonu AUG1 w reakcji kontrolnej bez oligonukleotydu antysensowego.



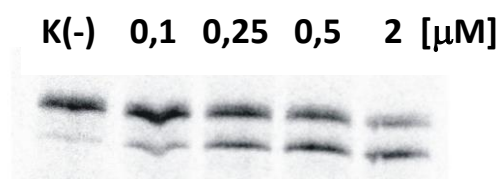
Rys. 49 Translacja *in vitro* mRNA P1- Δ Np53-Luc w obecności oligonukleotydów antysensowych nr 1 - nr 7. Otrzymane produkty białkowe rozdzielano w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. K(-) - reakcja kontrolna bez oligonukleotydu antysensowego; * - niespecyficzny produkt białkowy powstający w obecności oligonukleotydu nr 2.

We wszystkich reakcjach translacji zawsze powstawały dwa białka. Od kodonu AUG1 dla białka p53 rozpoczynała się synteza białka fuzyjnego, składającego się z pierwszych 39 aminokwasów białka p53 oraz pełnej długości lucyferazy, które reprezentowane jest przez górny prążek na autoradiogramach. Z kolei dolny prążek odpowiada białku reporterowemu lucyferazy, którego synteza inicjowana była z kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53. Wyjątek stanowi linia z reakcją translacji prowadzonej w obecności oligonukleotydu antysensowego nr 2, w której obecny jest dodatkowy trzeci prążek. Produkt ten migruje najwolniej, a jego synteza najprawdopodobniej rozpoczyna się z niestandardowego kodonu inicjacyjnego. Analiza *in silico* z wykorzystaniem programu *Virtual Ribosome 1.1* [190] sugeruje, że w tym przypadku translacja może być inicjowana z kodonów dla leucyny CUG (kodon 11 i 12 od końca 5' mRNA) lub UUG (kodon 18), które poprzedzają kodon AUG1 (Rys. 50). Wszystkie trzy kodony występują zgodnie z otwartą ramką odczytu określoną przez AUG1. Ponieważ celem moich badań była regulacja translacji inicjowanej z kodonów AUG1 i AUG2, wątek ten nie był dalej analizowany.



Rys. 51 Wpływ oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu P1- Δ Np53 na wydajność translacji inicjowanej z AUG1 dla białka p53 oraz AUG2 dla izoformy Δ Np53. Wartości na wykresie wyrażono w procentach w stosunku do reakcji kontrolnej prowadzonej bez oligonukleotydów antysensowych K(-). Wszystkie wartości są średnimi otrzymanymi z co najmniej trzech powtórzeń.

Ponieważ oligomer nr 7 wykazał zaskakujący wpływ na translację, postanowiłam dowiedzieć się przy jakim najniższym jego stężeniu można osiągnąć wzrost poziomu translacji z kodonu AUG2. W tym celu przeprowadziłam szereg reakcji w obecności wzrastającego stężenia oligomeru nr 7 (Rys. 52). Okazało się, że wzrost poziomu białka syntetyzowanego z kodonu AUG2 następował już przy 0,1 μ M stężeniu oligomeru nr 7, a przy stężeniu 0,25 μ M intensywność dolnego prążka na żelu była porównywalna z intensywnością przy 2 μ M stężeniu oligomeru.

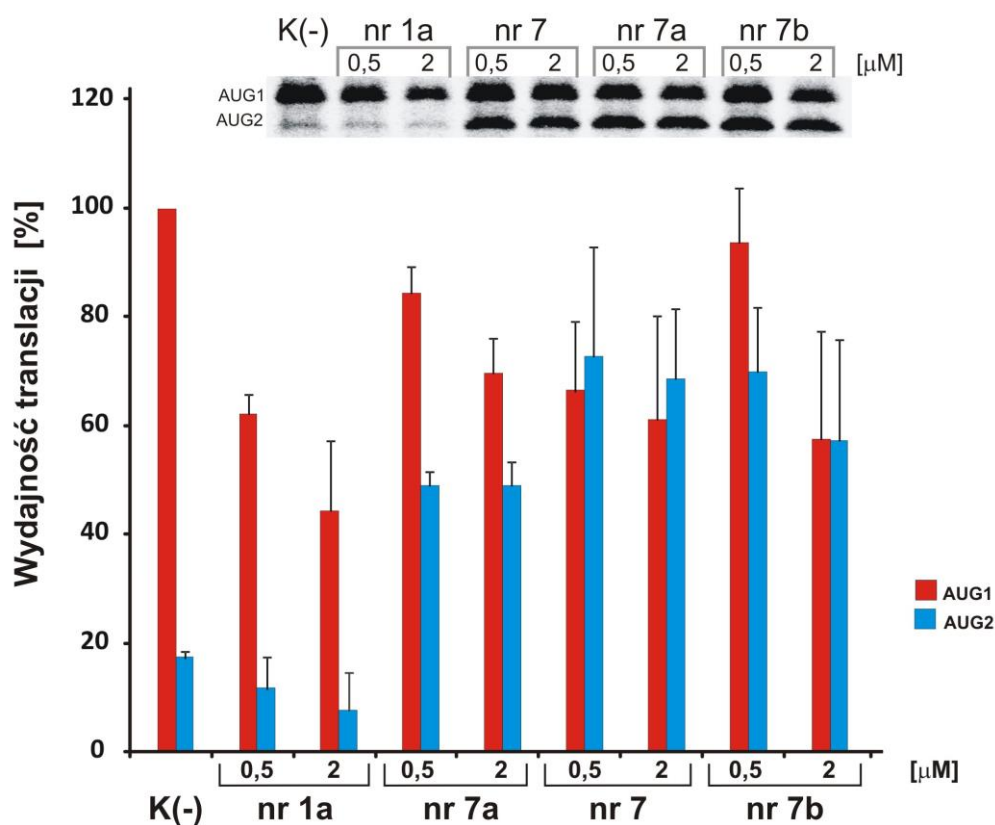


Rys. 52 Translacja *in vitro* w RRL mRNA P1- Δ Np53-Luc w obecności oligomeru nr 7, zastosowanego w różnych stężeniach.

Znaczące zmiany poziomu syntetyzowanego białka spowodowane oligomerami nr 1 i nr 7, które hybrydują do kluczowych elementów strukturalnych regionu P1- Δ Np53, skłoniły mnie do zaprojektowania kolejnych oligonukleotydów antysensowych nr 1a, nr 7a

i nr 7b. Stanowiły one w pewien sposób warianty oligomerów nr 1 i nr 7, ponieważ hybrydowały do regionów sąsiadujących w sekwencji (Rys. 48). Sekwencje nukleotydowe oligomerów nr 1a, nr 7a i nr 7b oraz wartości $\Delta G_{\text{overall}}$ umieszczone są w Tabeli 4.

Oligomer nr 1a komplementarny do nukleotydów A20-G44 powodował spadek wydajności translacji z AUG1 o ok. 50%, podczas gdy poziom białka powstającego z AUG2 nie uległ większej zmianie (Rys. 53). Jednakże, efekt inhibicji wywołany za pomocą oligomeru nr 1a nie był aż tak znaczący, jak w przypadku oligomeru nr 1. Z kolei oba warianty nr 7a i nr 7b, stymulowały inicjację translacji na poziomie podobnym do obserwowanego w obecności oligomeru nr 7.



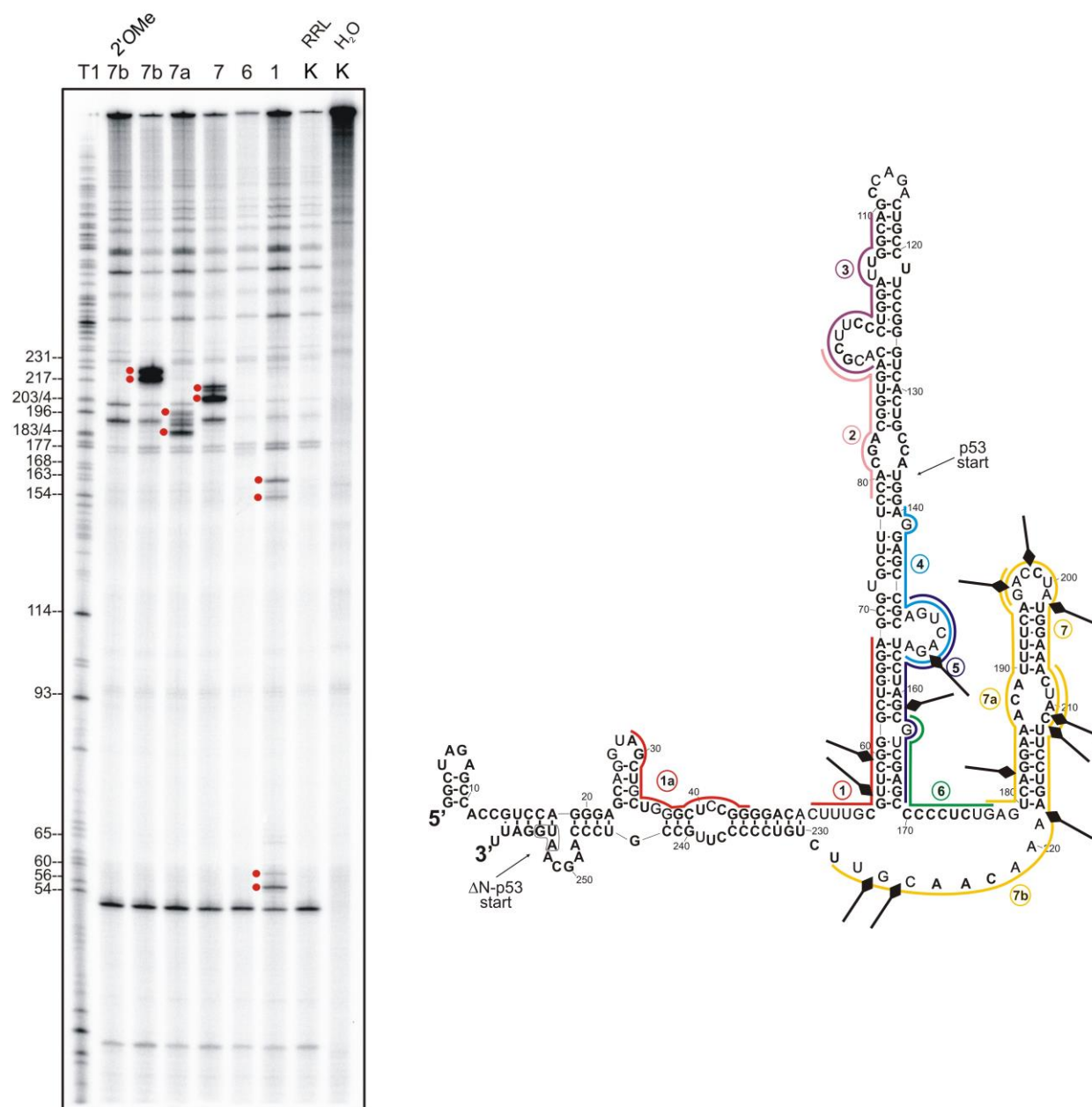
Rys. 53 Translacja *in vitro* mRNA P1- Δ Np53-Luc w obecności oligonukleotydów antysensowych nr 1, nr 7a i nr 7b. Autoradiogram przedstawia rozdział białkowych produktów reakcji translacji w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Wykres obrazuje wpływ oligonukleotydów na wydajność translacji inicjowanej z AUG1 i AUG2. Wszystkie wartości są średnimi pochodzącymi z trzech powtórzeń, znormalizowanymi w stosunku do reakcji kontrolnej K(-) bez oligonukleotydu antysensowego.

3.4.3. Analiza aktywności endogennej RNazy H w RRL w obecności oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53

3.4.3.1. Indukcja RNAazy H pod wpływem niemodyfikowanych oligonukleotydów antysensowych w RRL

Ponieważ wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem oligonukleotydów przeprowadzałam w RRL, postanowiłam sprawdzić czy środowisko lizatu ma wpływ na efekt wywoływany przez oligonukleotydy antysensowe. Skłoniły mnie do tego również doniesienia literaturowe na temat obecności RNazy H w bezkomórkowych systemach do translacji, takich jak lizat z retikulocytów królika czy zarodków pszenicy [191].

Cząsteczkę mRNA P1- Δ Np53-Luc znakowaną na końcu 5' izotopem fosforu ^{32}P inkubowałam w RRL w obecności oligonukleotydów antysensowych, które miały największy wpływ na translację, czyli nr 1, nr 7, nr 7a i nr 7b. Wykonałam również reakcje z oligomerem nr 6, który nie zmienił poziomu syntezy obu białek, a także z metylowanym oligomerem nr 7b (nr 7b 2'OMe), który nie aktywuje RNazy H. Ilość mRNA, lizatu oraz końcowe stężenia oligomerów były takie same jak w prowadzonych wcześniej reakcjach translacji. Następnie mRNA izolowano z użyciem odczynnika TriReagent i rozdzielano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. W celu identyfikacji cięć indukowanych przez RNazę H przeprowadziłam reakcję ograniczonego trawienia mRNA P1- Δ Np53-Luc przez RNazę T1. Widoczne na rysunku 54 cięcia w liniach odpowiadającym reakcjom z niemodyfikowanymi oligonukleotydami antysensowymi nr 1 i wszystkimi wariantami oligomeru nr 7, świadczą o udziale obecnej w lizacie RNazy H w efekcie wywołanym przez powyższe oligomery. Cięcia RNazą H zostały naniesione na model struktury drugorzędowej regionu P1- Δ Np53 (Rys. 54). We wszystkich przypadkach RNaza H hydrolizuje mRNA w obrębie przyłączonego oligomeru. W przypadku oligomeru nr 7b 2'OMe brak cięć w pozycjach C225 i G226, które są charakterystyczne dla niemodyfikowanego oligomeru nr 7b, jest dodatkowym potwierdzeniem udziału RNazy H w obserwowanym wpływie tego oligomeru na translację.



Rys. 54 Cięcia RNazą H w RNA P1-ΔNp53-Luc w obecności niemodyfikowanych oligonukleotydów antysensownych w RRL. Widoczne na autoradiogramie cięcia RNazą H w mRNA P1-ΔNp53-Luc indukowane przez oligomery nr 1, nr 7, nr 7a i nr 7b, zostały oznaczone czerwonymi kropkami oraz naniesione na model struktury drugorzędowej RNA w postaci strzałek. mRNA P1-ΔNp53-Luc był także poddany ograniczonemu trawieniu RNazą T1 w celu identyfikacji cięć indukowanych przez RNazę H. Linie K_{RRL} i K_{H₂O} na autoradiogramie oznaczają reakcje kontrolne bez oligonukleotydów, odpowiednio w RRL i wodzie. Po lewej stronie autoradiogramu zaznaczono wybrane reszty guanozyny.

Brak prążków w reakcji z oligomerem nr 6 sugeruje, że oligomer ten nie wiąże się do mRNA w środowisku lizatu i nie aktywuje RNazy H pomimo dostępności do hybrydyzacji w regionie pomiędzy spinkami G56-C169 i U180-A218. Ciekawy wynik otrzymałam w reakcji z oligomerem nr 1. Oprócz cięć w obrębie miejsca hybrydyzacji, oligomer ten indukował cięcia po drugiej stronie spinki G56-C169, za resztami A153 i G161, do których wiążą się oligomery nr 4 i nr 5. Być może oligomer nr 1 przyłącza się również po drugiej stronie spinki na zasadzie częściowej komplementarności i aktywuje RNazę H. Możliwe jest także, że przyłączenie oligomeru nr 1 do reszt C50-A68 powoduje rozluźnienie spinki, w konsekwencji czego region po jej drugiej stronie staje się dostępny dla działania innych rybonukleaz obecnych w RRL.

3.4.3.2. Wpływ oligonuleotydów antysensowych typu 2'-O-metylo i gapmer na aktywność RNazy H

W kolejnych doświadczeniach postanowiłam wykorzystać potencjał oligomerów nr 1 i nr 7b do indukowania cięć przez RNazę H i zaprojektowałam ich warianty w formie gapmerów, które mogłyby wpływać na translację mRNA p53 w liniach komórkowych. Gapmery nr 1 i nr 7b posiadały na obu końcach trzy nukleotydy typu LNA, w celu zwiększenia ich stabilności i specyficzności wiązania oraz kilkunastonukleotydową sekwencję wewnętrzną. Wcześniejsze prace pokazały, że oligonukleotydy antysensowe typu gapmer posiadające co najmniej sześcionukleotydowy odcinek wewnętrzny, są zdolne do aktywowania RNazy H w komórkach [192].

W celu modulacji translacji inicjowanej z AUG1 dla białka p53 i AUG2 dla izoformy Δ Np53 zastosowałam również odmienne podejście, polegające na wykorzystaniu oligomerów nr 1 i nr 7b w formie metylowanej, tak aby nie aktywowały RNazy H, a stanowiły zawadę steryczną i/lub indukowały zmiany struktury regionu P1- Δ Np53.

W tabeli 5 przedstawiłam sekwencje nukleotydowe oraz modyfikacje zastosowanych w doświadczeniu oligonukleotydów antysensowych, a także ich miejsca docelowe w mRNA.

Tabela 5. Modyfikowane warianty oligonukleotydów antysensowych nr 1 i nr 7b. Kursywą zaznaczone są sekwencje oligomerów 2'-O-metylowanych; pogrubione litery - nukleotydy typu LNA; s - wiązanie fosfotiolowe; Kfluc - oligomer kontrolny hybrydujący do sekwencji kodującej lucyferazę *Firefly*.

Oligonukleotyd antysensowy	Długość	Seqwencja (5'-3')	Miejsce docelowe w mRNA P1-ΔNp53-Luc (5'-3')
nr 1 2'OMe	19 nt	<i>TCCCAGCCCCGAACGCAAAG</i>	28-44
nr 7b 2'OMe	21 nt	<i>AACGTTGTTTTCAGGAAGTAG</i>	208-228
Kfluc 2'OMe	21 nt	<i>ACCAGGGCGTATCTCTCCATA</i>	-
nr 1 GAP	19 nt	TCC _s A _s G _s C _s C _s C _s G _s A _s A _s C _s G _s C _s A _s AAG	28-44
nr 7b GAP	21 nt	AAC _s G _s T _s T _s G _s T _s T _s T _s C _s A _s G _s G _s A _s A _s G _s TAG	208-228
Kfluc GAP	21 nt	ACC _s G _s G _s G _s C _s G _s T _s A _s T _s C _s T _s C _s T _s C _s ATA	-

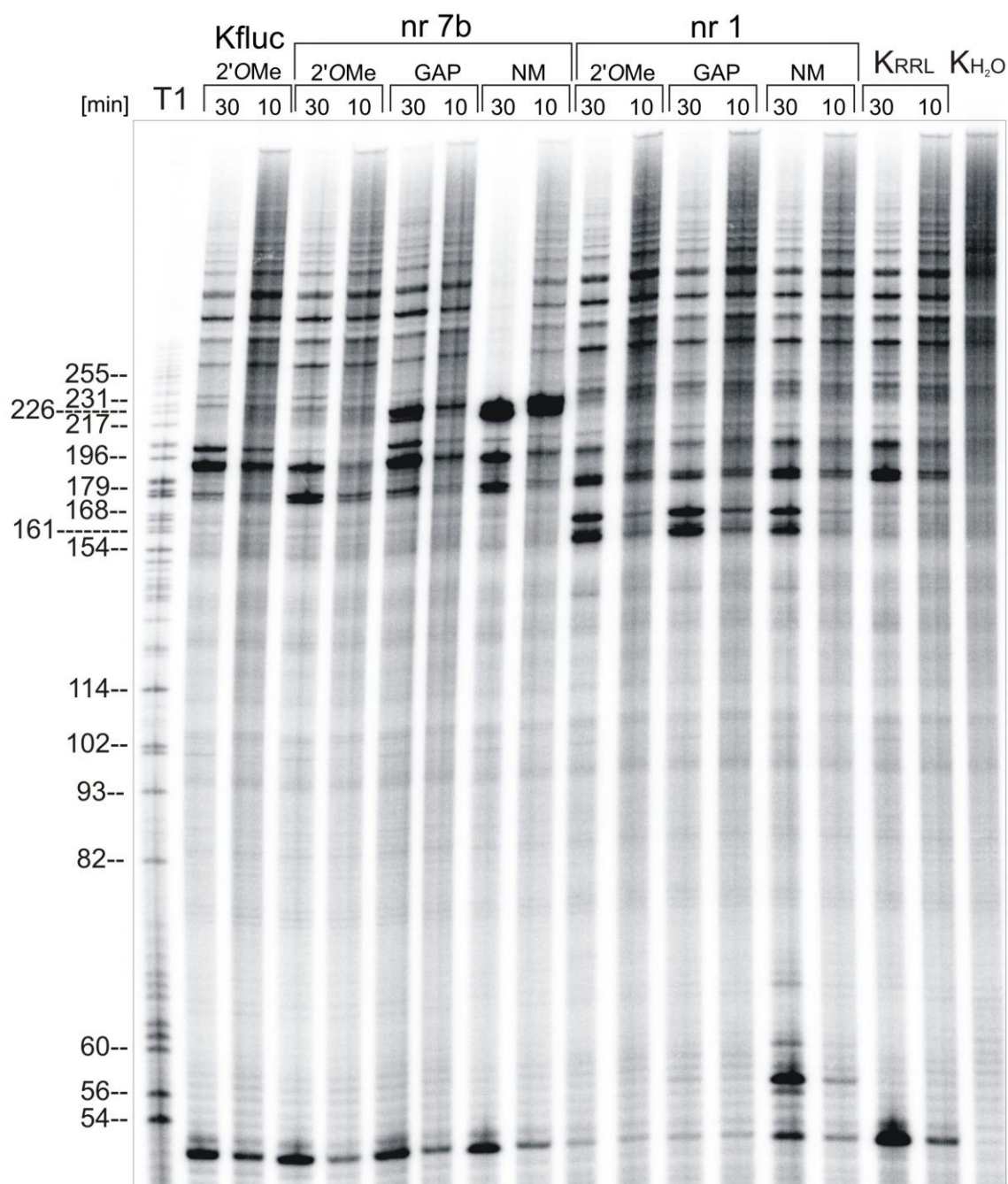
Aby sprawdzić czy oligomery typu gapmer indukują aktywność RNazy H podobnie jak ich niemodyfikowane odpowiedniki, mRNA P1-ΔNp53-Luc inkubowałam w RRL w obecności wszystkich wariantów oligomerów nr 1 i nr 7b (Rys. 55). Wykonałam także reakcję z oligomerem kontrolnym Kfluc. Inkubacja 2'-O-metylowanych oligomerów z radioaktywnie znakowanym mRNA P1-ΔNp53-Luc w RRL, miała potwierdzić ich brak zdolności do indukowania cięć RNazą H.

Analiza elektroforetyczna fragmentów RNA na rysunku 55 pokazuje, że w obecności gapmeru nr 7b RNaza H generuje cięcia w regionie A217-G226, czyli w tych samych pozycjach co niemodyfikowany oligomer nr 7b. Co ciekawe, niemodyfikowany oligomer nr 7b indukuje silniejsze cięcia od gapmeru nr 7b, co objawia się również brakiem prążka na żelu odpowiadającemu pełnej długości mRNA. Tak jak oczekiwano, nie zaobserwowano cięć w obrębie reszt A217-G226 dla oligomeru nr 7b 2'OMe, który nie ma zdolności aktywowania RNazy H, a także oligomeru kontrolnego Kfluc 2'OMe, komplementarnego do sekwencji kodującej lucyferazę *Firefly*, nieobecną w badanym konstrukcie mRNA.

Zaskakujący wynik otrzymałam w przypadku serii oligomerów nr 1 (Rys. 55). Cięcia w pozycjach G56 i U57 generowane w obecności niemodyfikowanego oligomeru nie pojawiły się w reakcji z gapmerem, który powinien działać według tego samego mechanizmu co wariant niemodyfikowany. Możliwe więc, że gapmer nie stymuluje RNazy H do cięcia w obrębie heterodupleksu. Co więcej, przy 2 μM stężeniu oligomeru niemodyfikowanego obecne są dodatkowe cięcia w pozycjach G60 i G66. Ponadto, pomiędzy A151 i G161 pojawiają się cięcia we wszystkich reakcjach, nawet z oligomerem

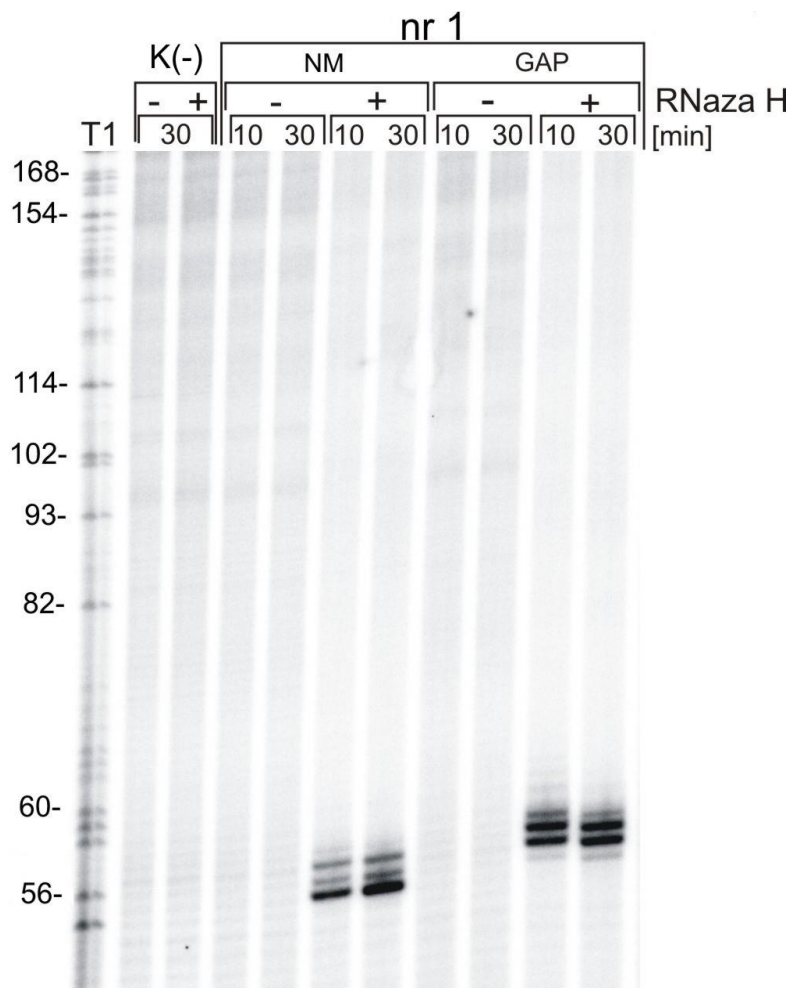
metylowanym. W przypadku oligomeru niemodyfikowanego cięcia te pojawiają się dopiero przy jego 2 μM stężeniu, natomiast w przypadku oligomerów modyfikowanych obecne są już przy stężeniu 0,5 μM . Ponadto cięcia w regionie A151-G161 są silniejsze w liniach odpowiadających reakjom z gapmerem i oligomerem typu 2'OMe. Prawdopodobnie, za efekt ten odpowiadają modyfikacje tych oligomerów, które zwiększają ich powinowactwo do mRNA.

Ciekawa obserwacja dotyczy reakcji z modyfikowanymi oligomerami nr 1, w obecności których zanika cięcie w pozycji U52 (czyli u podstawy spinki G56-C169, po jej stronie 5'). Ponieważ cięcie to obecne jest we wszystkich pozostałych reakcjach, nawet z oligomerem kontrolnym Kfluc 2'OMe, a także w reakcji kontrolnej bez oligomeru, prawdopodobnie jest to degradacja mRNA wynikająca z właściwości lizatu. Oligomery modyfikowane nr 1, które silniej wiążą się do regionu C50-G68 chronią to miejsce w cząsteczce mRNA, co uwidacznia się poprzez zanik prążka na żelu w pozycji U52.



Rys. 55 Cięcia RNazy H obecnej w RRL, indukowane pod wpływem niemodyfikowanych oligomerów nr 1 i nr 7b oraz ich wariantów w formie 2'-O-metylo i gapmer. mRNA P1- Δ Np53-Luc znakowany na końcu 5' izotopem ^{32}P był inkubowany z wybranymi oligomerami w RRL przez 10 i 30 minut. Po izolacji, produkty reakcji rozdzielano w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. $\text{K}_{\text{H}_2\text{O}}$ i K_{RRL} - reakcje kontrolne bez oligomerów, odpowiednio w wodzie i RRL; Kfluc 2'-OMe - reakcja kontrolna z metylowanym oligomerem komplementarnym do sekwencji kodującej lucyferazę *Firefly*. GAP - oligomery typu gapmer; NM - oligomery niemodyfikowane. Po lewej stronie autoradiogramu zaznaczone są pozycje reszt guanozyny.

W celu wyjaśnienia braku cięcia za pomocą RNazy H w pozycjach G56 i U57 inkubowałam mRNA P1- Δ Np53-Luc z komercyjnie dostępną RNazą H z *E.coli* w obecności oligomeru nr 1 w formie niemodyfikowanej i gapmeru (Rys. 56).



Rys. 56 Cięcia w mRNA P1- Δ Np53-Luc indukowane przez RNazę H z *E.coli* w obecności oligomeru nr 1 w formie niemodyfikowanej i gapmeru. mRNA znakowany na końcu 5' izotopem ^{32}P był inkubowany wraz z oligomerami przez 10 i 30 minut, zarówno z (+) jak i bez (-) RNazy H. K(-) - reakcje kontrolne bez oligomerów, odpowiednio bez (-) i w obecności (+) RNazy H.

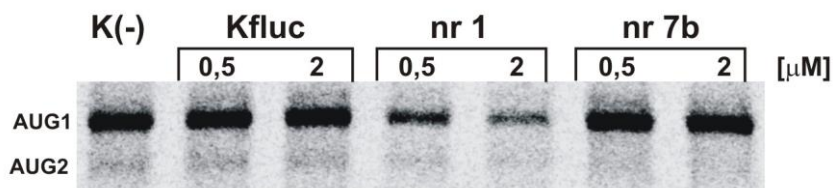
Zarówno niemodyfikowany oligomer nr 1 jak i gapmer nr 1 indukowały RNazę H do przecinania cząsteczki mRNA w obrębie utworzonych heterodupleksów (Rys. 56). W tych warunkach nie doszło do cięcia RNA w pozycjach A151-G161 ani U52, tak jak miało to miejsce w RRL. Świadczy to raczej o degradacji mRNA w tych regionach w warunkach lizatu. Różnice dotyczą również ilości oraz pozycji generowanych cięć. W przypadku niemodyfikowanego oligomeru, na autoradiogramie obecne są trzy prążki, natomiast w linii z gapmerem widoczne są dwa prążki przesunięte o dwie reszty nukleotydowe w kierunku 3'

mRNA P1- Δ Np53-Luc. Różnice te mogą być spowodowane odmienną specyficznością RNazy H w stosunku do modyfikowanego i niemodyfikowanego oligomeru nr 1.

3.4.4. Translacja modelowego mRNA P1- Δ Np53-Luc w RRL w obecności modyfikowanych oligomerów nr 1 i nr 7b.

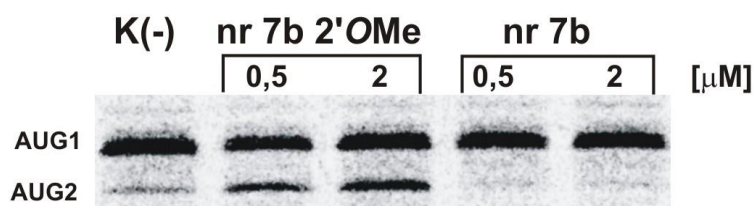
Zbadałam również wpływ modyfikowanych oligomerów antysensowych nr 1 i nr 7b typu 2'*O*-metylo i gapmer na translację modelowego mRNA P1- Δ Np53-Luc inicjowaną z kodonów AUG1 i AUG2. Tak jak poprzednio, wszystkie reakcje translacji prowadzone były w RRL z wykorzystaniem mRNA kapowanym na końcu 5'. Modyfikowane oligomery antysensowe dodawane były do reakcji translacji oddzielnie, a ich końcowe stężenia wynosiły 0,5 i 2 μ M. Równe objętości mieszaniny reakcyjnej nanosiłam na 15% żel poliakryloamidowy z dodatkiem SDS. Dzięki zastosowaniu znakowanej radioaktywnie [³⁵S]-metioniny, detekcja odbywała się na drodze autoradiografii.

Rysunek 57 przedstawia rozdział elektroforetyczny produktów reakcji translacji, prowadzonych w obecności metylowanych wariantów oligomerów nr 1 i nr 7b. Podobnie jak w przypadku niemodyfikowanego oligomeru nr 1 komplementarnego do regionu C50-G68, oligomer typu 2'*O*Me obniżał poziom syntetyzowanego białka, aczkolwiek w mniejszym stopniu niż jego niemodyfikowany odpowiednik. Ponieważ oligomer typu 2'*O*Me nie wykazuje zdolności do aktywowania RNazy H (Rys. 55) można przypuszczać, że stanowi on przeszkodę dla skanującego kompleksu rybosomalnego. Intensywność górnego prążka na żelu w reakcji z oligomerem nr 1 typu 2'*O*Me o końcowym stężeniu 2 μ M, wskazuje na niecałkowitą inhibicję translacji. Można przypuszczać, że skanujący kompleks rybosomalny w pewnym stopniu omija bądź rozplata heterodupleks utworzony przez oligomer nr 1 2'*O*Me u podstawy spinki G56-C169, dzięki czemu kompleks rybosomalny dociera do kodonu inicjacyjnego AUG1.



Rys. 57 Translacja mRNA P1- Δ Np53-Luc w RRL w obecności 2'-O-metylowanych oligonukleotydów antysensowych nr 1 i nr 7b oraz oligomeru kontrolnego Kfluc. Linia K(-) oznacza reakcję kontrolną bez oligonukleotydów antysensowych.

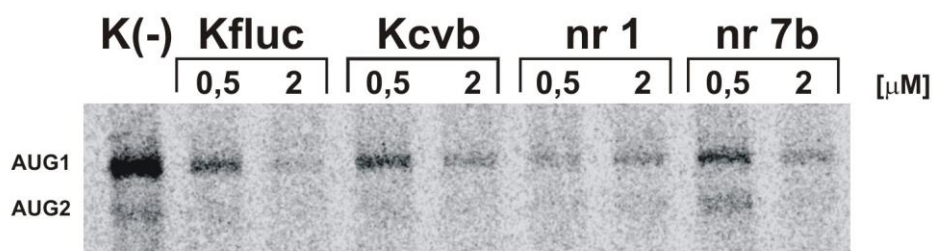
Natomiast oligomer nr 7b typu 2'OMe wywiera odwrotny wpływ na translację niż oligomer niemodyfikowany (Rys. 57). W obecności oligomeru nr 7b 2'OMe dochodzi do wzrostu poziomu białka syntetyzowanego z AUG2, podczas gdy ilość białka z AUG1 nie ulega zmianie. Wcześniejsze doświadczenia (Rys. 53) wykazały, że metylowany oligomer nr 7b nie aktywuje RNazy H, w związku z czym pełni on najprawdopodobniej funkcję zawady sterycznej dla kompleksu rybosomalnego.



Rys. 58 Wpływ oligomeru nr 7b niemodyfikowanego oraz typu 2'OMe na translację modelowego mRNA P1- Δ Np53-Luc w RRL.

Wszystkie oligomery typu gapmer silnie obniżały poziom translacji (Rys. 59). Wynik ten jest szczególnie zaskakujący, ponieważ translację inhibowały nawet oligomery kontrolne, które hybrydują do sekwencji nukleotydowych nieobecnych w lizacie, czyli sekwencji kodującej lucyferazę *Firefly* i elementu IRES wirusa Coxackie. Jeżeli chodzi o gapmer nr 1, to pomimo iż prawdopodobnie nie aktywuje on RNazy H, osłabia efektywność translacji podobnie do wariantu niemodyfikowanego. Co ciekawe, niższy poziom białek obserwuje się również w obecności gapmeru nr 7b. Biorąc pod uwagę mechanizm działania gapmerów, gapmer nr 7b powinien wywoływać efekt podobny do niemodyfikowanego oligomeru nr 7b, czyli wzrost poziomu białka syntetyzowanego

z kodonu AUG2. Wynik ten jest tym bardziej interesujący, ponieważ gapmer nr 7b pomimo innego mechanizmu działania, osłabia translację podobnie jak oligomer nr 7b 2'OMe.



Rys. 59 Translacja mRNA P1- Δ Np53-Luc w RRL w obecności oligomerów nr 1 i nr 7b typu gapmer. Linie Kfluc i Kcvb - reakcje z gapmerami kontrolnymi.

Pomimo inhibującego wpływu gapmerów nr 1 i nr 7b na wydajność translacji, nie można jednoznacznie stwierdzić, że jest to efekt trawienia mRNA przez RNazę H, ze względu na niespecyficzne działanie oligomerów kontrolnych.

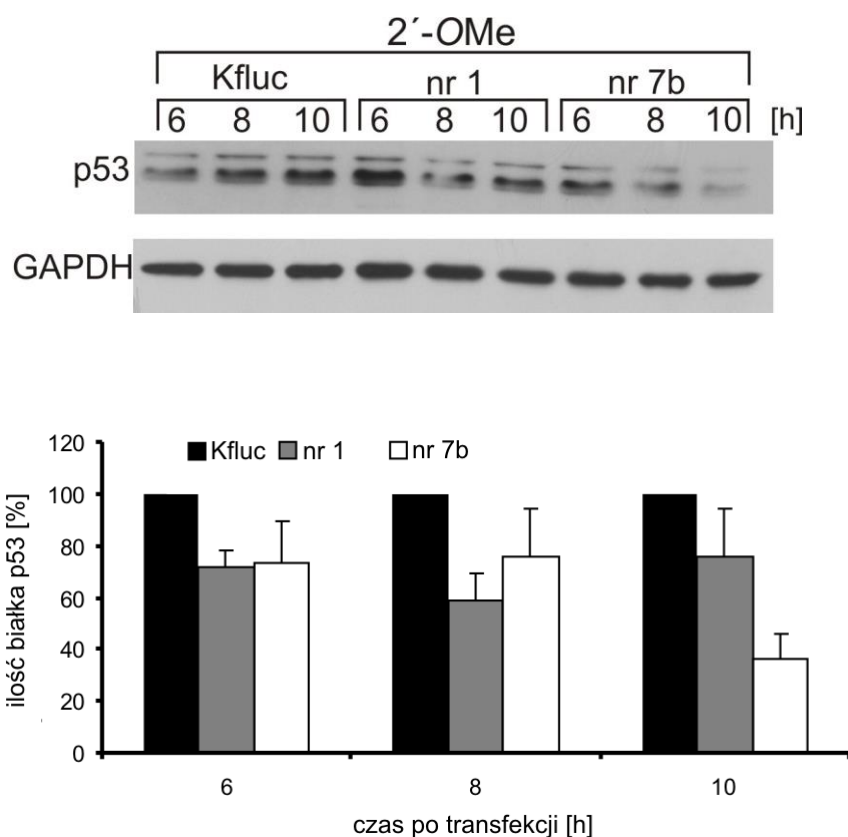
3.4.5. Wpływ oligonukleotydów antysensownych nr 1 i nr 7b typu 2'-metylo i gapmer na poziom białka p53 w komórkach MCF-7

Kolejny etap badań polegał na próbie zmiany efektywności syntezy białka p53 w komórce za pomocą oligonukleotydów antysensownych. W tym celu wykorzystałam modyfikowane warianty oligomerów nr 1 i nr 7b, ponieważ w przeciwieństwie do swoich niemodyfikowanych odpowiedników, są one względnie stabilne w środowisku komórkowym. Ponadto, dzięki różnym mechanizmom działania oligomerów typu gapmer i 2'OMe, regulacja poziomu białka p53 może zachodzić z udziałem RNazy H lub poprzez zmiany strukturalne indukowane w regionie terminalnym 5' mRNA p53.

Zarówno oligomery metylowane jak i gapmery wprowadzane były do ludzkich komórek raka piersi MCF-7, w których zachodzi ekspresja białka p53. Oligonukleotydy antysensowe były dostarczane do komórek za pomocą odczynnika Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen). Podczas transfekcji konfluencja komórek wynosiła około 80%, dzięki czemu oligonukleotydy mogły być efektywnie dostarczane do komórek. W ramach jednego doświadczenia, wszystkie transfekcje wykonywane były kilkakrotnie z użyciem komórek pochodzących z różnych pasażów (jednak nie wcześniej niż przed 4 pasażem i nie później niż po 15 pasażu). Po 6, 8 i 10 godzinach od transfekcji, komórki poddawałam lizie w celu

określenia poziomu białka p53 metodą Western blot. Do analizy Western blot zastosowałam monoklonalne, pierwszorzędowe przeciwciało PAb 1801, które wiąże się do aminokwasów 39-79 w białku p53. Wizualizacja odbywała się z wykorzystaniem reakcji chemiluminescencji, dzięki użyciu drugorzędowego przeciwciała skoniugowanego z peroksydazą chrzanową. Aby sprawdzić, czy oligonukleotydy antysensowne nie wpływają na poziom innych białek, w każdym doświadczeniu monitorowałam poziom dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego GAPDH, będącej białkiem metabolizmu podstawowego.

Rysunek 60 przedstawia poziom białka p53 w komórkach MCF-7 po transfekcji oligomerami nr 1 i nr 7b typu 2'OMe. Spadek poziomu białka p53 jest widoczny w przypadku obu oligomerów. Już po 6 godzinach po transfekcji ilość białka p53 spadła do około 30% w porównaniu z reakcją kontrolną, w której wykorzystany był oligomer kontrolny. Oligomer nr 1 typu 2'OMe osłabiał translację zarówno w RRL jak i w komórkach MCF-7. Największy stopień inhibicji w obecności oligomeru nr 1 typu 2'OMe miał miejsce po 8 godzinach od transfekcji. Natomiast oligomer nr 7b typu 2'OMe, pomimo braku wpływu na translację inicjowaną z kodonu AUG1 w RRL, obniżał ilość powstającego białka p53 do 40% w porównaniu z reakcją kontrolną.

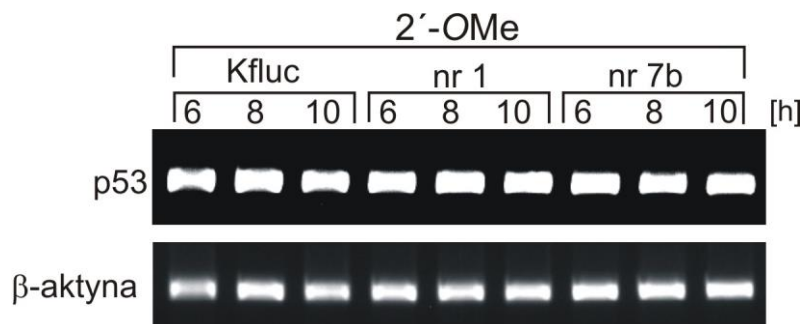


Rys. 60 Przykładowy autoradiogram reprezentujący poziom białka p53 w komórkach MCF-7 pod wpływem metylowanych oligomerów antysensownych nr 1 i nr 7b po 6, 8 i 10 godzinach po transfekcji, wykrytego za pomocą przeciwciała PAb1801. GAPDH - poziom dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Kfluc - transfekcja oligomerem kontrolnym komplementarnym do sekwencji lucyferazy *Firefly*. Na wykresie wszystkie wartości dla oligomerów nr 1 i nr 7b są wartościami średnimi pochodzącymi z kilku powtórzeń transfekcji przeprowadzonej w różnych pasażach. Ilość białka p53 syntetyzowanego w obecności oligomerów określano w stosunku do poziomu białka p53 w transfekcji z oligomerem kontrolnymi i normalizowano w stosunku do poziomu GAPDH.

Równocześnie analizowałam poziom mRNA p53 w komórkach MCF-7 dla wszystkich punktów czasowych po transfekcji komórek metylowanymi oligomerami nr 1 i nr 7b (Rys. 61). Po transfekcji, izolowałam całkowitą RNA z komórek MCF-7, z którego w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem oligo(dT) otrzymywałam całkowitą cDNA. Następnie, w reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla sekwencji p53 otrzymywałam fragment DNA o długości około 500 nukleotydów. Dodatkowo przeprowadzałam reakcje PCR ze starterami komplementarnymi do mRNA β -aktyny, w celu sprawdzenia czy oligomery nie wpływają na poziom innych mRNA.

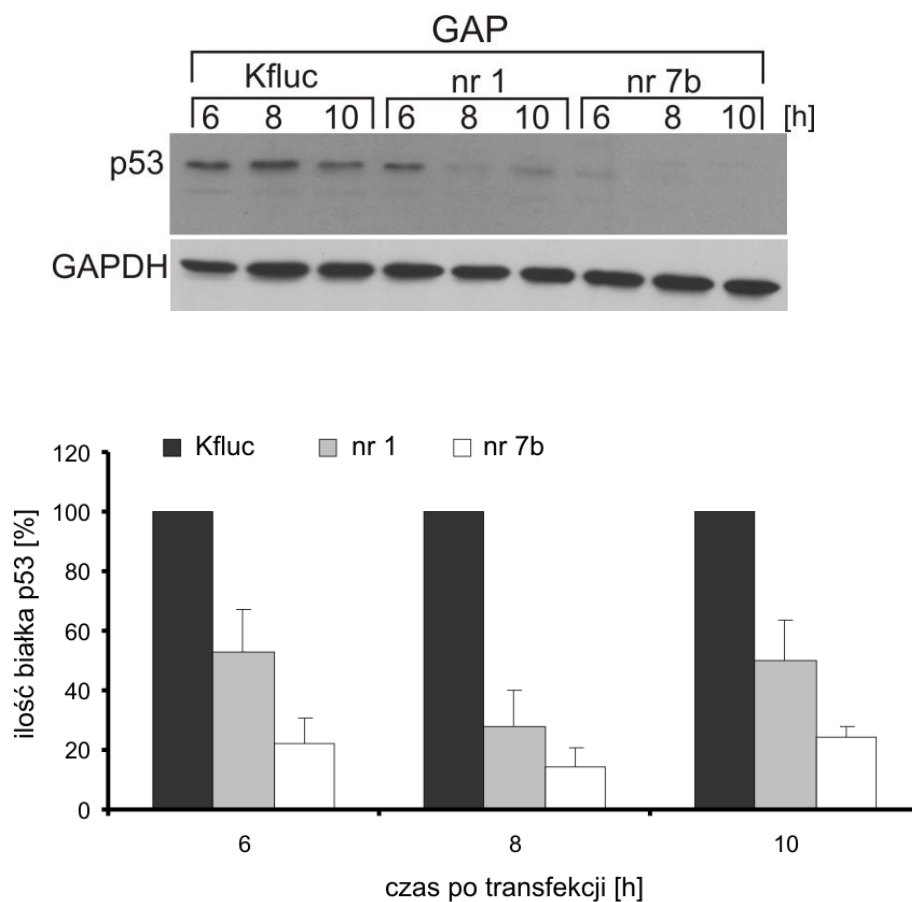
Analiza RT-PCR ujawniła, że w komórkach transfekowanych oligomerami nr1 2'OMe i nr 7b 2'OMe poziom mRNA p53 jest taki sam jak w reakcji z oligomerem kontrolnym Kfluc

(Rys. 61). W związku z powyższym, zmniejszonej ilości białka p53 nie towarzyszy degradacja mRNA p53. Wynik ten potwierdza, że efekt metylowanych oligomerów nr 1 i nr 7b na translację p53 nie jest zależny od aktywności RNazy H.

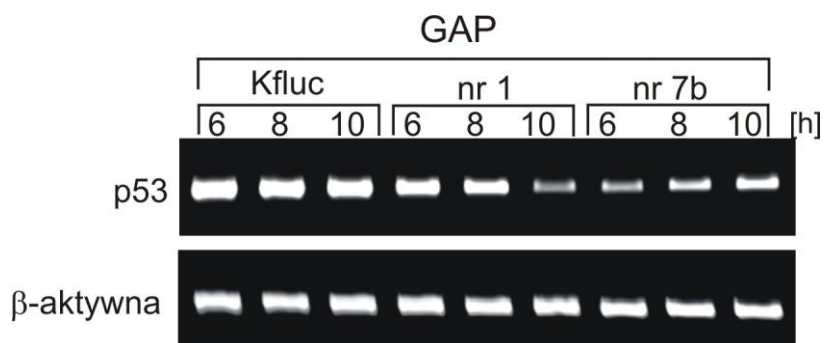


Rys. 61 Poziom mRNA p53 i β-aktyny po transfekcji komórek MCF-7 metylowanymi oligomerami nr 1 i nr 7b, analizowany za pomocą metody RT-PCR.

Silna redukcja ilości białka p53 miała również miejsce w komórkach MCF-7 transfekowanych oligomerami typu gapmer (Rys. 62). Analiza Western blot wykazała 50% spadek ilości białka p53 w obecności gapmeru nr 1 oraz 80% w przypadku gapmeru nr 7b już po 6 godzinach po transfekcji. Gapmer kontrolny, który wcześniej inhibował translację w RRL nie wpływał na poziom białka p53 w komórkach MCF-7, dzięki czemu mógł on stanowić kontrolę dla reakcji z oligomerami nr 1 i nr 7b. Analiza RT-PCR wykazała, że zarówno gapmer nr 1 jak i nr 7b redukują poziom mRNA p53, natomiast nie wpływają na poziom mRNA β-aktyny (Rys. 63). Co więcej, gapmer kontrolny nie tylko nie miał wpływu na ilość białka p53 ale również na poziom mRNA p53. Otrzymane wyniki są zgodne ze wcześniejszymi przypuszczeniami, że za spadek ilości białka p53 odpowiada RNaza H, która w obecności gapmerów nr 1 i nr 7b trawi mRNA p53.



Rys. 62 Wpływ gapmerów nr 1 i nr 7b na poziom białka i mRNA p53 w komórkach MCF-7.



Rys. 63 Poziom mRNA p53 oraz mRNA β-aktywny w komórkach MCF-7 po transfekcji oligomerami nr 1 i nr 7b typu gapmer.

3.5. Dyskusja uzyskanych wyników

Celem przeprowadzonych doświadczeń była próba modulacji translacji białka p53 oraz izoformy Δ Np53 z wykorzystaniem strategii oligonukleotydów antysensowych. Szczególnie pożądane byłoby obniżenie poziomu białka p53 lub wzrost ilości izoformy Δ Np53, która jest negatywnym regulatorem aktywności białka p53 o pełnej długości. Skłoniły mnie do tego doniesienia literaturowe na temat oporności komórek rakowych na naświetlanie, która ma najprawdopodobniej związek z zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G2, spowodowanym aktywacją białka p53 [193; 194; 195]. Aby zwiększyć wrażliwość komórek nowotworowych na naświetlanie, inaktywowano białko p53 w linii niedrobnokomórkowego raka płuc (ang. *non small cell lung cancer*, NSCLC) za pomocą oligonukleotydów antysensowych, co prowadziło do rozpoczęcia mitozy [196; 197].

Ponieważ zastosowane przez Sak i współpracowników oligonukleotydy antysensowe skierowane były na sekwencję kodującą białko p53, postanowiłam sprawdzić czy możliwa jest regulacja translacji zarówno białka p53 jak i jego izoformy Δ Np53 za pomocą oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA p53. Badania te miały również na celu uzyskanie informacji na temat roli elementów strukturalnych regionu terminalnego 5' mRNA p53 w translacji obu białek.

3.5.1. Region terminalny 5' mRNA p53 jest dostępny do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów pomimo obecności stabilnych termodynamicznie motywów strukturalnych

Strategia oligonukleotydów antysensowych jest stosowana od wielu lat w celu obniżenia ekspresji genów [198; 199; 200]. Pomimo prostej idei zastosowania oligonukleotydów antysensowych, dla jej powodzenia istotne znaczenie ma szereg czynników wpływających na oddziaływanie oligonukleotydów z docelowym RNA. Należą do nich m.in., struktura atakowanej cząsteczki oraz jej dostępność do wiązania oligomeru, a także stabilność oligonukleotydów antysensowych w komórce oraz mechanizm ich działania.

Mechanizm wiązania oligonukleotydów antysensowych do docelowego RNA polega na tworzeniu par zasad według modelu Watsona-Cricka. Wiązanie oligonukleotydów antysensowych do regionów terminalnych 5' mRNA może być utrudnione ze względu na tworzone w ich obrębie stabilne termodynamicznie rejony dwuniciowe. Dotyczy to

w szczególności długich regionów terminalnych 5', zawierających dużą ilość par G-C. Izolowany region terminalny 5' mRNA p53, któremu odpowiada cząsteczka RNA P1-ΔNp53, przyjmuje określoną strukturę drugorzędową dzięki oddziaływaniu regionu niekodującego 5' UTR z fragmentem sekwencji kodującej białko p53 (Rys. 32) [151]. W regionie tym aż 62% nukleotydów zaangażowanych jest w oddziaływania drugorzędowe. Najbardziej charakterystyczne dla tego regionu są dwa motywy strukturalne typu spinki G56-C169 i U180-A218, o wysokiej stabilności termodynamicznej [151]. Przeprowadzona przeze mnie wcześniej analiza strukturalna regionu terminalnego 5' mRNA p53 w modelowym konstrukcie mRNA P1-ΔNp53-Luc wykazała obecność obu spinek, pomimo znajdującej się poniżej w kierunku 3' sekwencji kodującej białko reporterowe lucyferazy (Rys. 33). Co więcej, wyniki mapowania struktury w lizacie z króliczych retikulocytów z wykorzystaniem siarczany dimetylu pokazały, że struktura tego regionu jest również zachowana w warunkach, w których prowadzona jest translacja *in vitro* (Rys. 34). Pomimo wielu motywów strukturalnych typu spinki w regionie terminalnym 5' mRNA p53, około 38% jego sekwencji stanowią fragmenty jednoniciowe. W związku z tym można było oczekiwać, że przynajmniej częściowo jest on dostępny do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów. Przed zaprojektowaniem oligonukleotydów antysensowych zbadalam dostępność tego regionu do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów w modelowym konstrukcie mRNA P1-ΔNp53-Luc, za pomocą bibliotek kombinatorycznych oligonukleotydów DNA i RNazy H (Rys. 47). Metodę tą Ho i współpracownicy [201], zastosowali do identyfikacji cięć RNazą H, indukowanych w obecności jedenastomerów DNA w mRNA receptora angiotensyny typu I. Z kolei cztery kombinatoryczne biblioteki sześciomerów DNA z określonym stałym nukleotydem w każdej z bibliotek stosowano w badaniu dostępności regionu X(+) wirusa HCV, rybozomu delta oraz drożdżowego tRNA^{Phe} [189; 202]. Wyniki mapowania dostępności regionu terminalnego 5' mRNA p53 do wiązania oligomerów DNA ujawniły, że również niektóre regiony dwuniciowe mogą być dostępne do hybrydyzacji. Świadczą o tym szczególnie silne cięcia u podstawy spinki G56-C169, zarówno po jej stronie 5' jak i 3'. Prawdopodobnie obecność niestandardowych par G•U ułatwia hybrydyzację oligomerów DNA. Podobnych spostrzeżeń dokonano w przypadku helis P1, P2 i P4 rybozomu *delta* [189]. Co więcej, cięcia RNazą H w regionach dwuniciowych mogą być wynikiem tworzenia szczególnie trwałych hybrydów DNA-RNA, zawierających dużą ilość par G-C. Oligomery hybrydowały również w obrębie spinki G56-C169, w miejscach gdzie struktura spinki jest częściowo zaburzona przez jedno-

lub kilkunukleotydowe wybrzuszenia, o czym świadczą cięcia w pozycjach G82 i C145. Dostępna do hybrydyzacji okazała się również spinka U180-A218, do której wiązało się najwięcej oligomerów. Prawdopodobnie, częste występowanie par A-U w jej obrębie obniża jej stabilność i ułatwia przyłączanie sześciomerów DNA. Sugerowano wcześniej, że wiązanie oligomerów do regionów dwuniciowych jest szczególnie wydajne, gdy tworzą one z łańcuchem RNA regularną helisę [189].

Zgodnie z oczekiwaniami, oligomery hybrydowały do większości regionów jednoniciowych (Rys. 47). Najwięcej cięć RNazą H zaobserwowano w jednoniciowym regionie pomiędzy spinkami G56-C169 oraz U180-A218. Można przypuszczać, że jest to związane z występującą w nim dużą ilością reszt C, które oddziałując z resztami G zwiększają trwałość hybrydów utworzonych z oligomerami DNA. Jednakże region ten okazał się mniej dostępny do hybrydyzacji w miejscu zgięcia, bliżej spinki U180-A218. Wyniki analizy regionu X(+) RNA wirusa HCV pokazują, że zgięcia łańcucha RNA nie sprzyjają powstawaniu hybrydów RNA-DNA [202]. Dostępność do hybrydyzacji tylko jednej strony jednoniciowego regionu łącznikowego, może wynikać nie tylko ze struktury drugorzędowej RNA, ale również sekwencji tego regionu oraz jego oddziaływania z innymi elementami strukturalnymi. Szczególnie dostępny dla sześciomerów DNA był najdłuższy w regionie terminalnym 5' mRNA p53 jednoniciowy region A218-A229. Zaobserwowałam również szczególną podatność do hybrydyzacji pętli apikalnej spinki U180-A218 oraz pętli wewnętrznych w spince G56-C169. Cięcia RNazą H pojawiły się także w obu spinkach w obrębie dwustronnych wybrzuszeń. Chociaż cięcia występują po obu stronach dwustronnych wybrzuszeń, to w przypadku spinki G56-C169 w reakcji kontrolnej obecny jest również silny prążek w pozycji A136, czyli po stronie 3' dwustronnego wybrzuszenia. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku dwustronnego wybrzuszenia po stronie 5' w spince U180-A218, gdzie w reakcji kontrolnej nie występują cięcia. Możliwym wytłumaczeniem tego wyniku może być mała stabilność tworzonego dupleksu, spowodowana obecnością reszt A oraz par A-U, które zamykają obustronne wybrzuszenie. Podobną zależność zaobserwowałam dla obustronnego wybrzuszenia bliżej końca 5' analizowanego regionu, zbudowanego z reszt U40-C42 i C237-U239. W spince G56-C169 dostępne do hybrydyzacji okazały się dwie pętli wewnętrzne utworzone z reszt A92-C99 i A149-A155. Nieoczekiwanie, oligomery nie przyłączały się do pętli apikalnej spinki G56-C169, chociaż algorytm OligoWalk przewiduje dostępność tego regionu do hybrydyzacji. Co więcej, wspomniana pętla apikalna była dobrze zmapowana za pomocą

techniki SHAPE, siarczanu dimetylu oraz cięć indukowanych jonami Pb^{2+} . Brak dostępności do hybrydyzacji był charakterystyczny również dla pętli apikalnej domeny IIIb w elemencie IRES wirusa HCV (rozprawa doktorska dr Marioli Dutkiewicz, 2004). Aczkolwiek pętla apikalna w domenie IIIb była większa i składała się w większości z reszt A i U, przez co utworzone hybrydy DNA-RNA mogły wykazywać mniejszą stabilność termodynamiczną. Być może zbyt mała pętla apikalna w spince G56-C169 oraz przeważająca ilość nukleotydów G i C (także u jej podstawy) uniemożliwia powstawanie hybrydów. W regionie terminalnym 5' mRNA p53 obecna jest także spinka G23-C34, której pętla apikalna zbudowana z czterech nukleotydów była tylko częściowo dostępna do hybrydyzacji.

3.5.2. Niemodyfikowane oligonukleotydy antysensowe komplementarne do regionu terminalnego 5' mRNA p53 regulują translację inicjowaną z AUG1 i AUG2 poprzez indukcję RNazy H w systemie bezkomórkowym

Znajomość struktury drugorzędowej RNA regionu terminalnego 5' mRNA p53, wyniki mapowania dostępności do hybrydyzacji sześciomerów DNA oraz analiza *in silico* z wykorzystaniem funkcji OligoWalk w programie *RNAstructure* umożliwiły racjonalne zaprojektowanie oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do tego regionu (Rys. 48). Początkowo badałam wpływ 7 oligonukleotydów antysensowych na poziom białek syntetyzowanych z kodonów AUG1 i AUG2 w RRL (Rys. 49). Największe zmiany w poziomie syntetyzowanych białek obserwowałam w obecności oligomeru nr 1, komplementarnego do podstawy spinki G56-C169 oraz oligomeru nr 7 wiążącego się do spinki U180-A218 (Rys. 51). Powyższa obserwacja potwierdza istotną rolę obu elementów strukturalnych w procesie translacji. Zgodne z tą tezą są wyniki translacji *in vitro* z oligomerami nr 1a, nr 7a i nr 7b, które stanowiły warianty oligomerów nr 1 i nr 7 i hybrydowały do sekwencji sąsiadujących (Rys. 48). Przesunięcie miejsca docelowego bliżej końca 5' cząsteczki w stosunku do spinki G56-C169 nie obniżało ilości białek syntetyzowanych z obu kodonów AUG, tak jak miało to miejsce w przypadku oligomeru nr 1 (Rys. 53, linia z oligomerem nr 1a). Ponadto, inne oligonukleotydy antysensowe komplementarne do spinki G56-C169 nie wpływały znacząco na ilość powstających białek. Wyjątek stanowił oligomer nr 4, hybrydujący poniżej kodonu AUG1, który nieznacznie obniżył poziom białka syntetyzowanego z kodonu AUG1. Sugeruje to, że podstawa spinki G56-C169 ma kluczowe znaczenie dla inicjacji translacji. Aczkolwiek nie obserwowałam zmniejszenia ilości białka powstającego z kodonu AUG1 pod wpływem oligonukleotydu

antysensowego nr 6, hybrydującego częściowo do podstawy spinki G56-C169 po jej stronie 3' (Rys. 48 i 49). Zastosowane przez Sak i współpracowników [197] oligonukleotydy antysensowe komplementarne do spinki G56-C169 w obrębie kodonu AUG1 zmniejszyły ilość syntetyzowanego białka p53. Sytuacja ta miała miejsce w ludzkich komórkach gruczolaka A549 i wielkokomórkowego raka płuc H460. Z kolei oligomery nr 7, nr 7a i nr 7b, wiążące się do spinki U180-A218 stymulowały translację inicjowaną z kodonu AUG2. Efekt ten był tym bardziej zaskakujący, ponieważ regulacja translacji za pomocą oligonukleotydów antysensowych wiąże się zazwyczaj z inhibicją tego procesu. W świetle odporności niektórych komórek nowotworowych na naświetlanie, spowodowanej wzrostem poziomu białka p53, wynik ten był pożądanym ze względu na możliwość obniżania poziomu białka p53 poprzez wzrost ilości $\Delta Np53$ w komórce.

Mając na uwadze doniesienia literaturowe odnośnie obecności RNazy H w lizatach stosowanych do badania procesu translacji [191; 203], postanowiłam sprawdzić czy oligonukleotydy antysensowe nr 1 i nr 7 indukują cięcia RNazą H w cząsteczce mRNA P1- $\Delta Np53$ -Luc, inkubowanej w RRL (Rys. 54). Otrzymane wyniki potwierdziły obecność RNazy H w lizacie i jej możliwy udział w efekcie wywoływanym przez zastosowane oligonukleotydy antysensowe. W przypadku oligomeru nr 7 oraz jego wariantów, obserwowałam cięcia w obrębie spinki U180-A218. Brak cięć w obecności 2'-*O*-metylowanego oligomeru nr 7b wskazuje na mechanizm zależny od RNazy H, ponieważ nie wykazuje ona aktywności w stosunku do oligomerów z modyfikacjami typu 2'-*O*-metylo (Monia i in. 1993). Również oligomer nr 1 aktywuje RNazę H w RRL, czego dowodem są cięcia w obrębie tworzonego heterodupleksu u podstawy spinki G56-C169. Co więcej, oligomer ten indukował cięcia po drugiej stronie spinki G56-C169, w miejscu do którego potencjalnie hybrydują oligomery nr 4 i nr 5. Możliwe, że oligomer nr 1 posiada więcej niż jedno miejsce docelowej hybrydyzacji w regionie terminalnym 5' mRNA p53, do których może wiązać się na zasadzie częściowej komplementarności. Można również przypuszczać, że przyłączenie oligomeru nr 1 do reszt C50-A68 (czyli u podstawy spinki G56-C169 po jej stronie 5') powoduje, że region po drugiej stronie staje się bardziej podatny na autodegradację lub działanie innych rybonukleaz obecnych w lizacie. Co ciekawe, w obecności oligomeru nr 6, którego potencjalne miejsce hybrydyzacji znajduje się w regionie jednoniciowym łączącym spinki G56-C169 i U180-A218, nie zaobserwowałam żadnych cięć. Może to świadczyć o tym, że oligomer nr 6 w tych warunkach nie wiąże się do regionu terminalnego 5' mRNA p53. Należy wziąć pod uwagę fakt, że dostępność tego

regionu do hybrydyzacji krótkich oligomerów DNA badana była w warunkach *in vitro*, podczas gdy obecność innych białek w lizacie może skutecznie zakłócać wiązanie oligonukleotydów antysensowych. Ponadto, miejsce wiązania oligomeru nr 6 znajduje się w regionie bogatym w pirymidyny, do którego może wiązać się białko PTB (ang. *polypyrimidine tract binding protein*) obecne również w RRL [204]. Otrzymane wyniki pokazują, że aktywność RNazy H obecnej w RRL jest wystarczająca do osiągnięcia efektu inhibicji translacji za pomocą oligonukleotydów antysensowych i wbrew niektórym sugestiom, nie wymaga dodatku tego enzymu do reakcji [203].

Na podstawie powyższych wyników można zaproponować, że za efekt inhibicji translacji w obecności oligomeru nr 1 odpowiada prawdopodobnie odcinanie przez RNazę H spinki G56-C169 wraz z kodonem AUG1 od reszty cząsteczki RNA P1- Δ Np53-Luc, w związku z czym nie jest możliwa synteza białka fuzyjnego reprezentowanego przez górny prążek na żelu (Rys. 49). Spinka G56-C169 stanowi również ważny element struktury IRES, w związku z czym jej brak w cząsteczce RNA P1- Δ Np53-Luc wpływa również na obniżenie poziomu białka z kodonu AUG2, którego synteza zachodzi prawdopodobnie według mechanizmu zależnego od IRES [11; 151]. Jednakże, cięcia RNazą H w obecności oligomerów nr 7, które również prowadzą do odcięcia spinki G56-C169 oraz w różnym stopniu spinki U180-A218, stymulują translację inicjowaną z kodonu AUG2. Możliwe, że usunięcie dwóch motywów typu spinki ułatwia wiązanie i skanowanie mRNA przez rybosom. Co więcej, pod wpływem oligomerów nr 7, nr 7a i nr 7b RNaza H nie trawiła całej puli RNA P1- Δ Np53-Luc, na co wskazuje prążek reprezentujący główny produkt w teście RNazy H (Rys. 54). Dzięki temu z części cząsteczek o pełnej długości generowane było białko fuzyjne na poziomie zbliżonym do reakcji kontrolnej bez oligomeru. Z drugiej strony, stosowany powszechnie do badania procesu translacji lizat z króliczych retikulocytów jest dodatkowo wzbogacany o czynniki inicjacyjne oraz inne komponenty maszynierii translacyjnej, co sprawia, że nawet matrycowe mRNA pozbawione kapu na końcu 5' lub posiadające bardzo krótkie regiony niekodujące 5' nadal ulegają translacji.

3.5.3. Oligonukleotydy antysensowe typu 2'-O-metylo i gapmer działają według dwóch różnych mechanizmów i wywierają zróżnicowany wpływ na translację inicjowaną z kodonów AUG1 i AUG2 w lizacie z króliczych retikulocytów

Wyróżnia się dwa główne mechanizmy inhibicji translacji za pomocą oligonukleotydów antysensowych [205; 206]. Pierwszy z nich polega na degradacji docelowego mRNA przez RNazę H. Natomiast drugi zakłada, że przyłączony do mRNA oligonukleotyd antysensowy stanowi zawadę przestrzenną dla rybosomu. Oba mechanizmy wykorzystałam w celu modulacji translacji inicjowanej z kodonów AUG1 i AUG2. Zastosowałam oligomery nr 1 i nr 7b indukujące cięcia RNazą H i zaprojektowałam ich warianty w formie gapmerów LNA. Stosowałam również warianty obu oligomerów w formie 2'-O-metylowanej, tak aby nie aktywowały RNazy H, a stanowiły zawadę steryczną dla rybosomu, bądź indukowały takie zmiany strukturalne w regionie terminalnym 5' mRNA p53, które mogłyby zaburzać tworzenie kompleksu inicjacyjnego.

Oligomer nr 7b typu gapmer indukował cięcia RNazą H w tych samych pozycjach co jego niemodyfikowany odpowiednik. Jest to spowodowane obecnością wewnętrznej sekwencji o długości 15 nukleotydów. Wcześniejsze prace pokazały, że oligonukleotydy antysensowe typu gapmer posiadające co najmniej 6-8 nukleotydową sekwencję wewnętrzną, są zdolne do aktywowania RNazy H [192; 207]. Aczkolwiek cięcia były słabsze niż w reakcji z oligomerem niemodyfikowanym (Rys. 55). Jest to dość zaskakujące, ponieważ oligomery typu gapmer posiadające na swoich końcach oligonukleotydy typu LNA najefektywniej indukowały cięcia za pomocą RNazy H [207]. W związku z tym, że oligomer nr 7b typu gapmer indukuje cięcia w tych samych pozycjach co wariant niemodyfikowany, można było spodziewać się podobnego efektu na translację inicjowaną z kodonów AUG1 i AUG2. Jednakże, oligomer nr 7b typu gapmer inhibował translację zarówno z kodonu AUG1 jak i AUG2 (Rys. 59). Inhibicja translacji z kodonu AUG1 jest następstwem cięć indukowanych w regionie A217-G226, gdyż wówczas usuwana jest spinka G56-C169 zawierająca kodon inicjacyjny AUG1. Jednakże, mimo skrócenia regionu terminalnego 5', kompleks rybosomalny nie inicjował translacji wydajniej z kodonu AUG2, tak jak miało to miejsce w przypadku niemodyfikowanego oligomeru nr 7b. Przepuszczalnie, osłabienie translacji z kodonu AUG2 może mieć związek z utratą odpowiedniej struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53, w obrębie którego postuluje się występowanie elementu IRES [11]. Przeprowadzone wcześniej badania wskazują, że translacja inicjowana z kodonu AUG2 jest raczej niezależna od kapu na końcu 5' mRNA i prawdopodobnie zachodzi według

mechanizmu wewnętrznej inicjacji [151; 185]. Innym wytłumaczeniem zahamowania syntezy białka z kodonu AUG2 pod wpływem oligomeru nr 7b typu gapmer, może być jego zwiększone powinowactwo do mRNA, dzięki występowaniu modyfikacji typu LNA. Wykazano, że obecność nukleotydów typu LNA zwiększa temperaturę topnienia heterodupleksu DNA-RNA [208]. W przypadku oligomerów posiadających na obu końcach trzy nukleotydy typu LNA, temperatura topnienia wzrasta o 1,5 - 2,7°C na każdy modyfikowany nukleotyd [207]. Istnieje zatem możliwość, że pomimo indukowania cięcia przez RNazę H, gapmer nr 7b pozostaje związany z mRNA i stanowi przeszkodę dla rybosomu. Efekt zawady przestrzennej obserwowano także w przypadku gapmerów komplementarnych do regionu TAR wirusa HIV, chociaż zawierały one na przemian nukleotydy niemodyfikowane i typu LNA (tzw. miksmery DNA/LNA) [209].

Z kolei oligomer nr 1 typu gapmer, który podobnie jak jego niemodyfikowany wariant obniżał poziom białek powstających z kodonów AUG1 i AUG2, nie indukował cięć w obrębie miejsca hybrydyzacji (reszty C50-G68) (Rys. 59 i 55). Jest to dość niespodziewany efekt, ponieważ oligomer ten spełnia wszystkie warunki aby skutecznie aktywować RNazę H. W przypadku obu oligomerów, cięcia pojawiły się w regionie A151-G161, czyli po przeciwnej stronie spinki G56-C169. Było to tym bardziej zaskakujące, ponieważ komercyjnie dostępna RNaza H z *E.coli*, której aktywność jest zbliżona do RNazy H występującej w RRL, trawiła mRNA P1-ΔNp53-Luc w obrębie heterodupleksu (Rys. 56). Aczkolwiek, w reakcji z gapmerem widoczne jest przesunięcie cięć w kierunku 3' o trzy nukleotydy oraz silniejsze cięcia drugorzędowe. Może to wskazywać na nieco odmienne miejsce hybrydyzacji gapmeru lub mechanizm działania RNazy H, w porównaniu do niemodyfikowanego oligomeru. Ponadto, RNaza H z *E.coli* nie generowała cięć w regionie A151-G161, tak jak miało to miejsce w lizacie. Sugeruje to, że cięcia po stronie 3' spinki G56-C169 nie są wynikiem przyłączenia oligomerów nr 1 i cięcia przez RNazę H. Dodatkowo obserwowano cięcia w tym regionie w obecności oligomeru nr 1 typu 2'-O-metylo, który nie posiada zdolności do aktywowania RNazy H (Rys. 55). W związku z powyższym istnieje możliwość, że wiązanie gapmeru nr 1 i nr 1 2'OMe do nukleotydów C50-A68 chroni ten region przed autodegradacją, o czym świadczy brak prążka w pozycji U52 w RRL w obecności obu oligomerów. Z drugiej strony, hybrydyzacja oligomerów nr 1 prowadzi do częściowego rozplątania spinki G56-C169 u jej podstawy, co w konsekwencji czyni region po jej stronie 3' bardziej podatnym na autodegradację lub dostępnym dla działania innych rybonukleaz obecnych w RRL. Przemawia za tym

również fakt, że cięcia w pozycjach A151-G161 pojawiają się tylko w RRL oraz są obecne w linii z oligomerem nr 1 2'OMe, który nie aktywuje RNazy H.

Pomimo inhibującego wpływu gamperów nr 1 i nr 7b na translację inicjowaną z kodonów AUG1 i AUG2 nie można jednoznacznie określić mechanizmu ich działania na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w RRL. Co więcej, również gampery kontrolne, które nie były komplementarne do mRNA P1-ΔNp53-Luc, prowadziły do obniżenia poziomu syntetyzowanych białek (Rys. 59). Być może środowisko lizatu, obecność mRNA P1-ΔNp53-Luc jako jedynej matrycy w reakcji translacji *in vitro* oraz nukleotydów typu LNA na obu końcach gamperów umożliwiają ich wiązanie do mRNA na zasadzie częściowej komplementarności.

Wcześniejsze badania pokazały, że translacja z kodonu AUG1 inicjowana jest z udziałem kapu na końcu 5' mRNA P1-ΔNp53-Luc (Rys. 26). Ze względu na wiązanie się oligomeru nr 1 2'OMe blisko końca 5' mRNA, może on utrudniać identyfikację kodonu AUG1 przez kompleks rybosomalny, czego wynikiem może być obniżona ilość białka powstającego od tego kodonu. Jednak bardziej prawdopodobne wydaje się, że za efekt inhibicji translacji odpowiadają niespecyficzne cięcia w pozycjach A153 i G161 czyli po drugiej stronie spinki G56-C169, obecne w liniach ze wszystkimi wariantami oligomeru nr 1 (Rys. 55). Jak już wcześniej wspomniałam, przypuszczalnie cięcia te mogą być wynikiem przyłączenia oligomeru nr 1 2'OMe do przeciwnej strony spinki G56-C169, co w konsekwencji prowadzi do autodegradacji RNA lub działania innych RNaz obecnych w RRL i odcinania spinki wraz z kodonem AUG1. Z kolei niecałkowita inhibicja translacji, może być spowodowana ochronnym działaniem oligomeru nr 1 2'OMe w regionie C50-G68, a przez to na spinkę G56-C169. Zmiany struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 spowodowane wiązaniem oligomeru nr 1 2'OMe do spinki G56-C169, mogą mieć wpływ na wiązanie kompleksu rybosomalnego do elementu IRES znajdującego się w jego obrębie. Ponieważ translacja z kodonu AUG2 inicjowana jest prawdopodobnie z wykorzystaniem elementu IRES, wszelkie zmiany struktury mogą odpowiadać za spadek syntezy białka z tego kodonu.

Metylowany oligomer nr 7b, w przeciwieństwie do wariantu niemodyfikowanego i typu gapmer hamował translację jedynie z kodonu AUG2 (Rys. 58). Na podstawie cięć RNazą H w RRL można stwierdzić, że wariant oligomeru typu 2'OMe pełni podczas translacji rolę zawady przestrzennej (Rys. 55). Ponieważ translacja z kodonu AUG2

inicjowana jest z wykorzystaniem elementu IRES, to przyłączenie oligomeru nr 7b 2'OMe do regionu terminalnego 5' mRNA p53 może utrudniać oddziaływanie z rybosomem, co ostatecznie prowadzi do zahamowania translacji z tego kodonu (Rys. 57 i 58). Z kolei translacja z kodonu AUG1 inicjowana jest prawdopodobnie według mechanizmu skaningowego. Ponieważ oligomer nr 7b hybryduje do mRNA poniżej kodonu AUG1, kompleks inicjacyjny może bez przeszkód związać się z mRNA i rozpocząć syntezę białka z kodonu AUG1. Następnie, po napotkaniu na heterodupleks rozplata go dzięki swojej aktywności helikazowej, dzięki czemu poziom białka z kodonu AUG1 nie zmienia się w porównaniu z reakcją kontrolną.

3.5.4. Oligonukleotydy antysensowe typu gapmer i 2'-O-metylo, które hybrydują do regionu terminalnego 5' mRNA p53 obniżają poziom białka p53 w komórkach raka piersi MCF-7

Obniżenie endogennego poziomu białka p53 w komórkach MCF-7 transfekowanych metylowanymi oligonukleotydami antysensowymi nr 1 i nr 7b nie wiązało się z redukcją poziomu mRNA p53, na co wskazują wyniki analizy RT-PCR, przedstawione na rysunku 61. W przypadku oligomeru nr 1 2'OMe za spadek ilości białka p53 mogą odpowiadać zaburzenia procesu inicjacji translacji, związane ze skanowaniem mRNA lub tworzeniem kompleksu inicjacyjnego. Ponieważ kompleks rybosomalny wykazuje aktywność helikazy, tylko silne wiązanie oligonukleotydu antysensowego do mRNA może prowadzić do inhibicji translacji [206]. 2'-O-metylowane oligonukleotydy antysensowe stanowią doskonałą zawadę przestrzenną, dzięki tworzeniu wysoce stabilnych heterodupleksów, a ponadto nie wykazują zdolności do aktywowania RNazy H [210]. Za pomocą oligonukleotydów antysensowych typu 2'-O-metylo, komplementarnych do regionu terminalnego 5' mRNA, obniżano poziom czynnika adhezji międzykomórkowej ICAM-1 w ludzkich komórkach śródbłonna żyły pępowinowej HUVEC [211]. Analiza asocjacji z polirybosomami wykazała, że spadek ilości białka ICAM-1 związany jest z inhibicją translacji na etapie inicjacji, ponieważ większość transkryptów ICAM-1 do których hybrydowały oligonukleotydy antysensowe, pozostawała związana z podjednostkami rybosomalnymi. Zakładając, że translacja z kodonu AUG1 inicjowana jest według modelu skaningowego, a oligomer nr 1 2'OMe wiąże się do regionu terminalnego 5' mRNA p53 w pobliżu kodonu AUG1, prawdopodobnie utrudnia on migrację rybosomu w poszukiwaniu kodonu inicjacyjnego. Niewykluczone również, że wiązanie oligomeru nr 1 2'OMe prowadzi do rearanżacji strukturalnych w obrębie spinki G56-C169,

które potencjalnie mogą wpływać na dokładność rozpoznania kodonu AUG1, znajdującego się w jej obrębie.

Efektywność syntezy białka p53 była silnie obniżona w obecności oligomeru nr 7b 2'OMe, który hybrydyzuje do reszt nukleotydowych w pozycjach A208-U228. Część tego regionu znajduje się w obrębie spinki U180-A218, z którą oddziałuje ligaza ubikwitynowa Hdm2 [161]. Oddziaływanie białka Hdm2 z regionem terminalnym 5' mRNA p53 stymuluje jego translację, ponieważ ogranicza wiązanie białka p53 do tego regionu [212]. W związku z powyższym, obniżenie poziomu białka p53 w komórkach MCF-7 może być konsekwencją współzawodnictwa o wiązanie między oligomerem nr 7b 2'OMe a specyficznymi czynnikami białkowymi. Należy wziąć również pod uwagę możliwość generowania zmian w strukturze spinki U180-A218 przez oligomer nr 7b 2'OMe, które mogą zapobiegać jej oddziaływaniu z białkiem Hdm2.

W przypadku oligomerów nr 1 i nr 7b typu gapmer, drastyczne zmniejszenie ilości białka p53 w komórkach MCF-7 korelowało ze spadkiem poziomu mRNA p53 (Rys. 62 i 63). Sugeruje to, że oba oligomery wykazują zdolność do aktywowania RNazy H w środowisku komórkowym. Gamper nr 7b, komplementarny do części spinki U180-A218, inhibował translację w krótszym czasie niż gapmer nr 1, hybrydujący do spinki G56-C169. Odwrotna sytuacja miała miejsce w RRL, gdzie oligomer nr 1 typu gapmer wykazywał silniejszy efekt inhibicji w porównaniu z oligomerem nr 7b (Rys. 59). Należy również zwrócić uwagę, na odmienne działanie gapmeru kontrolnego Fluc w środowisku komórkowym i lizacie (Rys. 59 i 62). Pomimo braku komplementarności do mRNA P1-ΔNp53-Luc i innych ludzkich mRNA, gamper kontrolny hamował translację w RRL, podczas gdy jego obecność w komórkach MCF-7 nie wpływała na poziom białka p53.

Nie jest jednak do końca zrozumiałe, dlaczego gapmer nr 7b w większym stopniu obniża poziom białka p53 w komórkach MCF-7 niż gapmer nr 1. Analiza poziomu mRNA p53 sugeruje, że w przypadku oligomeru nr 7b typu gapmer cięcia indukowane są w krótszym czasie po transfekcji niż w obecności oligomeru nr 1 (Rys. 63). Być może jest to spowodowane wydajniejszym wiązaniem się oligomeru nr 7b typu gapmer do regionu terminalnego 5' mRNA. Dowodem tego może być większa dostępność do hybrydyzacji spinki U180-A218 i sąsiadującego z nią jednoniciowego regionu A219-C229, niż spinki G56-C169, do której wiąże się oligomer nr 1 (Rys. 47 i 48). Oligonukleotyd antysensowy, komplementarny do spinki G56-C169 w obrębie kodonu AUG1 (reszty A130-G147) był

z powodzeniem stosowany przez Sak'a i współautorów [197], do obniżenia ilości białka p53 w komórkach niedrobno-komórkowego raka płuc NSCLC. Skutkowało to zwiększeniem wrażliwości komórek NSCLC na naświetlanie, dzięki indukcji apoptozy zależnej od p53. Oligomer ten działał według mechanizmu zależnego od RNazy H i obniżał poziom białka p53 o około 25-35%. Zastosowany przez mnie oligomer nr 7b typu gapmer w takim samym stężeniu co oligomer stosowany przez Sak'a i wsp., redukował ilość białka p53 w komórkach MCF-7 o około 40% w stosunkowo krótkim czasie po transfekcji. Dodatkowo, stabilność gapmeru nr 7b była zwiększona dzięki obecności nukleotydów typu LNA na jego końcach. Badania prowadzone przez inne grupy pokazały, że obecność trzech nukleotydów typu LNA na obu końcach zwiększa stabilność oligomeru w ludzkiej surowicy około 10-krotnie, w porównaniu z oligomerem niemodyfikowanym [207]. Ponadto, modyfikacje typu LNA nie wywołują efektu toksycznego [213]. Oligonukleotydy antysensowe, komplementarne do sekwencji kodującej białko p53, stosowano również w komórkach MCF-7, w celu obniżenia ilości białka p53 [196]. Miejsce docelowe dla jednego z nich (AS1) pokrywało się częściowo z sekwencją docelową dla oligomeru nr 6. Jednakże, oligomer AS1 nie wpływał na poziom białka p53 w komórkach MCF-7. Najbardziej skutecznym okazał się być oligomer AS3 komplementarny do nukleotydów 886-905 w mRNA p53.

W prowadzonych przeze mnie badaniach stosowałam oligonukleotydy antysensowe typu gapmer i 2'-O-metylo, ponieważ charakteryzują się one wysoką trwałością w środowisku komórkowym. Zastosowanie niemodyfikowanych oligonukleotydów antysensowych w liniach komórkowych czy na modelach zwierzęcych jest ograniczone, ponieważ *in vivo* ulegają one całkowitej degradacji już po czterech godzinach [207]. Modyfikacje typu LNA i 2'-O-metylo, które zwiększają powinowactwo do sekwencji docelowej oraz fakt, że zastosowane oligonukleotydy antysensowe hybrydyzowały do regionu terminalnego 5' mRNA (który jak wiadomo charakteryzuje się wysoką zachowawczością sekwencji), zapewniały specyficzność działania oligonukleotydów antysensowych nr 1 i nr 7b. Dowodem na to jest nie zmieniony poziom dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego GAPDH, będącej białkiem metabolizmu podstawowego (ang. *house-keeping genes*) (Rys. 60 i 62). Ponadto oba typy oligomerów nie wpływały również na poziom mRNA β -aktyny, co miało szczególne znaczenie w przypadku gapmerów aktywujących RNazę H w komórce (Rys. 61 i 63).

Nie uzyskano efektu stymulacji translacji izoformy $\Delta Np53$, który byłby szczególnie interesujący ze względu na potencjalne wykorzystanie w celu obniżania poziomu białka p53 za pomocą izoformy $\Delta Np53$. W wyniku działania oligomeru nr 7b typu gapmer i aktywności komórkowej RNazy H, można by oczekiwać przecinania mRNA p53 i generowania matrycowej cząsteczki, pozbawionej trwałych termodynamicznie spinek G56-C169 i U180-A218, wskutek czego kompleksy rybosomalne wydajniej inicjowałyby translację z kodonu AUG2. Jednak taki mRNA w środowisku komórkowym zostałby szybko zdegradowany przez rybonukleazy, ponieważ nie posiada kapu na końcu 5'. Dodatkowo, nie powiodły się próby detekcji izoformy $\Delta Np53$ w komórkach MCF-7, za pomocą przeciwciała monoklonalnego PAb 1801, pomimo iż stosowano je wcześniej do identyfikacji zarówno pełnej długości białka p53 jak i izoformy $\Delta Np53$ [12; 13]. Autorzy, którzy w swoich badaniach stosowali komórki MCF-7, dodatkowo wprowadzali do nich konstrukty cDNA, co skutkowało zwiększoną ekspresją obu białek i prawdopodobnie ułatwiało ich identyfikację metodą Western blot [13]. Badania przeprowadzone przez Candeias i współpracowników [143] sugerują, że ekspresja izoformy $\Delta Np53$ różni się w zależności od linii komórkowej i na jej poziom mogą wpływać różne rodzaje czynników stresowych. Ponadto, do identyfikacji białka p53 i izoformy $\Delta Np53$ stosowali oni przeciwciało poliklonalne CM-1. W naszym laboratorium prowadzone są obecnie badania pod kątem regulacji ekspresji izoformy $\Delta Np53$, za pomocą oligonukleotydów antysensowych w różnych liniach komórkowych poddawanych działaniu czynników stresowych.

Biorąc pod uwagę efektywność oraz mechanizm działania gapmeru nr 7b w komórkach MCF-7, wydaje się on być potencjalnym kandydatem obniżającym poziom białka p53 w liniach komórek nowotworowych poddawanych naświetlaniu. Jego praktyczne zastosowanie wymaga jednak dalszych badań, uwzględniających wpływ tego oligomeru na przebieg cyklu komórkowego oraz zdolność do indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych poddawanych naświetlaniu.

4. Podsumowanie

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki dotyczą wpływu wariantów regionu terminalnego 5' mRNA p53 na proces inicjacji translacji w układzie reporterowym lucyferazy w systemie bezkomórkowym, lizacie z króliczych retikulocytów, a także w wybranych liniach komórek ludzkich. Analizowano również rolę elementów struktury drugorzędowej tego regionu w mechanizmie inicjacji translacji oraz tworzeniu kompleksów rybosomalnych. Ponadto, zastosowano oligonukleotydy antysensowe, komplementarne do regionu terminalnego 5' mRNA p53 w celu modulacji aktywności translacyjnej kodonów inicjacyjnych dla białka p53 oraz izoformy Δ Np53.

Wyniki reakcji translacji prowadzonych w lizacie z króliczych retikulocytów oraz w liniach komórkowych HeLa i MCF-7 pokazały, że wszystkie warianty regionu terminalnego 5' mRNA p53 silnie osłabiają translację białka reporterowego w porównaniu do mRNA kontrolnego, kodującego białko lucyferazy. Wydłużenie tego regionu o region międzypromotorowy P0-P1 silnie osłabiało efektywność procesu. W przypadku wariantów regionu terminalnego 5' zawierających sekwencję intronu 2 translacja białka reporterowego zachodziła jedynie z kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53. Ponadto, wykazano że w wariantach z zachowanym intronem 2, aktywny translacyjnie jest także kodon AUG1 dla białka p53. Co więcej, obecność krótkiej, otwartej ramki odczytu utworzonej przez kodon AUG1 i kodon STOP obecny w intronie 2 osłabia translację inicjowaną z kodonu AUG2.

W przypadku modelowego mRNA z dwoma kodonami inicjacyjnymi, translacja inicjowana była silniej z kodonu AUG1 dla pełnej długości białka p53 niż z kodonu AUG2 dla izoformy Δ Np53. Otrzymane wyniki sugerują, że inicjacja translacji z AUG1 jest zależna od kapu obecnego na końcu 5' mRNA, ponieważ jego obecność silnie stymulowała translację. Natomiast wzrastające stężenie wolnego analogu kapu prowadziło do jej inhibicji. Z kolei, translacja rozpoczynająca się z kodonu AUG2 wykazuje charakter kap-niezależny, ponieważ obecność kapu na końcu 5' mRNA oraz dodanie wolnego analogu kapu do reakcji translacji nie wpłynęło na zmianę poziomu syntetyzowanego białka.

Mapowanie struktury drugorzędowej RNA regionu terminalnego 5' mRNA p53 posiadającego dwa kodony inicjacyjne AUG1 i AUG2 pokazały, że charakterystyczne dla tego regionu elementy strukturalne typu spinki G56-C169 i U180-A218 są zachowane

pomimo obecności sekwencji kodującej lucyferazę w modelowym konstrukcie mRNA, zarówno *in vitro* jak i w lizacie z króliczych retikulocytów. Miało to szczególnie duże znaczenie dla interpretacji wyników analizy tworzenia kompleksów rybosomalnych na mRNA. Okazało się bowiem, że umiejscowienie kodonu AUG1 w obrębie stabilnej termodynamicznie spinki G56-C169 utrudnia zaobserwowanie kompleksu rybosomalnego, zatrzymanego w miejscu inicjacji translacji, pomimo iż translacja z tego kodonu zachodzi na wyższym poziomie niż z AUG2. Ponieważ w wariantcie posiadającym tylko kodon AUG1 nie tworzy się spinka G56-C169, identyfikacja kompleksów rybosomalnych dla tego kodonu nie sprawiała trudności. Charakterystyczny układ prążków dla kompleksów rybosomalnych obserwowano zawsze dla kodonu AUG2, z którego inicjowana jest synteza izoformy Δ Np53. Powyższe wyniki wskazują na istotny udział elementów struktury drugorzędowej regionu terminalnego 5' mRNA p53 w rozpoznawaniu kodonu inicjacyjnego przez kompleks rybosomalny.

Określono miejsca dostępne do hybrydyzacji komplementarnych oligonukleotydów w regionie terminalnym 5' mRNA p53 stosując bibliotekę krótkich oligomerów DNA oraz RNazę H. Okazało się, że pomimo obecności licznych motywów dwuniciowych w tym regionie można znaleźć miejsca dostępne do hybrydyzacji. Większość oligomerów DNA wiązała się do spinki U180-A218, regionu zlokalizowanego pomiędzy spinką G56-C169 i U180-A218 oraz do jednoniciowego odcinka sekwencji pomiędzy nukleotydami A218 i C229. Na podstawie wyników uzyskanych z mapowania dostępności metodą eksperymentalną, a także wyników analizy komputerowej, zaprojektowano dziesięć oligonukleotydów antysensowych i badano ich wpływ na translację reporterowego konstruktów mRNA w lizacie z króliczych retikulocytów. Największe zmiany w poziomie otrzymanego produktu białkowego indukował oligomer nr 1, wiążący się do sekwencji u podstawy dużej spinki G56-C169 oraz oligomer nr 7, komplementarny do sekwencji mRNA w obrębie spinki U180-A218. Oligomery te wpływały na efektywność translacji inicjowanej z dwóch kodonów AUG1 i AUG2, aczkolwiek w różnym stopniu, co z kolei zmieniało stosunek ilościowy obu białek. Kolejne doświadczenia ujawniły, że obserwowany wpływ oligonukleotydów antysensowych na translację jest zależny od RNazy H, obecnej w lizacie z króliczych retikulocytów. W celu modulacji poziomu białka p53 i izoformy Δ Np53 w komórkach MCF-7 zastosowane zostały oligomery nr 1 i nr 7b w formie pochodnych 2'-*O*-metylo stanowiące zawadę przestrzenną w procesie translacji oraz typu gapmer, które indukują cięcia mRNA przez RNazę H. Zarówno oligomery typu gapmer jak i 2'-*O*-metylo obniżały poziom białka

p53 syntetyzowanego w komórkach MCF-7. W przypadku gapmerów nr 1 i nr 7b, efekt ten był związany z obniżeniem poziomu mRNA p53 na skutek aktywności komórkowej RNazy H. Natomiast obecność oligomerów 2'-*O*-metylo nie wpływała na zmianę ilości mRNA p53 w komórkach. Sugeruje to, że wiązanie tych oligomerów do transkryptu p53 indukowało zmiany w strukturze drugorzędowej jego regionu terminalnego 5'. Otrzymane wyniki wskazują, że motywy strukturalne typu spinki G56-C169 i U180-A218 mają kluczowe znaczenie w translacji inicjowanej z kodonów AUG1 (dla p53 pełnej długości) oraz AUG2 (dla izoformy Δ Np53). Ponadto, aktywność translacyjna może być selektywnie regulowana za pomocą oligonukleotydów antysensowych komplementarnych do określonych miejsc w regionie terminalnym 5' mRNA p53.

5. Materiały i metody

5.1. Aparatura

Zestaw do elektroforezy płytowej S2 – Life Technologies

Zestaw do elektroforezy płytowej S2001 – Life Technologies

Mały zestaw do elektroforezy płytowej

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

Zasilacz E833 – Consort

Zasilacz E863 – Consort

Termocykler UNO II – Biometra

Termocykler T-professional – Biometra

pH-metr Accumet BASIC – Fisher Scientific

Wirówka 5804R – Eppendorf

Wirówka 5415D – Eppendorf

Wirówka 5702 – Eppendorf

Wirówka próżniowa N 840.3 – Labort

Cieplarka do hodowli bakterii – Memmert

Spektrofotometr UV/VIS NanoDrop – Thermo Scientific

Licznik scyntylacyjny Microplate Counter 2450 – Perkin Elmer

Zestaw do wizualizacji żeli UVP2000

Skaner radioaktywności Typhoon 8600 – Molecular Dynamics

Skaner radioaktywności FLA-5100 – Fuji Film

Suszarka do żeli Gel Dryer 583 – Bio-Rad

Pompa próżniowa – Laboport

Komora laminarna aura mini – BioAir

Komora laminarna Steril-Bio BAN Compact – Angelantoni Lifescience

Inkubator do hodowli komórkowych – Memmert

Multilabel Reader VICTOR X4 – Perkin Elmer

Homogenizator ULTRA-TURRAX IKA T10 basic

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

Sekwenator ABI 3130 *xl* – Applied Biosystems

5.2. Odczynniki i materiały

Większość odczynników pochodziła z firm Sigma Aldrich, Lab Empire, Invitrogen, Serva, Fluka lub Bio-Rad. Filtry strzykawkowe Milex GP oraz analogi kapu ARCA (ang. *anti-reverse cap analog*) oraz trimetylowany analog kapu m7G(5')ppp(5')G zakupiono w firmie Tebu bio. Analog kapu ApppG otrzymano dzięki uprzejmości prof. dr hab. E. Darżynkiewicza z Zakładu Biofizyki Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Warszawskiego.

5.2.1. Związki promieniotwórcze

[$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (4000-5000 Ci/mmol) oraz L-[S^{35}] metionina (1000 Ci/mmol) – Hartmann Analytic

5.2.2. Enzymy

XbaI, NheI, NotI, BamHI, PstI, Taq DNA polimeraza, rybonukleaza T1, T4 kinaza polinukleotydomowa, odwrotna transkryptaza RevertAid M-MuLV – Thermo Scientific, Csp45I, DpnI, Pfu DNA polimeraza, inhibitor rybonukleaz RNasin, odwrotna transkryptaza AMV – Promega, rybonukleaza A – Sigma Aldrich, rybonukleaza H – Thermo Scientific i Promega, polimeraza poli(A) – Epicentre Biotechnologies

5.2.3. Zestawy odczynników

- Zestaw do transkrypcji *in vitro* AmpliScribe™ T7, T3, and SP6 High Yield Transcription Kit – Epicentre Biotechnologies
- Zestawy do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakterii – Qiagen oraz Bio Basic
- Zestaw do odwrotnej transkrypcji SuperScript III – Invitrogen
- Lizat z retikulocytów królika, trawiony mikrokokalną nukleazą – Promega
- Zestaw do oczyszczania RNA po transkrypcji *in vitro* RNeasy Min Elute Cleanup Kit – Qiagen
- Zestaw do oczyszczania RNA po transkrypcji *in vitro* RNA Clean-Up and Concentration Kit – Norgen BIOTEK CORP.
- Zestaw do mutagenyzy Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit – Agilent
- Zestaw do pomiaru aktywności lucyferazy *Firefly* i *Renilla* Dual Luciferase Reporter Assay System – Promega
- Odczynnik do izolacji kwasów nukleinowych TRI Reagent – Molecular Research Centre, Inc.
- Zestaw do izolacji RNA z tkanek RNAqueous Midi – Ambion
- Odczynnik do transfekcji komórek Lipofectamine RNAi Max – Invitrogen
- Odczynnik do transfekcji komórek TransMessenger – Qiagen
- Zestaw do detekcji chemiluminescencji w metodzie Western blot – ECL Western Blotting Substrate – Pierce

5.2.4. Odczynniki do hodowli komórek ludzkich

- PBS 1x pH 7,4 bez jonów wapnia i magnezu – BioShop
- Medium do hodowli DMEM z wysoką zawartością glukozy – Lonza
- Medium do transfekcji OPTIMEM – Gibco

- Medium do hodowli RPMI 1640 – Sigma Aldrich
- Witaminy MEM – Gibco
- Mieszanina antybiotyków Antibiotic/Antimycotic Solution 100x – Sigma Aldrich
- Mieszanina aminokwasów endogennych Non-Essential Amino Acids – Gibco
- Trypsyna z EDTA 10x – PAA
- Bydłęca surowica płodowa Fetal Bovine Serum (FBS) – Sigma Aldrich
- Medium do zamrażania komórek Recovery Cell Culture Freezing Medium – Gibco

5.2.5. Oligonukleotydy

Wszystkie startery DNA użyte w toku wykonywania pracy doktorskiej zostały zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (www.oligo.pl) lub zakupione w firmie Genomed. Oligonukleotydy antysensowe typu gapmer zostały zakupione w firmie Exiqon, a 2'-*O*-metylowane w firmie Future Synthesis. 2'-*O*-metylowany oligomer nr 7b został zsyntetyzowany w Zakładzie Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN pod kierownictwem prof. dr hab. R. Kierzka. Startery znakowane barwnikami fluorescencyjnymi VIC, FAM, PET i NED pochodziły z firmy Applied Biosystems.

5.2.6. Preparaty genomowego DNA i cDNA

DNA genomowy – European Collection of Cell Culture

cDNA z ludzkiej wątroby – Ambion

5.2.7. Plazmidy

Plazmid pRL-CMV – Promega

5.2.8. Szczepy bakteryjne

E. coli DH5 α – Invitrogen

5.2.9. Linie komórkowe oraz tkanki zwierzęce

– Komórki raka szyjki macicy HeLa – dostarczone dzięki uprzejmości prof. dr hab. J. Barciszewskiego z Zakładu Biologii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

– Komórki raka piersi MCF-7 – pochodziły z Zakładu Biomedycyny Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu pod kierownictwem z prof. dr hab. J. W. Krzyżosiaka

– Fragment wątroby świni domowej – dostarczone dzięki uprzejmości dr inż. M. Kamyczka z Zakładu doświadczalnego w Pawłowicach Instytutu Zootechniki PIB Balice k. Krakowa

– Fragment wątroby królika – dzięki uprzejmości dr hab. D. Rakusa z Zakładu Fizjologii Molekularnej Zwierząt Uniwersytetu Wrocławskiego

– Fragment wątroby krowy pochodził z ubojni w Goli k. Gostynia

5.2.10. Przeciwciała

– I-rzędowe przeciwciało przeciwko p53 PAb1801 – sc-98 Santa Cruz

– I-rzędowe przeciwciało przeciwko dehydrogenazie aldehydu 3-fosfoglicerynowego – GAPDH (A3) Santa Cruz

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

5.2.11. Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych i białek

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

5.2.12. Bufory, roztwory i pożywki**Bufor elektroforetyczny 1x TBE**

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

Bufor elektroforetyczny 1x TAE

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

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

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

Bufor do żelu poliakryloamidowego zagęszczającego do elektroforezy białek

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

Bufor do żelu poliakryloamidowego rozdzielającego do elektroforezy białek

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

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

50% metanol, 10% lodowaty kwas octowy

Roztwór do płukania żeli poliakryloamidowych do elektroforezy białek

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

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

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

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

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

1x bufor do transferu białek

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

10x TBS

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

Bufor Laemmli

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

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

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

Roztwory obciążające próbki zawierającej RNA lub DNA

– Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących: 8 M mocznik, 0,02% (w/v) błękit bromofenolowy, 0,02% (w/v) ksylencjanol

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

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

Bufor do elucji kwasów nukleinowych z żelu poliakryloamidowego

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

Bufor do trawienia rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących

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

Bufor „stop”

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

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

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

Pożywki do hodowli bakteryjnych**Pożywka stała LB**

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

Pożywka płynna LB

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

Antybiotyki

Ampicylina 100 mg/ml H₂O

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

5.3. Metody standardowe**5.3.1. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących**

Metodę wykorzystywano do analizy produktów cDNA otrzymanych w reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanymi starterami, fragmentów RNA po cięciu przez rybonukleazę H w obecności oligonukleotydów antysensowych, a także do oczyszczania oligomerów DNA po syntezie chemicznej. Stosowano żel poliakryloamidowy o usieciowaniu 29:1 (stosunek wagowy akryloamidu do bisakryloamidu) z 8 M mocznikiem oraz bufor elektroforetyczny 1x TBE. Procentowość żelu uzależniona była od długości rozdzielanych fragmentów i wynosiła od 8%. Próbkę obciążano roztworem 8 M mocznika

z barwnikami elektroforetycznymi w stosunku 1:1. Każdą elektroforezę poprzedzała preelektroforeza prowadzona przy natężeniu prądu 10 mA, aż do ustalenia parametrów prądowych. Podczas rozdziału elektroforetycznego stosowano natężenie prądu 20 mA (żel 20x20 cm) lub 40 mA (żel 30x40 cm). Do wizualizacji wyników wykorzystywano: autoradiografię po znakowaniu radioizotopowym, wygaszanie światła UV po oczyszczeniu oligomerów DNA po syntezie chemicznej, ekrany odwzorowujące po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji odwrotnej transkrypcji z radioaktywnie znakowanym starterem DNA oraz fragmentów RNA po trawieniu rybonukleazą H.

5.3.2. Elektroforeza cząsteczek DNA i RNA w żelu agarozowym

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

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

5.3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących

Metodę stosowano do rozdziału produktów translacji *in vitro* oraz lizatu białkowego z komórek MCF-7 transfekowanych oligonukleotydami antysenowymi. Żel białkowy składał się z dwóch warstw różniących się procentowością i wartością pH. Stosowano 5% żel

zagęszczający pH 6,8 i 15% żel rozdzielający pH 8,8, przy czym obydwie zawierały 0,1% SDS jako czynnik denaturujący. Przed elektroforezą, próbki obciążano 25 µl roztworu SSB i denaturowano 3 minuty w 95°C. Próbki zwirowywano, pobierano 5 µl i nakładano bezpośrednio do kieszonek w żelu. Natężenie prądu podczas migracji białek w warstwie żelu zagęszczającego wynosiło 15 mA, a w warstwie żelu rozdzielającego 30 mA.

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

5.3.4. Elucja kwasów nukleinowych z żelu poliakrylamidowego

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

5.3.5. Wytrącanie kwasów nukleinowych z roztworu

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

RNA wyizolowany z tkanek wytrącano za pomocą chlorku litu. Do eluentu dodawano chlorek litu w stosunku objętościowym 2:1 i strącano przez 1 godzinę w -20°C. Osad zwirowywano przy 13000 rpm przez 20 minut w temperaturze 4°C. Po usunięciu supernatantu, osad przemywano dodatkowo 100 µl 70% etanolu i wirowano ponownie.

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

5.3.6. Ekstrakcja fenolem

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

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

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

5.3.8. Izolacja RNA za pomocą odczynnika TriReagent

Odczynnik TriReagent stosowano do izolacji RNA z RRL, po mapowaniu struktury drugorzędowej RNA za pomocą DMS oraz izolacji całkowitego RNA z komórek MCF-7 po transfekcji oligonukleotydami antysensowymi. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano wodę do objętości 50 μ l oraz 300 μ l odczynnika TriReagent, natomiast komórki MCF-7 rosące w monowarstwie zalewano bezpośrednio 300 μ l odczynnika TriReagent i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 60 μ l chloroformu, wytrząsano przez 15 sekund i ponownie inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Mieszaninę wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy 12000 x g. Następnie do zebranej fazy wodnej dodawano 150 μ l izopropanolu i 0,5 μ l glikogenu i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu 10000 x g, w 4°C przez 10 minut z fazy wodnej wytrącano osad, który przemywano 50 μ l 75% etanolu i odwirowywano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy 7500 x g. Wysuszony osad rozpuszczano w wodzie.

5.3.9. Izolacja całkowitego RNA z tkanek zwierzęcych

Do izolacji całkowitego RNA z wątroby świni, krowy i królika wykorzystywano zestaw RNAqueous-Midi Kit i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. Niewielki kawałek zamrożonej tkanki umieszczono w moździerz, zalano ciekłym azotem i ucierano do uzyskania proszku. 200 mg sproszkowanej tkanki rozpuszczano w buforze Lysis/Binding Buffer. W celu uzyskania lizatu, mieszaninę homogenizowano przy 30000 rpm, za pomocą homogenizatora ULTRA-TURRAX IKA T10 basic. Następnie lizat mieszano z 64% etanolem i podawano przez strzykawkę na filtr. Filtr przemywano kilkakrotnie, najpierw za pomocą 12 ml Wash Solution I, a następnie taką samą objętością Wash Solution 2/3 oraz etanolem. RNA związany na filtrze eluowano podgrzanym do 100°C Elution Solution do 1,5 ml probówek. Następnie wytrącano osad przy użyciu chlorku litu.

5.3.10. Hodowla ludzkich komórek nowotworowych

Ludzkie komórki raka szyjki macicy HeLa hodowano w medium RPMI 1640, a raka piersi MCF-7 hodowano w medium DMEM z wysoką zawartością glukozy 4,5 g/L. Do mediów dodawano mieszaninę aminokwasów endogennych, mieszaninę antybiotyków i antymykotyków zawierającą 100 U/ml penicyliny G, 0,1 mg/ml siarczanu streptomycyny

i 0,25 mg/ml amfoterycyny B oraz bydlęcą surowicę płodową FBS, której końcowe stężenie wynosiło 10%. Do medium DMEM dodawano glutaminę do końcowego stężenia 2 mM. Natomiast medium RPMI uzupełniano o mieszaninę witamin. Hodowlę prowadzono w 37°C w 5% CO₂. Komórki pasażowano 2-3 razy w tygodniu w stosunku 1:2 lub 1:4. Hodowlę prowadzono maksymalnie do 20 pasażu.

5.4. Metody stosowane w badaniach własnych

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

5.4.1.1. Otrzymywanie insertów dsDNA

Wszystkie modelowe konstrukty dsDNA zostały otrzymane w Zakładzie Biochemii RNA, przy czym konstrukt dsDNA P1-p53-Luc i P1-ΔNp53-Luc otrzymał dr Leszek Błaszczyk, natomiast konstrukt P1-ΔNp53(int2)-Luc wykonała mgr inż. Dorota Kowalczykiewicz. Wykorzystane w niniejszej pracy konstrukty dsDNA otrzymano z wykorzystaniem techniki PCR z odpowiednio dobranymi starterami, oznaczonymi na początku nazw literą F (ang. *primer forward*) i R (ang. *primer reverse*) (Tabela 6.). Konstrukty w formie dsDNA stanowiły matryce w reakcji transkrypcji *in vitro* w celu uzyskania modelowych mRNA.

Cząsteczki dsDNA odpowiadające regionom P1-p53 i P1-ΔNp53 otrzymano w reakcji PCR na matrycy cDNA z ludzkiej wątroby ze starterami: Fkrot i Rkrot dla P1-p53 oraz Fkrot i Rdlug dla P1-ΔNp53. W celu wklonowania otrzymanych dsDNA do plazmidu pRL-CMV, w kolejnej reakcji PCR dodano do końca 5' obu cząsteczek miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny XbaI za pomocą startera FXbakrot oraz do końca 3' miejsce dla enzymu Csp45I, stosując starter RCspkrot dla P1-p53 i RCspdlug dla P1-ΔNp53.

Tabela 6. Startery stosowane w reakcjach PCR

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'-3'	Otrzymywanie cząsteczki dsDNA
Fkrot	CTAGAGCCACCGTCCAGGGAGC	P1-p53, P1-ΔNp53, P1-ΔNp53(int2)
Rkrot	TCCATGGCAGTGACCCGGAAGG	P1-p53

Rdlug	TCCATTGCTTGGGACGGCAAGG	P1- Δ Np53
FXbakrot	AAGTCTAGAGCCACCGTCCAGG	P1-p53, P1- Δ Np53, P1- Δ Np53(int2)
RCspkrot	CTATTCGAATCCATGGCAGTGACC	P1-p53, P0-p53
RCspdlug	TCCATTGCTTGGGACGGCAAGG	P1- Δ Np53, P0- Δ Np53, P0- Δ Np53(int2)
RE1-2	AGTTTCCATAGGTCTGAAAATGTTTCC	P1- Δ Np53(int2)
FE2-I2first	GGAAACATTTTCAGACCTATGG	P1- Δ Np53(int2)
RE3-I2	CAGAACGTTGTTTTTCAGGAAGTC	P1- Δ Np53(int2), P0- Δ Np53(int2)
RE34-I2	CTATTCGAATCCATTGCTTGGGACGGCAAG GGGGACAGAACGTTGTTTTTCAGGAAGTC	P1- Δ Np53(int2)
F112	GTCATGGCGACTGTCCAGCTTTG	P0- Δ Np53, P0- Δ Np53(int2)
Rex1c	CTGCTCCCTGGACGGTGGCTC	P0- Δ Np53
Fpst7112	GACTGTCTGCAGTAATACGACTCACTATAG GTCATGGCGACTGTCC	P0- Δ Np53, P0-p53, P0- Δ Np53(int2)

Otrzymywanie cząsteczki P1- Δ Np53(int2) przebiegało w kilku etapach. W pierwszym etapie, wykonano reakcję PCR ze starterami Fkrot i RE1-2 na cDNA z ludzkiej wątroby, w celu namnożenia fragmentu zawierającego egzon 1 i egzon 2. W kolejnej reakcji PCR otrzymano fragment składający się z egzonu 2, intronu 2 i egzonu 3 na matrycy genomowego DNA ze starterami FE2-I2first i RE3-I2. W celu połączenia otrzymanych produktów zastosowano startery Fkrot i RE3-I2. Ostatnia reakcja PCR polegała na dodaniu do końców cząsteczki miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne XbaI i Csp45I oraz fragmentu egzonu 4. W tym celu użyto startery FXbakrot i RE34-I2.

W celu uzyskania cząsteczki dsDNA P0- Δ Np53, w pierwszej kolejności amplifikowano fragment P0-P1 na matrycy genomowego DNA za pomocą starterów F112 i Rex1c. Następnie fragment P0-P1 połączono z cząsteczką P1- Δ Np53, jednocześnie dodając do końca 5' miejsce dla enzymu restrykcyjnego PstI i sekwencję promotora T7 i miejsce

dla enzymu restrykcyjnego Csp45I do końca 3'. W tym celu w reakcji PCR wykorzystano startery Fpst7112 i RCspdlug.

Cząsteczkę dsDNA P0-p53 otrzymano wykorzystując w reakcji PCR dsDNAP0-ΔNp53 jak matrycę oraz startery Fpst7112, który posiada miejsce dla enzymu restrykcyjnego PstI i sekwencję promotora T7 oraz starter RCspkrot, niosący miejsce dla enzymu restrykcyjnego Csp45I.

Cząsteczkę dsDNA P0-ΔNp53(int2) uzyskano poprzez dodanie fragmentu P0-P1 do cząsteczki P1-ΔNp53(int2), stosując w reakcji PCR startery F112 i RE3-I2. W celu wklonowania cząsteczki do wektora PRL-CMV, do otrzymanego produktu PCR w kolejnej reakcji dodano miejsce dla enzymu restrykcyjnego PstI i promotora T7 do końca 5' i miejsca dla enzymu restrykcyjnego Csp45I do końca 3', za pomocą starterów Fpst7112 i Rcpdlug.

Mieszanina reakcyjna zawierała 0,5-20 ng dsDNA (lub cDNA) matrycy, odpowiednie startery o stężeniu 0,5 μM, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 200 μM mieszaninę dNTP, 1,5-2 mM MgCl₂ and 30U/ml DNA polimerazy Taq. Właściwe reakcje PCR poprzedzały reakcje testowe prowadzone w 5-krotnie mniejszej objętości w gradiencie temperatury oraz stężenia MgCl₂, w celu ustalenia temperatury wiązania poszczególnych par starterów oraz optymalnych warunków amplifikacji.

5.4.1.2. Trawienie insertów dsDNA oraz wektora plazmidowego enzymami restrykcyjnymi

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

5.4.1.3. Ligacja insertów dsDNA z plazmidem

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

Cząsteczki dsDNA P1-p53, P1-ΔNp53, P1-ΔNp53(int2) klonowano do plazmidu poniżej sekwencji dla promotora T7. Z kolei, inserty dsDNA P0-p53, P0-ΔNp53, P0-ΔNp53(int2) posiadały na końcu 5' sekwencję promotora T7, w związku z czym był on usuwany z plazmidu za pomocą trawienia enzymem restrykcyjnym.

5.4.1.4. Ukierunkowana mutageneza

Metodę wykorzystano do otrzymania konstruktów DNA P1-ΔNp53(int2-mut)-Luc, posiadającego zmutowany kodon STOP w intronie 2 (UGA → GCG), P1-ΔNp53(int2/AUG1-mut)-Luc posiadającego zmutowany kodon AUG1 (AUG1 → GCG) oraz P1-ΔNp53(int2-mut/AUG1-mut)-Luc, który posiadał zmutowany zarówno kodon STOP jak i AUG1. W pierwszym etapie ukierunkowanej mutagenezy, przygotowywano dwie reakcje PCR zawierające 500 ng plazmidu, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1 mg/ml BSA, 0,1% Triton X-100, 1 μM stężenie jednego ze starterów posiadających mutację, 250 μM dNTP i 1 U Pfu DNA polimerazy. Stosowano następujące warunki temperaturowe: 95°C–2 minuty i 10 cykli: 95°C–50 s, 60°C–50 s, 68°C–16 minut, po czym następowało końcowe wydłużanie w 68°C przez 7 minut. Obie reakcje mieszano ze sobą, dodawano 0,8 U Pfu DNA polimerazy, rozdzielano na dwie równe części i przeprowadzano kolejną reakcję PCR stosując warunki: 95°C–2 minuty i 20 cykli: 95°C–50 s, 60°C–50 s, 68°C–16 minut, po czym następowało końcowe wydłużanie w 68°C przez 7 minut. Mieszaninę reakcyjną poddawano ekstrakcji fenolem, dsDNA strącano etanolem, próbki wirowano i osad rozpuszczano w wodzie. W celu usunięcia matrycowego plazmidu przeprowadzono trawienie za pomocą enzymu restrykcyjnego DpnI. Mieszanina reakcyjna zawierała handlowo dostępny bufor dla DpnI, 5 μg DNA, 0,04 μg/μl

BSA, 50 U DpnI. Reakcję inkubowano 3 godziny w temperaturze 37°C. Otrzymanym DNA transformowano komórki bakteryjne *E.coli*.

W celu otrzymania konstruktu DNA P0-ΔNp53(int2-mut)-Luc wykorzystany został zestaw Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit firmy Agilent. Całą procedurę przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. W pierwszym etapie wykonano reakcję PCR, która w 50 μl zawierała 50 ng konstrukt dsDNA P0-ΔNp53(int2)-Luc, 5 μl buforu reakcyjnego 10 x, 125 ng startera Fstop-mut 5'-ACCTATGGAAACTGGGAGTGGATCCATTGG-3', 125 ng startera Rstop-mut 5'-CCAATGGATCCACTCCCA GTTTCATAGGT-3' , 1 μl dNTP oraz 2,5 U polimerazy DNA Pfu Turbo. Warunki temperaturowe reakcji były następujące: 95°C–30s oraz 12 cykli: 95°C–30s, 55°C–1 min, 68°C–5 min. W celu usunięcia niezmutowanej matrycy do mieszaniny reakcyjnej dodano 10 U DpnI i inkubowano w 37°C przez 1 godzinę.

5.4.1.5. Transformacja komórek *E.coli*

Plazmidowy DNA wprowadzano do komórek kompetentnych *E. coli* DH5α metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne rozmrażano w lodzie przez 30 minut. Następnie, dodawano 5 μl mieszaniny ligacyjnej i inkubowano 30 minut w lodzie. Zawiesinę bakteryjną umieszczano na 30 sekund w temperaturze 42°C, po czym przenoszono na 2 minuty do lodu, dodawano 250 μl pożywki LB i komórki hodowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (200 rpm). Komórki bakteryjne (50 μl) rozprowadzano na powierzchni szalek z pożywką LB i ampicyliną. Hodowlę prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 37°C. Bakterie pochodzące z pojedynczej kolonii zawieszano w 8 ml pożywki LB z ampicyliną i inkubowano przez 8 godzin w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przy 240 rpm. Izolację plazmidu prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników firmy Qiagen lub Bio Basic. Otrzymane plazmidy sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie lub firmie Genomed.

5.4.2. Otrzymywanie modelowych mRNA p53 świni domowej, krowy oraz królika

Cząsteczki dsDNA, kodujące region 5'UTR i białko p53 świni domowej *Sus scrofa* (Ss 5'UTR+ORF), krowy *Bos taurus* (Bt 5'UTR+ORF) i królika *Oryctolagus cuniculus* (Oc 5'UTR+ORF) otrzymywano w reakcji PCR na matrycy cDNA. cDNA uzyskano w reakcji odwrotnej transkrypcji ze starterem oligo(dT) na matrycy całkowitego RNA, wyizolowanego z wątroby powyższych organizmów. W przypadku dsDNA Ss 5'UTR+ORF wykonano jedną reakcję PCR ze starterem Fss1T7 (posiadającym sekwencję promotora T7) i RssFL. Z kolei otrzymywanie dsDNA Bt i Oc odbywało się dwustopniowo. W pierwszej reakcji PCR stosowano startery Fbt i RbtFL dla dsDNA Bt oraz Foc i RocFL dla dsDNA Oc. W kolejnej reakcji PCR wykorzystano startery FbtT73G i FocT7G, w celu dodania do końca 5' dsDNA sekwencji promotora T7. Mieszanina reakcyjna zawierała 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 1,5-2 mM MgCl₂, 200 mM każdego dNTP, 0,5 μM startery, 1,2 μl cDNA lub 1 ng/ml dsDNA oraz 0,3 U/ml Taq DNA polimerazy. Warunki reakcji były następujące: 95°C–5 min, a następnie 30 cykli: 95°C–30 sek., 62°C (dla Ss), 58°C (dla Bt), 60°C (dla Oc)–30 sek., 72°C–2 min i końcowe wydłużanie 72°C–10 min.

Tabela 7. Startery stosowane do otrzymywania modelowych konstruktów mRNA p53 wybranych organizmów

Nazwa startera	Sekwencja 5'-3'	Otrzymywanie dsDNA 5'UTR+ORF
Fss1T7	TAATACGACTCACTATAAAAAGTCCAGGGC	dsDNA Ss
RssFL	TCAGTCTGAGTCAGGTCCTTCTCTTGAACATCG	dsDNA Ss
Fbt	TAAAGTCCAGAGCCACCATCC	dsDNA Bt
FbtT73G	TAATACGACTCACTATAGGGTAAAGTCCAGAGC	dsDNA Bt
RbtFL	TCAGTCTGAGTCAGGTCC	dsDNA Bt
Foc	GGCAGGAGACCGTCCGGGAAGC	dsDNA Oc
FocT7G	TAATACGACTCACTATAGGGCAGGAGACCGTCCGGGAAGC	dsDNA Oc
RocFL	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTCTCTC	dsDNA Oc

5.4.3. Transkrypcja *in vitro*

Wszystkie analizowane cząsteczki mRNA otrzymano przy użyciu zestawu do transkrypcji firmy Epicentre Biotechnologies (AmpliScribe™ T7, T3, and SP6 High Yield Transcription Kit), zgodnie z wytycznymi producenta. Jako matryce stosowano cząsteczki dsDNA otrzymane w reakcji PCR lub plazmidy uprzednio poddane linearyzacji. Mieszanina reakcyjna zawierała 0,5–1 µg matrycowego dsDNA, bufor transkrypcyjny, 7,5 mM mieszaninę NTP, 20 mM DTT oraz 2 µl mieszaniny polimeraz RNA. Reakcję prowadzono przez 2–4 godziny w temperaturze 37°C. Następnie, dodawano 1 U DNazy I i inkubowano 10 minut w temperaturze 37°C. Transkrypty oczyszczano z wykorzystaniem zestawu RNeasy Min Elute Cleanup Kit firmy Qiagen lub Clean-Up and Concentration Kit firmy Norgen. Otrzymane transkrypty rozdzielano w żelu agarozowym w obecności buforu 1x TAE w celu analizy jakościowej.

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

5.4.4. Mapowanie miejsc w mRNA dostępnych do hybrydyzacji za pomocą bibliotek kombinatorycznych DNA i RNazy H

0,5 pmola RNA P1-ΔNp53-Luc poddawano denaturacji – renaturacji w buforze zawierającym 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 40 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA przez podgrzanie w 65°C przez 2 minuty i powolne schłodzenie do 37°C. Następnie dodawano RNazę H z *Escherichia coli* do końcowego stężenia 250 U/ml. Reakcję cięcia indukowano poprzez dodanie do czterech próbek jednej z czterech bibliotek kombinatorycznych 6-merów DNA (końcowe stężenie 200 µM). Końcowa objętość próbki wynosiła 10 µl. Mieszaniny reakcyjne inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 i 30 minut. Reakcje zatrzymywano poprzez dodanie równej objętości 20 mM EDTA. Produkty cięcia były oczyszczane poprzez ekstrakcję fenolem pH 4,5 oraz mieszaniną chloroform – alkohol izoamylowy, a następnie wytrącano je za pomocą trzech objętości 96% etanolu w obecności 0,3 M octanu sodu pH 5,2 i glikogenu (20 mg/ml) w -20°C.

5.4.5. Cięcia indukowane przez RNazę H z *E.coli* w obecności oligonukleotydów antysensowych

2,5 pmola mRNA P1-ΔNp53-Luc znakowanego na końcu 5' izotopem ^{32}P renaturowano w buforze zawierającym 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 40 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA ogrzewając przez 2 minuty w temperaturze 37°C. Następnie dodawano RNazę H z *E.coli* do końcowego stężenia 250 U/ml. Reakcje cięcia indukowano poprzez dodanie oligonukleotydy antysensowego nr 1 w formie niemodyfikowanej i gapmeru do końcowego stężenia 2 μM . Po 10 i 30 minutowej inkubacji w temperaturze 37°C, reakcje zatrzymywano poprzez dodanie EDTA do końcowego stężenia 100 mM. Wykonano również reakcje kontrolne bez dodania RNazy H. Wszystkie reakcje uzupełniono wodą do końcowej objętości 100 μl . Produkty cięcia oczyszczano poprzez ekstrakcję fenolem i strącano w standardowych warunkach w obecności glikogenu (20 mg/ml). Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących. Przed nałożeniem na żel próbki denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 95°C w 8 M moczniku z barwnikami elektroforetycznymi.

5.4.6. Ograniczone trawienie RNA rybonukleazą T1 w warunkach semidenaturujących

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

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

4.5.7.1. Translacja *in vitro*

Wszystkie reakcje translacji *in vitro* prowadzono w RRL ściśle według zaleceń producenta (Promega). Produkty reakcji analizowano z wykorzystaniem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Przed reakcją, mRNA inkubowano 3 minuty w temperaturze 65°C i przenoszono na lód. Mieszanina reakcyjna zawierała 2,5 pmola modelowego konstruktu mRNA, 17,5 μl RRL, 20 μM mieszaninę aminokwasów

(bez metioniny), 1 μl L-[S³⁵] metioniny (1000 Ci/mmol), 40 U inhibitora rybonukleaz i wodę do końcowej objętości 25 μl . Reakcję prowadzono 90 minut w temperaturze 30°C, po czym przenoszono do lodu. W celu degradacji mRNA, do 5 μl mieszaniny reakcyjnej dodawano rybonukleazę A do końcowego stężenia 0,2 mg/ml i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 25°C. Następnie, dodawano 20 μl roztworu SSB. Bezpośrednio przed elektroforezą, próby denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 80°C. Z tak przygotowanej mieszaniny do kieszonek w żelu nanoszono po 5 μl . Natężenie prądu podczas migracji białek w warstwie żelu zagęszczającego wynosiło 15 mA, a w warstwie żelu rozdzielającego 30 mA.

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

W przypadku reakcji translacji prowadzonej w obecności oligonukleotydów antysensowych mRNA był preinkubowany w mieszaninie translacyjnej przez 2 minuty w temperaturze 30°C, po czym dodawane były oligonukleotydy antysensowe do końcowego stężenia 0,5 i 2 μM . Reakcje translacji kontynuowano w temperaturze 30°C przez 90 minut.

5.4.7.2. Analiza kompleksów rybosomalnych 48S i 80S w RRL tzw. „odcisk palca”

Tworzenie kompleksów rybosomalnych 48S i 80S na mRNA P1-p53-Luc, P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc analizowano przeprowadzając reakcję inhibicji odwrotnej transkrypcji w RRL tzw. metodzie „odcisku palca”. W celu otrzymania „odcisku palca” dla kodonu AUG2 w mRNA P1- Δ Np53-Luc i P1- Δ Np53(int2)-Luc oraz kodonu AUG1 w mRNA P1-p53-Luc wykorzystano starter DNA Rluc330 hybrydujący do sekwencji kodującej lucyferazę *Renilla* (Tabela 8.) oraz procedurę opisaną przez Dmitriev i wsp. [170]. Mieszanina reakcyjna zawierała 7,14 μl RRL, 10 U inhibitora rybonukleaz oraz 13 mM octan magnezu. W reakcji kontrolnej K_{H2O} lizat zastąpiono równą objętością wody. Aby zatrzymać kompleksy rybosomalne 48S i 80S, RRL traktowano oddzielnie odpowiednio GMP-PNP (5'-guanylo- imidofosforan) o końcowym stężeniu 2 mM lub cykloheksimidem o końcowym stężeniu 1mg/ml lub równą objętość wody dla reakcji kontrolnej w RRL K_{RRL}. Wszystkie próby inkubowano przez 5 minut w temperaturze 30°C. Następnie do mieszaniny dodawany był 1 pmol mRNA zawierający kap na końcu 5'. Po 5 minutowej inkubacji

w temperaturze 30°C, do każdej reakcji dodawano około 5 µl startera DNA znakowanego izotopem ^{32}P na końcu 5' i 8 µl mieszaniny do odwrotnej transkrypcji RT-MIX zawierającej 0,6 µl 320 mM MgAc_2 , 1 µl 10 mM dNTP, 1 µl 10 x buforu *Reconstitution*, 4,9 µl wody i 5 U odwrotnej transkryptazy AMV. Reakcja odwrotnej transkrypcji przebiegała przez 10 minut w temperaturze 30°C.

Tabela 8. Startery zastosowane do identyfikacji „odcisku palca”

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'-3'	Identyfikacja kompleksów rybosomalnych	
		dla kodonu:	w mRNA:
Rdlug	TCCATTGCTTGGGACGGCAAGG	AUG1	P1- Δ Np53-Luc
Rluc330	TAATAAATGAATCAAGAACATTC	AUG1	P1-p53-Luc
		AUG2	P1- Δ Np53-Luc, P1- Δ Np53(int2)-Luc
E2R	CTTCCCACAGGTCTCTGCTAGG	AUG1	P1- Δ Np53(int2)-Luc

W celu identyfikacji kompleksów rybosomalnych dla AUG1 w mRNA P1- Δ Np53-Luc zastosowany został starter DNA Rdlug, komplementarny do nukleotydów 232-257 oraz starter E2R komplementarny do nukleotydów 63-84 w obrębie intronu 2 w mRNA P1- Δ Np53(int2)-Luc. W tym przypadku reakcje inhibicji odwrotnej transkrypcji przeprowadzono według protokołu opisanego przez Gould i wsp. [214] z niewielkimi modyfikacjami. 10 pmoli startera znakowanego radioaktywnie na końcu 5' zmieszano z 1,28 pmolami mRNA, posiadającego kapu na końcu 5' i 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Mieszaninę podgrzano w 68°C przez 2 minuty, a następnie schłodzono przez 8 minut na lodzie. Następnie mRNA łączono z mieszaniną translacyjną, która zawierała 8,75 µl RRL, 20 µM mieszaninę aminokwasów bez metioniny, 20 µM mieszaninę aminokwasów bez leucyny oraz 0,5 U/µl inhibitora rybonukleaz. Reakcja zawierała cykloheksimid o końcowym stężeniu 0,5 mg/ml. Reakcje kontrolne zarówno w RRL jak i w wodzie zamiast cykloheksimidu zawierały taką samą ilość wody. Wszystkie reakcje inkubowano w temperaturze 30°C przez 20 minut. Następnie pobrano 4 µl z każdej mieszaniny reakcyjnej w celu przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji, która w końcowej objętości 20 µl zawierała: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 40 mM KCl, 3,5 mM MgAc_2 , 5 mM DTT, 0,8 mM dNTP, 0,5 mg/ml Cx, 1,5 U/ml inhibitora rybonukleaz i 5 U/ml odwrotnej transkryptazy SuperScriptIII i przebiegała w 25°C przez

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

5.4.7.3. Analiza cięć RNazą H w obecności oligonukleotydów antysensowych w RRL

W celu indukowania cięć przez RNazę H obecną w RRL 2,5 pmola mRNA P1-ΔNp53-Luc znakowanego na końcu 5' izotopem ^{32}P inkubowano w 65°C przez 2 minuty, a następnie schłodzono na lodzie przez 5 minut. mRNA zmieszano z 17,5 μl RRL i inkubowano przez 5 minut w 30°C. W celu indukcji cięć RNazą H dodawano oligonukleotydy antysensowe nr 1 i nr 7b w formie niemodyfikowanej, gapmeru i 2'-*O*-metylowanej do końcowego stężenia 2 μM. Po 30 minutowej inkubacji w 30°C wszystkie reakcje umieszczano w lodzie. Produkty cięcia izolowano przy użyciu odczynnika TriReagent według zaleceń producenta. Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących. Przed nałożeniem na żel próbki denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 95°C w 8 M moczniku z barwnikami elektroforetycznymi.

5.4.8. Odwrotna transkrypcja z radioaktywnie znakowanym starterem DNA

Miejsca cięcia w RNA indukowane jonami Pb^{2+} (rozdział 5.4.13.2), a także miejsca cięcia RNazą H w obecności biblioteki 6-merów DNA (rozdział 5.4.4.) analizowano w reakcji odwrotnej transkrypcji. Do 2 pmoli RNA dodawano 2 pmole startera DNA znakowanego radioizotopowo na końcu 5' oraz wodę do końcowej objętości 12 μl. RNA denaturowano przez 1 minutę w temperaturze 95°C i przenoszono na 10 minut do lodu. Do RNA dodawano 8 μl mieszaniny zawierającej 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 6 mM DTT, 0,5 mM każdego z dNTP oraz 50 U odwrotnej transkryptazę M-MuLV. Reakcje prowadzono przez 1 minutę w temperaturze 45°C, 10 – 60 minut w temperaturze 52°C, a następnie przez 5 minut w temperaturze 65°C. Po zakończeniu reakcji, w celu degradacji RNA, dodawano 1 μl 4M NaOH i inkubowano 5 minut w temperaturze 95°C. Reakcje zobojętniano przez dodanie 25 μl 160 mM Tris-HCl. Otrzymane cDNA strącano,

wirowano, suszono i rozpuszczano w 20 μ l wody. Produkty reakcji analizowano w 8% żelu w warunkach denaturujących. Przed nałożeniem na żel, próbki denaturowano przez 2 minuty w temperaturze 95°C w 8 M moczniku z barwnikami elektroforetycznymi. W celu otrzymania produktów reakcji sekwencjonowania, dNTP zastępowano mieszaniną ddNTP:dNTP w stosunku 4:1 (końcowe stężenia w reakcji: 0,2 mM ddNTP, 0,05 mM dNTP).

5.4.9. Transfekcja komórek HeLa i MCF-7 modelowymi mRNA i oligonukleotydami antysensowymi

Dwadzieścia cztery godziny przed transfekcją 2×10^5 komórek HeLa i MCF-7 w 2 ml kompletnego medium wysiewano do dołka w 12-dołkowej płytce. W dniu transfekcji, gdy konfluencja komórek wynosiła 80-90%, usuwano kompletne medium, komórki przemywano roztworem soli fizjologicznej PBS, tak aby nie dopuścić do ich wysychania. Następnie 3,2 μ l odczynnika wzmacniającego transfekcję Enhancer R mieszano z buforem ER-C oraz z równomolowymi ilościami kapowanego modelowego mRNA oraz kapowanego i poliadenylowanego mRNA lucyferazy *Firefly*, tak aby końcowa objętość wynosiła 100 μ l. Całkowita ilość mRNA wprowadzanego do komórek wynosiła 1,6 μ g. Do transfekcji nie stosowano mRNA którego wyjściowe stężenie było niższe niż 0,1 μ g/ μ l. Po 5 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, dodawano 6 μ l odczynnika do transfekcji TransMessenger. Utworzony w ten sposób kompleks z mRNA, mieszano z 300 μ l odpowiedniego medium bez antybiotyków i surowicy, i dodawano kroplami na komórki. Po 3 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C i 5% CO₂, kompleks mRNA-TransMessenger usuwano z dołków, komórki przemywano 500 μ l PBS i dodawano 2 ml świeżego medium zawierającego antybiotyki i surowicę i inkubowano przez kolejne 4 godziny.

5.4.10. Pomiar aktywności białek reporterowych lucyferazy *Renilla* i *Firefly*

Do pomiaru ilości białka lucyferazy *Renilla* i *Firefly* stosowano handlowo dostępny zestaw Dual-Luciferase Reporter Assay System. Cztery godzin po transfekcji modelowymi mRNA kodującymi lucyferazę *Renilla* i mRNA kontrolnym kodującym lucyferazę *Firefly*, komórki HeLa i MCF-7 poddawano lizie stosując 250 μ l buforu 1x Passive Lysis Buffer i mieszano 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie 20 μ l otrzymanego lizatu dodawano do 100 μ l odczynnika LAR II (Luciferase Assay Reagent II), będącego substratem

dla lucyferazy *Firefly* i dokonywano pomiaru luminescencji przez 10 sekund. Następnie całość mieszano ze 100µl odczynnika Stop&Glo, który w pierwszej kolejności wygasza luminescencję lucyferazy *Firefly*, a następnie indukuje aktywność lucyferazy *Renilla*. W tym przypadku pomiar trwał również 10 sekund. Do pomiaru chemiluminescencji używano płytek 96-dołkowych z białym dnem i ściankami oraz czytnika płytek 2030 Multilabel Reader VICTOR™ X4.

5.4.11. Analiza białek metodą Western-blot

W celu otrzymania lizatu białkowego, komórki MCF-7 po transfekcji oligonukleotydami antysensowymi, poddawano lizie w 30 µl buforu Laemmli poprzez inkubację w temperaturze 95°C przez 5 minut z wytrząsaniem. Następnie przeprowadzono elektroforezę otrzymanych białek w poliakryloamidowym żelu białkowym w warunkach denaturujących. Przed przystąpieniem do transferu białek, żel płukano w buforze do transferu, a membranę PVDF płukano przez 10 sekund w metanolu, następnie przemywano ją wodą i płukano przez 5 minut w buforze do transferu. Transfer białek z żelu na membranę prowadzono przez 1 godzinę przy napięciu prądu 70 mA w aparacie Trans-blot SD Semi-Dry Transfer cell. Po transferze, membranę blokowano za pomocą buforu zawierającego 0,1% Tween i 1x TBS przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie, membranę płukano 3 razy w buforze 1x TBS przez 10 min. W celu identyfikacji białka p53, membranę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z I-rzędowym mysim przeciwciałem PAb 1801 rozcieńczonym w stosunku 1:600 w 0,1 % Tween i 1x TBS. Po inkubacji, membranę płukano 3 razy buforem zawierającym 0,1% Tween i 1x TBS przez 15 minut. Następnie membranę inkubowano z przeciwciałem II-rzędowym IgG skoniugowanym z alkaliczną fosfatazą przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Przeciwciało rozcieńczano w stosunku 1:10000 w roztworze zawierającym 5% mleko, 0,1% Tween i 1xTBS. Po inkubacji membranę płukano 3 razy w buforze 0,1% Tween i 1x TBS. Tak przygotowaną membranę poddawano detekcji za pomocą reakcji barwnej z odczynnikiem Pierce ECL Western Blotting, w celu wykonania autoradiografii.

W celu identyfikacji białka dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego GAPDH stosowano I-rzędowe przeciwciało GAPDH A3 (Santa Cruz), które rozcieńczano w stosunku 1:100 w roztworze zawierającym 5% mleko, 0,1% Tween i 1xTBS.

5.4.12. Półilościowa analiza poziomu mRNA metodą RT-PCR

Po transfekcji komórek MCF-7 oligonukleotydami antysensowymi, izolowano całkowity RNA za pomocą odczynnika TriReagent zgodnie z protokołem, opisanym wcześniej w rozdziale 5.3.8. W celu otrzymania cDNA, 300 ng wyizolowanego całkowitego RNA połączono ze 100 ng startera oligo(dT) i inkubowano w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie 5 minut w lodzie. Następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji, która zawierała: 0,5 mM dNTP, 5 mM DTT, 1x bufor reakcyjny, 2 U/μl inhibitora RNazy oraz 100 U odwrotnej transkryptazy SuperScript III. Reakcje inkubowano najpierw przez 1 godzinę w temperaturze 50°C, następnie w temperaturze 70°C przez 15 minut, po czym schładzano ją w lodzie. W celu usunięcia matrycowego RNA, dodawano 250 U/ml RNazy H i inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 minut. Enzym inaktywowano poprzez inkubację w temperaturze 70°C przez 10 minut. Otrzymany cDNA stanowił matrycę w reakcji PCR ze starterami specyficznymi dla p53 Fkrot 5'-CTAGAGCCACCGTCCAGGGGAGC-3' i R295: 5'-GTCTTGCCAGTTGGCAAACATC-3' i β-aktyny Factin: 5'-AGAGCAAGAGAGGCATCCTG-3' i Ractin: 5'-CGACGTAGCACAGCTTCTCC-3'. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 1,2 μl cDNA, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 200 μM mieszaniny dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM starterów oraz 30 U/ml DNA polimerazy Taq. Reakcja przebiegała w następujących warunkach: preinkubacja w temperaturze 95°C przez 5 minut, 30 cykli obejmujących 95°C–30 sekund, 60°C (dla β-aktyny) i 62°C (dla p53)–30 sekund, 72°C–30 sekund, a następnie końcowe wydłużanie 72°C–5 minut. 5 μl każdej próbki DNA obciążano roztworem do obciążania próbek DNA i rozdzielano w 1% żelu agarozowym.

5.4.13. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA

5.4.13.1. Mapowanie struktury drugorzędowej RNA z wykorzystaniem techniki SHAPE

Przed reakcją modyfikacji, 20 pmoli mRNA zawieszono w 20 μl buforu zawierającego 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 100 μM EDTA denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 90°C, po czym schładzano do temperatury 4°C w tempie 0,1°C/sekundę. Następnie, dodawano 5x bufor o składzie 40 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 130 mM KCl, 100 μM EDTA oraz wodę do końcowej objętości 146 μl i inkubowano

10 minut w temperaturze 37°C. Mieszaninę dzielono na dwie równe części. Do jednej dodawano 7,3 µl 55 mM NMIA rozpuszczonego w bezwodnym DMSO, a do drugiej 7,3 µl bezwodnego DMSO (reakcja kontrolna). Końcowe stężenie NMIA w reakcji wynosiło 5 mM. Reakcje modyfikacji prowadzono przez 50 minut w temperaturze 37°C po czym mRNA strącano, wirowano, suszono i rozpuszczano w 10 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 z 0,1 mM EDTA.

5.4.13.2. Cięcia RNA indukowane w obecności jonów Pb²⁺

Przed reakcją cięcia, 130 pmoli mRNA renaturowano w buforze zawierającym 40 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂ w temperaturze 65°C przez 5 minut, a następnie przez 10 minut w temperaturze 37°C. Mieszaninę rozdzielano na 4 próbki i do każdej dodawano świeżo przygotowany roztwór octanu ołowiu, do uzyskania końcowych stężeń 0,25, 0,5 i 1 mM. Reakcje prowadzono 3 minuty w temperaturze 37°C i zatrzymywano przez dodanie buforu „stop” w stosunku 1:1 oraz przenoszono do suchego lodu. W kolejnym etapie, wykonywano reakcje odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy M-MuLV i radioaktywnie znakowanym starterem DNA. Produkty reakcji analizowano w 8% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących.

5.4.13.3. Modyfikacja chemiczna RNA za pomocą siarczany dimetylu DMS

Przed reakcją modyfikacji 10 pmoli mRNA w 100 mM NaCl w końcowej objętości 160 µl denaturowano w 90°C przez 3 minuty i schłodzono do 4°C w tempie 0,1°C/sekundę. Mieszaninę reakcyjną zawierającą 10 pmoli RNA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 40 mM NaCl podawano denaturacji-renaturacji w temperaturze 65°C przez 5 minut i inkubację w 90°C przez 3 minuty a następnie schładzano do 4°C w tempie 0,1°C/sekundę. Do mieszaniny zawierającej RNA dodawano bufor o końcowych stężeniach 50 mM HEPES pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl i inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 minut. Następnie, dodawano 10% roztwór DMS w etanolu (końcowe stężenie DMS w reakcji wynosiło 0,25%). Reakcje prowadzono 5 minut w temperaturze 37°C i zatrzymywano przez umieszczenie w lodzie i dodanie 3 objętości 96% etanolu. mRNA strącano w obecności glikogenu. Miejsca modyfikacji identyfikowano w reakcji odwrotnej transkrypcji

wykorzystując zestaw odczynników SuperScript III oraz fluorescencyjnie znakowany zestaw starterów DNA.

5.4.13.4. Modyfikacja chemiczna RNA w RRL za pomocą siarczanu dimetylu DMS

10 pmoli mRNA zawieszono w 100 mM KCl poddawano denaturacji przez 3 minuty w temperaturze 90°C, po czym schładzano do temperatury 4°C w tempie 0,1°C na sekundę. Następnie dodawano MgCl₂ tak aby końcowe stężenie jonów Mg²⁺ wynosiło 0,5 mM i inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 minut. Do mieszaniny zawierającej mRNA dodawano 17,5 µl RRL oraz wodę do końcowej objętości 23,75 µl. Po 10 minutowej inkubacji w temperaturze 30°C dodawano 5% DMS rozpuszczonego w etanolu do końcowego stężenia w reakcji 0,25%. W reakcji kontrolnej DMS zastąpiono taką samą ilością etanolu. Wszystkie reakcje inkubowano w temperaturze 30°C przez 2 minuty. Reakcje modyfikacji zatrzymywano poprzez dodanie zimnego β-merkaptioetanolu do końcowego stężenia 10%. Następnie mRNA izolowano z mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem odczynnika TriReagent. Miejsca modyfikacji identyfikowano w reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystując zestaw odczynników SuperScript III oraz fluorescencyjnie znakowany zestaw starterów DNA.

5.4.13.5. Odwrotna transkrypcja z fluorescencyjnie znakowanymi starterami DNA

Wyniki mapowania struktury drugorzędowej RNA za pomocą cięć indukowanych w obecności jonów Pb²⁺ wizualizowano z wykorzystaniem autoradiografii lub ekranów odwzorowujących i skanera FLA-5100 z oprogramowaniem *MultiGauge* (Fuji Film) (rozdział 5.4.8.). Natomiast, modyfikacje chemiczne za pomocą NMIA i DMS identyfikowano w reakcji odwrotnej transkrypcji z fluorescencyjnie znakowanymi starterami. Następnie fragmenty cDNA poddawano wysokorozdzielczej elektroforezie kapilarnej na sekwenatorze ABI 3130 *xl* (Wydziałowa Pracownia Techniki Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu), a otrzymane wyniki w postaci pików analizowano z wykorzystaniem programu *ShapeFinder* [155].

W celu identyfikacji miejsc podatnych na modyfikację NMIA i DMS stosowano fluorescencyjnie znakowany starter DNA Rluc 330 5'-TAATAAATG AATCAAGAACATCC-3', hybrydujący do sekwencji kodującej lucyferazę *Renilla*.

Ten sam starter był znakowany czterema różnymi barwnikami VIC (reakcja z odczynnikiem modyfikującym), 6-FAM (reakcja kontrolna), PET (reakcja sekwencjonowania z ddT) i NED (reakcje sekwencjonowania z ddA i ddG). Mieszanina reakcyjna zawierała 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 6 mM DTT, 500 μM każdego dNTP i 50 U odwrotnej transkryptazę SuperScriptIII. Próby inkubowano w temperaturze 45°C przez 1 minutę, w temperaturze 52°C przez 1 godzinę a następnie w temperaturze 65°C przez 5 minut. Po zakończeniu reakcji, w celu degradacji RNA, dodawano 1 μl 4M NaOH i inkubowano 5 minut w temperaturze 95°C. Reakcje zobojętniano przez dodanie 25 μl 160 mM Tris-HCl. Fragmenty cDNA otrzymane we wszystkich czterech reakcjach ze starterem znakowanym VIC, FAM, PET i NED łączono i rozpuszczano w formamidzie, a następnie poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu na jednej kapilarze.

6. Literatura

- [1]E. Martinez-Salas, D. Pineiro, N. Fernandez, Alternative Mechanisms to Initiate Translation in Eukaryotic mRNAs. *Comp Funct Genomics* 2012 (2012) 391546.
- [2]M. Lopez-Lastra, A. Rivas, M.I. Barria, Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res* 38 (2005) 121-146.
- [3]F. Gebauer, M.W. Hentze, Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004) 827-835.
- [4]M. Hemmings-Mieszczak, [The role of mRNA structure in translation initiation in Eucaryotes]. *Postepy Biochem* 47 (2001) 118-128.
- [5]A.A. Komar, B. Mazumder, W.C. Merrick, A new framework for understanding IRES-mediated translation. *Gene* 502 (2012) 75-86.
- [6]K.B. Van Der Kelen, R. Inzé, D. De Veylder, L., Translational control of eukaryotic gene expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* (2009).
- [7]M. Kozak, Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234 (1999) 187-208.
- [8]N. Sonenberg, A.G. Hinnebusch, Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136 (2009) 731-745.
- [9]M. Holcik, N. Sonenberg, R.G. Korneluk, Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet* 16 (2000) 469-473.
- [10]M. Stoneley, A.E. Willis, Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23 (2004) 3200-3207.
- [11]P.S. Ray, R. Grover, S. Das, Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep* 7 (2006) 404-410.
- [12]S. Courtois, G. Verhaegh, S. North, M.G. Luciani, P. Lassus, U. Hibner, M. Oren, P. Hainaut, DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* 21 (2002) 6722-6728.
- [13]A. Ghosh, D. Stewart, G. Matlashewski, Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 7987-7997.
- [14]S. Strudwick, L.M. Carastro, T. Stagg, P. Lazarus, Differential transcription-coupled translational inhibition of human p53 expression: a potentially important mechanism of regulating p53 expression in normal versus tumor tissue. *Mol Cancer Res* 1 (2003) 463-474.
- [15]C.U. Hellen, P. Sarnow, Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15 (2001) 1593-1612.
- [16]J. Frank, Toward an understanding of the structural basis of translation. *Genome Biol* 4 (2003) 237.
- [17]U. Liwak, M.D. Faye, M. Holcik, Translation control in apoptosis. *Exp Oncol* 34 (2012) 218-230.
- [18]A.G. Hinnebusch, J.R. Lorsch, The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (2012).
- [19]I.N. Shatsky, S.E. Dmitriev, I.M. Terenin, D.E. Andreev, Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs. *Mol Cells* 30 (2010) 285-293.
- [20]J. Chaudhuri, D. Chowdhury, U. Maitra, Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. *J Biol Chem* 274 (1999) 17975-17980.
- [21]F.L. Erickson, E.M. Hannig, Ligand interactions with eukaryotic translation initiation factor 2: role of the gamma subunit. *EMBO J* 15 (1996) 6311-6320.
- [22]J.W.B. Hershey, W.C. Merrick, The Pathway and Mechanism of Initiation of Protein Synthesis. *Translational Control of Gene Expression* 39 (2000) 487-502.
- [23]T.V. Pestova, S.I. Borukhov, C.U. Hellen, Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394 (1998) 854-859.

- [24]A.C. Gingras, B. Raught, N. Sonenberg, eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68 (1999) 913-963.
- [25]J. Marcotrigiano, A.C. Gingras, N. Sonenberg, S.K. Burley, Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 3 (1999) 707-716.
- [26]J.D. Gross, N.J. Moerke, T. von der Haar, A.A. Lugovskoy, A.B. Sachs, J.E. McCarthy, G. Wagner, Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115 (2003) 739-750.
- [27]D. Prevot, J.L. Darlix, T. Ohlmann, Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95 (2003) 141-156.
- [28]A.B. Sachs, P. Sarnow, M.W. Hentze, Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89 (1997) 831-838.
- [29]G.W. Rogers, Jr., A.A. Komar, W.C. Merrick, eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72 (2002) 307-331.
- [30]M. Kozak, Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44 (1986) 283-292.
- [31]S. Das, U. Maitra, Functional significance and mechanism of eIF5-promoted GTP hydrolysis in eukaryotic translation initiation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 70 (2001) 207-231.
- [32]A. Unbehauen, S.I. Borukhov, C.U. Hellen, T.V. Pestova, Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev* 18 (2004) 3078-3093.
- [33]D. Maag, C.A. Fekete, Z. Gryczynski, J.R. Lorsch, A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol Cell* 17 (2005) 265-275.
- [34]T. Preiss, M.W. Hentze, From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 9 (1999) 515-521.
- [35]D.A. Mangus, M.C. Evans, A. Jacobson, Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4 (2003) 223.
- [36]S.E. Wells, P.E. Hillner, R.D. Vale, A.B. Sachs, Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2 (1998) 135-140.
- [37]A. Kahvejian, G. Roy, N. Sonenberg, The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66 (2001) 293-300.
- [38]X. Bi, D.J. Goss, Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* 275 (2000) 17740-17746.
- [39]Y. Luo, D.J. Goss, Homeostasis in mRNA initiation: wheat germ poly(A)-binding protein lowers the activation energy barrier to initiation complex formation. *J Biol Chem* 276 (2001) 43083-43086.
- [40]K. Khaleghpour, Y.V. Svitkin, A.W. Craig, C.T. DeMaria, R.C. Deo, S.K. Burley, N. Sonenberg, Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell* 7 (2001) 205-216.
- [41]M. Kozak, A.J. Shatkin, Migration of 40 S ribosomal subunits on messenger RNA in the presence of edeine. *J Biol Chem* 253 (1978) 6568-6577.
- [42]M. Kozak, Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* 9 (1989) 5134-5142.
- [43]M. Kozak, Primer extension analysis of eukaryotic ribosome-mRNA complexes. *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 4853-4859.
- [44]E. Paraskeva, N.K. Gray, B. Schlager, K. Wehr, M.W. Hentze, Ribosomal pausing and scanning arrest as mechanisms of translational regulation from cap-distal iron-responsive elements. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 807-816.

- [45] A.M. Cigan, L. Feng, T.F. Donahue, tRNAⁱ(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science* 242 (1988) 93-97.
- [46] M. Kozak, Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 2662-2666.
- [47] T.V. Pestova, V.G. Kolupaeva, The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16 (2002) 2906-2922.
- [48] M. Kozak, Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* 16 (1997) 2482-2492.
- [49] D.R. Cavener, S.C. Ray, Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 3185-3192.
- [50] M. Kozak, An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 8125-8148.
- [51] S. Nakagawa, Y. Niimura, T. Gojobori, H. Tanaka, K. Miura, Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes. *Nucleic Acids Res* 36 (2008) 861-871.
- [52] D.F. Yun, T.M. Laz, J.M. Clements, F. Sherman, mRNA sequences influencing translation and the selection of AUG initiator codons in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 19 (1996) 1225-1239.
- [53] A.V. Pisarev, V.G. Kolupaeva, M.M. Yusupov, C.U. Hellen, T.V. Pestova, Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *EMBO J* 27 (2008) 1609-1621.
- [54] M. Kozak, Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299 (2002) 1-34.
- [55] S.J. Chen, G. Lin, K.J. Chang, L.S. Yeh, C.C. Wong, Translational efficiency of a non-AUG initiation codon is significantly affected by its sequence context in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 3173-3180.
- [56] V. Shalak, L. Guigou, M. Kaminska, M.P. Wautier, J.L. Wautier, M. Mirande, Characterization of p43(ARF), a derivative of the p43 component of multiaminoacyl-tRNA synthetase complex released during apoptosis. *J Biol Chem* 282 (2007) 10935-10943.
- [57] V. Shalak, M. Kaminska, M. Mirande, Translation initiation from two in-frame AUGs generates mitochondrial and cytoplasmic forms of the p43 component of the multisynthetase complex. *Biochemistry* 48 (2009) 9959-9968.
- [58] Y. Suzuki, J.B. Holmes, S.M. Cerritelli, K. Sakhuja, M. Minczuk, I.J. Holt, R.J. Crouch, An upstream open reading frame and the context of the two AUG codons affect the abundance of mitochondrial and nuclear RNase H1. *Mol Cell Biol* 30 (2010) 5123-5134.
- [59] J. Vera-Otarola, L. Solis, R. Soto-Rifo, E.P. Ricci, K. Pino, N.D. Tischler, T. Ohlmann, J.L. Darlix, M. Lopez-Lastra, The Andes hantavirus NSs protein is expressed from the viral small mRNA by a leaky scanning mechanism. *J Virol* 86 (2012) 2176-2187.
- [60] T. Racine, R. Duncan, Facilitated leaky scanning and atypical ribosome shunting direct downstream translation initiation on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus. *Nucleic Acids Res* 38 (2010) 7260-7272.
- [61] B.G. Luukkonen, W. Tan, S. Schwartz, Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J Virol* 69 (1995) 4086-4094.
- [62] M. Kozak, New ways of initiating translation in eukaryotes? *Mol Cell Biol* 21 (2001) 1899-1907.
- [63] T.A. Gray, S. Saitoh, R.D. Nicholls, An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 5616-5621.
- [64] C.F. Calkhoven, C. Muller, A. Leutz, Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev* 14 (2000) 1920-1932.

- [65]T. Hohn, H.S. Park, O. Guerra-Peraza, L. Stavalone, M.M. Pooggin, K. Kobayashi, L.A. Ryabova, Shunting and controlled reinitiation: the encounter of cauliflower mosaic virus with the translational machinery. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66 (2001) 269-276.
- [66]L.A. Ryabova, T. Hohn, Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes Dev* 14 (2000) 817-829.
- [67]D.D. Anthony, W.C. Merrick, Analysis of 40 S and 80 S complexes with mRNA as measured by sucrose density gradients and primer extension inhibition. *J Biol Chem* 267 (1992) 1554-1562.
- [68]M. Holcik, N. Sonenberg, Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 318-327.
- [69]A.G. Hinnebusch, Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem* 272 (1997) 21661-21664.
- [70]S.R. Kimball, Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells. *Prog Mol Subcell Biol* 26 (2001) 155-184.
- [71]L. Swiech, M. Perycz, A. Malik, J. Jaworski, Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (2008) 116-132.
- [72]R.E. Lloyd, Translational control by viral proteinases. *Virus Res* 119 (2006) 76-88.
- [73]C. Perales, L. Carrasco, I. Ventoso, Cleavage of eIF4G by HIV-1 protease: effects on translation. *FEBS Lett* 533 (2003) 89-94.
- [74]M. Bushell, D. Poncet, W.E. Marissen, H. Flotow, R.E. Lloyd, M.J. Clemens, S.J. Morley, Cleavage of polypeptide chain initiation factor eIF4GI during apoptosis in lymphoma cells: characterisation of an internal fragment generated by caspase-3-mediated cleavage. *Cell Death Differ* 7 (2000) 628-636.
- [75]W.E. Marissen, D. Triyoso, P. Younan, R.E. Lloyd, Degradation of poly(A)-binding protein in apoptotic cells and linkage to translation regulation. *Apoptosis* 9 (2004) 67-75.
- [76]A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (1998) 806-811.
- [77]S. Schutz, P. Sarnow, Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. *Virology* 344 (2006) 151-157.
- [78]N. Agrawal, P.V. Dasaradhi, A. Mohammed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar, S.K. Mukherjee, RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (2003) 657-685.
- [79]H. Cerutti, RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* 19 (2003) 39-46.
- [80]S.M. Hammond, A.A. Caudy, G.J. Hannon, Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2 (2001) 110-119.
- [81]D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2004) 281-297.
- [82]F. Yang, Q.J. Li, Z.B. Gong, L. Zhou, N. You, S. Wang, X.L. Li, J.J. Li, J.Z. An, D.S. Wang, Y. He, K.F. Dou, MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment. *Technol Cancer Res Treat* 13 (2014) 77-86.
- [83]T. Qiu, L. Zhou, T. Wang, J. Xu, J. Wang, W. Chen, X. Zhou, Z. Huang, W. Zhu, Y. Shu, P. Liu, miR-503 regulates the resistance of non-small cell lung cancer cells to cisplatin by targeting Bcl-2. *Int J Mol Med* 32 (2013) 593-598.
- [84]L. Xia, D. Zhang, R. Du, Y. Pan, L. Zhao, S. Sun, L. Hong, J. Liu, D. Fan, miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 123 (2008) 372-379.
- [85]W. Zhu, X. Shan, T. Wang, Y. Shu, P. Liu, miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *Int J Cancer* 127 (2010) 2520-2529.
- [86]W. Hu, C.S. Chan, R. Wu, C. Zhang, Y. Sun, J.S. Song, L.H. Tang, A.J. Levine, Z. Feng, Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. *Mol Cell* 38 (2010) 689-699.
- [87]M. Kumar, Z. Lu, A.A. Takwi, W. Chen, N.S. Callander, K.S. Ramos, K.H. Young, Y. Li, Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene* 30 (2011) 843-853.

- [88]M.T. Le, C. Teh, N. Shyh-Chang, H. Xie, B. Zhou, V. Korzh, H.F. Lodish, B. Lim, MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* 23 (2009) 862-876.
- [89]Y. Zhang, J.S. Gao, X. Tang, L.D. Tucker, P. Quesenberry, I. Rigoutsos, B. Ramratnam, MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. *FEBS Lett* 583 (2009) 3725-3730.
- [90]C.H. Lecellier, P. Dunoyer, K. Arar, J. Lehmann-Che, S. Eyquem, C. Himber, A. Saib, O. Voinnet, A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 308 (2005) 557-560.
- [91]I.M. Pedersen, G. Cheng, S. Wieland, S. Volinia, C.M. Croce, F.V. Chisari, M. David, Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449 (2007) 919-922.
- [92]C. Jopling, Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol* 9 (2012) 137-142.
- [93]L. Sun, Q. Li, The miRNAs of herpes simplex virus (HSV). *Virology* 27 (2012) 333-338.
- [94]A. Gupta, J.J. Gartner, P. Sethupathy, A.G. Hatzigeorgiou, N.W. Fraser, Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* 442 (2006) 82-85.
- [95]M. Konarska, W. Filipowicz, H. Domdey, H.J. Gross, Binding of ribosomes to linear and circular forms of the 5'-terminal leader fragment of tobacco-mosaic-virus RNA. *Eur J Biochem* 114 (1981) 221-227.
- [96]M. Kozak, Inability of circular mRNA to attach to eukaryotic ribosomes. *Nature* 280 (1979) 82-85.
- [97]J. Pelletier, N. Sonenberg, Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334 (1988) 320-325.
- [98]A. Gradi, Y.V. Svitkin, H. Imataka, N. Sonenberg, Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 11089-11094.
- [99]N.M. Kuyumcu-Martinez, M.E. Van Eden, P. Younan, R.E. Lloyd, Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 1779-1790.
- [100]A.A. Komar, M. Hatzoglou, Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J Biol Chem* 280 (2005) 23425-23428.
- [101]V.G. Kolupaeva, T.V. Pestova, C.U. Hellen, I.N. Shatsky, Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem* 273 (1998) 18599-18604.
- [102]H. Ji, C.S. Fraser, Y. Yu, J. Leary, J.A. Doudna, Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 16990-16995.
- [103]J.E. Wilson, M.J. Powell, S.E. Hoover, P. Sarnow, Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 4990-4999.
- [104]M. Piron, P. Vende, J. Cohen, D. Poncet, Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17 (1998) 5811-5821.
- [105]D.G. Macejak, P. Sarnow, Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353 (1991) 90-94.
- [106]S. Bonnal, C. Schaeffer, L. Creancier, S. Clamens, H. Moine, A.C. Prats, S. Vagner, A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J Biol Chem* 278 (2003) 39330-39336.
- [107]K.J. Lang, A. Kappel, G.J. Goodall, Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 1792-1801.
- [108]M. Stoneley, S.A. Chappell, C.L. Jopling, M. Dickens, M. MacFarlane, A.E. Willis, c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 1162-1169.
- [109]E. Martinez-Salas, S. Lopez de Quinto, R. Ramos, O. Fernandez-Miragall, IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* 84 (2002) 755-763.

- [110]S. Cornelis, Y. Bruynooghe, G. Denecker, S. Van Huffel, S. Tinton, R. Beyaert, Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5 (2000) 597-605.
- [111]A.A. Komar, T. Lesnik, C. Cullin, W.C. Merrick, H. Trachsel, M. Altmann, Internal initiation drives the synthesis of Ure2 protein lacking the prion domain and affects [URE3] propagation in yeast cells. *EMBO J* 22 (2003) 1199-1209.
- [112]S.A. Chappell, G.M. Edelman, V.P. Mauro, A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 1536-1541.
- [113]S.Y. Le, J.V. Maizel, Jr., A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 362-369.
- [114]C.L. Jopling, K.A. Spriggs, S.A. Mitchell, M. Stoneley, A.E. Willis, L-Myc protein synthesis is initiated by internal ribosome entry. *RNA* 10 (2004) 287-298.
- [115]J. Fernandez, I. Yaman, W.C. Merrick, A. Koromilas, R.C. Wek, R. Sood, J. Hensold, M. Hatzoglou, Regulation of internal ribosome entry site-mediated translation by eukaryotic initiation factor-2alpha phosphorylation and translation of a small upstream open reading frame. *J Biol Chem* 277 (2002) 2050-2058.
- [116]S.K. Jang, E. Wimmer, Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev* 4 (1990) 1560-1572.
- [117]N. Luz, E. Beck, Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 65 (1991) 6486-6494.
- [118]A. Borman, M.T. Howell, J.G. Patton, R.J. Jackson, The involvement of a spliceosome component in internal initiation of human rhinovirus RNA translation. *J Gen Virol* 74 (Pt 9) (1993) 1775-1788.
- [119]A.J. Dorner, B.L. Semler, R.J. Jackson, R. Hanecak, E. Duprey, E. Wimmer, In vitro translation of poliovirus RNA: utilization of internal initiation sites in reticulocyte lysate. *J Virol* 50 (1984) 507-514.
- [120]E. Ehrenfeld, S. Manis, Inhibition of 80S initiation complex formation by infection with poliovirus. *J Gen Virol* 43 (1979) 441-445.
- [121]S.A. Mitchell, K.A. Spriggs, M.J. Coldwell, R.J. Jackson, A.E. Willis, The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol Cell* 11 (2003) 757-771.
- [122]B.M. Pickering, S.A. Mitchell, K.A. Spriggs, M. Stoneley, A.E. Willis, Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 5595-5605.
- [123]J.R. Evans, S.A. Mitchell, K.A. Spriggs, J. Ostrowski, K. Bomszyk, D. Ostarek, A.E. Willis, Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene* 22 (2003) 8012-8020.
- [124]Y.K. Kim, B. Hahm, S.K. Jang, Polypyrimidine tract-binding protein inhibits translation of bip mRNA. *J Mol Biol* 304 (2000) 119-133.
- [125]M. Takagi, M.J. Absalon, K.G. McLure, M.B. Kastan, Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123 (2005) 49-63.
- [126]C. Thoma, G. Bergamini, B. Galy, P. Hundsdoerfer, M.W. Hentze, Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. *Mol Cell* 15 (2004) 925-935.
- [127]X. Qin, P. Sarnow, Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 279 (2004) 13721-13728.
- [128]S. Pyronnet, L. Pradayrol, N. Sonenberg, A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5 (2000) 607-616.
- [129]A.C. Childs, D.J. Mehta, E.W. Gerner, Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci* 60 (2003) 1394-1406.

- [130] S.A. Tinton, B. Schepens, Y. Bruynooghe, R. Beyaert, S. Cornelis, Regulation of the cell-cycle-dependent internal ribosome entry site of the PITSLRE protein kinase: roles of Unr (upstream of N-ras) protein and phosphorylated translation initiation factor eIF-2 α . *Biochem J* 385 (2005) 155-163.
- [131] L. Blaszczyk, M. Dutkiewicz, J. Ciesiolka, [Translation of eukaryotic mRNA in a cap-independent mode]. *Postepy Biochem* 53 (2007) 400-412.
- [132] C. Petretti, M. Savoian, E. Montembault, D.M. Glover, C. Prigent, R. Giet, The PITSLRE/CDK11p58 protein kinase promotes centrosome maturation and bipolar spindle formation. *EMBO Rep* 7 (2006) 418-424.
- [133] J.H. Trembley, D. Hu, L.C. Hsu, C.Y. Yeung, C. Slaughter, J.M. Lahti, V.J. Kidd, PITSLRE p110 protein kinases associate with transcription complexes and affect their activity. *J Biol Chem* 277 (2002) 2589-2596.
- [134] M.J. Coldwell, S.A. Mitchell, M. Stoneley, M. MacFarlane, A.E. Willis, Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene* 19 (2000) 899-905.
- [135] M. Holcik, C. Lefebvre, C. Yeh, T. Chow, R.G. Korneluk, A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* 1 (1999) 190-192.
- [136] J.H. Kim, K.Y. Paek, K. Choi, T.D. Kim, B. Hahm, K.T. Kim, S.K. Jang, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 708-720.
- [137] P. Lamb, L. Crawford, Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 1379-1385.
- [138] S.P. Tuck, L. Crawford, Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol* 9 (1989) 2163-2172.
- [139] D. Reisman, M. Greenberg, V. Rotter, Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 5146-5150.
- [140] J.C. Bourdon, K. Fernandes, F. Murray-Zmijewski, G. Liu, A. Diot, D.P. Xirodimas, M.K. Saville, D.P. Lane, p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19 (2005) 2122-2137.
- [141] B. Bienz-Tadmor, R. Zakut-Houri, S. Libresco, D. Givol, M. Oren, The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J* 4 (1985) 3209-3213.
- [142] Y. Yin, C.W. Stephen, M.G. Luciani, R. Fahraeus, p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* 4 (2002) 462-467.
- [143] M.M. Candeias, D.J. Powell, E. Roubalova, S. Apcher, K. Bourougaa, B. Vojtesek, H. Bruzzoni-Giovanelli, R. Fahraeus, Expression of p53 and p53/47 are controlled by alternative mechanisms of messenger RNA translation initiation. *Oncogene* 25 (2006) 6936-6947.
- [144] J.C. Bourdon, K. Fernandes, F. Murray-Zmijewski, G. Liu, A. Diot, D.P. Xirodimas, M.K. Saville, D.P. Lane, p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Development* 19 (2005) 2122-2137.
- [145] H.A. Meijer, A.A. Thomas, Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J* 367 (2002) 1-11.
- [146] A.V. Kochetov, A. Sarai, I.B. Rogozin, V.K. Shumny, N.A. Kolchanov, The role of alternative translation start sites in the generation of human protein diversity. *Mol Genet Genomics* 273 (2005) 491-496.
- [147] I.B. Rogozin, A.V. Kochetov, F.A. Kondrashov, E.V. Koonin, L. Milanesi, Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a 'weak' context of the start codon. *Bioinformatics* 17 (2001) 890-900.
- [148] E. Grudzien-Nogalska, J. Stepinski, J. Jemielity, J. Zuberek, R. Stolarski, R.E. Rhoads, E. Darzynkiewicz, Synthesis of anti-reverse cap analogs (ARCA) and their applications in mRNA translation and stability. *Methods Enzymol* 431 (2007) 203-227.

- [149]D.R. Gallie, The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5 (1991) 2108-2116.
- [150]G. Bergamini, T. Preiss, M.W. Hentze, Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA* 6 (2000) 1781-1790.
- [151]L. Blaszczyk, J. Ciesiolka, Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry* 50 (2011) 7080-7092.
- [152]K.A. Wilkinson, E.J. Merino, K.M. Weeks, Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nat Protoc* 1 (2006) 1610-1616.
- [153]L.A. Kirsebom, J. Ciesiolka, Pb²⁺-induced cleavage of RNA. *Handbook of RNA Biochemistry*, 2nd Edition. Edited by R.K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön, and E. Westhof. WILEY-VCH Verlag, ISBN: 978-3-527-32764-5 (2012). (2012).
- [154]J.T. Low, K.M. Weeks, SHAPE-directed RNA secondary structure prediction. *Methods* 52 (2010) 150-158.
- [155]S.M. Vasa, N. Guex, K.A. Wilkinson, K.M. Weeks, M.C. Giddings, ShapeFinder: a software system for high-throughput quantitative analysis of nucleic acid reactivity information resolved by capillary electrophoresis. *RNA* 14 (2008) 1979-1990.
- [156]J.S. Reuter, D.H. Mathews, RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* 11 (2010) 129.
- [157]s.e. wells, J.M.X. Hughes, A. Haller Igel, M. Ares, Jr., Use of dimethylsulfate to probe RNA structure in vivo. *Methods in Enzymology Vol 318* (2000) 479-493.
- [158]D.S. Peabody, Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J Biol Chem* 264 (1989) 5031-5035.
- [159]A.V. Kochetov, Alternative translation start sites and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs. *Bioessays* 30 (2008) 683-691.
- [160]A.C. Joerger, A.R. Fersht, Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77 (2008) 557-582.
- [161]L. Romer, C. Klein, A. Dehner, H. Kessler, J. Buchner, p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl* 45 (2006) 6440-6460.
- [162]C. Venot, M. Maratrat, V. Sierra, E. Conseiller, L. Debussche, Definition of a p53 transactivation function-deficient mutant and characterization of two independent p53 transactivation subdomains. *Oncogene* 18 (1999) 2405-2410.
- [163]J. Zhu, W. Zhou, J. Jiang, X. Chen, Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* 273 (1998) 13030-13036.
- [164]R. Soto Rifo, E.P. Ricci, D. Decimo, O. Moncorge, T. Ohlmann, Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucleic Acids Res* 35 (2007) e121.
- [165]J. Stepinski, C. Waddell, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, R.E. Rhoads, Synthesis and properties of mRNAs containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA* 7 (2001) 1486-1495.
- [166]M.E. Beaudoin, V.J. Poirel, L.A. Krushel, Regulating amyloid precursor protein synthesis through an internal ribosomal entry site. *Nucleic Acids Res* 36 (2008) 6835-6847.
- [167]T. Dobson, E. Kube, S. Timmerman, L.A. Krushel, Identifying intrinsic and extrinsic determinants that regulate internal initiation of translation mediated by the FMR1 5' leader. *BMC Mol Biol* 9 (2008) 89.
- [168]F. Martin, S. Barends, S. Jaeger, L. Schaeffer, L. Prongidi-Fix, G. Eriani, Cap-assisted internal initiation of translation of histone H4. *Mol Cell* 41 (2011) 197-209.
- [169]D.E. Andreev, S.E. Dmitriev, I.M. Terenin, V.S. Prassolov, W.C. Merrick, I.N. Shatsky, Differential contribution of the m7G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs. *Nucleic Acids Res* 37 (2009) 6135-6147.

- [170] S.E. Dmitriev, A.V. Pisarev, M.P. Rubtsova, Y.E. Dunaevsky, I.N. Shatsky, Conversion of 48S translation preinitiation complexes into 80S initiation complexes as revealed by toeprinting. *FEBS Lett* 533 (2003) 99-104.
- [171] D. Matsuda, T.W. Dreher, Cap- and initiator tRNA-dependent initiation of TYMV polyprotein synthesis by ribosomes: evaluation of the Trojan horse model for TYMV RNA translation. *RNA* 13 (2007) 129-137.
- [172] C.L. Shenvi, K.C. Dong, E.M. Friedman, J.A. Hanson, J.H. Cate, Accessibility of 18S rRNA in human 40S subunits and 80S ribosomes at physiological magnesium ion concentrations--implications for the study of ribosome dynamics. *RNA* 11 (2005) 1898-1908.
- [173] S. Paulous, C.E. Malnou, Y.M. Michel, K.M. Kean, A.M. Borman, Comparison of the capacity of different viral internal ribosome entry segments to direct translation initiation in poly(A)-dependent reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 722-733.
- [174] Y.V. Svitkin, H. Imataka, K. Khaleghpour, A. Kahvejian, H.D. Liebig, N. Sonenberg, Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA* 7 (2001) 1743-1752.
- [175] N. Iizuka, L. Najita, A. Franzusoff, P. Sarnow, Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14 (1994) 7322-7330.
- [176] G. Matlashewski, P. Lamb, D. Pim, J. Peacock, L. Crawford, S. Benchimol, Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J* 3 (1984) 3257-3262.
- [177] G. Matlashewski, D. Pim, L. Banks, L. Crawford, Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res* 1 (1987) 77-85.
- [178] M. Kozak, A short leader sequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes. *Gene Expr* 1 (1991) 111-115.
- [179] M. Mihailovich, R. Thermann, F. Grohovaz, M.W. Hentze, D. Zacchetti, Complex translational regulation of BACE1 involves upstream AUGs and stimulatory elements within the 5' untranslated region. *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 2975-2985.
- [180] T.A. Poyry, A. Kaminski, R.J. Jackson, What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev* 18 (2004) 62-75.
- [181] S. Peri, A. Pandey, A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates. *Trends Genet* 17 (2001) 685-687.
- [182] A.E. Willis, Translational control of growth factor and proto-oncogene expression. *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999) 73-86.
- [183] B.M. Pickering, A.E. Willis, The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 16 (2005) 39-47.
- [184] M.J. Clemens, U.A. Bommer, Translational control: the cancer connection. *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999) 1-23.
- [185] A. Gorska, L. Blaszczyk, M. Dutkiewicz, J. Ciesiolka, Length variants of the 5' untranslated region of p53 mRNA and their impact on the efficiency of translation initiation of p53 and its N-truncated isoform DeltaNp53. *RNA Biol* 10 (2013) 1726-1740.
- [186] J.R. Babendure, J.L. Babendure, J.H. Ding, R.Y. Tsien, Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA* 12 (2006) 851-861.
- [187] V.P. Pisareva, A.V. Pisarev, A.A. Komar, C.U. Hellen, T.V. Pestova, Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* 135 (2008) 1237-1250.
- [188] A.W. van der Velden, K. van Nierop, H.O. Voorma, A.A. Thomas, Ribosomal scanning on the highly structured insulin-like growth factor II-leader 1. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (2002) 286-297.
- [189] J. Wrzesinski, M. Legiewicz, J. Ciesiolka, Mapping of accessible sites for oligonucleotide hybridization on hepatitis delta virus ribozymes. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 1785-1793.

- [190]R. Wernersson, Virtual Ribosome--a comprehensive DNA translation tool with support for integration of sequence feature annotation. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue):W385-8. (2006).
- [191]C. Cazenave, P. Frank, W. Busen, Characterization of ribonuclease H activities present in two cell-free protein synthesizing systems, the wheat germ extract and the rabbit reticulocyte lysate. *Biochimie* 75 (1993) 113-122.
- [192]A. Grunweller, E. Wyszko, B. Bieber, R. Jahnel, V.A. Erdmann, J. Kurreck, Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 3185-3193.
- [193]C. Lu, W.S. El-Deiry, Targeting p53 for enhanced radio- and chemo-sensitivity. *Apoptosis* 14 (2009) 597-606.
- [194]R. Mirzayans, B. Andrais, A. Scott, D. Murray, New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2012 (2012) 170325.
- [195]Q. Zhan, Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res* 569 (2005) 133-143.
- [196]L.C. Dai, X. Wang, X. Yao, L.S. Min, F.C. Qian, J.F. He, Antisense oligonucleotide targeting p53 increased apoptosis of MCF-7 cells induced by ionizing radiation. *Acta Pharmacol Sin* 27 (2006) 1453-1458.
- [197]A. Sak, R. Wurm, B. Elo, S. Grehl, C. Pottgen, G. Stuben, B. Sinn, G. Wolf, V. Budach, M. Stuschke, Increased radiation-induced apoptosis and altered cell cycle progression of human lung cancer cell lines by antisense oligodeoxynucleotides targeting p53 and p21(WAF1/CIP1). *Cancer Gene Ther* 10 (2003) 926-934.
- [198]A. Aartsma-Rus, G.J. van Ommen, Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *RNA* 13 (2007) 1609-1624.
- [199]L.M. Alvarez-Salas, Nucleic acids as therapeutic agents. *Curr Top Med Chem* 8 (2008) 1379-1404.
- [200]A. Mescalchin, T. Restle, Oligomeric nucleic acids as antivirals. *Molecules* 16 (2011) 1271-1296.
- [201]S.P. Ho, Y. Bao, T. Leshner, R. Malhotra, L.Y. Ma, S.J. Fluharty, R.R. Sakai, Mapping of RNA accessible sites for antisense experiments with oligonucleotide libraries. *Nature Biotechnology* 16 (1998) 59-63.
- [202]A. Swiatkowska, M. Dutkiewicz, J. Ciesiolka, Structural features of target RNA molecules greatly modulate the cleavage efficiency of trans-acting delta ribozymes. *Biochemistry* 46 (2007) 5523-5533.
- [203]M.T. Haeuptle, R. Frank, B. Dobberstein, Translation arrest by oligodeoxynucleotides complementary to mRNA coding sequences yields polypeptides of predetermined length. *Nucleic Acids Res* 14 (1986) 1427-1448.
- [204]R. Grover, P.S. Ray, S. Das, Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms. *Cell Cycle* 7 (2008) 2189-2198.
- [205]N. Dias, C.A. Stein, Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1 (2002) 347-355.
- [206]L. Good, Translation repression by antisense sequences. *Cell Mol Life Sci* 60 (2003) 854-861.
- [207]J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen, V.A. Erdmann, Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 1911-1918.
- [208]D.A. Braasch, D.R. Corey, Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 8 (2001) 1-7.
- [209]A. Arzumanov, A.P. Walsh, V.K. Rajwanshi, R. Kumar, J. Wengel, M.J. Gait, Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides. *Biochemistry* 40 (2001) 14645-14654.
- [210]B.P. Monia, E.A. Lesnik, C. Gonzalez, W.F. Lima, D. McGee, C.J. Guinasso, A.M. Kawasaki, P.D. Cook, S.M. Freier, Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem* 268 (1993) 14514-14522.

-
- [211]B.F. Baker, S.S. Lot, T.P. Condon, S. Cheng-Flournoy, E.A. Lesnik, H.M. Sasmor, C.F. Bennett, 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 11994-12000.
- [212]M.M. Candeias, L. Malbert-Colas, D.J. Powell, C. Daskalogianni, M.M. Maslon, N. Naski, K. Bourougaa, F. Calvo, R. Fahraeus, P53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat Cell Biol* 10 (2008) 1098-1105.
- [213]C. Wahlestedt, P. Salmi, L. Good, J. Kela, T. Johnsson, T. Hokfelt, C. Broberger, F. Porreca, J. Lai, K. Ren, M. Ossipov, A. Koshkin, N. Jakobsen, J. Skouv, H. Oerum, M.H. Jacobsen, J. Wengel, Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 5633-5638.
- [214]P.S.B. Gould, H. Easton, A., Translation toeprinting assays using fluorescently labeled primers and capillary electrophoresis. *Biotechniques* 38 (2005) 397-400.