



INSTYTUT
GENETYKI CZŁOWIEKA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Damian Janecki

Potranskrypcyjna regulacja
SPINDLIN,
potencjalnych modulatorów
cyklu komórkowego i apoptozy,
w modelu nasieniaka człowieka

M O N O G R A F I A

Poznań, 2018

Copyright © Damian Janecki
Copyright © Instytut Genetyki Człowieka PAN
Poznań 2018

Recenzenci naukowi – Prof. dr hab. Jadwiga Jaruzelska
dr Barbara Ginter-Matuszewska
Projekt okładki – Mirka Korbańska
Zdjęcia i ilustracje pochodzą ze zbiorów autora

978-83-950393-2-4

Wydawca
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
www.igcz.poznan.pl

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	7
1. STRESZCZENIE	9
2. WSTĘP	11
2.1. Białka PUM należą do rodziny białek PUF	11
2.2. Podstawy mechanizmu działania białek PUF	11
2.3. Struktura klasycznej domeny PUF białek PUM	12
2.4. Białka PUM człowieka	13
2.5. Rodzina białek Nanos – domena palców cynkowych, mechanizm powstawania potrójnego kompleksu	16
2.6. Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów przez białka Pum i Nanos	17
2.6.1. Rola w regulacji apoptozy	17
2.6.2. Rola w regulacji proliferacji i utrzymania niezróżnicowanego stanu linii komórek gametogenicznych	18
2.6.3. Rola w regulacji cyklu komórkowego	20
2.7. Kompleks PUM2–NANOS1 funkcjonuje również w męskich komórkach gametogenicznych człowieka	24
2.8. Globalna identyfikacja mRNA regulowanych potranskrypcyjnie przez białka PUM człowieka	25
2.9. Białko SPIN1 i jego rola w apoptozie, proliferacji i cyklu komórkowym	28
2.10. Nowotwory jądra typu zarodkowego	31
2.11. Komórki TCam-2 – unikatowy model badań ludzkich komórek gametogenicznych w hodowli wyprowadzonych z nasieniaka	33
3. CEL PRACY	35
4. MATERIAŁY	36
4.1. Aparatura	36
4.2. Oprogramowanie	36
4.3. Odczynniki	37
4.4. Przeciwciała	39
4.5. siRNA	39

4.6.	Plazmidy	40
4.7.	Genomowe DNA	42
5.	METODY	43
5.1.	Warunki hodowli komórek TCam-2.....	43
5.2.	Transfekcja komórek TCam-2	43
5.3.	Pomiary intensywności proliferacji komórek TCam-2 przy nadekspresji białek SPIN, PUM i NANOS.....	45
5.4.	Wykrywanie i ocena ilościowa białek metodą Western blot (immunoblotowania) ..	45
5.5.	Badanie poziomu apoptozy komórek TCam-2 z nadekspresją białek SPIN, PUM, NANOS lub z wyciszoną ekspresją genów <i>SPIN</i>	46
5.6.	Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja i reakcja PCR w czasie rzeczywistym	47
5.7.	Analiza cyklu komórkowego z nadekspresją białek SPIN, PUM, NANOS lub z wyciszoną ekspresją genów <i>SPIN</i>	49
5.8.	Analiza morfologii jąder komórek TCam-2 z nadekspresją białek SPIN	50
5.9.	Immunoprecypitacja RNA w komórkach TCam-2 z zastosowaniem przeciwciał anti-PUM1 i anti-PUM2.....	50
5.10.	Przygotowanie plazmidów reporterowych: amplifikacja i klonowanie	51
5.11.	Testy lucyferazowe	55
5.12.	Mutageneza ukierunkowana motywów A i B w 3'UTR <i>SPIN3</i>	56
5.13.	Amplifikacja matryc do transkrypcji <i>in vitro</i>	57
5.14.	Transkrypcja <i>in vitro</i> fragmentu 3'UTR <i>SPIN3</i> typu dzikiego i zmutowany.....	58
5.15.	Ekspresja fuzyjnego białka w bakteriach i izolacja domeny PUF.....	59
5.16.	Test retardacji żelowej.....	61
5.17.	Test kompetycji.....	61
6.	WYNIKI	63
6.1.	SPIN4 zwalnia, podczas gdy SPIN1 przyspiesza proliferację komórek	63
6.2.	SPIN1 obniża, podczas gdy SPIN3 i SPIN4 wzmagają apoptozę komórek.....	65
6.3.	SPIN1 i SPIN3 przyspieszają cykl komórkowy	69
6.4.	Nadekspresja SPIN1, SPIN3 i SPIN4 nie wpływa na morfologię komórek	75

6.5.	Profil nadekspresji białek SPIN1, SPIN3 i SPIN4 jest różny w komórkach nowotworowych w porównaniu z nienowotworowymi	76
6.6.	W regionie 3'UTR mRNA wszystkich trzech <i>SPIN</i> znajdują się potencjalne miejsca wiązania (PBE) domeny PUF białek PUM.....	77
6.7.	mRNA <i>SPIN1</i> i <i>SPIN3</i> koimmunoprecypitują z białkami PUM1 i PUM2	79
6.8.	PUM1 i PUM2 powodują silną represję mRNA <i>SPIN1</i> , <i>SPIN3</i> i <i>SPIN4</i>	81
6.9.	Wyciszenie endogennej ekspresji genów <i>PUM</i> powoduje efekt niezgodny z oczekiwaniem, tzn. niewielką represję lucyferazowych reporterów kodujących regiony 3'UTR <i>SPIN</i>	82
6.10.	Domena PUF białek PUM1 i PUM2 oddziałuje specyficznie z fragmentem 3'UTR mRNA <i>SPIN3</i> zawierającym motywy podobne do PBE.....	85
6.11.	Obecność wybranych motywów w regionie 3'UTR jest istotna dla represji mRNA <i>SPIN3</i> przez białka PUM	88
6.12.	Gen <i>PUM2</i> jest pod represją białka PUM1	89
6.13.	Białka PUM1 i PUM2 oddziałują z mRNA <i>PUM1</i> i <i>PUM2</i>	89
6.14.	PUM1 powoduje zwolnienie proliferacji.....	90
6.15.	PUM1 w odróżnieniu od PUM2 znacząco wzmacnia apoptozę.....	92
6.16.	PUM1 i PUM2 powodują nieznaczne zwolnienie cyklu komórkowego	94
6.17.	Białka NANOS1, NANOS2 i NANOS3 regulują ekspresję <i>SPIN</i> w odmienny sposób, w zależności od paraloga	96
6.18.	Białka NANOS2 i NANOS3 powodują zwolnienie proliferacji, m.in. poprzez represję mRNA <i>SPIN1</i>	98
6.19.	Białko NANOS1 działa anty-apoptotycznie, m.in. poprzez represję mRNA <i>SPIN3</i> i <i>SPIN4</i>	99
6.20.	Substytucje nukleotydowe w obrębie motywów w 3'UTR <i>SPIN3</i> powodują częściowe zniesienie represji wywołanej przez białko NANOS1	101
6.21.	Białko NANOS1 razem z domeną PUF2 tworzy potrójny kompleks z fragmentem 3'UTR mRNA <i>SPIN3</i> w teście retardacji żelowej	102
6.22.	Mutacja p.P34T;S78del białka NANOS1 powoduje zniesienie represji <i>SPIN3</i> natomiast wzmacnia represję <i>SPIN1</i>	103

6.23. Mutacja p.P34T;S78del NANOS1 powoduje zwolnienie proliferacji komórek m.in. przez represję mRNA <i>SPIN1</i>	104
6.24. Mutacja NANOS1 p.P34T;S78del działa pro-apoptycznie, m.in. poprzez modulację represji mRNA <i>SPIN</i>	106
6.25. Zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del niweluje efekt zwolnienia cyklu komórkowego wywołanego przez dzikie białko NANOS1	108
7. DYSKUSJA	110
8. WNIOSKI	115
9. Manuskrypty przygotowane na podstawie uzyskanych wyników	117
10. LITERATURA	118

WYKAZ SKRÓTÓW

AEBSF	fluorek 4-(2-aminoetylo)benzenosulfonylu
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
AZF	ang. <i>AZoSpermia Factor</i> nazwa regionu, którego delecje powiązane są z bezpłodnością mężczyzn
BSA	ang. <i>Bovine Serum Albumin</i> , albumina surowicy cielęcej
CBD	ang. <i>Chitin Binding Domain</i> , domena wiązania z chityną
CCHC	domena palców cynkowych wiążących RNA
CCR4	ang. <i>C-C Chemokine Receptor type 4</i> , typ 4 receptora chemokiny C-C
cDNA	ang. <i>complementary DNA</i> , komplementarny DNA
CEP3	ang. <i>Cdc42 Effector Protein 3</i>
Ci	curie, jednostka radioaktywności
CPE	ang. <i>CPE – Cytoplasmic Polyadenylation Element</i> , motyw (najczęściej AAUAAA) w sekwencji 3'UTR mRNA odpowiedzialny za cytoplazmatyczną poliadenylację
CPEB	ang. <i>CPE Binding protein</i> , białko wiążące się z motywem CPE
cpm	ang. <i>counts per minute</i> , zliczenia na minutę, jednostka pomiaru radioaktywności
CTP	cytydyno-5'-trifosforan
cycB	cyklina B
Da	dalton
dATP	deoksyadenozyno-5'-trifosforan
DAZ	ang. <i>Deleted in AZoSpermia</i> , gen kodowany w chromosomie Y w regionie AZF, którego delecje powodują azoospermie (brak plemników w nasieniu)
DAZL	ang. <i>DAZ like</i> , austosomowy homolog genu <i>DAZ</i>
dCTP	deoksycytydyno-5'-trifosforan
DEPC	eter dietylowy kwasu pirowęglowego (dietylopirowęglan)
dGTP	deoksyguanozyno-5'-trifosforan
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
DTT	ditiotreitol
dTTP	deoksytymidyno-5'-trifosforan
E2F3	ang. <i>E2F transcription factor 3</i> , czynnik transkrypcyjny
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy
ERK2	ang. <i>Extracellular signal-Regulated Kinase 2</i> , kinaza MAPK1
ESC	ang. <i>Embryonic Stem Cell</i> , embrionalna komórka macierzysta
fbf	ang. <i>fem-3 mRNA-binding factor</i> , homolog białka pumilio u nicienia
fem-3	ang. <i>sex-determining gene</i> , gen determinacji płci nicienia
fog-2	ang. <i>germ-line-specific sex determination gene</i> , regulator promujący różnicowanie męskich komórek płciowych, niezbędny w spermatogenezie nicienia
GSCs	ang. <i>Germ line Stem Cells</i> , komórki macierzyste linii germlinalnej
gld-1, 3	ang. <i>germ line development protein</i> , białko pełniące rolę w spermatogenezie nicienia
GTP	guanozyno-5'-trifosforan
hb	ang. <i>hunchback</i> , morfogen głowy Muszki owocowej
hbl	ang. <i>hunchback like</i> , homolog genu <i>hunchback</i> u nicienia
HEK	ang. <i>Human Embryonic Kidney cells 293</i> , linia komórkowa wywodząca się z komórek embrionalnej nerki
HeLa	linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy, nazwa linii pochodzi od nazwiska pacjentki
HEPES	N-[2-hydroksyetylo]piperazyno-N'-etanosulfonian)
hid	ang. <i>head involution defective</i>
HRP	ang. <i>HorseRadish Peroxidase</i> , peroksydaza chrzanowa
ICM	ang. <i>Inner Cell Mass</i> , węzeł zarodkowy
IgG	klasa immunoglobulin wchodzących w skład γ -globulin (gamma)
IPTG	izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozyd
LB	ang. <i>Lysogeny Broth</i> , pożywka do mikrobiologicznej hodowli bakterii
MAPK	ang. <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> , kinaza białkowa aktywowana mitogenem
miRNA	ang. <i>microRNA</i> , mikroRNA
mkp	ang. <i>MAPK phosphatase</i> , fosfataza kinaz MAPK

MPF	ang. <i>Maturation-Promoting Factor</i> , czynnik stymulujący dojrzewanie oocytu
mpk-1	kinaza MAPK nicienia
mRNA	ang. <i>messenger RNA</i> , matrycowy (informacyjny) RNA
NED	ang. <i>Nanos Effector Domain</i> , domena oddziaływania białka nanos Muszki owocowej z podjednostką NOT4
NIM	ang. <i>NOT1 Interacting Motif</i> , domena oddziaływania białek Nanos z kompleksem deadenylicyjnym CCR4–NOT u myszy
OD	ang. <i>Optical Density</i> , gęstość optyczna
ORF	ang. <i>Open Reading Frame</i> , otwarta ramka odczytu
PAR-CLIP	ang. <i>PhotoActivatable Ribonucleoside-enhanced CrossLinking and ImmunoPrecipitation</i>
PBS	buforowany roztwór soli fizjologicznej
PCR	ang. <i>Polimerase Chain Reaction</i> , reakcja łańcuchowa polimerazy
PGCs	ang. <i>Primordial Germ Cells</i> , pierwotna komórka gametogeniczna
polyU	sól potasowa kwasu poliurydynowego (kwas poliurydynowy)
Pop	ang. <i>Poly(A) ribonuclease</i> , rybonukleaza specyficzna dla ogona poli(A)
PTGR	ang. <i>Post-Transcriptional Gene Regulation</i> , potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów
Puf	powtórzenie aminokwasowe w domenie PUF
PUF	ang. <i>PUmilio and Fbf RNA-binding domain</i> , domena wiązania z RNA białek pumilio
puf3p	jeden z homologów białka pumilio u drożdży
qPCR	ang. <i>quantitative PCR</i> , ilościowa PCR
RBD	ang. <i>RNA-Binding Domain</i> , domena wiązania RNA
rcf	ang. <i>relative centrifugal force</i> , wielokrotność ziemskiego przyspieszenia grawitacyjnego
RIP–Chip	ang. <i>RNA ImmunoPrecipitation Chip</i> , <i>chip – microarray</i> , mikromacierze na matrycy RNA, uzyskanego w wyniku immunoprecypitacji
RLU	ang. <i>Relative Luciferase Units</i> , stosunek luminescencji dwóch lucyferaz
RNA	kwas rybonukleinowy
RNazin	inhibitor RNaz (rybonukleaz)
RNP	ang. <i>RiboNucleoProtein</i> , rybonukleoproteina
rpm	ang. <i>revolutions per minute</i> , obroty na minutę – jednostka miary częstotliwości obrotu
rRNA	ang. <i>ribosomal RNA</i> , rybosomalny (rybosomowy) RNA
RT	ang. <i>Revers Transcription</i> , odwrotna transkrypcja
SCID	ang. <i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i> , ciężki złożony niedobór odporności,
sda1	ang. <i>severe depolymerization of actin</i> , czynnik depolimeryzujący aktyne
SDS	sól sodowa siarczanu dodecyłu (dodecylosiarczan sodu)
shRNA	ang. <i>short hairpin RNA or small hairpin RNA</i> , krótki interferujący RNA o strukturze typu spinki do włosów
siRNA	ang. <i>small interfering RNA</i> , krótki interferujący RNA
skl	ang. <i>sickle</i>
Taq	polimeraza DNA z <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	bufor zawierający: 90 mM TRIS; 90 mM kwas borowy i 2 mM EDTA
TEMED	N,N,N',N'–tetrametyloetylenodiamina, katalizator reakcji polimeryzacji
TGCT	ang. <i>Testis Germ Cell Tumor</i> , nowotwór jądra typu germinálního
T _m	ang. <i>melting temperature</i> , temperatura topnienia
tra-2	ang. <i>sexual transformer</i> , białko pełniące rolę w oogenezie u nicienia
TRIS	trihydroksymetyloaminometan
tRNA	ang. <i>transfer RNA</i> , transportujący (transferowy) RNA
UTP	urydino–5'–trifosforan
UTP ³² P	urydino–5'–trifosforan wyznakowany atomem fosforu ³² P w pozycji α
UTR	ang. <i>UnTranslated Region</i> , region nieulegający translacji
xcat-2	homolog białka nanos żaby
xpum	homolog białka pum żaby
YST	ang. <i>Yolk Sac Tumor</i> , rak pęcherzyka żółtkowego

1. STRESZCZENIE

Białko SPIN1 oddziałuje z wrzecionem kariokinetycznym w progresji mejozy. Posiada również funkcje onkogenne w raku jajnika, co potwierdzono w kilku liniach nowotworowych. W rozprawie analizowano funkcje SPIN1, SPIN3 oraz SPIN4 w modelu męskich komórek gametogenicznych, wyprowadzonych z nasieniaka i zahamowanych na wczesnym etapie rozwoju – TCam-2. Pokazano po raz pierwszy funkcje nieopisanych dotąd paralogów SPIN3 i SPIN4 oraz odmienne efekty w porównaniu ze SPIN1. Mianowicie nadekspresja SPIN1 powodowała znaczące przyspieszenie proliferacji, a nadekspresja SPIN3 i SPIN4 miały efekt odwrotny. Ponadto przeciwnie do SPIN1 powodującej obniżenie apoptozy, SPIN3 i SPIN4 powodowały jej wzrost. Wydaje się, że SPIN1 ma właściwości onkogenne, podczas gdy SPIN3 i SPIN4 supresorowe w komórkach TCam-2. Jednak zarówno SPIN1 i SPIN3 powodowały przyspieszenie cyklu komórkowego, natomiast SPIN4 była pod tym względem neutralna. Zastosowanie reporterów lucyferazowych zawierających regiony 3' nieulegające translacji (3'UTR) poszczególnych *SPIN* pokazało po raz pierwszy że wszystkie trzy *SPIN* są pod silną represją białek PUM1 i PUM2. Analiza potencjalnych regulatorów *SPIN* oraz efektorów białek PUM w kontekście potranskrypcyjnej regulacji *SPIN* mogłaby rzucić światło na odmienne role paralogów *SPIN* w komórkach gametogenicznych oraz nasieniaka. Z uwagi na kooperację Pum z białkiem Nanos w utrzymaniu (ang. *maintenance*) komórek gametogenicznych i ochronie tych komórek przed apoptozą przez białko Nanos u Muszki owocowej, badano ludzkie paralogi NANOS1, NANOS2 oraz NANOS3, czy wpływają na potranskrypcyjną regulację *SPIN*. Pokazano, że tak jest oraz że ów wpływ zależał od kombinacji NANOS/3'UTR-*SPIN*. Co więcej, NANOS2 i NANOS3 powodowały zwolnienie proliferacji, podczas gdy białko NANOS1 nie miało tego efektu. Jednak jedynie białko NANOS1 miało wpływ anty-apoptotyczny na komórki TCam-2. Pokazano, że mutacja *NANOS1* p.P34T;S78del wykryta u niepłodnych mężczyzn pozbawionych komórek gametogenicznych w kanalikach plemnikotwórczych, powodowała przełączenie funkcji białka NANOS1 z anty-apoptotycznej na pro-apoptotyczną. Odbywało się ono poprzez derepresję mRNA pro-apoptotycznej SPIN3 a jednocześnie wzmożenie represji anty-apoptotycznej SPIN1. Tego typu mechanizm mógłby skutkować wyczerpaniem komórek gametogenicznych u mężczyzn posiadających mutacje genu *NANOS1*. Powyższe badania podkreślają funkcjonalną zachowawczość białka Nanos od Muszki owocowej do człowieka, jako represora mRNA powiązanych z apoptozą w komórkach gametogenicznych.

SUMMARY

SPIN1 binds meiotic spindle and is necessary for meiotic progression in animal models. It is also a positive regulator of human ovarian cancer and a few cancer cell lines. Here, we examined functional significance and expression regulation of SPIN1, SPIN3 and SPIN4 in a human testis germ cell tumor (seminoma) TCam-2 cell line, representing male germ cells blocked at early developmental stage. We show, for the first time, that SPIN3 and SPIN4 paralogues, have differential effects, as compared to SPIN1. Namely, while overexpression of SPIN1 caused a significant increase of proliferation, overexpression of SPIN3 and SPIN4 elicited its decrease. Also, opposite to SPIN1 decreasing apoptosis, overexpression of SPIN3 and SPIN4 induced it. Thus, it seems that SPIN1 is oncogenic whereas SPIN3 and SPIN4 are anti-oncogenic in TCam-2 cells. However, both SPIN1 and SPIN3 stimulated the cell cycle, while SPIN4 did not. In addition, using luciferase reporters carrying *SPIN* 3'untranslated regions (3'UTR) and measuring endogenous *SPIN* expression, we show for the first time that *SPINs* are strongly targeted by PUM1 and PUM2 for repression. Addressing other SPIN regulators and PUM effectors may shed light on differential function of paralogues and mechanism of PUM role in germ cells and seminoma. Given previously reported cooperation of Pum with Nanos protein, in the context of germ cell development, as well as reports about the role of Nanos in apoptosis downregulation in *Drosophila* germ cells, NANOS1, NANOS2 and NANOS3 human homologues were studied to test whether they posttranscriptionally regulated *SPINs*. Indeed, it was shown here that *SPINs* are regulated by NANOS paralogues and that the regulation pattern is particular for each NANOS/3'UTR-*SPIN* combination. Interestingly, exclusively NANOS1 had an anti-apoptotic influence on TCam-2 cells while NANOS2 and NANOS3 were neutral. Moreover, it was found here that *NANOS1* p.P34TS78del mutation, previously identified in association with lack of germ cells in testes, caused NANOS1 to functionally switch from being anti-apoptotic towards pro-apoptotic. The mutated NANOS1 triggered this switch by disrupting repression of pro-apoptotic SPIN3 mRNA while enhancing repression of anti-apoptotic SPIN1, leading altogether to apoptosis increase and proliferation decrease of TCam-2. Such mechanism may underlie lack of germ cells in patients carrying NANOS1 mutations. This work underscores conservation of Nanos from flies to humans, as a repressor of apoptosis-related mRNAs in germ cells.

2. WSTĘP

Apoptoza, proliferacja i cykl komórkowy to procesy, które istotnie wpływają na liczbę męskich komórek gametogenicznych (ang. *germline cells*) na różnych etapach rozwoju. Są zatem ważne dla przebiegu gametogenezy i w rezultacie dla płodności człowieka. Jak już wielokrotnie pokazano, ich zaburzenie może prowadzić z jednej strony do niepłodności, lecz z drugiej do pojawienia się nowotworów gonad męskich [Beumer i wsp. 1998; Yin i wsp. 2002]. Zaobserwowano mianowicie, że niepłodność męska oraz pewna grupa nowotworów jądra, zwanych nowotworami jądra typu germinalnego (ang. *Testis Germ Cell Tumors – TGCT*), nierzadko współwystępują. Co więcej, niepłodność stanowi czynnik ryzyka do wystąpienia TGCT [van de Geijn i wsp. 2009]. Z tego powodu badanie procesów apoptozy, proliferacji oraz cyklu komórkowego, a precyzyjniej ich regulacji w obu tych kontekstach (komórek gametogenicznych oraz TGCT) wydaje się bardzo ważnym kierunkiem badań. Wprawdzie geny zaangażowane w powyższe trzy procesy są regulowane na różnych poziomach, jednak większość badań dotyczy poziomu transkrypcji. Znacznie mniej uwagi poświęcono dotąd ich regulacji potranskrypcyjnej. Dopiero od stosunkowo niedawna analizowane jest znaczenie mikroRNA (miRNA) w kontekście nowotworów, jednak znacznie szerszym niż TGCT. Niewiele uwagi poświęcono roli białek, które regulują losy indywidualnych mRNA (translacja, przechowywanie lub deadenylacja i degradacja) przez specyficzne wiązanie się z regionem 3' nieulegającym translacji (ang. *3' UnTranslated Region – 3'UTR*). W świetle tego, zainteresowanie budzi potranskrypcyjna regulacja przez białka PUM (zwane także PUMILIO) ekspresji mRNA kodujących białka zaangażowane w procesy apoptozy [Lee i wsp. 2007, Miles i wsp. 2014], proliferacji [Miles i wsp. 2012; Joly i wsp. 2013; Asaoka-Taguchi i wsp. 1999] i cyklu komórkowego [Kedde i wsp. 2010].

2.1. Białka PUM należą do rodziny białek PUF

Eukariotyczna rodzina białek PUF, do której należą białka PUM, została zachowana w ewolucji od drożdży (łac. *Saccharomyces cerevisiae*) do człowieka. Występuje nawet u roślin, np. u Rzodkiewnika pospolitego (łac. *Arabidopsis thaliana*). Białka PUF są potranskrypcyjnymi regulatorami zależnymi od 3'UTR [Quenault i wsp. 2011].

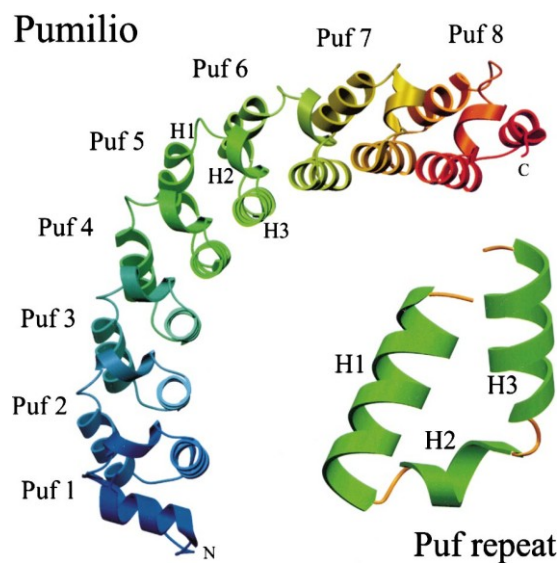
2.2. Podstawy mechanizmu działania białek PUF

Białka PUF posiadają zachowaną w ewolucji domenę wiązania RNA (ang. *RNA Binding Domain – RBD*) zwaną PUF, za pomocą której oddziałują specyficznie z mRNA

w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów (ang. *Post-Transcriptional Gene Regulation* – PTGR) [Murata i Wharton 1995, Wharton i wsp. 1998]. Jej nazwa pochodzi od pierwszych liter najwcześniej zidentyfikowanych dwóch białek tej rodziny, białka pum Muszki owocowej (łac. *Drosophila melanogaster*) oraz fbf nicienia (łac. *Caenorhabditis elegans*) (ang. *PUmilio* & *Fbf* – PUF) [Zamore i wsp. 1997, Zhang i wsp. 1997]. Przy pomocy domeny PUF białka te rozpoznają oraz wiążą się specyficznym z ośmionukleotydowymi motywami sekwencyjnymi UGUANAUA (N oznacza dowolny nukleotyd), obecnymi w 3'UTR regulowanych mRNA.

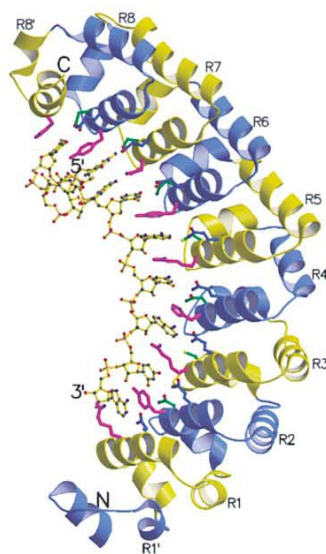
2.3. Struktura klasycznej domeny PUF białek PUM

Klasyczna, najpowszechniej występująca domena PUF zbudowana jest z ośmiu nie w pełni identycznych powtórzeń, (Puf-1 – Puf-8, lub R1 – R8) oraz dwóch „pseudopowtórzeń” (ang. *pseudorepeats*) na końcach N i C domeny (odpowiednio R1' i R8'), o długości 35 – 39 aminokwasów. Struktura krystaliczna domen PUF kilku białek Pum została rozwiązana (**Rycina 1 i 2**) [Edwards i wsp. 2001, Wang i wsp. 2001, 2002]. Analiza kryształu pokazała, że każde powtórzenie przybiera strukturę przestrzenną trzech α -helis (H1, H2 i H3, **Rycina 1**), a wszystkie powtórzenia tworzą w sumie prawoskrętną superhelisę kształtem przypominającą rogalik lub łuk tęczy (ang. *rainbow-like arc*) [Edwards i wsp. 2001]. Długość strony wewnętrznej domeny PUF białka PUM1 człowieka wynosi ~ 40 Å, zewnętrznej ~ 85 Å, a szerokość ~ 30 Å.



Rycina 1. Struktura krystaliczna domeny PUF białka pum Muszki owocowej. Kolejne powtórzenia motywu Puf oznaczono różnymi kolorami. Schemat struktury jednego powtórzenia, zbudowanego z trzech α -helis H1, H2 i H3 umieszczono u dołu po prawej stronie [Edwards i wsp. 2001].

Według badań krystalograficznych wewnętrzna powierzchnia domeny PUF oddziałuje z RNA, a każde z ośmiu powtórzeń, łączy się z kolejnym nukleotydem rozpoznawanego motywu sekwencyjnego UGUANAUA, zwanego PBE (ang. *Pumilio Binding Element*), w której N oznacza dowolny nukleotyd [Galgano i wsp., 2008] (**Rycina 2**). Co więcej, łańcuch cukrowo-fosforanowy RNA zwrócony jest na zewnątrz. Wiązanie to jest antyrównoległe, tzn. koniec aminowy (tzw. koniec N) domeny oddziałuje z końcem 3' RNA. Natomiast zewnętrzna powierzchnia zaangażowana jest w oddziaływanie z kofaktorami białkowymi, czego konsekwencją jest zwykle represja, rzadziej aktywacja



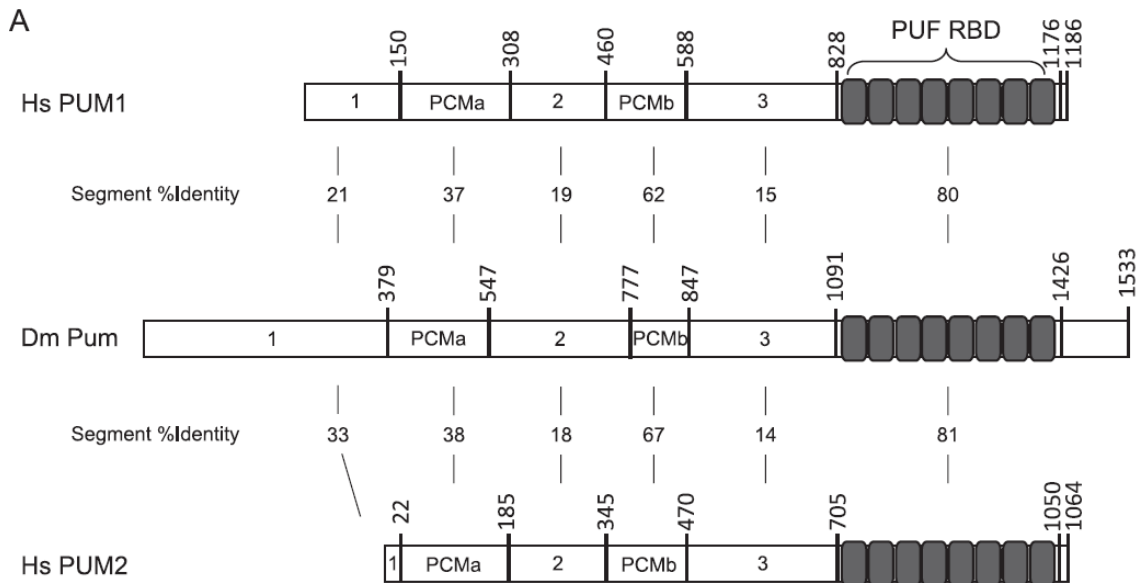
docelowych mRNA [Wang i wsp. 2002].

Rycina 2. Struktura krystaliczna kompleksu domeny PUF ludzkiego białka PUM1 z ośmionukleotydom motywu sekwencyjnym UGUUAUAUA. Naprzemiennie ułożone kolory niebieski i żółty przedstawiają kolejne powtórzenia (R1 – R8) i pseudopowtórzenia (R1' i R8') [Wang i wsp. 2002].

Poza domeną PUF za represję odpowiedzialny jest również fragment znajdujący się bliżej końca N białek Pum. W jego obrębie zidentyfikowano dwa motywy białkowe zwane PCMa i PCMb (ang. *Pumilio Conserved Motif* – PCM). Również one zostały zachowane w ewolucji od Muszki owocowej do człowieka. Pomimo to za represję odpowiedzialne są przede wszystkim mniej zachowane regiony, jeden znajdujący się pomiędzy PCMa i PCMb (oznaczony nr 2) oraz drugi występujący pomiędzy PCMb i domeną PUF (oznaczony nr 3) (**Rycina 3**) [Weidmann i Goldstrohm 2012].

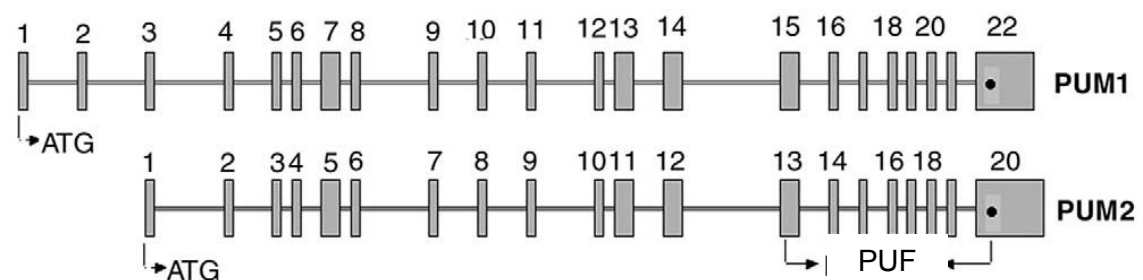
2.4. Białka PUM człowieka

Wprawdzie u człowieka występują cztery białka posiadające domenę PUF [Spasov i Jurecic 2002; Qiu i wsp., 2014], jednak wyłącznie PUM1 i PUM2 posiadają klasyczną domenę PUF.



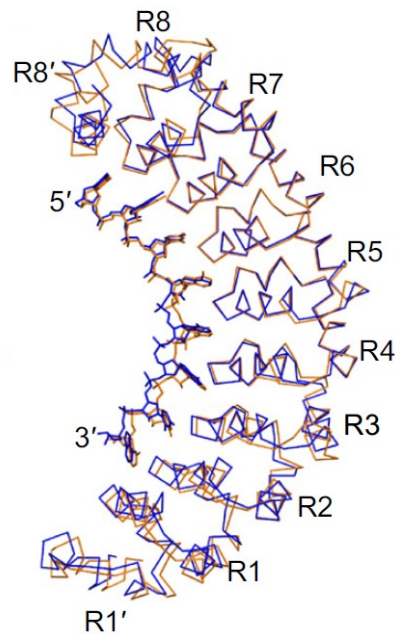
Rycina 3. Porównanie poszczególnych domen i motywów białkowych PUM1 (Hs PUM1) i PUM2 (Hs PUM2) człowieka oraz pum Muszki owocowej (Dm Pum) pod względem zachowania sekwencji aminokwasowej [Weidmann i Goldstrohm 2012].

Białka PUM1 i PUM2 człowieka pod względem sekwencji aminokwasowej są bardzo do siebie podobne. Identyeczność aminokwasowa pomiędzy białkiem PUM1 a PUM2 wynosi 75% (**Rycina 4**) [Moore i wsp. 2003], natomiast w obrębie samej domeny PUF wynosi aż 91% (**Rycina 4 i 5**) [Spasov i Jurecic 2002]. Rozwiązanie struktur krystalicznych domen PUF białek PUM1 i PUM2 człowieka, pokazało, że wysoka identyczność sekwencji aminokwasowej tych dwóch białek w obrębie tej domeny przekłada się na ich podobieństwo strukturalne. Znamienne, że domena PUF białka PUM1 i PUM2 człowieka wykazuje ponad 80% identyczności na poziomie sekwencji aminokwasowej z domeną PUF białka pum Muszki owocowej [Moore i wsp. 2003].



Rycina 4. Porównanie struktury genu *PUM1* i *PUM2* człowieka. Gen *PUM1* składa się z 22 eksonów, natomiast gen *PUM2* z 20 eksonów. Domena PUF kodowana jest przez eksony 15 – 22 w *PUM1* oraz eksony 13 – 20 w *PUM2* [według Spassov i Jurecic 2002].

Pokazano ponadto, że domena PUF białka PUM1 człowieka oddziałuje specyficznie z motywami sekwencyjnymi owadziego mRNA *hb* (ang. *hunchback*) z równie wysokim powinowactwem i specyficznością, jak domena PUF białka pum Muszki owocowej [Zamore i wsp. 1997, 1999]. Ta niezwykła obserwacja zachęciła do rozwiązania struktury kryształu domeny PUF białka PUM1 w kompleksie z motywem ośmionukleotydom w mRNA *hb* (**Rycina 2**) [Wang i wsp. 2001 i 2002].



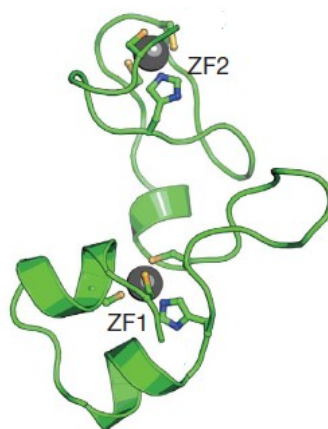
Rycina 5. Porównanie struktury krystalicznej domeny PUF ludzkich białek PUM1 i PUM2. Rysunek przedstawia nałożenie struktur przestrzennych domeny PUF dla białek PUM1 (kolorem niebieskim) i PUM2 (kolorem żółtym). Domeny te występują w powiązaniu z krótką sekwencją mRNA *p38α*. R1 – R8 oznaczają powtórzenia Puf [Lu i Hall 2011].

Ważnym pytaniem jest czy funkcje białek PUM1 i PUM2 są podobne. Różne sposoby rozpoznania poszczególnych mRNA przez białka PUM1 i PUM2 mogą powodować m.in. zmianę rozkładu ładunku na powierzchni białka, co może skutkować wiązaniem odmiennych dla obu białek kofaktorów białkowych [Lu i Hall 2011]. W rezultacie może mieć to odzwierciedlenie w regulacji odmiennych mRNA przez białka PUM1 i PUM2.

2.5. Rodzina białek Nanos – domena palców cynkowych, mechanizm powstawania potrójnego kompleksu

Białka Nanos są najlepiej poznanymi partnerami białek zawierających domenę PUF i również one zostały zachowane w ewolucji od nicienia do człowieka. Podobnie jak białka PUF charakteryzują się obecnością domeny wiązania RNA (RBD), jednak odmienną bo zbudowaną z dwóch palców cynkowych typu CCHC. W sekwencji aminokwasowej każdego palca cynkowego kluczowe są cztery aminokwasy, trzy cysteiny (C) i jedna histydyna (H). Owe aminokwasy oddziałują z dodatnio naładowanym jonem cynku. Strukturę krystaliczną RBD białka nanos rozwiązano jedynie dla homologa *Danio pręgowanego* (łac. *Danio rerio*) (**Rycina 6**) [Hashimoto i wsp. 2010].

Rola specyficznego rozpoznawania mRNA przez kompleks Pum–Nanos leży po stronie białka Pum [Murata i Wharton 1995, Wharton i wsp. 1998]. Co więcej, warunkiem interakcji Pum z Nanos jest uprzednie połączenie Pum z RNA [Sonoda i Wharton 1999]. Chociaż domena (CCHC)₂ białka nanos oddziałuje bezpośrednio z mRNA specyficzność tego oddziaływania jest niska [Curtis i wsp. 1997, Arrizabalaga i Lehmann 1999]. Domena (CCHC)₂ zaangażowana jest również w oddziaływanie z białkiem PUM2 [Jaruzelska i wsp. 2003]. W potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów kontrolowanej przez kompleks Pum–Nanos–mRNA zaangażowane są również inne białka. Odzwierciedla to złożoność mechanizmu regulacji ekspresji specyficznych mRNA.



Rycina 6. Struktura krystaliczna RBD dwóch palców cynkowych białka nanos *Danio pręgowanego*. Jony cynku przedstawiono za pomocą szarych kuleczek, a symbole ZF1 i ZF2 oznaczają palce cynkowe [Hashimoto i wsp. 2010].

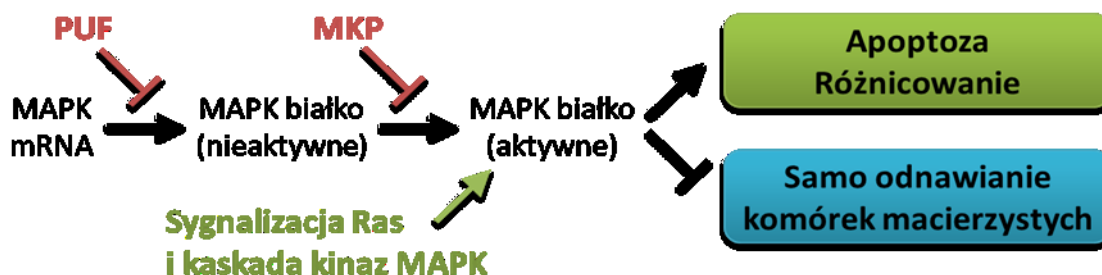
2.6. Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów przez białka Pum i Nanos

2.6.1. Rola w regulacji apoptozy

Wiedza na temat mRNA regulowanych przez białka Pum w organizmach ssaków i człowieka była do niedawna bardzo ograniczona. Jeden z niewielu przykładów stanowiła represja dwóch mRNA kodujących ludzkie homologi kinazy MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*), *ERK2* i *p38α* przez białko PUM2. Represja ta ma miejsce w embrionalnych komórkach macierzystych człowieka (ang. *Embryonic Stem Cell – ESC*). Istotnym elementem tej represji jest oddziaływanie PUM2 z krótkimi sekwencjami regulatorowymi (UGUANAUA, N oznacza dowolny nukleotyd) występującymi w 3'UTR mRNA *ERK2* i *p38α*. Opisany mechanizm potranskrypcyjnej regulacji ekspresji kinaz jest ponadto zachowany w ewolucji. Bowiem mRNA kodujący homolog kinazy MAPK, *mpk-1* w linii gametogenicznej nicieni, ulega represji pod wpływem wyżej wspomnianego białka *fbf* należącego do rodziny PUF. W obrębie 3'UTR mRNA *mpk-1* nicienia zidentyfikowano dwa motywy o sekwencji (UGURHHAUW, gdzie R oznacza purynę, H – A/C/U), które są niezbędne dla tej regulacji. Jej znaczenie podkreśla fenotyp mutantów z dysfunkcją genu *fbf*. Osobniki te charakteryzują się istotnym wzrostem intensywności translacji mRNA *mpk-1* w stosunku do osobników dzikich. W represji tego mRNA białko *fbf* prawdopodobnie współdziała z białkiem *lip-1*, homologiem fosfatazy MAPK (*mcp*). Białka *mcp* są kluczowymi inhibitorami aktywności *mpk-1*. Przypuszcza się, że hamowanie ekspresji kinaz MAPK może z jednej strony promować żywotność komórek rakowych wspomagając progresję nowotworową, z drugiej zaś stymulować proces samoodnawiania (ang. *selfrenewal*) komórek macierzystych. W rezultacie, zaproponowano podwójną negatywną regulację kinaz MAPK. Polegałaby ona na regulacji potranskrypcyjnej – represji kontrolowanej przez białka PUF, oraz na potranslacyjnej inhibicji aktywności przy udziale fosfataz *mcp* (**Rycina 7**) [Lee i wsp. 2007].

Kolejne regulowane przez białka PUM dwa mRNA to kodujący kinazę MAP2K3 i kinazę MAP3K1. Owe kinazy odpowiadają m.in. za regulację apoptozy w trakcie spermatogenezy. Usunięcie motywów PBE z reporterowych konstrukcji lucyferazowych zawierających 3'UTR mRNA tych kinaz powodowało wzrost poziomu ekspresji lucyferazy. Obserwacja ta wskazywała na regulację kinaz przez endogenne białka PUM. Natomiast wyciszanie ekspresji przy użyciu shRNA w komórkach retinoblastoma, pokazało, że oprócz białek PUM również białko NANOS1 jest zaangażowane w regulację ekspresji kinaz MAP2K3 i MAP3K1 [Miles i wsp. 2014].

Zakonserwowana kontrola MAPK



Rycina 7. Pozytywna i negatywna regulacja ekspresji i aktywacji MAPK za pośrednictwem białek PUF. W potranskrypcyjnym hamowaniu ekspresji mRNA *MAPK* białka z rodziny PUF współdziałają z fosfatazami MKP. Te ostatnie inaktywują białko MAPK i w ten sposób promują samoodnawianie komórek macierzystych. Rolę aktywatora kinazy MAPK odgrywają z kolei ścieżka sygnalizacji Ras i kaskada kinaz MAPK. Promują one różnicowanie oraz apoptozę [według Lee i wsp. 2007].

Żywotność pierwotnych komórek gametogenicznych (ang. *Primordial Germ Cells* – PGCs) podczas migracji komórek płciowych do gonad Muszki owocowej białko nanos warunkuje poprzez zapobieganie apoptozie. Rolę tę pełni przez represję mRNA *hid* (ang. *head involution defective*) oraz *skl* (ang. *sickle*). Kodowane w tych mRNA białka należą do rodziny białek zaangażowanych w aktywację kaspaz [Hayashi i wsp. 2004, Sato i wsp. 2007]. Homologi białka nanos, nanos-1, nanos-2 oraz nanos-3, warunkują żywotność PGCs poprzez regulację apoptozy także u nicienia. [Subramaniam i Seydoux 1999, Kraemer i wsp. 1999]. Podobną rolę odgrywa białko nanos-1 Danio pręgowanego [Köprunner i wsp. 2001]. Również białka Nanos2 i Nanos3 myszy są zaangażowane w hamowanie apoptozy męskich komórek germinalnych [Suzuki i wsp. 2008].

2.6.2. Rola w regulacji proliferacji i utrzymania niezróżnicowanego stanu linii komórek gametogenicznych

Potranskrypcyjna regulacja ekspresji mRNA *E2F3* przez białka PUM pokazuje, że również czynniki transkrypcyjne, a jednocześnie modulatory cyklu komórkowego i proliferacji komórek mogą być w ten sposób regulowane. W immunoprecypitatach anty-PUM1 i anty-PUM2 z ludzkich fibroblastów pokazano wzbogacenie mRNA *E2F3*. Dodatkowo wyciszenie obu genów *PUM* w fibroblastach powodowało wzrost poziomu białka E2F3, co było zbieżne z wynikami uzyskanymi z zastosowaniem reporterowych konstrukcji lucyferazowych zawierających 3'UTR *E2F3*. Natomiast zmutowanie motywów PBE w 3'UTR skutkowało zniesieniem represji. Ponadto nadekspresja kombinacji różnych białek PUM i NANOS powodowała znaczne obniżenie poziomu endogennego białka

E2F3. Wskazuje to dodatkowo na udział białek NANOS w powyższej regulacji [Miles i wsp. 2012].

Białka Pum i Nanos odgrywają różnorodne role w rozwoju komórek gametogenicznych. Podobnie do białka pum, białko nanos Muszki owocowej warunkuje również utrzymanie (ang. *maintenance*) niezróżnicowanego stanu PGCs w czasie migracji do gonad pierwotnych. Pokazano bowiem, że profil ekspresji genów osobników ze zmutowanym genem *nanos* jest typowy dla późnego okresu rozwojowego, czyli po dotarciu PGCs do gonad i wskazuje na przedwczesne różnicowanie. Przypuszcza się, że w czasie migracji PGCs białka pum i nanos powodują represję mRNA warunkujących różnicowanie. [Asaoka i wsp. 1998, Sano i wsp. 2001].

Co więcej, białko nanos odgrywa istotną rolę w utrzymaniu linii męskich komórek gametogenicznych również osobników dorosłych [Forbes i Lehmann 1998]. Otóż mutacja genu *nanos* u samców Muszki owocowej zaburza spermatogenezę i prowadzi do bezpłodności męskiej [Bhat 1999]. Także u myszy białka Nanos2 i Nanos3, potrzebne są do utrzymania męskiej linii germinalnej ponieważ mutacja genu *Nanos2* skutkuje całkowitym brakiem spermatogoniów u dorosłych męskich osobników myszy [Tsuda i wsp. 2003, Saga 2008, 2010].

Z kolei u samic mutantów tego genu, komórki macierzyste linii gametogenicznej (ang. *Germline Stem Cells – GSCs*) przechodzą wprawdzie kilka asymetrycznych podziałów, jednak później zaprzestają się dzielić i degenerują [Bhat 1999]. Ponadto białko nanos jest konieczne do ciągłej produkcji pęcherzyków jajnikowych podczas oogenezy [Wang i wsp. 1994, Kobayashi i wsp. 1996]. Podobną rolę pełni homolog białka nanos Danio przegowanego, ponieważ warunkuje utrzymanie zdolności wytwarzania oocytów w dojrzałych jajnikach [Draper i wsp. 2007].

Podobnie do białka nanos, jedną z ról białka pum poza zaangażowaniem w uśpienie mitotyczne migrujących PGCs, stanowi utrzymanie GSCs w stanie niezróżnicowanym [Lin i Spradling 1997, Forbes i Lehmann 1998]. Pokazano bowiem, że jajniki dorosłych samic Muszki owocowej charakteryzujące się mutacją genu *pum* (*pum^{ovt}*) tracą zdolność utrzymania komórek macierzystych w stanie niezróżnicowanym i w konsekwencji wszystkie komórki linii germinalnej różnicują się w komory jajowe (ang. *egg chambers*) [Lin i Spradling 1997]. Również u nicienia białko fbf, homologi białka pum, pełnią rolę w utrzymaniu komórek macierzystych linii germinalnej w stanie niezróżnicowanym [Kaymak i wsp. 2010, Crittenden i wsp. 2002].

Szczególną cechą nicieni jest występowanie płci męskiej oraz obojnaczej, natomiast brak płci żeńskiej. Osobniki obojnacze posiadają obie gonady, jądra i jajniki. Obojnacze larwy podczas wczesnego rozwoju produkują męskie komórki płciowe. Natomiast w wieku dorosłym dochodzi do przełączenia gametogenezy męskiej na żeńską (ang. *sperm/oocyte switch*) i w konsekwencji produkowane są komórki jajowe. W proces ten zaangażowane są homologi białek pum i nanos, odpowiednio białko fbf-1 (ang. *fbf-fem-3 binding factor*) i nanos-3 [Ahringer i Kimble 1991, Kraemer i wsp. 1999]. Owe homologe tworzą ze sobą kompleks, który powoduje represję typowego dla męskich komórek germinalnych mRNA *fem-3* i w ten sposób powodują przełączenie spermatogenezy na oogenezę (**Rycina 8**) [Zhang i wsp. 1997, Kraemer i wsp. 1999]. Białko fbf-1 potranskrypcyjnie hamuje ekspresję mRNA *fog-2* i *gld-1*, których represja jest kolejnym warunkiem przełączenia spermatogenezy na oogenezę (**Rycina 8**) [Evans i wsp. 1994, Suh i wsp. 2009]. W tym złożonym procesie uczestniczy również białko puf-8, które spośród białek PUF nicienia wykazuje najwyższe podobieństwo do homologów PUM człowieka (**Rycina 8**) [Bachorik i Kimble 2005].

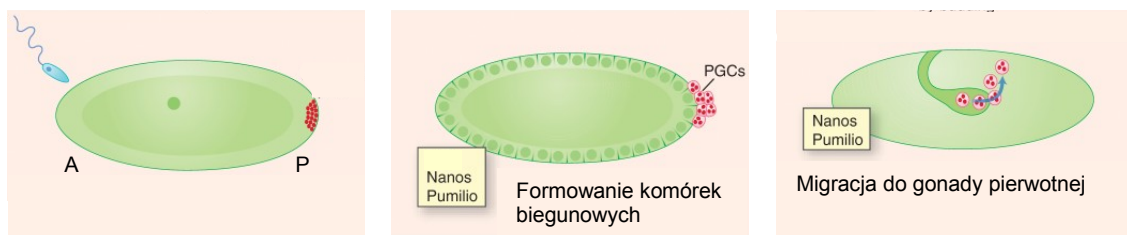


Rycina 8. Molekularny model przełączenia gametogenezy męskiej na żeńską osobników obojnaczych nicieni. Model po lewej stronie przedstawia spermatogenezę, natomiast po prawej oogenezę. Pogrubiona czcionka na obrazie oznacza białka aktywne [Bachorik i Kimble 2005].

2.6.3. Rola w regulacji cyklu komórkowego

Jak już wspomniano, mechanizm PTGR jest niezwykle istotny w rozwoju komórek gametogenicznych. Aspekt ten był podejmowany w badaniach i został dobrze opisany w wielu organizmach modelowych. Przykładem może być potranskrypcyjna regulacja mRNA *cykliny B (cycB)* w rozwoju komórek gametogenicznych Muszki owocowej przez białka pum i nanos. Mianowicie w biegunie tylnym dojrzałego oocytu, który wyznacza tył ciała (ang. *posterior* – *P*) przyszłego embrionu Muszki owocowej znajduje się dziedziczona po matce plazma zarodkowa, której obecność warunkuje powstawanie komórek płciowych (**Rycina 9, po lewej**). Obecność plazmy zarodkowej warunkuje powstawanie komórek płciowych również u robaków, ryb oraz płazów. Stanowi ona optycznie gęsty region cytoplazmy zawierający cząstki rybonukleoproteinowe

(ang. *RiboNukleoProtein – RNP particles*), tzw. ziarna biegunowe, rybosomy oraz mitochondria [podręcznik Jura i Klag 2005]. W skład plazmy zarodkowej wchodzi m.in. matczyne mRNA kodujące białka pum (pumilio) i nanos [Wang i wsp. 1994, Forbes i Lehmann 1998]. Prekursory komórek płciowych, zwane u Muszki owocowej komórkami biegunowymi, powstają w obrębie plazmy zarodkowej na wczesnym etapie rozwoju embrionu [Strome i Lehmann 2007]. Komórki biegunowe dzielą się intensywnie, a następnie podczas gastrulacji już jako pierwotne komórki gametogeniczne migrują do gonad pierwotnych. Podczas całego okresu migracji podziały mitotyczne PGCs całkowicie ustają (**Rycina 9, po prawej**) [Strome i Lehmann 2007].



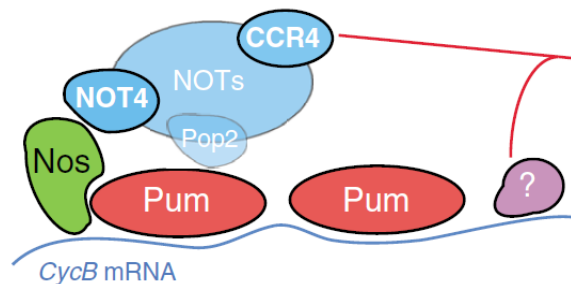
Rycina 9. Powstawanie oraz wczesne etapy rozwoju pierwotnych komórek gametogenicznych (PGCs) Muszki owocowej. Plazmę zarodkową przedstawiono w postaci czerwonych kropek. Za pomocą symboli A (ang. *anterior*) i P (ang. *posterior*) oznaczono odpowiednio biegun przedni i tylny wczesnego embrionu. Najistotniejsze białka regulatorowe tych procesów: nanos i pum (pumilio) zaznaczono w żółtych prostokątach. Strzałka wskazuje kierunek migracji PGCs [według Strome i Lehmann 2007].

Okazało się, że białka pum i nanos odgrywają kluczową rolę podczas tej migracji PGCs [Forbes i Lehmann 1998, Parisi i Lin 2000]. Zaobserwowano bowiem, że u osobników ze zmutowanym genem *pum* lub alternatywnie *nanos* podziały komórkowe są w czasie migracji kontynuowane. Wówczas PGCs degenerują i w konsekwencji nie docierają do gonad [Asaoka–Taguchi i wsp. 1999]. Wyjaśniono, że właśnie białka pum i nanos są odpowiedzialne za konieczne dla migrujących PGCs uśpienie mitotyczne. Powodują one hamowanie ekspresji matczynej mRNA *cykliny B* (*cycB^{mat}*), która stymuluje podziały komórkowe [Kobayashi i wsp. 1996, Asaoka–Taguchi i wsp. 1999]. Warto wspomnieć, że we wczesnych stadiach oogenezy matczynej transkrypt *cycB^{mat}* zostaje zlokalizowany na biegunie tylnym oocytu, a następnie mRNA *cycB^{mat}* zostaje wbudowany do rozwijających się komórek biegunowych [Whitfield i wsp. 1989, Dalby i Glover 1992]. Białko cycB jest niezbędne dla początkowych podziałów komórek biegunowych i PGCs przed rozpoczęciem migracji do gonad pierwotnych [Lehner i O’Farrell 1990, Raff i wsp. 1990]. Pokazano, że w represji mRNA *cycB^{mat}* białko pum wiąże się w 3’UTR, a bardziej precyzyjnie z kilkunukleotydowymi motywami rozpoczynającymi się od UGUA

(**Rycina 10**) [Dalby i Glover 1993, Kadyrova i wsp. 2007]. W kompleksie z mRNA *cycB^{mat}* białko pum rekrutuje kolejno nanos oraz kompleks deadenylicyjny CCR4–Pop2–NOT4 (**Rycina 11**), przy czym białko nanos oddziałuje bezpośrednio z podjednostką NOT4 poprzez domenę NED (ang. *Nanos Effector Domain*) [Kadyrova i wsp. 2007, Raisch i wsp. 2016]. Stąd konsekwencją represji mRNA *cycB^{mat}* jest deadenylacja.

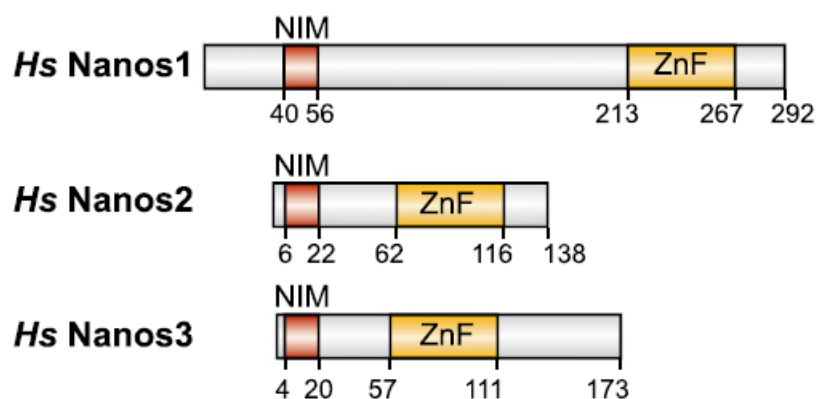


Rycina 10. Motywy w 3'UTR mRNA *cykliny B* (*CycB*) odpowiedzialne za wiązanie białka pum i nanos (Nos). Dwa motywy, które bezpośrednio oddziałują z białkiem pum, zaznaczono na czerwono, natomiast czteronukleotydomotywu zaangażowany w wiązanie nanos (Nos) oznaczono kolorem zielonym [według Kadyrova i wsp. 2007].



Rycina 11. Schemat mechanizmu potranskrypcyjnej regulacji ekspresji mRNA *cykliny B* (*CycB*) w migrujących do gonad PGCs Muszki owocowej. Kompleks białek pum i nanos (Nos) oddziałuje z kompleksem deadenylicyjnym (CCR4–Pop2–NOT4) i prawdopodobnie z dodatkowym niepoznanym dotąd białkiem (oznaczonym – ?) specyficznym dla linii gametogenicznej. Przedstawione oddziaływania warunkują represję mRNA *CycB* tylko w migrujących PGCs [Kadyrova i wsp. 2007].

W potranskrypcyjnej represji mRNA wszystkie trzy ludzkie i mysie homologii Nanos rekrutują kompleks deadenylicyjny CCR4–NOT poprzez domenę NIM (ang. *NOT1 Interacting Motif*). Jest to krótki, liczący 17 aminokwasów region na końcu aminowym białka Nanos, który oddziałuje z podjednostką CNOT1 stanowiącą rusztowanie kompleksu (**Rycina 12**). Oddziaływanie to może prowadzić do deadenylicacji a następnie degradacji docelowego transkryptu lub jedynie hamowania jego ekspresji [Bhandari i wsp. 2014]. Kompleks Nanos/CNOT1 ma aktywność deadenylicyjną także w warunkach *in vitro*. Jednak żaden mRNA, który byłby przedmiotem tej regulacji nie jest znany [Suzuki i wsp. 2010, Saga 2010, Barrios i wsp. 2010].



Rycina 12. Schemat układu domen funkcjonalnych białek NANOS człowieka (Hs Nanos1-3). NIM oznacza domenę oddziaływania z kompleksem deadenylującym CCR4-NOT. ZnF oznacza domenę palców cynkowych typu (CCHC)₂ [Bhandari i wsp. 2014].

Istotna jest również interakcja obu białek PUM z kompleksem CCR4-NOT. Polega ona na bezpośrednim oddziaływaniu z podjednostkami katalitycznymi CNOT7 i CNOT8 [Van Etten i wsp. 2012]. Interakcja pum z kompleksem ccr4-not reprezentuje silnie zachowany w ewolucji mechanizm PTGR, opisany wcześniej u Muszki owocowej [Wreden i wsp. 1997] oraz nicienia [Ahringer i Kimble 1991]

Inny, klasyczny przykład potranskrypcyjnej regulacji ekspresji mRNA *cykliny*, w który zaangażowane są białka pum i nanos, stanowi proces hamowania podziałów mitotycznych w dojrzewających oocytach żaby (łac. *Xenopus leavis*). Homolog białka nanos żaby, *xcat-2*, oddziałuje bezpośrednio z homologiem białka pum, *xpum*, oraz CPEB (ang. *CPE Binding protein*, *CPE* – *Cytoplasmic Polyadenylation Element*), które z kolei oddziałują z motywem zawierającym UGUA w 3'UTR mRNA *cykliny B1* [Nakahata i wsp. 2001]. Również w tym przypadku konsekwencją represji jest deadenylacja ogona poli(A) mRNA *cykliny B1* [Nakahata i wsp. 2001]. Również u nicienia zatrzymanie podziałów PGCs podczas rozwoju larwalnego warunkowane są przez homologi *nanos-1* i *nanos-2* [Subramaniam i Seydoux 1999].

Z kolei mRNA człowieka, który opisano jako cel regulacji białek PUM to mRNA kodujący supresor nowotworowy *p27*. W wyniku stymulacji czynnikami wzrostu, białka PUM wiążą się z 3'UTR tego mRNA. Wiązanie implikuje istotne modyfikacje w strukturze drugorzędowej w obrębie 3'UTR mRNA *p27*. Otóż region ten zawiera miejsca rozpoznania dla miR-221 i miR-222. Oddziaływanie z białkami PUM powoduje rozplecenie struktury dwuniciowej RNA, która dzięki temu staje się dostępna dla tych miRNA. Wiązanie miRNA warunkuje efektywną represję mRNA *p27* a w konsekwencji mitozę [Kedde i wsp. 2010]. Białko PUM2 oddziałuje ponadto z 3'UTR mRNA *SDADI*, który ulega ekspresji w gonadach męskich. Funkcja tego genu u człowieka pozostaje

nieznana. Wiadomo jedynie, że zachowany w ewolucji drożdżowy homolog sda1 (ang. *severe depolymerization of actin*) jest czynnikiem depolimeryzującym aktynę. W warunkach *in vitro* białko PUM2 wiąże się również z 3'UTR mRNA *CEP3* (ang. *Cdc42 Effector Protein 3*). Koduje on białko zaangażowane w kontrolę cyklu komórkowego i ulega specyficznej ekspresji w jądrach męskich [Spik i wsp. 2006].

2.7. Kompleks PUM2–NANOS1 funkcjonuje również w męskich komórkach gametogenicznych człowieka

Zidentyfikowano homologiczny do Muszki owocowej i innych organizmów modelowych kompleks PUM2–NANOS1 człowieka [Jaruzelska i wsp. 2003]. W tworzeniu owego kompleksu zaangażowane są RBD tych białek, te same które są potrzebne do utworzenia kompleksu pum–nanos oraz do potranskrypcyjnej regulacji ekspresji docelowych mRNA Muszki owocowej [Jaruzelska i wsp. 2003]. Wskazuje to na analogiczną funkcję tych białek, która polega na potranskrypcyjnej regulacji ekspresji specyficznych mRNA człowieka.

Białka PUM2 i NANOS1 zlokalizowane są w regionie około-jądrowym komórek germinalnych dorosłych mężczyzn. Interesujące, że w tym samym regionie subkomórkowym zlokalizowana jest plazma zarodkowa u organizmów niższych [Jaruzelska i wsp. 2003]. Obserwacja ta kontrastuje z brakiem plazmy zarodkowej u ssaków oraz bardzo odmiennym mechanizmem powstawania PGCs, które powstają z komórek somatycznych na skutek indukcji przez sygnały zewnątrzkomórkowe [podręcznik Jura i Klag 2005].

Podobnie jak u myszy, w komórkach germinalnych człowieka występują białka PUM1 oraz PUM2, które jednak różnią się pomiędzy sobą profilami ekspresji. Białko PUM1 występuje w różnych tkankach. Natomiast białko PUM2 ulega wzmożonej ekspresji w embrionalnych komórkach macierzystych, PGCs płodu, a później w spermatogoniach, mejotycznych spermatocytach oraz okrągłych spermatydach dorosłego mężczyzny [Moore i wsp. 2003].

Także białko NANOS1 ulega ekspresji w ludzkich komórkach embrionalnych, w PGCs płodu, oraz w spermatogoniach, mejotycznych spermatocytach i okrągłych spermatydach dorosłego człowieka [Jaruzelska i wsp. 2003]. Specyficzna ekspresja w męskiej linii gametogenicznej dotyczy również jego paraloga, białka NANOS2. Białko to obecne jest w prenatalnych PGCs oraz w późniejszych stadiach spermatogenezy, tzn. w spermatogoniach, mejotycznych spermatocytach i okrągłych spermatydach [Kusz

i wsp. 2009b]. Profil ekspresji specyficznej dla męskich komórek płciowych charakteryzuje także białko NANOS3, chociaż poprzez fakt, że ulega ekspresji w PGCs, zanim zostają zdeterminowane jako męskie lub żeńskie, jest istotne dla obu płci [Kusz i wsp. 2009a].

Domena palców cynkowych (CCHC)₂ na końcu karboksylowym (tzw. koniec C) białek NANOS człowieka jest wysoce zachowana w ewolucji. Identyczność aminokwasowa tej domeny pomiędzy Muszką owocową a człowiekiem wynosi 62% [Jaruzelska i wsp. 2003].

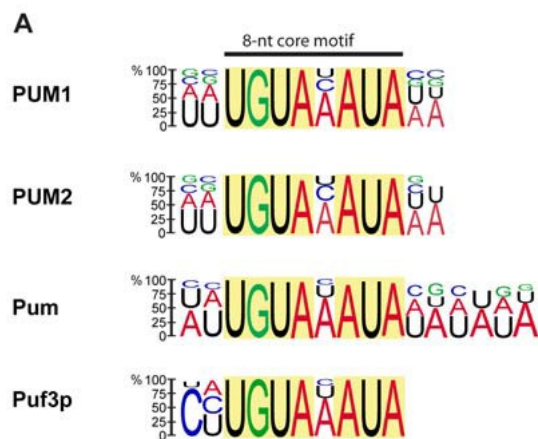
Podobnie do Muszki owocowej kompleks PUM2–NANOS1 człowieka oddziałuje z innymi białkami. Jeden z interaktorów stanowi wysoce zachowane w ewolucji białko SNAPINA. Białko to współwystępuje z PUM2 i NANOS1 w PGCs płodu oraz spermatogenicznych komórkach dorosłego mężczyzny [Ginter–Matuszewska i wsp. 2009]. Ludzkie białko PUM2 tworzy również kompleks z czynnikiem azoospermii, białkiem DAZ (ang. *Deleted in AZoospermia*) oraz DAZL (ang. *DAZ-like*) [Moore i wsp. 2003, Fox i wsp. 2005]. Gen *DAZ* kodowany jest w regionie AZF na chromosomie Y, a jego delecja stanowi jedną z najczęstszych genetycznych przyczyn niepłodności mężczyzn. Również inny lecz autosomowy homolog DAZ, białko BOULE, oddziałuje z białkiem PUM2. Białko to stymuluje translację i warunkuje właściwy przebieg mejozy oraz wytwarzania plemników w różnych gatunkach zwierząt modelowych [Urano i wsp. 2005].

2.8. Globalna identyfikacja mRNA regulowanych potranskrypcyjnie przez białka PUM człowieka

W ostatnich latach, przy zastosowaniu techniki powinowactwa białko–RNA w warunkach *in vitro*, powiązanej z analizą mikromacierzową, przeprowadzono globalną identyfikację mRNA wiążących się z białkami PUM w komórkach HeLa. Zidentyfikowano w ten sposób 1766 i 751 mRNA odpowiednio dla białek PUM1 i PUM2 człowieka. Jednak większość tych mRNA oddziałuje z oboma białkami. Nie jest to zaskakujące biorąc pod uwagę opisane wyżej wysokie podobieństwo domen PUF obu białek PUM. Dane te wskazują, że w PTGR białka PUM mogą funkcjonować synergistycznie. Wysoka liczba zidentyfikowanych mRNA pozwala sądzić, że PTGR za pośrednictwem białek PUM jest bardzo powszechna u człowieka, oraz że potencjalnie kontrolują aż 15% komórkowego transkryptomu [Galgano i wsp. 2008, Morris i wsp. 2008].

Jednak sama identyfikacja mRNA wiążących się z tymi białkami stanowi jedynie wstępny etap do bardziej szczegółowych badań funkcjonalnych, by odpowiedzieć na pytanie, czy te oddziaływania odzwierciedlają potranskrypcyjną regulację. Jeden z etapów stanowi poszukiwanie sekwencji nukleotydowych w 3'UTR specyficznie rozpoznawanych przez białka PUM. Dzięki analizie porównawczej sekwencji 100 mRNA najsilniej wiążących się z białkiem PUM1 i PUM2 zdefiniowano 12–nukleotydowe sekwencje konsensusowe dla wiązania tych białek. Sekwencje te są prawie identyczne dla obu białek. Zawierają ośmionukleotydowy motyw centralny UGUAHAUA (H oznacza A/C/U) oraz sekwencje oskrzydłające (**Rycina 13**) [Galgano i wsp. 2008, Morris i wsp. 2008].

Interesujące, że zidentyfikowany motyw konsensusowy jest niemal identyczny z wcześniej zidentyfikowanym motywem dla białka pum Muszki owocowej [Gerber i wsp. 2006] oraz białka puf3p drożdży (**Rycina 13**). Co więcej, wśród białek PUF drożdży białko puf3p charakteryzuje się najwyższym podobieństwem do ludzkich białek PUM [Gerber i wsp. 2004]. Bardzo podobny motyw konsensusowy zidentyfikowano również w badaniach nad mRNA regulowanymi przez białka PUF nicienia. Ów motyw różni się tylko jednym dodatkowym nukleotydem wewnątrz sekwencji (UGURHHAUW, R oznacza purynę, a W – A lub U) [Bernstein i wsp. 2005]. Powyższe badania porównawcze wskazują, że mechanizm rozpoznania docelowych mRNA przez białka PUF został zachowany w ewolucji do człowieka włącznie.



Rycina 13. Porównanie motywów w sekwencjach 3'UTR mRNA oddziałujących z białkami PUM1 i PUM2 człowieka [Morris i wsp. 2008, Galgano i wsp. 2008], pum u Muszki owocowej [Gerber i wsp. 2006] oraz puf3p u drożdży [Gerber i wsp. 2004]. Wysokość liter jest miarą prawdopodobieństwa wystąpienia nukleotydu w danej pozycji. Główna ośmionukleotydowa sekwencja jest identyczna dla wszystkich tych białek [Galgano i wsp. 2008].

Poszukiwanie docelowych mRNA wiązanych i potencjalnie regulowanych przez białko PUM2 wykonano dodatkowo metodą PAR-CLIP dla endogennego białka w komórkach raka okrężnicy HCT116 [Lee i wsp. 2016] i dla białka z nadekspresji w komórkach embrionalnych nerki HEK293T [Hafner i wsp. 2010]. Wyznaczony motyw wiązania był prawie identyczny z uzyskanym we wcześniejszych badaniach [Galgano i wsp. 2008].

Bardziej precyzyjna analiza sekwencji potencjalnych docelowych mRNA dla białek PUM człowieka wskazuje, że prócz opisanych wyżej motywów, w obrębie 3'UTR występują również inne krótkie sekwencje wspólne dla różnych grup mRNA. Niektóre z nich mogą stanowić miejsca wiązania innych niż PUM białek wiążących RNA. Tego typu białka, podobnie jak u opisanych wyżej organizmów modelowych, mogłyby współdziałać z białkami Pum w PTGR. Ponadto wiele potencjalnych docelowych mRNA zawiera w 3'UTR przypuszczalne miejsca wiązania dla różnych miRNA [Galgano i wsp. 2008]. Współdziałanie białek Pum ze ścieżką miRNA w PTGR pokazano już wcześniej u nicienia. Mianowicie białko *puf-9* wraz z miRNA *let-7* współdziałają w hamowaniu ekspresji docelowego mRNA *hbl-1* (ang. *hunchback-like*) homologa *hb* Muszki owocowej [Nolde i wsp. 2007]. Funkcjonalna współzależność pomiędzy białkami wiążącymi RNA oraz kompleksami miRNP zawierającymi specyficzne miRNA, stanowi obecnie jedno z kluczowych pytań w badaniach nad PTGR. Opisany wyżej mechanizm regulacji mRNA *p27* stanowi unikatowy przykład tej współzależności [Kedde i wsp. 2010].

Drożdże posiadają pięć białek PUF (Puf1p – Puf5p). W odniesieniu do trzech białek tej grupy pokazano, że każde oddziałuje z funkcjonalnie odrębnymi grupami mRNA [Gerber i wsp. 2004]. Zaobserwowano mianowicie, że mRNA związane z Puf3p biorą udział w regulacji funkcjonowania mitochondriów oraz ich biogenezie, w oddychaniu tlenowym oraz translokacji białek do mitochondriów. Z kolei mRNA związane z Puf5p uczestniczą w modyfikacji potranslacyjnej histonów, rearanżacji chromatyny lub regulacji transkrypcji. Natomiast mRNA związane z białkiem Puf4p kodują białka jądrowe, białka zaangażowane w syntezę rybosomalnego RNA (rRNA), przetwarzaniu i dojrzewaniu rybosomów, tj. w głównych funkcjach jąderka [Gerber i wsp. 2004, Wilinski i wsp. 2015]. Na podstawie powyższych obserwacji utworzono model tzw. „potranskrypcyjnego operonu RNA” zwanego również „potranskrypcyjnym regulonem” lub po prostu „regulonem RNA”. Model ten zakłada, że mRNA zawierające identyczny motyw w regionie 3'UTR regulowane są przez to samo białko (np. dane białko PUF) i zaangażowane są w regulację tej samej funkcji komórkowej [Blackinton i Keene, 2014]. Model ten przypomina działający na poziomie transkrypcji operon bakteryjny, w obrębie

którego geny powiązane funkcjonalnie ulegają ekspresji w sposób skoordynowany [Keene i Tenenbaum 2002, Keene 2007].

2.9. Białko SPIN1 i jego rola w apoptozie, proliferacji i cyklu komórkowym

Jednym z potencjalnych celów potranskrypcyjnej regulacji przez białko PUM1 jest mRNA *SPIN1* (dawniej zwane *SPINDLIN1*). Nazwa pochodzi od właściwości wiązania się z wrzecionem kariokinetycznym (ang. *spindle*). Ów mRNA został zidentyfikowany w globalnych poszukiwaniach mRNA wiążących się z PUM1 w komórkach HeLa [Morris i wsp. 2008].

mRNA kodujący Spin1 jest najbardziej wzbogaconym matczynym transkrypcyjnym dojrzewającego oocyty i wczesnego dwukomórkowego zarodka myszy. W tym czasie ulega intensywnej translacji oraz fosforylacji, która z kolei warunkuje wiązanie się Spin1 z wrzecionem kariokinetycznym. Na podstawie tych danych zaproponowano rolę Spin1 w regulacji cyklu komórkowego, w powyższych stadiach rozwojowych [Oh i wsp. 1997, 1998]. Mechanizm działania Spin1 w oocytach ssaków został dokładniej poznany w modelu Świni domowej. Podobnie jak u myszy, matczyny transkrypcyjny *Spin1* ulega wysokiej ekspresji w dojrzałych oocytach na etapie mejozy a precyzyjniej, w momencie jej zahamowania w metafazie II (ang. *MII-stage oocytes*), a następnie w zygocie i zarodku dwukomórkowym. Wyciszenie ekspresji genu *Spin1* powodowało spontaniczną aktywację zatrzymanego w metafazie II oocyty i wznowienie mejozy, objawiające się wytworzeniem przedjądrza (ang. *pronucleus*) oraz rozwój partenogenetyczny. Aktywacja ta jest spowodowana spadkiem poziomu aktywności czynnika stymulującego dojrzewanie MPF (ang. *Maturation-Promoting Factor – MPF*) i kinaz białkowych aktywowanych mitogenem MAPK oraz poprzez zmniejszenie stabilności mRNA jednej z kinaz MAPK – *ERK1*. Skutkuje to niskim poziomem białka ERK1, niezbędnego do utrzymania stanu zablokowania mejozy. Przywrócenie ekspresji Spin1 w oocytach, w których jej ekspresję wyciszono (eksperyment typu *rescue*) skutkuje utrzymaniem bloku mejotycznego w metafazie II [Choi i wsp. 2017].

SPIN1 potencjalnie uczestniczy w rozwoju nowotworów [Zhang i wsp. 2008]. Mianowicie nadekspresja SPIN1 powodowała transformację nowotworową komórek NIH3T3, które tworzyły kolonie w agarze oraz guzy lite w myszach nagich (ang. *nude mice*) [Gao i wsp. 2005]. SPIN1 człowieka ulega wysokiej ekspresji w komórkach raka jajnika, glejaka i tłuszczakomięsaka oraz innych nowotworach, w porównaniu do komórek zdrowych [Yue i wsp. 2004, Wang i wsp. 2012, Franz i wsp. 2015, Haslene-Hox i wsp.

2015]. Przejściowa nadekspresja SPIN1, również homologa mysiego Spin1, powodowała przyspieszenie cyklu komórek NIH3T3 (mysich embrionalnych fibroblastów) oraz HeLa (ludzkich komórek raka szyjki macicy) [Gao i wsp. 2005, Zhao i wsp. 2007, Yuan i wsp. 2008] i pobudzała proliferację komórek NIH3T3 [Gao i wsp. 2005]. W komórkach HeLa następowało to poprzez opóźnienie cyklu komórkowego w trakcie mitozy. Organizacja mikrotubul wrzeciona podziałowego była w tych warunkach zaburzona, co prowadziło do niestabilności chromosomów i pojawienia komórek wielojądrzastych [Zhang i wsp. 2008a]. Natomiast stała nadekspresja SPIN1 w komórkach HeLa (także Spin1 w komórkach NIH3T3) powodowała zwolnienie proliferacji komórek [Yuan i wsp. 2008], co pozostaje w pewnej kontrowersji w stosunku do doniesień dotyczących przejściowej nadekspresji i nie zostało dotąd wyjaśnione. Ponadto stała nadekspresja SPIN1 w komórkach HeLa (także Spin1 w komórkach NIH3T3), podobnie jak przejściowa, zaburzała mitozę, segregację chromosomów i powodowała pojawianie się komórek wielojądrzastych. Prowadziło to do starzenia, apoptozy i śmierci komórek. Natomiast przetrwanie tych zmian kierowało komórkę ku transformacji nowotworowej [Gao i wsp. 2005, Yuan i wsp. 2008].

Bardzo interesujący wątek dotyczący SPIN1 stanowi jej struktura oraz struktura bardzo podobnych pod względem sekwencji, choć dotąd nieopisanych, paralogów SPIN3 i SPIN4 (**Rycina 14 i 15**). Jak pokazano na rycinie, wszystkie trzy białka łączy obecność trzech domen typu Tudor, które warunkują ich istotną rolę jako modyfikatorów epigenetycznych histonu 3 (**Rycina 14**). W funkcji tej we wszystkich trzech paralogach najbardziej istotna jest druga domena Tudor, która oddziałuje z potrójnie metylovaną lizyną 4 histonu 3 (H3K4me3) [Wang i wsp. 2011, Bartke i wsp. 2010, Yang i wsp. 2012, Su i wsp. 2014, Shanle i wsp. 2017, Yang i wsp. 2012, Talon i wsp. 2014]. W przypadku SPIN1 dochodzi również do interakcji pierwszej domeny Tudor z podwójnie metylovaną arginina 8 histonu 3 (H3R8me2a) [Su i wsp. 2014]. Oba typy metylacji powyższych aminokwasów histonu 3 oznaczają chromatynę transkrypcyjnie aktywną [Wang i wsp. 2011, Yang i wsp. 2012, Su i wsp. 2014, Shanle i wsp. 2017]. Ponadto za pomocą drugiej domeny Tudor wszystkie SPIN oddziałują z potrójnie metylovaną lizyną 20 histonu 4 (H4K20me3). Jednak ten wzór metylacji oznacza chromatynę transkrypcyjnie nieaktywną. Druga domena Tudor SPIN1 i SPIN3 wykazuje podobną selektywność rozpoznania grup metylowych w kontekście H3K4me3 i H4K20me3, podczas gdy SPIN4 zdaje się posiadać powinowactwo do podwójnie i potrójnie metylowanej lizyny 20 histonu 4 (H4K20me2-3) [Shanle i wsp. 2017]. Rozpoznawanie i wiązanie metylowanej lizyny lub argininy jest

możliwe dzięki obecności w domenie Tudor aktywnej wnęki kilku aromatycznych aminokwasów (ang. *cage of aromatic residues, aromatic pocket*) [Wang i wsp. 2011, Yang i wsp. 2012, Su i wsp. 2014].

Rycina 14. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej trzech białek SPIN człowieka: SPIN1, SPIN3 i SPIN4. Gwiazdką zaznaczono identyczne aminokwasy we wszystkich trzech paralogach, natomiast na

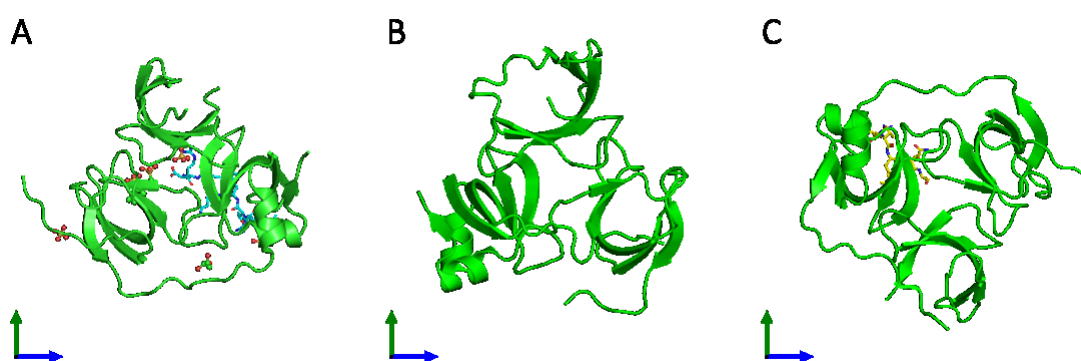
	*	*						*		*	*		*	*	*		*	*	*		*	*	*																														
SPIN1	M	K	T	P	F	G	K	T	P	-	G	Q	R	S	R	A	D	A	G	H	A	G	V	S	A	N	M	M	K	K	R	T	S	H	K	K	H	R	S	S	V	G	P	S	K	P	V	S	Q	P	R	R	N
SPIN3	M	K	T	P	F	G	K	A	A	A	G	Q	R	S	R	T	G	A	G	H	G	S	V	S	V	T	M	I	K	R	K	A	A	H	K	K	H	R	S	-	-	-	-	R	P	T	S	Q	P	R	G	N	
SPIN4	M	S	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	V	P	P	M	G	V	D	G	V	S	A	Y	L	M	K	K	R	H	T	H	R	K	Q	R	R	-	-	-	-	K	P	T	F	L	T	R	R	N	
	Tudor domain 1																																																				

SPIN1	I	V	G	C	R	I	Q	H	G	W	K	E	G	N	G	P	V	T	Q	W	K	G	T	V	L	D	Q	V	P	V	N	P	S	L	Y	L	I	K	Y	D	G	F	D	C	V	Y	G	L	E	L	N	K	D
SPIN3	I	V	G	C	R	I	Q	H	G	W	K	D	G	D	E	P	L	T	Q	W	K	G	T	V	L	D	Q	V	P	V	N	P	S	L	Y	L	I	K	Y	D	G	F	D	C	V	Y	G	L	E	L	H	R	D
SPIN4	I	V	G	C	R	I	Q	H	G	W	K	E	G	N	E	P	V	E	Q	W	K	G	T	V	L	E	Q	V	S	V	K	P	T	L	Y	I	I	K	Y	D	G	K	D	S	V	Y	G	L	E	L	H	R	D
	Tudor domain 2																																																				
	**																																																				
SPIN1	E	R	V	S	A	L	E	V	L	P	D	R	V	A	T	S	R	I	S	D	A	H	L	A	D	T	M	I	G	K	A	V	E	H	M	F	E	T	E	D	G	S	K	D	E	W	R	G	M	V	L	A	R
SPIN3	E	R	V	S	S	L	E	V	L	P	N	R	V	A	S	S	R	I	S	D	T	H	L	A	E	I	M	V	G	K	A	V	E	H	I	F	E	T	E	E	G	S	K	N	E	W	R	G	M	V	L	A	Q
SPIN4	K	R	V	L	A	L	E	I	L	P	E	R	V	P	T	P	R	I	-	D	S	R	L	A	D	S	L	I	G	K	A	V	E	H	V	F	E	G	E	H	G	T	K	D	E	W	K	G	M	V	L	A	R

SPIN1	A	P	V	M	N	T	W	F	Y	I	T	Y	E	K	D	P	V	L	Y	M	Y	Q	L	L	D	D	Y	K	E	G	D	L	R	I	M	P	D	S	N	D	S	-	P	A	E	R	E	P	G	E	V	V	
SPIN3	A	P	V	M	N	T	W	F	Y	I	T	Y	E	K	D	P	V	L	Y	M	Y	Q	L	L	D	D	Y	K	D	G	D	L	R	I	L	Q	D	S	N	D	S	-	P	L	A	E	R	E	P	G	E	V	I
SPIN4	A	P	V	M	D	T	W	F	Y	I	T	Y	E	K	D	P	V	L	Y	M	Y	T	L	L	D	D	Y	K	D	G	D	L	R	I	I	P	D	S	N	Y	Y	F	P	T	A	E	Q	E	P	G	E	V	V
	Tudor domain 3																																																				

SPIN1	S	L	V	G	K	Q	V	E	Y	A	K	E	D	G	S	K	R	T	G	M	V	I	H	Q	V	E	A	K	P	S	V	Y	F	I	K	F	D	D	D	F	H	I	Y	V	Y	D	L	V	K	T	S		
SPIN3	S	L	V	G	K	Q	V	E	Y	A	K	D	D	G	S	K	R	T	G	M	V	I	H	Q	V	E	A	K	P	S	V	Y	F	I	K	F	D	D	D	F	H	I	Y	V	Y	D	L	V	K	T	S		
SPIN4	S	L	V	G	K	Q	V	E	H	A	K	D	D	G	S	K	R	T	G	I	F	I	H	Q	V	V	A	K	P	S	V	Y	F	I	K	F	D	D	D	I	H	I	Y	V	Y	G	L	V	K	T	P		

czarno zaznaczono aminokwasy identyczne w co najmniej dwóch paralogach. Czerwoną klamrą zaznaczono trzy domeny Tudor.



Rycina 15. A – Struktura przestrzenna SPIN1 (238 aminokwasów z 262, fragment 27-262, 90% pokrycia sekwencji) w kompleksie z peptydem reprezentującym fragment sekwencji 8 aminokwasów (2-9) histonu 3 z metylowaną lizyną 4 (rozdzielczość 2,1 Å) [Yang i wsp. 2012]. B – Struktura przestrzenna SPIN3 (222 aminokwasy z 258, fragment 45-258, 83% pokrycia sekwencji) (rozdzielczość 2 Å) [Srikannathasan i wsp. 2015]. C – Struktura przestrzenna SPIN4 (216 aminokwasów z 249, fragment 36-249, 86% pokrycia sekwencji) w kompleksie z peptydem reprezentującym fragment sekwencji 6 aminokwasów (2-7) histonu 3 z metylowaną lizyną 4 (rozdzielczość 1,86 Å) [Talon i wsp. 2014]

Warto wspomnieć, że geny *SPIN* posiadają homologi kodowane na chromosomie Y, zwane *Ssty* i razem z nimi tworzą rodzinę genów *Spin/Ssty* ulegających ekspresji i pełniących ważne funkcje podczas męskiej gametogenezy [Oh i wsp. 1997]. Białka kodowane w tych genach łączy obecność domen Tudor. *Spin* wykazują wysoką homologię (około 70% identyczności sekwencji nukleotydowej [Zang i wsp. 2008]) do mysich genów *Ssty* występujących w wielu kopiach na długim ramieniu chromosomu Y (ang. *Y-linked spermiogenesis specific transcript*) [Laval i wsp. 1997, Oh i wsp. 1997].

Wczesny rozwój embrionalny kręgowców i bezkręgowców jest uzależniony od obecności w zygocie matczynej mRNA, ponieważ transkrypcja jest na tym wczesnym etapie zahamowana. Wówczas, jak już wspomniano, w zygocie oraz na etapie dwukomórkowego zarodka bardzo intensywnej translacji ulega matczynej mRNA kodującej *Spin1* [Oh i wsp. 1997], która jest stymulowana przez białko CPEB posiadające domenę wiązania z RNA (ang. *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding*). Białko to oddziałuje z motywem CPE (ang. *Cytoplasmic Polyadenylation Element*) w 3'UTR i stymuluje jego poliadenylację [Racki i Richter 2006]. Pokazano, że w potranskrypcyjną regulację mRNA *SPIN1* zaangażowane są również mikroRNA (miRNA). Cząsteczki miR-489 bezpośrednio regulują mRNA *SPIN1* w komórkach glejaka i raka piersi. Poziom miR-489 jest silnie obniżony w komórkach glejaka w porównaniu do komórek zdrowej tkanki oraz w komórkach raka piersi opornego na chemioterapeutyki i powodującego przerzuty. Umożliwia to wysoką ekspresję i gromadzenie się *SPIN1* w nieprawidłowych, nowotworowych komórkach [Chen i wsp. 2016, Li i wsp. 2017].

2.10. Nowotwory jądra typu zarodkowego

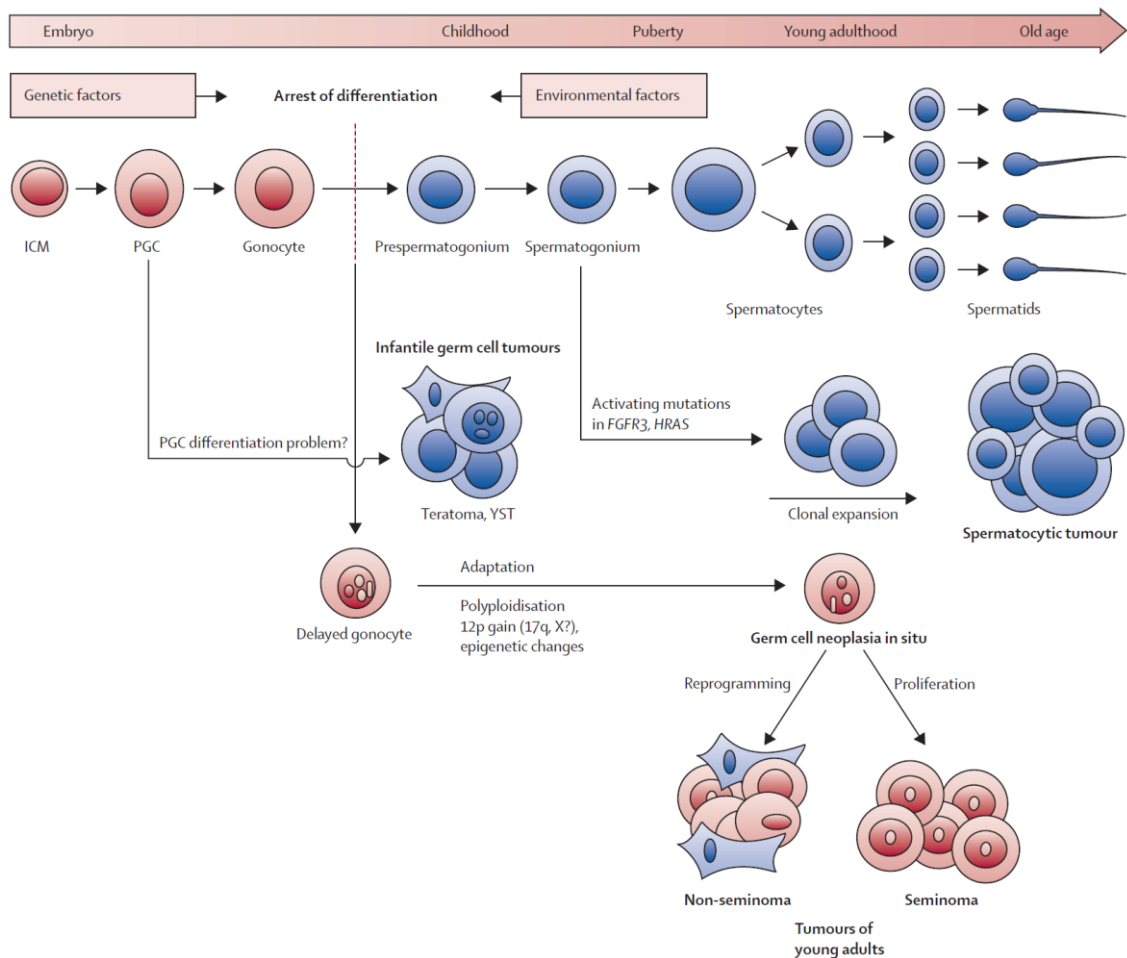
Nowotwór jądra jest najczęstszym nowotworem złośliwym wśród guzów litych u młodych mężczyzn, w wieku 20 – 39 lat, czyli w okresie prokreacji. Stanowi około 1,5% wszystkich nowotworów złośliwych u mężczyzn oraz 9% wszystkich nowotworów u dzieci. Prawdopodobieństwo zachorowania wynosi 1 na 263 mężczyzn. Co więcej, zapadalność na nowotwór jądra systematycznie wzrasta i jest obecnie dwukrotnie wyższa niż przed 40 laty. Wśród nowotworów jądra przeważa nowotwór typu zarodkowego (ang. *Testicular Germ Cell Tumor* – TGCT) ponieważ reprezentuje 95-99% przypadków [Rosen i wsp. 2011, Rajpert-De Meyts i wsp. 2016, American Cancer Society 2017]. Wywodzi się on z pierwotnych płodowych PGCs. Powstaje z komórki gametogenicznej na skutek jej opóźnienia w rozwoju, na etapie: 1/ pierwotnej komórki gametogenicznej (PGCs), 2/

później na etapie gonocyту lub wreszcie 3/ spermatogonium stanowiącego macierzystą komórkę linii męskiej (**Rycina 16**).

Biorąc pod uwagę cechy kliniczne i odmienne standardy leczenia wprowadzono podział TGCT na morfologicznie homogenne nasieniaki (ang. *seminomas*) i heterogenne nienasieniaki (ang. *non-seminomas, non-seminomatous germ cell tumours*). Częstość występowania obu typów TGCT jest podobna z przewagą nasieniaków (~60% przypadków). Największe ryzyko wystąpienia nienasieniaków przypada na 25 a nasieniaków na 35 rok życia [Rajpert-De Meyts i wsp. 2016]. Dla potrzeb niniejszej rozprawy skoncentrowano się na opisie genezy nasieniaka. Mianowicie opóźniony w rozwoju gonocyt lub spermatogonium jest źródłem powstania wewnątrzprzewodowej neoplazji komórek zarodkowych (ang. *Intratubular Germ Cell Neoplasia in situ – IGCN*) [Rajpert-De Meyts i wsp. 2016, Sonne i wsp. 2009] (**Rycina 16**). W tak opóźnionym w rozwoju gonocycie dochodzi do wielu zmian na poziomie DNA, takich jak: poliploidyżacja [Oosterhuis i wsp. 1989] oraz duplikacja krótkiego ramienia chromosomu 12, często uwidocznionej jako izochromosom i(12)p [Atkin i Baker 1982] oraz kilka mutacji lub amplifikacji genów ścieżki sygnalizacyjnej *KIT* i *RAS* [Goddard i wsp. 2007, Tian i wsp. 1999, Biermann i wsp. 2007]. Ponadto genom ulega hipometylacji pod względem zawartości 5-metylocytozyny [Kawakami i wsp. 2006, Smiraglia i wsp. 2002, Netto i wsp. 2008, Almstrup i wsp. 2010, Wermann i wsp. 2010, Ushida i wsp. 2012]. Hipometylacja genomu jest utrzymywana przez aktywny mechanizm demetylacji, prawdopodobnie taki sam jak w prawidłowych płodowych komórkach zarodkowych [Nettersheim i wsp. 2013, Kristensen i wsp. 2014]. Ponadto dochodzi do wzmożonej ekspresji genów warunkujących pluripotencjalność: *POU5F1*, *NANOG*, *TFAP2C* i *LIN28* [Looijenga i wsp. 2003, Almstrup i wsp. 2004, Skotheim i wsp. 2005, Minami i wsp. 2010, West i wsp. 2009].

Wszystkie nowotwory zarodkowe (z wyjątkiem dojrzałego potworniaka) cechują się dużą złośliwością histologiczną i agresywnym przebiegiem klinicznym. Są to jednocześnie jedne z niewielu guzów litych które można wyleczyć nawet w zaawansowanym stadium (z przerzutami odległymi). Pacjenci z guzami zarodkowymi szansę na wyleczenie zawdzięczają wrażliwości tych nowotworów na chemioterapię i radioterapię. Charakterystyczne, że wśród czynników ryzyka występują m.in.: niepłodność, w tym nieprawidłowa spermatogeneza [Møller i wsp. 1999], wnetrostwo (niezstąpione jądra) [Cook i wsp. 2009], spodziectwo (nieprawidłowe ujęcie cewki moczowej) [Trabert i wsp. 2013] i różne inne zespoły obojnactwa (dysgeneżja gonad,

obojnactwo prawdziwe, obojnactwo rzekome, zespół feminizujących jąder i aberracje chromosomowe np. zespół Klinefeltera (47,XXY)).



Rycina 16. Najczęściej występującym nowotworem TGCT jest nasieniak. U góry przedstawiony jest prawidłowy rozwój komórek gametogenicznych (spermatogeneza), począwszy od węzła zarodkowego (ICM), poprzez ich migrację PGCs do gonad pierwotnych i obecność w kanalikach plemnikotwórczych pomiędzy komórkami Sertolego. Nasieniak (*Seminoma*) ma swój początek podczas migracji lub po zasiedleniu gonad pierwotnych, gdy dochodzi do opóźnionego rozwoju gonocyту, który nie dojrzewa, lecz zachowuje fenotyp komórki embrionalnej i ostatecznie staje się komórką nowotworową. ICM – węzeł zarodkowy (ang. *Inner Cell Mass*), PGC – pierwotna komórka gametogeniczna (ang. *Primordial Germ Cell*), YST – rak pęcherzyka żółtkowego (ang. *Yolk Sac Tumor*), *Seminoma* – nasieniak, *Non-seminoma* – nienasieniak *Teratoma* – potworniak [Rajpert-De Meyts i wsp. 2016].

2.11. Komórki TCam-2 – unikatowy model badań ludzkich komórek gametogenicznych w hodowli wyprowadzonych z nasieniaka

Linia komórek TCam-2 została wyprowadzona z nasieniaka pierwotnego 35-letniego mężczyzny przez dr Kitazawę z Uniwersytetu w Ehime w Japonii [Mizuno i wsp. 1993]. Pod względem ekspresji genów markerowych komórki TCam-2 odpowiadają męskim komórkom gametogenicznym pomiędzy stadium PGCs a stadium gonocytów. Po przeszczepieniu do myszy SCID (z ciężkim złożonym niedoborem odporności, ang. *Severe Combined ImmunoDeficiency*) komórki TCam-2 tworzą klasyczną tkankę nasieniaka. W

przeciwieństwie do wcześniej wyprowadzanych ludzkich linii nasieniaka, komórki TCam-2 nie ulegają apoptozie i stanowią unikatowy, bo jedyny model męskich komórek gametogenicznych w hodowli [de Jong i wsp. 2009].

3. CEL PRACY

Celem pracy było udzielenie odpowiedzi na następujące pytania badawcze:

1. Czy geny *SPIN1*, *SPIN3* i *SPIN4* pełnią funkcję modulatorów apoptozy, proliferacji i cyklu komórkowego w modelu nasieniaka?

Funkcja *SPIN1* w powyższych procesach została opisana w kontekście: rozwoju komórek gametogenicznych ssaków, bardzo wczesnej embriogenezy oraz nowotworów. Natomiast funkcja bardzo podobnych pod względem struktury paralogów, *SPIN3* i *SPIN4*, nie została dotąd poznana. Skoro tak, interesujące było zbadanie, (1) na ile nieopisane dotąd paralogi *SPIN3* i *SPIN4* są w powyższych trzech procesach istotne oraz (2) jaka jest ich funkcjonalna współzależność, w porównaniu ze *SPIN1*. Do wyjaśnienia tych kwestii wybrano komórki TCam-2, które reprezentują jedyny model męskich komórek gametogenicznych w hodowli. Zostały one wyprowadzone z nasieniaka, który stanowi jeden z typów nowotworów jądra tzw. typu zarodkowego (TGCT).

2. Czy powyższe geny są potranskrypcyjnie regulowane przez białka PUM1, PUM2 a także ich białkowe kofaktory, NANOS1, NANOS2 oraz NANOS3?

mRNA *SPIN1* został niedawno opisany jako wchodzący w interakcję z ludzkim białkiem PUM1 oraz jako mRNA potranskrypcyjnie regulowany poprzez 3'UTR, w dojrzałym oocyocie oraz dwukomórkowym zarodku mysim. Zatem postanowiono sprawdzić, czy mRNA kodujące *SPIN1*, *SPIN3* oraz *SPIN4* są (1) potranskrypcyjnie regulowane przez białka PUM (2) oraz przez ich białkowe kofaktory NANOS. Ważną przesłanką tych badań była obecność kilku motywów PBE w regionach 3'UTR mRNA *SPIN1*, *SPIN3* oraz *SPIN4* oraz brak w mRNA paraloga *SPIN2*. Z tego powodu mRNA *SPIN2* nie został objęty badaniami.

4. MATERIAŁY

4.1. Aparatura

Urządzenie

aparat do elektroforezy pionowej PROTEAN® II xi Cell
aparat do elektroforezy pionowej Mini PROTEAN® 3 Cell
aparat do elektroforezy poziomej Wide Mini Sub™ Cell
aparat do elektroforezy poziomej mały
aparat do transferu białek (Mini Trans-Blot® Cell)
blok grzejny 16500 Dry Bath
chemiluminometr ChemiDoc™ XRS+
cytometr przepływowy FlowSight™
cytometr przepływowy S3e™ Cell Sorter
elektroporator Gene Pulser II
inkubator do hodowli komórek z przepływem CO₂
licznik scyntylicyjny
luminometr GloMax® Multi Detection System
łaźnia wodna
łaźnia wodna WB4-MS
łaźnia wodna z wytrząsaniem
kamera JuLI™ FL, Fluorescence live cell movie analyzer
komora Bürkera
mieszadło magnetyczne
mikroskop odwrócony AxioVert.A1
mikroskop odwrócony DMi8 IVD
mikrowirówka Centrifuge 5417R
mikrowirówka Centrifuge 5702
pH-metr HI9126
rotator 3025
sonikator Ultrasonic processor 251.147-1
spektrofotometr NanoDrop® ND-1000
spektrofotometr UltraSpec 2000
suszarka do żeli SE 1160
system do transfekcji linii komórkowych Neon
system do wizualizacji żeli BioDoc-It™
termocykler T100
termocykler IQ5 (real-time)
transiluminator UV
transiluminator UV Benchtop M-26
waga laboratoryjna 1600C
waga laboratoryjna 160M
waga laboratoryjna R1800
wirówka 5415 R
wirówka 5804 R
wirówka C1301T
wirówka MPW-65R
wirówka RT 6000 B
wstrząsarka typu vortex VF2
wytrząsarka Excelle E25
zasilacz do elektroforezy 2297 Macrodrive 5
zasilacz do elektroforezy Phero-stab 3000
zasilacz wysokonapięciowy E833
zasilacz wysokonapięciowy PowerPac™ Universal Power Supply

Firma

Bio-Rad
Bio-Rad
Bio-Rad
Polygen
Bio-Rad
Thermoline
Bio-Rad
Amnis
Bio-Rad
Bio-Rad
Binder
LKB Wallac
Promega
Julabo C
Biosan
GFL
NanoEntek
Knittel Glässer
IKA Labortechnik
Karl Zeiss
Leica
Eppendorf
Eppendorf
Hanna Instruments
GFL
Ultrasonic
TK Biotech
Pharmacia Biotech
Hoefer Scientific Instruments
Thermo Scientific
UVP
Bio-Rad
Bio-Rad
Ultra Lum
UVP
Medicat LTD
Medicat LTD
Sartorius
Eppendorf
Eppendorf
Labnet
MPW
Sorvall
Janke&Kunkel-Labortechnik
New Brunswick Scientific
LKB Bromma
Biotech-Fischer
Consort
Bio-Rad

4.2. Oprogramowanie

Nazwa

IDEAS® (Image Data Exploration and Analysis Software)

Firma

Amnis

Image Lab™ 5.1 Software (chemiluminometr)
INSPIRE® Software (cytometr)
ModFit LT™ Software
ProSort™ Software (cytometr)

Bio-Rad
Amnis
Verity Software House
Bio-Rad

4.3. Odczynniki

Substancja

$\alpha^{32}\text{P}$ urydyno-5'-trifosforan (3000 Ci/mmol)
adenozyno-5'-trifosforan (ATP)
agar bakteriologiczny
agaroz
akrylamid
albumina cielęca (BSA)
alkohol etylowy (etanol)
alkohol metylowy (metanol)
alkohol 2-propylowy (izopropanol)
antibiotic antimycotic solution 100x
aprotonina
baktotrypton
BD FACSCFlow™
benzamidyna
bibuła chromatograficzna 3MM
błękit bromofenolowy
błękit brylantynowy Coomassie
błękit trypanu
blona rentgenowska (radiologiczna XS-1)
bromek etydyny
buforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS)
chlorek magnezu
chlorek potasu
chlorek sodu
chloroform
cytydyno-5'-tri fosforan (CTP)
deoksyadenozyno-5'-trifosforan (dATP)
deoksytydyno-5'-trifosforan (dCTP)
deoksyguanozyno-5'-trifosforan (dGTP)
deoksytymidyno-5'-trifosforan (dTTP)
dimetylosulfotlenek (DMSO)
ditiotreitrol (DTT)
DNaza I
dodecylosiarczan sodu (SDS)
drożdżowy tRNA fenyloalaninowy
ekstrakt drożdżowy
endonukleaza NotI
endonukleaza XhoI
eter dietylowy kwasu pirowęglowego (DEPC)
fenol
filtr nitrocelulozowy do transferu białek
FlowSight Calibration Beads
fluorek 4-(2-aminoetylo)benzenosulfonylu (AEBSF)
formamid
glicerol
glicyna
glukoza
guanozyno-5'-trifosforan (GTP)
heparyna
hoechst33258
inhibitor RNaz (RNazin)

Firma

Hartmann Analytik
Promega
Bioshop
Bioshop
Bioshop
Sigma-Aldrich
POCH
POCH
POCH
Lonza
Bioshop
Difco
BD Biosciences
Sigma-Aldrich
Whatman
Bio-Rad
Serva
Sigma-Aldrich
Foton
Sigma-Aldrich
Lonza
Merck
Serva
Bioshop
POCH
Promega
Roche
Roche
Roche
Roche
Sigma-Aldrich
Bioshop
Sigma-Aldrich
Serva
Invitrogen
Difco
Thermo Scientific
Thermo Scientific
Bioshop
Bioshop
Bio-Rad
Amnis
Bioshop
Merck
Serva
Serva
Serva
Promega
Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Promega

izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	Bioshop
jodek propidyny	Sigma-Aldrich
kanamycyna	Bioshop
karbenicylina	Bioshop
kolumny filtracyjne Ultracel-10K	Millipore
kolumny filtracyjne Ultrafree-MC	Millipore
ksylencyjanol	Sigma-Aldrich
kulki agarozowe opłaszczone chityną	New England Biolabs
kwask borowy	Bioshop
kwask etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	Bioshop
leupeptyna	Bioshop
ligaza DNA T4	Promega
marker długości fragmentów DNA 1 Kb Ladder DNA	Thermo Scientific
marker długości fragmentów DNA 1 Kb+ Ladder DNA	Thermo Scientific
marker długości fragmentów DNA GeneRuler 1 kb DNA ladder	Thermo Scientific
marker długości fragmentów DNA Low DNA MASS Ladder	Thermo Scientific
marker masy białek Kaleidoscope	Bio-Rad
mieszanina inhibitorów proteaz 100x	Thermo Scientific
2-merkaptoetanol	Merck Millipore
mocznik	Serva
N-[2-hydroksyetylo]piperazyno-N'-etanosulfonian (HEPES)	Sigma-Aldrich
N,N'-metylenobisakrylamid	Bioshop
N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Bioshop
nadsiarczan amonu (APS)	Bioshop
octan sodu	Sigma-Aldrich
odczynnik Bradforda	Bio-Rad
odwrotna transkryptaza	Thermo Scientific
pepstatyna A	Sigma-Aldrich
plodowa surowica cielęca (FBS)	Hyclone
plyn scyntylny Eco Lite	ICN
polimeraza DNA Taq	Thermo Scientific
polimeraza RNA T7	Sigma-Aldrich
pożywka płynna LB (ang. <i>Lysogeny Broth</i>)	Bioshop
ProFlow™ Sort Grade 8x Sheath Fluid	Bio-Rad
ProLine™ Universal Calibration Beads	Bio-Rad
proteinaza K	Thermo Scientific
RPMI 1640 + 1x GlutaMAX	Invitrogen
RNaza A	Sigma-Aldrich
Sephadex G 25 ^{FINE}	Loba Chemie
sól potasowa kwasu poliurydynowego (polyU)	Sigma-Aldrich
spermidyna	Sigma-Aldrich
trihydroksymetyloaminometan (Tris)	Bioshop
triton X-100	Merck
Trizol	Thermo Scientific
trypsyna 10x	Lonza
Tween 20	Sigma-Aldrich
urydino-5'-tri fosforan (UTP)	Promega
utrwalacz fotograficzny	Foton
wywoływacz fotograficzny	Foton
zestaw odczynników do izolacji DNA z żelu agarozowego	Qiagen
zestaw odczynników do izolacji plazmidów w skali maxi	Qiagen
zestaw odczynników do izolacji plazmidów w skali mini	Syngen
zestaw odczynników do izolacji produktów PCR	Syngen
zestaw odczynników do ukierunkowanej mutagenyzy	Agilent
zestaw odczynników do transfekcji Neon	Thermo Scientific
zestaw substratów do chemiluminescencji (HRP)	Bio-Rad
zestaw substratów do luminescencji	Promega
zestaw do detekcji apoptozy	Beckman Coulter

4.4. Przeciwciała

A) Przeciwciała pierwszorzędowe:

- anty-DDK (FLAG[®]) (OriGene Technologies, nr kat. TA50011) mysie monoklonalne, klon 4C5, używane w Western blot (1:2500)
- anty-WINKULINA (Abcam, nr kat. Ab129002) królicze poliklonalne, używane w Western blot (1:10000)
- anty- β AKTYNA (Sigma-Aldrich, nr kat. A2066) królicze poliklonalne, używane w Western blot (1:10000)
- anty-PUM1 (Abcam, nr kat. Ab3717) kozie poliklonalne, używane w Western blot (1:5000) i immunoprecypitacji (5 μ g)
- anty-PUM2 (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc31535) kozie poliklonalne, używane w Western blot (1:250) i immunoprecypitacji (5 μ g)
- anty-NANOS1 (Everest Biotech, nr kat. EB06680) królicze poliklonalne, używane w Western blot (1:2000)
- anty-NANOS2 (Merck Millipore, nr kat. ABE252) królicze poliklonalne, używane w Western blot (1:500)
- anty-NANOS3 (Abcam, nr kat. Ab70001) królicze poliklonalne, używane w Western blot (1:1000)

B) Przeciwciała drugorzędowe

- anty-królicze IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (Sigma-Aldrich, nr kat. A6154), kozie poliklonalne, używane w Western blot (1:25000)
- anty-kozie IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc-2020), ośle poliklonalne, używane w Western blot (1:50000)
- anty-mysie IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc-2005), kozie poliklonalne, używane w Western blot (1:25000)

4.5. siRNA

siRNA kontrolne (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc37007) – mieszanina 3 siRNA niemających miejsc rozpoznania w ludzkich mRNA

siRNA PUM1 (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc62912) – mieszanina 3 siRNA mających miejsca rozpoznania w mRNA *PUM1*

siRNA PUM2 (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc44773) – mieszanina 3 siRNA mających miejsca rozpoznania w mRNA *PUM2*

siRNA SPIN1 (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc92696) – mieszanina 3 siRNA mających miejsca rozpoznania w mRNA *SPIN1*

siRNA SPIN3 (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc91032) – mieszanina 3 siRNA mających miejsca rozpoznania w mRNA *SPIN3*

siRNA SPIN4 (Santa Cruz Biotechnology, nr kat. sc90949) – mieszanina 3 siRNA mających miejsca rozpoznania w mRNA *SPIN4*

4.6. Plazmidy

Wszystkie zastosowane w niniejszej pracy plazmidy znajdują się w zasobach laboratorium profesor Jadwigi Jaruzelskiej, w Instytucie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.

A) Plazmidy reporterowe kodujące pełnej długości 3'UTR *SPIN1*, *SPIN3*, *SPIN4* lub *GAPDH* w wektorze psiCheck2 (Rycina 1) – zastosowane do badania wpływu nadekspresji białek PUM i NANOS lub wyciszenia ekspresji genów *PUM* na ekspresję lucyferazy z tego plazmidu:

- Plazmid kodujący 3'UTR *SPIN1* (NM_006717.2), pozycja od pierwszego nukleotydu za kodonem STOP 1-3429,

- Plazmid kodujący 3'UTR *SPIN3* (NM_001010862.2), pozycja od pierwszego nukleotydu za kodonem STOP 1-3339,

- Plazmid kodujący 3'UTR *SPIN4* (NM_001012968.2), pozycja od pierwszego nukleotydu za kodonem STOP 1-2816,

- Plazmid kodujący 3'UTR *GAPDH* (NM_001289746), pozycja od pierwszego nukleotydu za kodonem STOP 1-201, służąca jako kontrola negatywna dla oddziaływania z białkami PUM

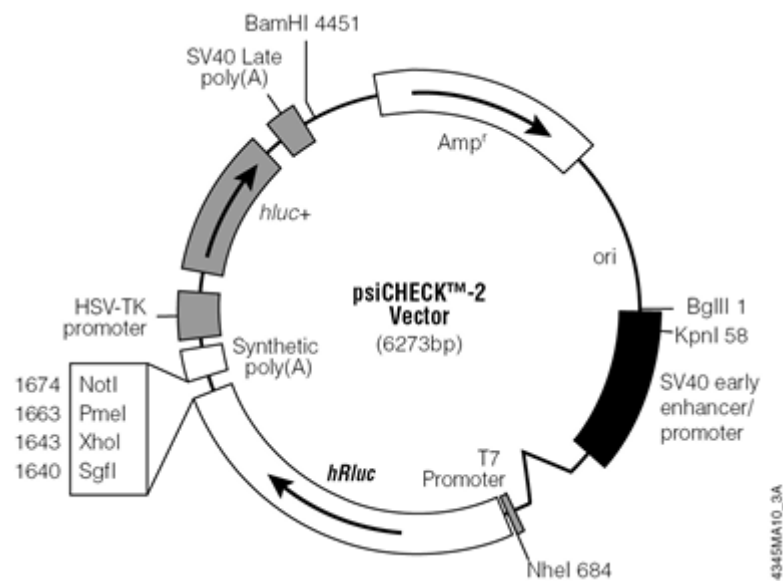
B) Plazmidy kodujące otwartą ramkę odczytu (ang. *Open Reading Frame* – ORF) ludzkich białek SPIN, PUM i NANOS w wektorze pCMV6-entry (Rycina 2) (nr kat. PS100001) – używane do nadekspresji w komórkach. Wszystkie wymienione plazmidy posiadają kilku aminokwasowe znaczniki fuzyjne Myc i DDK (FLAG[®]) na końcu karboksylowym białka (C). Plazmidy kodujące ORF białek typu dzikiego zostały zakupione w firmie OriGene Technologies:

- SPIN1 – (NM_006717.2, nr kat. RC201938)

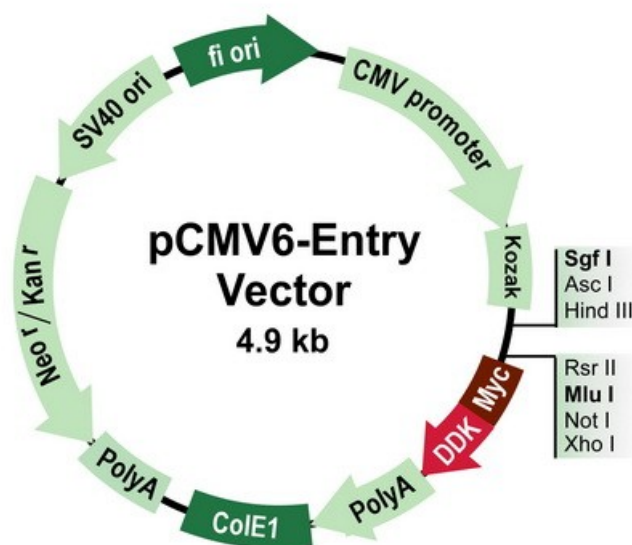
- SPIN3 – (NM_001010862.2, nr kat. RC215063)

- SPIN4 – (NM_001012968.2, nr kat. RC214332)

- PUM1 – (NM_014676, nr kat. RC201219)
- PUM2 – (NM_015317, nr kat. RC211307)
- NANOS1 – (NM_199461, nr kat. RC219123)
- NANOS1 p.P34T;S78del – Plazmid kodujący ORF białka NANOS1, z następującymi zmianami w sekwencji aminokwasów: p.Pro34Thr; p.Ser78del
- NANOS2 – (NM_001029861, nr kat. RC212815)
- NANOS3 – (NM_001098622, nr kat. RC221867)



Rycina 1. Schemat wektora psiCheck2 (firmy Promega)



Rycina 2. Schemat wektora pCMV6-entry (firmy Origene)

C) Plazmidy kodujące ORF domeny PUF (domeny wiązania RNA) białka PUM1 lub PUM2 w wektorze pTYB12 – używane do nadekspresji w bakteriach *E. coli*. Posiadają one znacznik fuzyjny, fragment inteiny, tzw. domenę wiązania chityny (ang. *Chitin Binding Domain* – CBD) na końcu aminowym białka (N). CBD poprzez wiązanie do chityny znajdującej się na kulkach agarozowych służy do oczyszczania białka fuzyjnego. Białko to o masie 45,76 kDa uzyskiwano poprzez nadekspresję w bakteriach przy użyciu zestawu IMPACT–CN firmy New England Biolabs [Spik i wsp. 2006].

4.7. Genomowe DNA wyizolowane od trzech losowych zdrowych mężczyzn służące do amplifikacji sekwencji regionów 3'UTR wszystkich trzech *SPIN*.

5. METODY

5.1. Warunki hodowli komórek TCam-2

Komórki TCam-2 hodowano w podłożu płynnym w inkubatorze o stałych warunkach temperatury (37°C) i stężenia CO₂ (5%). Pożywka hodowlana zawierała medium RPMI 1640 + 1x GlutaMAX (Invitrogen), 10% płodową surowicę cielęcą (ang. *Fetal Bovine Serum* - FBS) (Hyclone), antybiotyki bakteriobójcze penicylinę i streptomycynę oraz antybiotyk przeciwgrzybiczy amfoterycynę B (Antibiotic Antimycotic Solution, Lonza). Pasażowanie komórek rozpoczynano od usunięcia pożywki, następnie przepłukiwano komórki 1x stężonym roztworem PBS pozbawionym jonów wapnia i magnezu (zwanym dalej „roztworem PBS”, Lonza). Komórki „odklejano” od naczynia hodowlanego poprzez inkubację w 1x stężonym roztworze trypsyny (Lonza) 5 min. w 37°C. Komórki spłukiwano następnie świeżą pożywką. Ich zawiesinę rozdzielano do trzech nowych naczyń hodowlanych, a po całonocnej hodowli, kiedy komórki ponownie przywarły do podłoża, pożywkę wymieniano.

5.2. Transfekcja komórek TCam-2

Do transfekcji komórek TCam-2 używano systemu opartego na elektroporacji – Neon (Invitrogen), który jest jedynym wydajnym systemem wprowadzania DNA do tych komórek. Z płytek hodowlanych o średnicy Ø=15 cm usuwano pożywkę i komórki przemywano roztworem PBS. Tak jak przy pasażowaniu, komórki odklejały od naczynia hodowlanego poprzez inkubację w roztworze trypsyny. Komórki spłukiwano strumieniem świeżej pożywki i wirowano w probówkach typu falkon o pojemności 50 ml przy 400 rcf (ang. *relative centrifugal force* – wielokrotność ziemskiego przyspieszenia grawitacyjnego), w temp. pokojowej, 5 minut. Komórki zawieszano następnie w roztworze PBS, pobierano 20 µl, dodawano taką samą objętość błękitu trypanu (Sigma-Aldrich) celem liczenia komórek oraz wykrycia komórek martwych. Liczbę komórek określano w komorze Bürkera według wzoru: średnia liczba żywych komórek zliczona z 5 kwadratów x rozcieńczenie (czyli 2) x objętość, w której zawieszono komórki x 10⁴. Komórki wirowano ponownie jak wyżej i zawieszano w odpowiedniej objętości buforu do transfekcji – buforu R. Następnie odpowiednią liczbę komórek dodawano do wcześniej przygotowanych mieszanin DNA i poddawano elektroporacji jednym impulsem o napięciu 1000 V w czasie 40 milisekund. Po elektroporacji komórki przenoszono do wielodołkowych płytek hodowlanych (6 lub 12 dołkowe) lub o średnicy Ø=6 i Ø=10 cm zawierających uprzednio ogrzaną pożywkę RPMI 1640 + 1x GlutaMAX oraz 10% FBS,

bez dodatku antybiotyków. Do transfekcji używano następujące mieszaniny DNA w zależności od typu doświadczenia:

A/ Pomiar intensywności proliferacji komórek. Do transfekcji używano plazmidy kodujące ORF danego białka, SPIN, PUM lub NANOS, w wektorze pCMV6-entry lub pustym plazmid pCMV6-entry, jako kontrolę (**Materialy, 4.6B**). Do pojedynczej transfekcji używano ~150 tysięcy komórek TCam-2 i 1,5 µg DNA, w przeliczeniu na jeden dołek płytki 6 dołkowej, wypełniony 2 ml pożywki.

B/ Pomiar poziomu apoptozy komórek z nadekspresją białek SPIN, PUM lub NANOS. Komórki transfekowano plazmidami służącymi do nadekspresji białka (wektor pCMV6-entry) kodujące ORF SPIN, PUM, NANOS lub pustym wektorem pCMV6-entry, używanym jako kontrola (**Materialy, 4.6B**). Do pojedynczej transfekcji używano ~300 tysięcy komórek TCam-2 i 2 µg DNA na płytkę o średnicy Ø=6 cm wypełnioną 5 ml pożywki.

C/ Pomiar poziomu apoptozy komórek z wyciszoną ekspresją genów SPIN. Do transfekcji używano siRNA specyficzne do mRNA *SPIN* o końcowym stężeniu 10 nM w pożywce (**Materialy, 4.5**). Jednocześnie stosowano siRNA kontrolne, które nie rozpoznawało miejsc w ludzkich mRNA. Do pojedynczej transfekcji używano ~300 tysięcy komórek TCam-2 na płytkę o średnicy Ø=6 cm, wypełnioną 5 ml pożywki.

D/ Pomiar cyklu komórkowego. Transfekcję wykonywano analogicznie jak do pomiarów apoptozy, jednak po transfekcji komórki wysiewano na większą płytkę o średnicy Ø=10 cm wypełnioną 10 ml pożywki, by ułatwić im podziały.

E/ Testy lucyferazowe po nadekspresji białek PUM lub NANOS. W odpowiednich kombinacjach mieszaniny DNA zawierały ilościowo 10% odpowiedniej plazmidu reporterowego (wektor psiCheck2), kodującego odpowiedni 3'UTR *SPIN* lub 3'UTR *GAPDH* (**Materialy, 4.6A**), 90% plazmidu do nadekspresji białka (wektor pCMV6-entry) kodujący ORF PUM lub NANOS (**Materialy, 4.6B**) lub pustym wektorem pCMV6-entry, służący jako kontrola. W testach lucyferazowych do pojedynczej transfekcji używano ~150 tysięcy komórek TCam-2 i 1,5 µg DNA na jeden dołek płytki 12 dołkowej, wypełniony 1 ml pożywki.

F/ Testy lucyferazowe po wyciszeniu ekspresji genów PUM. Mieszaniny DNA i siRNA w odpowiednich kombinacjach zawierały ilościowo 150 ng odpowiedniego plazmidu reporterowego (wektor psiCheck2) (**Materialy, 4.6A**) i 10 nM w pożywce siRNA, specyficznego dla mRNA *PUM*, lub siRNA kontrolnego (**Materialy, 4.5**). Do testów

lucyferazowych w pojedynczej transfekcji używano ~150 tysięcy komórek TCam-2 na jeden dołek płytki 12 dołkowej, wypełniony 1 ml pożywki.

5.3. Pomiary intensywności proliferacji komórek TCam-2 przy nadekspresji białek SPIN, PUM i NANOS

Intensywność proliferacji badano poprzez pomiar stopnia konfluencji komórek TCam-2 w hodowli, mierzonej po 24, 48 i 72 godz. po transfekcji, przy użyciu kamery JuLI™ FL Fluorescence live cell movie analyzer firmy NanoEntek. Dla każdego białka, SPIN, PUM, oraz NANOS, doświadczenie wykonywano w trzech niezależnych biologicznych powtórzeniach. W każdym z nich wykonywano co najmniej pięć zdjęć pól wybranych losowo z powierzchni 10 cm² każdego dołka płytki 6-dołkowej. Każde zdjęcie analizowano automatycznie w kamerze poprzez wykreślenie powierzchni porośniętej przez komórki, w porównaniu do całej powierzchni zdjęcia. Uzyskane wyniki pomiarów konfluencji komórek znormalizowano w stosunku do konfluencji komórek kontrolnych, tzn. z nadekspresją pustego plazmidu pCMV6-entry (**Wyniki, Tabela 1 i 2**). Było to niezwykle istotne ponieważ pomimo prób wyrównania konfluencji początkowej po 24 godz. po transfekcji, nie była taka sama dla poszczególnych hodowli. Zrównoważenie konfluencji początkowej w przypadku białek powodujących wysoką śmiertelność, osiągnano poprzez wysiewanie do jednego dołka płytki 6-dołkowej komórek z kilku transfekcji. Wyniki poddawano analizie statystycznej polegającej na obliczaniu średniej, odchylenia standardowego i istotności statystycznej, czyli wartości *p* (ang. *p value*), za pomocą niesparowanego testu t-Studenta o rozkładzie jednostronnym. Następnie wykreślano krzywe proliferacji komórek TCam-2, która miała miejsce po nadekspresji białek SPIN, PUM lub NANOS, względem pustego plazmidu pCMV6-entry. Stopień nadekspresji białek sprawdzano metodą Western blot.

5.4. Wykrywanie i ocena półilościowa białek metodą Western blot (immunoblotowania)

Ekstrakt białkowy uzyskiwano poprzez lizę komórek w 2x stężonym buforze Laemli, zawierającym 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 25% glicerol; 0,01% błękit bromofenolowy oraz 350 mM DTT (dodawany bezpośrednio przed użyciem buforu). W tym celu na płytkę o średnicy Ø=10 cm i powierzchni ~75 cm² o konfluencji 80-90% dodawano 500 µl 2x buforu Laemli i zbierano lizat komórkowy. W przypadku, gdy powierzchnia płytki była mniejsza, dodawano proporcjonalnie mniej 2x buforu Laemli.

Ekstrakty białkowe dodatkowo denaturowano w 95°C, 10 min., a następnie wirowano przy 14000 rpm, w 4°C, 2 minuty. Zdenaturowane ekstrakty białkowe frakcjonowano w 12% żelu poliakrylamidowym zawierającym 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 12% akrylamid (stosunek akrylamidu do bisakrylamidu wynosił 49:1); 0,1% SDS. Mieszanka 4% żelu zagęszczającego zawierała 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% akrylamid; 0,1% SDS. Przed rozdzieleniem białek w aparacie do elektroforezy pionowej Mini PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) i w buforze zawierającym 25 mM Tris; 192 mM glicynę; 0,1% SDS przeprowadzono elektroforezę wstępną, pod napięciem 50 V, 30 minut. Po nałożeniu prób do kieszonek w żelu, elektroforezę prowadzono najpierw pod napięciem 50 V, 15 min., a następnie pod napięciem 100 V, 3 godziny. Elektrotransfer białek na filtr nitrocelulozowy o średnicy porów $\varnothing=0,2 \mu\text{m}$ (Bio-Rad) przeprowadzono w buforze zawierającym 25 mM Tris; 192 mM glicynę; 20% metanol, pod napięciem 30 V, w 4°C, przez noc. Następnie filtr blokowano w buforze 1x stężonym TBS, pH 7,4, zawierającym 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,025 mM Tris; z dodatkiem 0,1% Tween20 i 5% odtłuszczonego mleka, w temp. pokojowej, 60 minut. Reakcję z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym prowadzono w tym samym buforze, w 4°C przez noc. Następnego dnia, po trzykrotnym płukaniu filtra 1x stężonym buforem TBS z dodatkiem 0,1% Tween20 w temp. pokojowej, 10 min., inkubowano z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z peroksydazą chrzanową, w temp. pokojowej, 1 godzinę. Kolejno, filtr dwukrotnie płukano w 1x stężonym buforze TBS z dodatkiem 0,1% Tween20 oraz jeden raz w 1x stężonym buforze TBS bez detergentu. Białko wykrywano w chemiluminometrze ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad), przy pomocy zestawu substratów do reakcji chemiluminescencji (Bio-Rad), według przepisu dołączonego przez producenta.

5.5. Badanie poziomu apoptozy komórek TCam-2 z nadekspresją białek SPIN, PUM, NANOS lub z wyciszoną ekspresją genów *SPIN*

Poziom apoptozy komórek TCam-2 badano poprzez pomiar intensywności wybarwienia błony komórkowej Aneksyną V (ang. *Annexin V*) skoniugowaną z izotiocyjanianem fluoresceiny (ang. *Fluorescein IsoThioCyanate* - FITC), w cytometrze przepływowym. Aneksyna V jest białkiem używanym do oznaczenia komórek apoptotycznych, dzięki swoim właściwościom wiązania fosfatydyloseryny (ang. *phosphatidyl serine* – PS). W żywych komórkach PS jest zlokalizowana po wewnętrznej stronie błony komórkowej. Jednak podczas apoptozy PS traci asymetryczne rozmieszczenie w dwuwarstwie lipidowej

i przechodzi do strony zewnętrznej, gdzie zostaje wykryta dzięki fluorescencyjnie wyznakowanej Aneksynie V.

Drugiego dnia po transfekcji z płytek usuwano pożywkę z komórkami martwymi, a komórki przyklejone do powierzchni przepłukiwano roztworem PBS. Komórki odklejano od płytki hodowlanej poprzez inkubację w roztworze trypsyny w standardowych warunkach. Komórki splukiwano strumieniem świeżej pożywki, a uzyskaną zawiesinę komórkową przenoszono do probówek typu falkon o pojemności 15 ml i wirowano przy 400 rcf, w temp. pokojowej, 5 minut. Następnie komórki przepłukiwano zimnym roztworem PBS, przenoszono do probówek o pojemności 1,5 ml typu eppendorf i wirowano jak wyżej. Komórki barwiono przy użyciu zestawu do detekcji apoptozy – *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Beckman Coulter). Osad komórek zawieszano w 100 μ l zimnego 1x stężonego buforu wiążącego (ang. *Binding Buffer* – BB) zawierającego 1 μ l odczynnika Aneksyny V skoniugowanej z FITC (AnV-FITC) (stężenie zastrzeżone przez producenta) i 1 μ l jodku propidyny (ang. *propidium iodide* – PI) o stężeniu końcowym 2,5 ng/ μ l. Próby inkubowano w lodzie 15 min., a następnie dodawano 300 μ l zimnego 1x stężonego roztworu BB i wykonywano pomiar w cytometrze przepływowym FlowSight (Amnis) przy użyciu oprogramowania INSPIRE[®] (Amnis). Zgromadzone dane analizowano w programie IDEAS[®] (*Image Data Exploration and Analysis Software*) (Amnis). Wyniki poddawano analizie statystycznej jak wyżej. Poziom nadekspresji białek sprawdzano metodą Western blot. Wydajność wyciszania ekspresji genów *SPIN* weryfikowano w reakcji PCR w czasie rzeczywistym na matrycy cDNA.

5.6. Izolacja RNA, odwrotna transkrypcja i reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Całkowity RNA komórek TCam-2 izolowano przy użyciu odczynnika Trizol (Thermo Scientific). Do dołka o średnicy $\varnothing=3,5$ cm i powierzchni 10 cm² w płytce 6 dołkowej dodawano 1,2 ml ogrzanego do temp. pokojowej odczynnika Trizol i inkubowano 15 min. w temp. pokojowej. Po tym czasie, całość mieszaniny homogenizowano przez kilkunastokrotne pipetowanie. Homogenat przenoszono do 1,5 ml probówki typu Eppendorf, dodawano 240 μ l chloroformu i ekstrahowano 15 sekund. Po 2 min. inkubacji w temp. pokojowej, probówki wirowano przy 12000 rcf, w 4°C, 15 minut. Zgodnie z oczekiwaniem mieszanina ulegała rozdzieleniu na trzy fazy: górna – wodna zawierająca RNA, interfaza zawierająca wytrącone białka i DNA oraz dolna – organiczna, zawierająca również DNA. Fazę wodną przenoszono do świeżej probówki i dodawano 600 μ l

izopropanolu. Próby inkubowano przez 10 min. w temp. pokojowej, a następnie wirowano przy 12000 rcf, w 4°C, 10 minut. Precypitat RNA płukano w 1 ml roztworu 75% etanolu i ponownie wirowano przy 7600 rcf, w 4°C, 10 minut. Po usunięciu etanolu osad RNA suszono przez 15 min., a następnie rozpuszczano w 20 μ l wody wolnej od RNaz. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono w spektrofotometrze NanoDrop przy długości fali 260 nm. W celu określenia czystości preparatu mierzono również absorbancję przy długościach 230 i 280 nm oraz analizowano widmo absorpcyjne RNA.

Z uzyskanego RNA usuwano następnie potencjalne pozostałości DNA poprzez hydrolizę DNazą I o stężeniu końcowym 0,1 U/ μ l, w buforze 20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 2 mM MgCl₂, w temp. pokojowej, 20 minut. Następnie enzym inaktywowano przy użyciu EDTA o stężeniu końcowym 4,55 mM i denaturowano w 75°C, 5 minut. Wyizolowany RNA przepisano następnie na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji (ang. *Reverse Transcription* – RT). W tym celu do uzyskanego RNA w objętości 10 μ l dodawano 4 μ l buforu reakcyjnego (skład zastrzeżony przez producenta) zawierającego m. in. trifosforany deoksyrybonukleozydów, heksamery DNA o losowej sekwencji i oligomer oligo(dT)₁₈ oraz 2 μ l (stężenie zastrzeżone przez producenta) mieszaniny odwrotnej transkryptazy – Maxima™ oraz inhibitora RNaz - RiboLock™ (Thermo Scientific). Całość mieszaniny reakcyjnej uzupełniano wodą do objętości 20 μ l. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w następujących warunkach: przyłączenie heksamerów w 25°C, 10 min.; przyłączenie oligo(dT)₁₈ i synteza w 50°C, 35 min.; denaturacja w 85°C 5 minut. Po zakończeniu reakcji mieszaninę zawierającą cDNA rozcieńczano 8-krotnie. Uzyskany w ten sposób cDNA zastosowano w ilościowej reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) w czasie rzeczywistym przy użyciu termocyklera iQ5 (Bio-Rad) oraz starterów specyficznych dla ORF *PUM1* i 2, *SPIN1*, 3 i 4 oraz *GAPDH*, *β AKTYNY* i *ARNT* jako kontroli normalizacji. Reakcja prowadzona była w objętości 20 μ l w buforze zawierającym 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 3,5 mM MgCl₂; 10 nM fluoresceiny; 0,2x stężony SybrGreen (Sigma-Aldrich); 50 μ M każdego dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,2 μ M startera F i R; 0,5 jednostki polimerazy DNA JumpStart™ Taq (Sigma-Aldrich). Reakcję prowadzono w następujących warunkach: 1/ denaturacja wstępna w 95°C, 2,5 min.; 2/ 40 cykli amplifikacji: denaturacja w 95°C, 15 s; przyłączenie starterów w określonej temperaturze dla każdej pary starterów (**Tabela 1**), 10 s; synteza w 72°C, 15 sekund. Dla każdego cDNA i dla każdej pary starterów reakcja prowadzona była w 3 powtórzeniach.

Tabela 1. Lista par starterów i optymalna temperatura ich przyłączenia w amplifikacji w ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Nazwa startera	Sekwencja startera 5' → 3'	Długość startera [nt]	T _{amp} [°C]	Długość produktu PCR [nt]
GAPDHF	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT	24	56	307
GAPDHR	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC	24		
βAKTYNAF	CACCACACCTTCTACAATG	19	60	162
βAKTYNAR	TAGCACAGCCTGGATAG	17		
ARNTF	CCACAGGAACCTCTTAGGAA	19	54	117
ARNTR	CATGACAGACAGCACTTG	18		
PUM1F	TGATGTGATGGACAAGAC	18	56	97
PUM1R	AGAGTTCTGGCAATTACC	18		
PUM2F	CAGCCACAGTCACTACAG	18	60	78
PUM2R	GCAGCCATAAGGATGAGTT	19		
SPIN1F	TACCAACTCTTAGATGAT	18	53	177
SPIN1R	TTCTACTTGATGAATGAC	18		
SPIN3F	ATGAACCTCTAACACAGT	18	53	158
SPIN3R	AACTCTATTAGGAAGGACTT	20		
SPIN4F	CACGCTGCTTGATGACTA	18	59	75
SPIN4R	GCTCCTGTTCTGCTGTAG	18		

5.7. Analiza cyklu komórkowego TCam-2 z nadekspresją białek SPIN, PUM, NANOS lub z wyciszoną ekspresją genów *SPIN*

Cykl komórkowy analizowano w cytometrze przepływowym po utrwaleniu komórek. Analiza polegała na pomiarze dystrybucji DNA wybarwionego jodkiem propidyny w poszczególnych fazach cyklu. W tym celu drugiego dnia po transfekcji z płytek hodowlanych usuwano pożywkę by pozbyć się komórek martwych przy czym pozostałe przyklejone komórki przepłukiwano roztworem PBS. Komórki odklejano poprzez inkubację w roztworze trypsyny w standardowych warunkach. Oderwane od podłoża komórki zawieszono w świeżej pożywce przenoszono do probówek typu falkon o pojemności 15 ml i wirowano przy 400 rcf, w temp. pokojowej, 5 minut. Następnie przepłukiwano je zimnym roztworem PBS i wirowano jak wyżej. Osad komórek zawieszano w małej objętości ~0,5 ml roztworu PBS, a następnie kroplami dodawano 100% zimnego metanolu przy ciągłym mieszaniu na wstrząsarce (ang. *vortex mixer*). Po 15 min. inkubacji w lodzie utrwalone komórki wirowano przy 200 rcf, w temp. pokojowej, 5 minut. Następnie przepłukiwano je 5 ml zimnego roztworu PBS i ponownie wirowano. Osad komórek zawieszano w 1 ml roztworu PBS zawierającego 50 µg/ml jodku propidyny, do wybarwienia DNA oraz 330 µg/ml RNazy A, do hydrolizy RNA które mogłoby być źródłem tła podczas pomiarów. Próby inkubowano w 37°C, 15 min., a następnie w lodzie, 1 godzinę. Po inkubacji próby wirowano przy 200 rcf, w temp. pokojowej, 5 minut, a osad komórek zawieszano w 500 µl zimnego roztworu PBS

i wykonywano pomiar w cytometrze przepływowym S3e™ Cell Sorter (Bio-Rad). Uzyskane dane wstępnie analizowano w programie ProSort™ Software (Bio-Rad), a ostatecznie w programie ModFit LT™ firmy Verity Software House. Wyniki poddawano analizie statystycznej jak wyżej. Nadekspresję białek sprawdzano metodą Western blot. Wydajność wyciszania ekspresji genów *SPIN* weryfikowano metodą PCR w czasie rzeczywistym, na matrycy cDNA.

5.8. Analiza morfologii jąder komórek TCam-2 z nadekspresją białek SPIN

Ta analiza była kontynuacją eksperymentu dotyczącego pomiaru intensywności proliferacji. Przeprowadzono ją w 72 godz. po transfekcji na komórkach wybarwionych odczynnikiem Hoechst33258 (Sigma-Aldrich). Do 2 ml pożywki na płytce 6 dołkowej dodawano odczynnik Hoechst33258 o końcowym stężeniu 1 µg/ml i inkubowano 1 godz. w inkubatorze, w standardowych warunkach. Po zakończeniu komórki przemywano roztworem PBS i wykonywano zdjęcia w świetle widzialnym i ultrafioletowym (UV wzbudzało fluorescencję związanego z DNA odczynnika Hoechst33258) w mikroskopie DMI8 IVD (Leica).

5.9. Immunoprecypitacja RNA w komórkach TCam-2 z zastosowaniem przeciwciał anty-PUM1 i anty-PUM2

Z płytek o średnicy Ø=10 cm z komórkami o konfluencji 80-90% usuwano pożywkę, a następnie dwukrotnie płukano zimnym roztworem PBS w 4°C. Komórki mechanicznie odrywano od naczynia hodowlanego i zawieszano w 500 µl zimnego roztworu PBS i wirowano przy 400 rcf, w 4°C, 5 minut. Komórki zawieszano następnie w 100 µl buforu do lizy z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz i 0,1 U/µl inhibitora RNaz (Merck Millipore, skład odczynników jest zastrzeżony przez producenta). Lizę komórek prowadzono w rotatorze, w 4°C, 30 minut. Lizaty wirowano następnie przy 14000 rpm, w 4°C, 5 minut. Uzyskany supernatant zastosowano w immunoprecypitacji. W tym celu 50 µl kulek magnetycznych opłaszczonych białkami A i G (Merck Millipore) płukano dwukrotnie 500 µl buforu płuczającego (Merck Millipore, skład zastrzeżony przez producenta). Następnie zawieszano w 100 µl buforu płuczającego z dodatkiem 5 µg przeciwciała anty-PUM1, anty-PUM2 lub 5 µg oczyszczonej z surowicy koziej frakcji IgG zastosowanej, jako kontrola negatywna. Wiązanie przeciwciał lub IgG z kulkami prowadzono w rotatorze w temp. pokojowej, 30 minut. Po zakończeniu inkubacji kulki dwukrotnie płukano 500 µl buforu płuczającego. Do kulek związanych z przeciwciałem

anty-PUM1, anty-PUM2 lub frakcją IgG dodawano 1 ml mieszaniny immunoprecypitacyjnej. Zawierała ona 100 μ l lizatu w buforze płuczącym z dodatkiem 17,5 mM EDTA i 0,2 U/ μ l inhibitora RNaz. Powyższą mieszaninę inkubowano w rotatorze, w 4°C, 3 godziny. Następnie usuwano supernatant przy użyciu separatora magnetycznego (Thermo Scientific), a kulki płukano sześciokrotnie 500 μ l buforu płuczącego. Obecność białek PUM1 lub PUM2 na kulkach związanych z przeciwciałami, a ich brak na kulkach związanych z IgG wykazano przy pomocy metody Western blot. Do tej kontroli zastosowano 1/10 objętości kulek (5 μ l) w 15 μ l 2x stężonego buforu Laemmli. Pozostałą objętość kulek zawieszano w 150 μ l buforu płuczącego zawierającego 1% SDS i 180 μ g proteiny K i inkubowano z wytrząsaniem w 55°C, 30 minut. Następnie supernatant oddzielano od kulek w separatorze magnetycznym. Do supernatantu dodawano 350 μ l buforu RLT Plus (Qiagen, skład buforu zastrzeżony przez producenta) i całość nakładano na kolumnkę zawierającą złożę wiążące DNA. Wirowano przy 14000 rpm w temp. pokojowej, 30 sekund. Do przesączu z kolumnki dodawano 750 μ l 100% etanolu a następnie całość nakładano na kolumnkę zawierającą złożę wiążące RNA. Wirowano przy 14000 rpm w temp. pokojowej, 20 sekund. Kolumnkę dwukrotnie płukano buforem RPE (Qiagen, skład buforu zastrzeżony przez producenta) a następnie wirowano przy 14000 rpm w temp. pokojowej, 5 min. celem usunięcia pozostałości buforu. Następnie RNA eluowano z kolumnki sterylną wodą wolną od RNaz, w objętości 15 μ l. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono na spektrofotometrze NanoDrop przy długości fali 260 nm. W celu określenia czystości preparatu mierzono również absorbancję przy długościach fali 230 i 280 nm oraz analizowano widmo absorpcyjne RNA. Następnie przeprowadzano odwrotną transkrypcję i reakcję PCR w czasie rzeczywistym, zgodnie z opisem powyżej.

5.10 Przygotowanie plazmidów reporterowych: amplifikacja i klonowanie

Plazmidy reporterowe kodujące pełnej długości 3'UTR *SPIN1*, *SPIN3* lub *SPIN4* przygotowywano w wektorze psiCheck2 (Promega) kodującym ORF zarówno lucyferazy *Firefly* (luminescencja miareczkująca), jak i lucyferazy *Renilla* (luminescencja badana). Sekwencje starterów do amplifikacji 3'UTR *SPIN* zaprojektowano na podstawie sekwencji dostępnych w bazie danych NCBI. Startery do amplifikacji zaprojektowano w taki sposób, by każdy starter 5'→3' (ang. *forward*) zawierał dodatkowo sekwencję miejsca rozpoznania dla enzymu restrykcyjnego XhoI, natomiast starter 3'→5' (ang. *revers*) dla enzymu restrykcyjnego NotI lub XhoI w przypadku 3'UTR *SPIN3*. Sekwencje

starterów zaprojektowano, przyjmując jako temp. topnienia (T_m) fragmentu komplementarnego 54-59°C, a całego startera 64-67°C. Temp. topnienia (T_m) starterów obliczono wg wzoru:

$$T_m = 59,457 + (0,41) \times (\%GC) - 500/l$$

%GC oznacza procent par GC, a litera l – liczbę nukleotydów, czyli długość odpowiednio fragmentu komplementarnego lub startera. Dane dotyczące długości poszczególnych starterów i produktów amplifikacji zamieszczono w **Tabeli 2**.

Tabela 2. Lista par starterów do amplifikacji pełnej długości 3'UTR *SPIN*. W sekwencji każdego startera podkreślono miejsce rozpoznania dla enzymu restrykcyjnego.

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'→3'	Długość startera [nt]	Długość produktu PCR [nt]
SPIN1F	ACGTCGAGCTCGAGATGTCATCACAAACTCTGCCAAATTTG	41	3445
SPIN1R	ATTAATGCGGCCGCGAGTCAGGAGTTGCACATAAAGGG	37	
SPIN3F	GCACGTCTCGAGAGGTCATCTTGAAATTTGCC	32	3362
SPIN3R	GCCGACTCGAGAGGGATTAAGATATCAGCTTTAATATATTG	43	
SPIN4F	ATCAGTACTCGAGATTCTTTGTGCTCTTTAGAGAAGTTGTGG	42	2855
SPIN4R	ATTAATGCGGCCGCAATGTTTTCAGAATTAGATCTAGGTGAC	42	

Całe regiony 3'UTR *SPIN* amplifikowano z zastosowaniem dwustopniowej reakcji PCR ze względu na obecność sekwencji starterów miejsc rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych, które nie posiadały komplementarnego odpowiednika w matrycy. Warunki amplifikacji pod względem składu, temperatury i czasów reakcji były identyczne dla 3'UTR *SPIN1* i *SPIN4*. Reakcję prowadzono w objętości 50 µl w 1x stężonym buforze Advantage 2[®] PCR Buffer zawierającym: 40 mM Trityna–KOH pH 8,7; 0,3 mM Tris-HCl pH 8,0; 15 mM octan potasu; 3,5 mM octan magnezu; 1,5 mM KCl; 1 µM EDTA; 3,75 ng/µl BSA; 0,0005% Tween20; 0,0005% Nonidet P40; 1% glicerol; startery o stężeniu 200 nM każdy; dNTP 200 µM każdy i 1x stężoną mieszaną polimeraz Advantage 2[®] (Clontech). Matrycę do amplifikacji stanowił genomowy DNA wyizolowany od trzech losowych zdrowych mężczyzn w stężeniu końcowym 4 – 5 ng/µl. Reakcję prowadzono w następujących warunkach: denaturacja wstępna w 95°C, 1 min.; następnie 12 cykli amplifikacji (denaturacja w 95°C, 30 s; hybrydyzacja starterów w 59°C, 30 s i synteza w 68°C, 3 min.) i kolejnych 18 cykli amplifikacji (denaturacja 95°C, 30 s; hybrydyzacja starterów i synteza 68°C, 3 min.) oraz synteza końcowa w 68°C, 3 minuty. Natomiast w przypadku 3'UTR *SPIN3* reakcję prowadzono w 1x stężonym buforze Advantage[®] GC-Melt LA Buffer (skład buforu jest zastrzeżony przez producenta);

startery o stężeniu 500 nM każdy; dNTP 400 μ M każdy i 1x stężoną (0,05 U/ μ l) mieszanę polimeraz Advantage[®] GC Genomic LA (Clontech). Warunki reakcji były następujące: denaturacja wstępna w 95°C, 1 min.; następnie 15 cykli amplifikacji (denaturacja w 94°C, 30 s; hybrydyzacja starterów w 59°C, 30 s i synteza w 72°C, 3 min.) i kolejnych 20 cykli amplifikacji (denaturacja 94°C, 30 s; hybrydyzacja starterów 68°C, 30 s i synteza 72°C, 3 min.) oraz synteza końcowa w 72°C, 10 minut.

Produkty amplifikacji PCR izolowano przy użyciu zestawu firmy Syngen. Wydajność izolacji DNA sprawdzano wstępnie przy pomocy spektrofotometru NanoDrop (Thermo Scientific), a następnie elektroforetycznie w 1 % żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny, w buforze TBE, jw. Po zakończeniu frakcjonowania DNA oceniano w świetle UV oraz wykonywano dokumentację fotograficzną.

Oczyszczone produkty, jak również plazmid psiCheck2 poddawano hydrolizie enzymami restrykcyjnymi NotI oraz XhoI. Reakcję prowadzono w objętości 50 μ l mieszaniny zawierającej 2,5 μ g DNA, 25 jednostek każdego z dwóch enzymów w 1x stężonym buforze Orange zawierającym 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 2 μ g BSA w 37°C, 5 godzin. Fragment DNA po trawieniu frakcjonowano elektroforetycznie po uprzednim dodaniu buforu obciążającego o stężeniu końcowym 45 mM Tris, 45 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, 5% glicerol, 0,04% błękit bromofenolowy i 0,04% ksylencyjanol. Żel agarozowy o stężeniu 1% zawierał bromek etydyny o końcowym stężeniu 0,4 μ g/ml. Rozdział prowadzono w buforze TBE zawierającym 45 mM Tris, 45 mM kwas borowy i 1 mM EDTA, 1 godz. przy napięciu 100 V. Żel analizowano w świetle UV wobec markera mas 1kb DNA Plus Mass Ladder (Thermo Scientific), a następnie wycinano odpowiednie prążki. Izolację DNA z żelu agarozowego przeprowadzano za pomocą zestawu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Zgodnie z załączoną procedurą fragmenty żelu inkubowano w 3 objętościach buforu QG (skład buforu jest zastrzeżony), tzn. 300 μ l buforu na każde 100 mg żelu w 50°C, 10 min. i kilkakrotnie mieszano. Dodawano równoważną objętość izopropanolu (100 μ l na 100 mg żelu), próbę przenoszono na kolumnienkę ze złożem o powinowactwie do DNA i wirowano przy 14000 rpm, w temp. pokojowej, 1 minutę. Niezwiązane zanieczyszczenia usuwano przez przepłukanie kolumnienki buforem PE (skład buforu jest zastrzeżony), wirowano jw. a na końcu DNA eluowano w 30 μ l wody. Stężenie DNA oceniano przy pomocy spektrofotometru NanoDrop oraz w 1% żelu agarozowym jak wyżej względem markera GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific).

Ligację prowadzono w proporcji molowej insertu do zlinearyzowanego plazmidu 3:1 i 1:1 w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 150 ng wektora psiCheck2, 1 U ligazy T4 (Promega) oraz 30 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP;. Reakcję prowadzono w 4°C, 16 godzin. Elektrokompetentne komórki bakteryjne *Escherichia coli* (szczep DH5α) transformowano mieszaniną ligacyjną metodą elektroporacji. W tym celu, do jałowej probówki zawierającej 50 µl zawiesiny bakterii elektrokompetentnych, zawieszonych w rozworze 10% glicerolu dodawano 3 µl mieszaniny ligacyjnej i inkubowano 1 min. w lodzie. Elektroporację wykonywano pod napięciem 2,5 kV w aparacie Gene Pulser II (Bio-Rad). Do zawiesiny bakterii dodawano następnie 1 ml pożywki SOC pH 7,0 zawierającej 2% baktotrypton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glukozę i inkubowano z wytrząsaniem przy 125 rpm, w 37°C, 1 godzinę. Zawiesinę bakterii wysiewano następnie na płytki z agarem w podłożu LB zawierającym karbenicylinę o stężeniu końcowym 50 µg/ml i inkubowano w 37°C, kilkanaście godzin.

W celu identyfikacji plazmidów rekombinowanych, kolonie bakteryjne namnażano w 3 ml pożywki LB z karbenicyliną o stężeniu końcowym 50 µg/ml, z wytrząsaniem przy 250 rpm, w 37°C, 16 godzin. Po odwirowaniu hodowli bakterii przy 14000 rpm, w temp. pokojowej, 2 min., rekombinowane plazmidy izolowano przy użyciu zestawu do izolacji plazmidów w skali mini (Syngen). W tym celu bakterie zawieszano w 100 µl buforu I zawierającym RNazę A. Do zawiesiny dodawano 200 µl buforu II – lizującego i inkubowano w temp. pokojowej, minutę. Następnie dodawano 350 µl buforu III – neutralizującego i inkubowano w temp. pokojowej, minutę (skład wszystkich powyższych buforów jest zastrzeżony), po czym lizat bakteryjny wirowano przy 14000 rpm w temp. pokojowej, 5 minut. Supernatant przenoszono do kolumny wiążącej DNA i wirowano 2 min. jak wyżej. Po dwukrotnym traktowaniu 750 µl buforem do płukania (skład zastrzeżony przez producenta) plazmid eluowano 50 µl sterylnej wody. Obecność oraz długość insertów w wektorze psiCheck2 sprawdzano cięciem restrykcyjnym przy pomocy enzymów: NotI i XhoI w 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 1 µg rekombinowanego plazmidu, 10 jednostek każdego z enzymów w buforze Orange, w 37°C, godzinę. Produkty trawienia frakcjonowano w 1% żelu agarozowym. Plazmidy zawierające inserty o odpowiedniej długości, poddawano kontrolnemu sekwencjonowaniu w laboratorium usługowym firmy Genomed.

Rekombinowane plazmidy przeznaczone do transfekcji komórek TCam-2 przygotowywano za pomocą zestawu Plasmid Maxi Kit firmy Qiagen. Całonocną hodowlę

bakterii *E. coli* (szcep DH5 α) w objętości 100 ml wirowano w probówkach typu falkon o pojemności 50 ml przy 4000 rcf w 4°C, 10 minut. Następnie bakterie zawieszano w 10 ml buforu P1 zawierającego RNazę A i dodawano 10 ml buforu lizującego P2, mieszano oraz inkubowano w temp. pokojowej, 5 minut. Po zakończonej inkubacji dodawano 10 ml buforu neutralizującego P3, mieszano i pozostawiano próby w lodzie, 20 min., po czym wirowano przy 18000 rcf, w 4°C, 40 minut. Supernatant przenoszono do świeżej probówki typu falkon o pojemności 50 ml i powtórnie wirowano przy 18000 rcf, w 4°C, 20 minut. W tym czasie kolumny do izolacji DNA równoważono 10 ml buforu QBT. Supernatant nakładano na kolumny, następnie płukano je dwukrotnie w 30 ml buforu QC. Plazmidowy DNA eluowano z kolumny 15 ml buforu QF (skład wszystkich powyższych buforów jest zastrzeżony przez producenta). Do eluatu dodawano 11 ml izopropanolu i wirowano przy 18000 rcf, w 4°C, 40 minut. Osad przemywano 5 ml 70% etanolu i wirowano przy 18000 rcf, w 4°C, 15 minut. Osad DNA rozpuszczano w 250 μ l sterylnej wody. Stężenie plazmidowego DNA mierzone w spektrofotometrze NanoDrop przy długości fali 260 nm. W celu określenia czystości preparatu mierzone również absorbancję przy długościach 230 i 280 nm.

5.11. Testy lucyferazowe

Pomiary luminescencji wykonywano około 24 godz. po transfekcji. Pożywkę z płytek 12 dołkowych usuwano by pozbyć się komórek martwych, a pozostałe komórki przyklejone do powierzchni przepłukiwano zimnym roztworem PBS. Następnie do każdego dołka płytki hodowlanej dodawano 250 μ l 1x stężonego buforu lizującego – Passive Lysis Buffer (Promega, skład buforu zastrzeżony przez producenta) i prowadzono lizę na kołyszce laboratoryjnej, w temp. pokojowej, 1 godzinę. Po tym czasie 20 μ l lizatu przenoszono do białej nieprzezroczystej płytki 96-dołkowej (Corning). Pomiar luminescencji dla każdej hodowli w danym dołku płytki hodowlanej wykonany był dwukrotnie, a w każdym eksperymencie wykonano trzy powtórzenia techniczne. Do pomiaru ekspresji genów reporterowych używano luminometru z automatycznymi iniektorami Glomax Multi Detection System (Promega), który wstrzykiwał 50 μ l substratu dla lucyferazy *Firefly* (LAR II), a następnie 50 μ l mieszaniny odczynnika wygaszającego luminescencję lucyferazy *Firefly* i substratu dla lucyferazy *Renilla* (Stop&Glo). Sygnał luminescencji rejestrowano za każdym razem przez 10 s, dokładnie po 2 s od dodania substratu. Uzyskane wyniki poddawano analizie statystycznej. Mianowicie obliczano stosunek luminescencji lucyferazy *Renilla* do *Firefly* dla każdej próby, a z sześciu

pomiarów dla każdej z kombinacji obliczano średnią oraz odchylenie standardowe. Stosunek luminescencji obu lucyferaz (ang. *Relative Luciferase Units* – RLU) w poszczególnych próbach przedstawiano w procentach, a jako 100% przyjmowano RLU próby transfekowanej plazmidem reporterowym oraz pustym wektorem pCMV6-entry.

5.12. Mutageneza ukierunkowana motywów A i B w 3'UTR *SPIN3*

Mutagenezie ukierunkowanej poddano wszystkie pięć motywów A (AUUGUA) i B (GUUGU) obecnych w pełnej długości 3'UTR *SPIN3* w wektorze psiCheck2 lub we fragmencie 3'UTR *SPIN3* w wektorze pUC18, z użyciem zestawu QuickChange II XL SiteDirected Mutagenesis Kit (Agilent). Zaprojektowano w tym celu pięć par starterów, których sekwencje oraz wprowadzane dzięki nim substytucje nukleotydowe przedstawiono w **Tabeli 3**. Temp. topnienia (T_m) starterów obliczono wg wzoru:

$$T_m = 81,5 + (0,41) (\%GC) - 675/l - \%niesparowania$$

%GC oznacza procent par GC, litera l – liczbę nukleotydów, czyli długość startera, a %niesparowania oznacza procent niesparowania.

Tabela 3. Charakterystyka starterów do mutagenezy 3'UTR mRNA *SPIN3*. W sekwencji startera zaznaczono nukleotydy wprowadzające mutacje.

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'→3'	Długość startera [nt]	T_{melt} [°C]	T_{amp} [°C]	Zmiana
SP3B1F	GGCATT TTTTATTATGTTGTTGATAccacATTATTTGGAG	39	66,55	52	TTGT >ccac
SP3B1R	CTCCAAATAATgtggTATCAACAACATAATAAAAATGCC				
SP3A1B1F	GGCATT TTTTATTATaccacTGATACCACATTATTTGGAG	39	65,04	52	GTTGT >accac
SP3A1B1R	CTCCAAATAATGTGGTATCAgtggATAATAAAAATGCC				
SP3A2F	CATTGTATAATTaccacCAGCTATGTCAGG	30	58,73	50	GTTGT >accac
SP3A2R	CCTGACATAGCTGgtggAATTATACAATG				
SP3B2F	GGCTGGACATAAccacAAATTAGGGCTGC	29	65,64	52	TTGT >ccac
SP3B2R	GCAGCCCTAATTTgtggTTATGTCCAGCC				
SP3B3F	GCTATCTTTGGGAGTCAccacATAATTACCACCAGCTATG	40	73,07	60	TTGT >ccac
SP3B3R	CATAGCTGGTGGTAATTATgtggTGACTCCCAAAGATAGC				

Reakcję mutagenezy prowadzono w 25 µl mieszaniny zawierającej 1 ng/µl matrycy (czyli plazmid psiCheck2 z 3'UTR *SPIN3*); 5 ng/µl obu starterów; 0,05 U/µl polimerazy Pfu Ultra; 0,5 µl mieszaniny dNTP (stężenie zastrzeżone przez producenta); bufor reakcyjny (skład zastrzeżony przez producenta) oraz 1,5 µl buforu QuickSolution (skład zastrzeżony przez producenta). Amplifikację prowadzono w następujących warunkach: 1/ denaturacja wstępna w 95°C, 1 min., 2/ 16 cykli amplifikacji DNA (denaturacja

w 95°C, 50 s; przyłączanie starterów określonej temp. dla każdej pary starterów (**Tabela**), 50 s; synteza w 68°C, 6 min.), 3/ amplifikacja końcowa w 68°C, 6 minut. Produkt PCR z wprowadzoną mutacją nie jest metylowany, dlatego do mieszaniny reakcyjnej dodawano 10 U enzymu DpnI, który hydrolizuje jedynie metylowane DNA, czyli pierwotne matryce typu dzikiego zastosowane do amplifikacji. Specyficzne cięcie metylowanego DNA prowadzono w 37°C, 2 godziny. Po zakończeniu reakcji hydrolizy enzymem DpnI DNA wytrącano poprzez dodanie 3 objętości 96% etanolu i wirowano przy 14000 rpm, w 4°C, 30 minut. Osad DNA rozpuszczano w 4 µl wody. Transformację elektrokompetentnych bakterii *E. coli* szczepu DH5α przeprowadzono analogicznie jak wyżej. Wyizolowane plazmidy poddawano sekwencjonowaniu w laboratorium usługowym firmy Genomed.

5.13. Amplifikacja matryc do transkrypcji *in vitro*

Fragment 3'UTR *SPIN3* z motywami A i B służący jako matryca do transkrypcji *in vitro* amplifikowano z zastosowaniem dwustopniowej reakcji PCR ze względu na obecność sekwencji promotorowej, która nie posiadała komplementarnego odpowiednika w matrycy. Reakcję prowadzono w objętości 20 µl w buforze zawierającym: 40 mM Trityna–KOH, 15 mM octan potasu, 3,5 mM octan magnezu, 1,5 mM MgCl₂, 3,75 ng/µl BSA, 0,005% Tween20, 0,005% Nonidet P40, startery o stężeniu 0,5 µM każdy (**Tabela 4**), dNTP 50 µM każdy i 0,05 U polimerazy Taq (Thermo Scientific). Matrycę do amplifikacji stanowiło plazmidowe DNA zawierające pełnej długości region 3'UTR *SPIN3* typu dzikiego lub zmutowany w wektorze psiCheck2 w stężeniu 5 ng/µl. Amplifikację prowadzono w następujących warunkach: denaturacja wstępna w 95°C, 3 min., następnie 15 cykli amplifikacji (denaturacja 95°C, 30 s, hybrydyzacja starterów 58°C, 30 s i synteza 72°C, 1,5 min.) i kolejnych 20 cykli amplifikacji (denaturacja 95°C, 30 s, hybrydyzacja starterów 68°C, 30 s i synteza 72°C, 1,5 min.) oraz synteza końcowa w 72°C, 5 minut.

Tabela 4. Para starterów do amplifikacji fragmentu 3'UTR *SPIN* z motywami PBE jako matryca do transkrypcji *in vitro*.

Nazwa startera	Sekwencja startera 5' → 3'	Długość startera [nt]	Długość produktu PCR [nt]
XTrF	GGCGCCGGTAATACGACTCACTATAGGGTTCAAACCTAAGGC	41	205
XTrR	GGCTACATTACACCCTAGACTGAAAATTTGATCACAATTGCAGCC	46	

Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydydy jak opisano wcześniej (**Metody 5.10**). Żel analizowano

w świetle UV, a następnie wycinano prążki odpowiadające długością oczekiwanym matrycom do transkrypcji. Izolację DNA z żelu agarozowego przeprowadzano za pomocą zestawu QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen zgodnie z załączoną procedurą i jak opisano wcześniej (**Metody 5.10**). Wydajność izolacji DNA z żelu sprawdzano wstępnie przy pomocy spektrofotometru NanoDrop, a następnie elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny. Po zakończeniu frakcjonowania DNA oceniano w świetle UV oraz wykonywano dokumentację fotograficzną.

5.14. Transkrypcja *in vitro* fragmentu 3'UTR *SPIN3* typu dzikiego i zmutowany

Transkrypcja *in vitro* prowadzono w objętości 25 μ l mieszaniny reakcyjnej, zawierającej matrycę DNA 20 ng/ μ l; ATP, CTP, GTP 25 mM każdy; 1 mM UTP; 10 mM DTT; 40 mM Tris-HCl pH 7,5; 24 mM MgCl₂, 2 mM spermidyna; 0,01% triton X-100; 0,5 U/ μ l RNazin (inhibitor RNaz); 60 U polimerazy RNA T7 oraz 20 μ Ci³²P UTP o aktywności 3000 Ci/mM; znakowany w pozycji α . W przypadku syntezy transkryptów nieradioaktywnych, UTP stosowano w stężeniu 25 mM, takim jak pozostałe trifosforany nukleozydów. Reakcję prowadzono w 37°C, 20 godzin.

Po zakończeniu transkrypcji *in vitro* do prób dodawano bufor obciążający o stężeniu końcowym 1,6 M mocznik; 40 mM EDTA; 0,02% ksylencyjanol i 0,02% błękit bromofenolowy, a następnie denaturowano w temp. 75°C, 5 min. RNA rozdzielano elektroforetycznie w 5% denaturującym żelu poliakrylamidowym (stosunek akrylamidu do bisakrylamidu 29:1) zawierającym 7 M mocznik, w buforze TBE zawierającym 90 mM Tris; 90 mM kwas borowy i 2 mM EDTA, 1,5 godz., przy mocy 15 W. Frakcjonowanie poprzedzone było 1,5 godz. elektroforezą wstępną, w warunkach jak wyżej. Po zakończeniu rozdziału żel eksponowano w obecności kliszy rentgenowskiej, by precyzyjnie wyciąć fragmenty z żelu zawierające transkrypty. W przypadku RNA nieznakowanego żel barwiono bromkiem etydyny o stężeniu 10 μ g/ml i analizowano w świetle UV. Po wycięciu z żelu radioaktywne i nieradioaktywne transkrypty eluowano w 37°C, 16 godz. z wytrząsaniem w obecności równoważnej objętości fenolu o pH 4,5 i 4 objętości 0,3 M octanu sodu o pH 5,3. Po zakończeniu elucji próby wirowano przy 13000 rpm, w temp. pokojowej, 1 minutę. RNA ekstrahowano z fazy wodnej równoważną objętością mieszaniny fenol – chloroform (1:1), po czym wirowano jak wyżej. Ponowną ekstrakcję fazy wodnej zawierającej RNA prowadzono w obecności chloroformu w stosunku 1:1 oraz wirowano jak wyżej. RNA wytrącano 3 objętościami 96% alkoholu etylowego w temp. -20°C, 20 godz. i wirowano przy 13000 rpm w 4°C,

1 godz., Osad 2-krotnie przepłukiwano 70% etanolem, suszono w temp. pokojowej i rozpuszczano w wodzie wolnej od RNaz. W następnym etapie RNA odsalano na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-25^{FINE} zawieszonym w buforze zawierającym 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 i 1 mM EDTA i ponownie wytrącano jak wyżej. Oczyszczone transkrypty oceniano w 5% denaturującym żelu poliakrylamidowym jak wyżej. Radioaktywność RNA mierzono w liczniku scyntylacyjnym, natomiast stężenia nieznakowanych transkryptów oceniano spektrofotometrycznie.

5.15. Ekspresja fuzyjnego białka w bakteriach i izolacja domeny PUF

Domę PUF białek PUM odpowiadającą za wiązanie z RNA, uzyskiwano w wyniku przeprowadzenia nadekspresji z plazmidu pTYB12 w bakteriach *E. coli* szczepu BER2566. Bakterie te transformowano plazmidem pTYB12 kodującym ORF białka fuzyjnego inteina-PUF przy użyciu elektroporacji jak opisano wyżej (**Metody, 5.10**). Bakterie wysiewano na płytki z agarem zawierającym LB oraz karbenicylinę, w stężeniu 50 µg/ml i inkubowano w 37°C, 16 godzin. Pojedynczą kolonią zaszczepiano 10 ml płynnego medium LB zawierającego karbenicylinę w stężeniu 50 µg/ml i wytrząsano 250 rpm w 37°C, 20 godz., do osiągnięcia stacjonarnej fazy wzrostu. Uzyskanym inokulum zaszczepiono 500 ml pożywki i hodowano do osiągnięcia gęstości optycznej (OD) ~0,6 mierzonej spektrofotometrycznie przy długości fali 600 nm. Hodowlę chłodzono w lodzie. Po dodaniu induktora ekspresji białek – IPTG o stężeniu końcowym 0,3 mM/ml, hodowlę bakterii wytrząsano 250 rpm w 30°C, 16 godzin. Na koniec schładzano w lodzie, po czym wirowano przy 3000 rpm w temp. 4°C, 10 minut.

Osad uzyskany z 500 ml hodowli bakterii zawieszano w 10 ml buforu zawierającym 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 0,5% triton X-100 oraz mieszaninę inhibitorów proteaz: 2,76 mM benzamidyna, 0,58 µM leupeptyna, 50 µg/ml AEBSF, 7 µg/ml aprotonina, 1,82 µg/ml pepstatyna A. Bakterie poddawano 3-krotnej sonikacji w mieszaninie lodu i NaCl, 30 s zachowując 1 min. przerwy pomiędzy impulsami. Po odwirowaniu całości przy 14000 rpm, w 4°C, 1 godz., supernatant zawierający fuzyjne białko inteina-PUF zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temp. -80°C lub natychmiast przystępowano do oczyszczania.

Do izolacji domeny PUF z supernatantów uzyskanych z lizatów bakteryjnych stosowano technikę chromatografii powinowactwa, biorąc pod uwagę, że domena ta została sklonowana w fuzji z inteiną. Znacznik ten zawiera domenę wiążącą się silnie z chityną (ang. *Chitin Binding Domain* – CBD), którą opłaszczono były stosowane kulki

agarozowe. W obecności DTT następuje precyzyjne cięcie na granicy inteina – domena PUF. W ten sposób uzyskiwano oczyszczone białko.

Supernatant uzyskany po sonikacji bakterii mieszano z agarozowymi kulkami opłaszczonymi chityną zrównoważonymi identycznym buforem, który użyto do sonikacji w 4°C, 40 min. Po odwirowaniu przy 3000 rpm, w 4°C, 2 minuty, kulki płukano 3-krotnie tym samym buforem w celu usunięcia niezwiązanych białek bakteryjnych. Kulki równoważono następnie buforem jw., zawierającym dodatkowo 90 mM DTT. Odcinanie białka od inteiny prowadzono w buforze o tym samym składzie z mieszaniem, w 4°C przez 3 doby. Preparat białka uzyskano przez odfiltrowanie kulek w kolumiencie Ultrafree–MC przy 14000 rpm, w 4°C, 5 min., a następnie białko zagęszczano 2-krotnie na kolumiencie Ultracel–10K o punkcie odcięcia (ang. *cut-off*) 10 kDa (domena PUF ma masę 45,76 kDa), przy 3000 rpm, w 4°C, 20 minut. Preparat białka porcjowano, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temp. –80°C. Wszystkie etapy procesu oczyszczania oceniano elektroforetycznie w denaturującym żelu poliakrylamidowym. W tym celu do prób dodawano równoważną objętość 2x stężonego buforu Laemmli, denaturowano w 100°C, 8 min. i wirowano przed nałożeniem na żel. Skład żelu i buforów oraz warunki rozdziału elektroforetycznego opisano wcześniej (**Metody 5.4**) Frakcjonowanie prowadzono 1 godz., przy napięciu 100 V. Po zakończeniu rozdziału żełe barwiono 1 godz. roztworem 0,25% błękitu brylantowego Coomassie, 45% metanol, 10% kwas octowy, a następnie odbarwiano przez kolejne płukania w roztworze zawierającym 30% metanol, 10% kwas octowy. Po usunięciu barwnika niezwiązanego z białkiem żel suszono i skanowano.

Pomiar stężenia białka w oczyszczonym preparacie wykonywano metodą Bradforda. Na początku wyznaczano krzywą wzorcową dla BSA o stężeniach: 12,5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 µg/ml. Do roztworów BSA o objętości 10 µl oraz do roztworu zawierającego badane białko dodawano po 1 ml wcześniej przygotowanego odczynnika Bradforda. Po pół godzinnej inkubacji w temp. pokojowej odczytywano wartości absorbancji w spektrofotometrze przy długości fali 595 nm. Stężenie białka (domena PUF) obliczano za pomocą równania regresji krzywej standardowej wyznaczonej w programie MS Excel.

5.16. Test retardacji żelowej

Oddziaływanie domeny PUF z fragmentem 3'UTR *SPIN3* typu dzikiego i zmutowanym analizowano testem retardacji żelowej (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay* – EMSA). Polega on na porównaniu w natywnym żelu poliakrylamidowym migracji nagiego RNA z migracją RNA po inkubacji z badanym białkiem. Utworzony kompleks rybonukleoproteinowy (ang. *RiboNucleProtein* - RNP) migruje wolniej w porównaniu z RNA nagim. Wynik doświadczenia oceniany jest na kliszy rentgenowskiej, ponieważ RNA wyznakowano radioaktywnym fosforem z zastosowaniem UTP ³²P.

RNA znakowany ³²P w pozycji α, o aktywności 1000 cpm (zliczeń na minutę) denaturowano w temp. 90°C 3 min. i inkubowano 1 godz. w lodzie w mieszaninie reakcyjnej z domeną PUF. Bufor zawierał 50 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 100 ng/μl BSA, 5% glicerolu, 0,02% Tween20, 0,5 U/μl RNazin oraz kompetytory RNA: 100 ng/μl syntetycznego polyU, 30 ng/μl heparyny, 10 ng/μl tRNA drożdżowego. Po inkubacji próby nakładano na 4% natywny żel poliakrylamidowy (stosunek akrylamidu do bisakrylamidu 29:1), 2,5% glicerol, TBE zawierający 90 mM Tris; 90 mM kwas borowy; 2 mM EDTA i poddawano frakcjonowaniu w temp. 4°C, 2 godziny przy mocy 5 W. Rozdział elektroforetyczny poprzedzony był 2-godziną elektroforezą wstępną, w tych samych warunkach. Następnie żel suszono i eksponowano z kliszą rentgenowską w obecności ekranów wzmacniających w temp. -80°C od 1 doby do kilku dni.

5.17. Test kompetycji

Test kompetycji służył stwierdzeniu, czy obserwowane na kliszy rentgenowskiej kompleksy domeny PUF z fragmentem 3'UTR *SPIN3* reprezentują oddziaływanie specyficzne. Polega on na wykonaniu dwóch równoległych doświadczeń, w których stosuje się odmienne kompetytory. W pierwszym doświadczeniu do reakcji wiązania radioaktywnego badanego RNA z białkiem dodaje się wzrastające stężenie tego samego badanego, ale nieradioaktywnego RNA. Natomiast w drugim doświadczeniu kompetytorem jest niespecyficzny, nieznakowany RNA. Stężenie kompetytorów w obu doświadczeniach powinno być identyczne. Jako niespecyficzny kompetytor zastosowano fragment wektora, ponieważ nie wykazywał interakcji z domeną PUF i nie posiadał potencjalnych motywów PBE wiązania dla tego białka. Do mieszaniny reakcyjnej, której skład był identyczny, jak w przypadku testu retardacji żelowej dodawano białko i zdenaturowany w temp. 90°C, 3 min. nieznakowany badany lub niespecyficzny kompetytor we wzrastających stężeniach i inkubowano w lodzie przez 30 minut. Następnie

do obu mieszanin wprowadzano zdenaturowany jw. radioaktywny badany transkrypt i kontynuowano inkubację kolejne 30 minut. Na koniec próby rozdzielano elektroforetycznie w tych samych warunkach, co test retardacji żelowej. Żel suszono i eksponowano w obecności kliszy rentgenowskiej.

6. WYNIKI

6.1. SPIN4 zwalnia, podczas gdy SPIN1 przyspiesza proliferację komórek

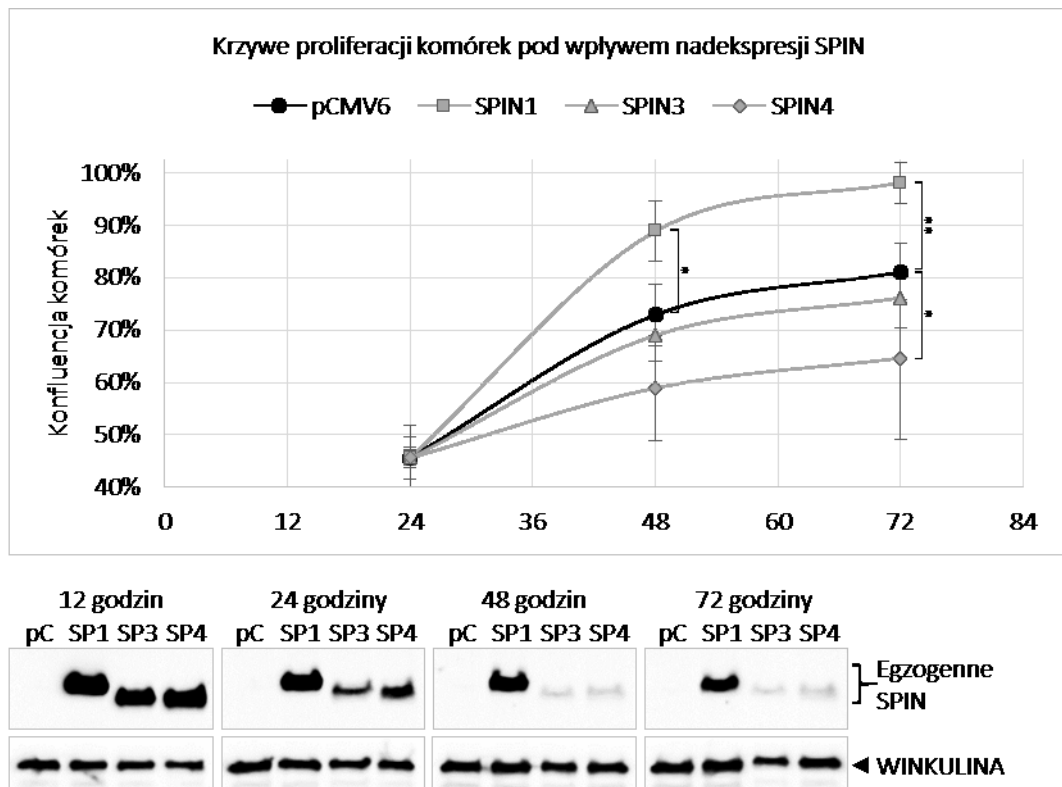
Skoro stabilna nadekspresja mysiej Spin1 w mysiej linii fibroblastów NIH3T3 i ludzkiej SPIN1 w komórkach tłuszczakomięsa (ang. *liposarcoma*) powodowała przyspieszenie proliferacji [Gao i wsp., 2005; Franz i wsp., 2015], postanowiono sprawdzić wpływ na proliferację ludzkiej SPIN1 oraz jej dwóch, jak dotąd nieopisanych paralogów SPIN3 i SPIN4. Modelem tych badań były komórki TCam-2, które reprezentują jedyny model męskich komórek gametogenicznych w hodowli. Linia komórek TCam-2 została wyprowadzona z nasieniaka (ang. *seminoma*), który stanowi jeden z typów nowotworu jądra typu germinalnego (ang. *Testis Germ Cell Tumor* – TGCT).

Badania nad rolą SPIN w komórkach TCam-2 poprzedzono sprawdzeniem poziomu przejściowej nadekspresji tych białek, w kolejnych dniach po transfekcji plazmidami kodującymi odpowiadające im otwarte ramki odczytu (ang. *Open Reading Frame* – ORF). Okazało się, że SPIN1, SPIN3 i SPIN4 ulegały nadekspresji na wysokim poziomie 12 godz. po transfekcji, natomiast przy dłuższym czasie hodowli do 72 godz., nadekspresja SPIN3 i SPIN4 obniżała się znacznie (**Rycina 1, u dołu**). Z tego powodu obserwacji nie prowadzono przez okres dłuższy niż 72 godziny.

Proliferację badano poprzez pomiar zmian konfluencji komórek w hodowli, mierzonej 24, 48 i 72 godz. po transfekcji, przy użyciu kamery JuLI FL, Fluorescence live cell movie analyzer firmy NanoEntek. Doświadczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. W każdym z nich wykonywano zdjęcia pięciu pól wybranych losowo z powierzchni 10 cm² każdego dołka płytki 6-dołkowej. Krzywe proliferacji komórek TCam-2 przy nadekspresji SPIN znormalizowano w stosunku do kontrolnej nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (**Tabela 1 i 2**). Było to istotne ponieważ pomimo prób jej wyrównania, konfluencja początkowa 24 godz. po transfekcji nie była taka sama. Dlatego, w przypadku białek powodujących wysoką śmiertelność komórek, tzn. SPIN3 i SPIN4, wysiewano komórki z kilkukrotnej transfekcji na jeden dołek płytki 6-dołkowej, by zrównoważyć konfluencję początkową.

Pokazano, że intensywność proliferacji komórek linii TCam-2 zmieniała się pod wpływem nadekspresji każdej z trzech SPIN, w porównaniu do komórek kontrolnych, czyli transfekowanych pustym wektorem pCMV6-entry, jednak w odmienny sposób w zależności od paraloga (**Rycina 1, wykres**). Zaobserwowano mianowicie, że podziały komórkowe ulegały istotnemu przyspieszeniu pod wpływem nadekspresji SPIN1. Wzrost liczby komórek był widoczny już 48 godz. po transfekcji ($p \leq 0,05$, $p = 0,0094$) i ulegał

wzmocnieniu aż do 72 godz. ($p \leq 0,005$, $p = 0,00083$). Natomiast przeciwny efekt, czyli zwolnienie podziałów, był obserwowany pod wpływem nadekspresji SPIN4, 72 godz. po transfekcji ($p \leq 0,05$, $p = 0,0134$). Negatywny wpływ SPIN4 na proliferację mógłby być w rzeczywistości silniejszy, biorąc pod uwagę poziom nadekspresji tego białka, który był znacznie niższy w porównaniu do poziomu nadekspresji SPIN1 (**Rycina 1, u dołu**). Nadekspresja SPIN3 powodowała tylko niewielkie zwolnienie proliferacji komórek TCam-2, które okazało się nieistotne statystycznie, w teście niesparowanym t-Studenta o rozkładzie jednostronnym (**Rycina 1, wykres**). Oznacza to, że SPIN mogą mieć odmienne funkcje w komórce. Zaobserwowany wpływ SPIN na proliferację komórek doprowadził do pytania, czy SPIN wpływają również na proces apoptozy (**Wyniki, punkt 2**) lub cykl komórkowy (**Wyniki, punkt 3**).



Rycina 1. Wpływ nadekspresji białek SPIN na proliferację komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 3 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF SPIN (oznaczono SP1, SP3 i SP4) lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC) i mierzono konfluencję. Pomiar wykonano w trzech punktach czasowych (24, 48 i 72 godz.). U góry: wykres zależności konfluencji komórek TCam-2 z nadekspresją SPIN1, 3 lub 4, względem pustego wektora pCMV6-entry, do czasu po transfekcji (w godz.). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$). U dołu: sprawdzenie poziomu nadekspresji SPIN metodą Western blot w różnych czasach po transfekcji komórek. Po prawej stronie klamrą zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom SPIN, a grotem strzałki białko WINKULINĘ, będącą kontrolą ilości białka w ścieżkach (ang. *loading control*). SPIN ulegały najwyższej nadekspresji 12 godz. po transfekcji, natomiast po dłuższym czasie hodowli, nadekspresja SPIN3 i SPIN4 obniżała się znacznie. Pokazano zatem, że SPIN1 (SP1) przyspieszała, podczas gdy SPIN4 (SP4) zwalniała proliferację komórek TCam-2.

Tabela 1. Surowe dane liczbowe oznaczające wartości konfluencji komórek TCam-2 pod wpływem nadekspresji SPIN, względem pustego wektora pCMV6-entry, w różnych czasach po transfekcji.

Egzogenna ekspresja	Średnia (godz.)	Odchylenie standardowe	Średnia (godz.)	Odchylenie standardowe	Średnia (godz.)	Odchylenie standardowe
pCMV6-entry	45,60%	1,46%	72,97%	5,86%	81,11%	5,41%
SPIN1	32,25%	1,37%	62,86%	4,01%	69,43%	2,77%
SPIN3	35,86%	3,13%	54,23%	3,82%	59,84%	4,43%
SPIN4	20,76%	2,86%	26,82%	4,52%	29,40%	6,99%

Tabela 2. Znormalizowane dane przedstawiające wartości konfluencji komórek TCam-2 pod wpływem nadekspresji SPIN, względem pustego wektora pCMV6-entry, w różnych czasach po transfekcji.

Egzogenna ekspresja	Średnia (godz.)	Odchylenie standardowe	Średnia (godz.)	Odchylenie standardowe	Średnia (godz.)	Odchylenie standardowe
pCMV6-entry	45,60%	1,46%	72,97%	5,86%	81,11%	5,41%
SPIN1	45,60%	1,94%	88,88%	5,67%	98,17%	3,91%
SPIN3	45,60%	3,98%	68,95%	4,86%	76,08%	5,63%
SPIN4	45,60%	6,29%	58,91%	9,92%	64,56%	15,36%

6.2. SPIN1 obniża, podczas gdy SPIN3 i SPIN4 wzmagają apoptozę komórek

By odpowiedzieć na pytanie, jaki proces mógłby być odpowiedzialny za zmianę liczby komórek TCam-2 przy nadekspresji SPIN, postanowiono sprawdzić czy mają wpływ na apoptozę komórek TCam-2. Uzasadnieniem wyboru tego podejścia było doniesienie innych autorów, że SPIN1 obniżała poziom apoptozy komórek tłuszczakomięsa (ang. *liposarcoma*) [Franz i wsp., 2015].

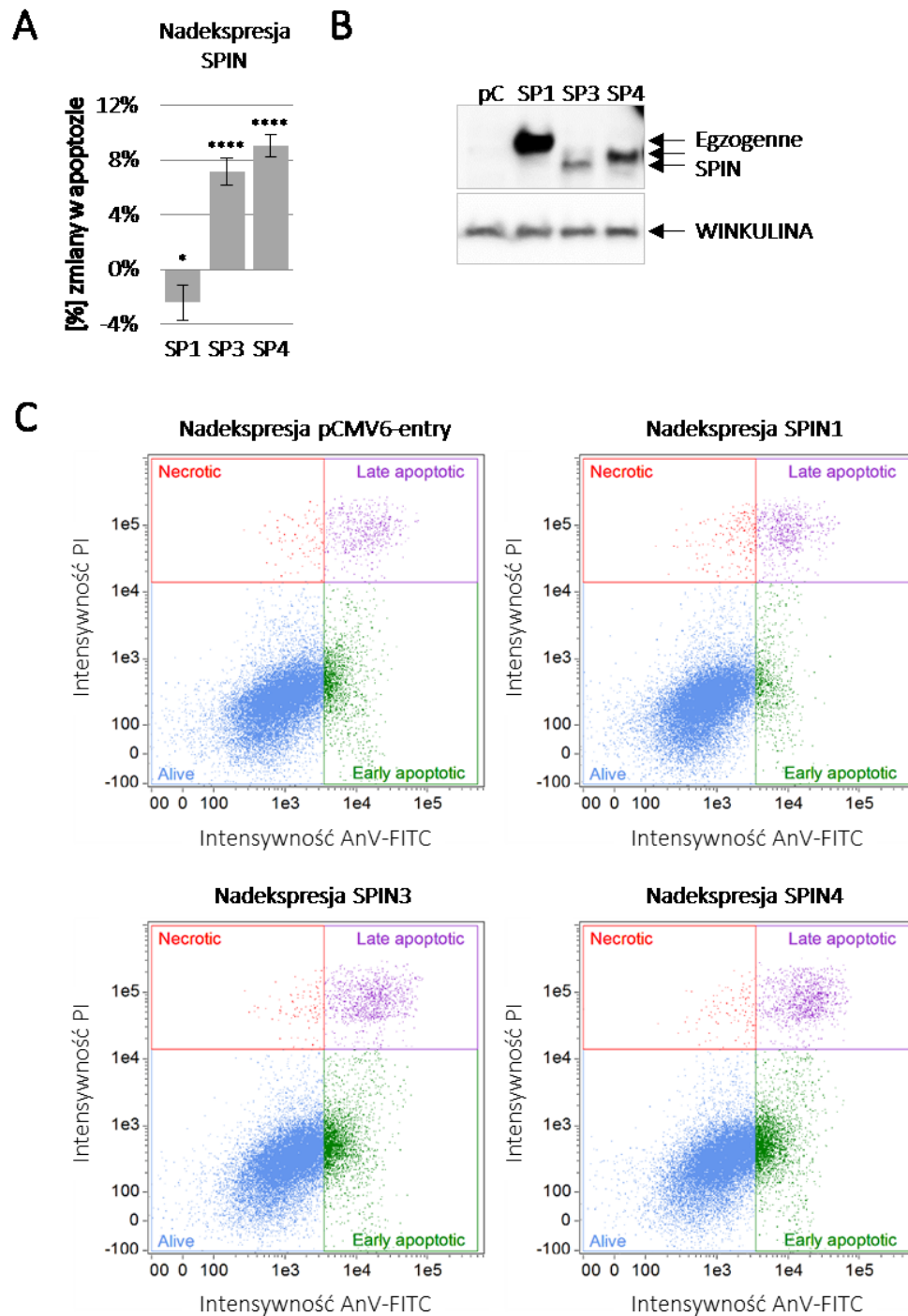
Poziom apoptozy mierzono w cytometrze przepływowym 48 godz. po transfekcji, przy użyciu zestawu z Aneksyną V (ang. *Annexin V*) skoniugowaną z izotiocyanianem fluoresceiny (ang. *Fluorescein IsoThioCyanate* - FITC). Doświadczenie wykonano w czterech niezależnych powtórzeniach, a uzyskane wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej, czyli pustego wektora pCMV6-entry (**Rycina 2A**, wartość 0, linia podstawna). Okazało się, że nadekspresja SPIN3 i SPIN4 powodowała wzrost poziomu apoptozy o odpowiednio $\sim 7\%$ ($p \leq 0,00005$, $p = 9,38 \times 10^{-6}$) i $\sim 9\%$ ($p \leq 0,00005$, $p = 5,12 \times 10^{-7}$), w porównaniu do komórek kontrolnych (**Rycina 2A i B**). Zaobserwowano mianowicie znaczący wzrost liczby komórek wybarwionych Aneksyną V skoniugowaną z FITC (oznaczono AnV-FITC), czyli świecących na zielono pod wpływem wzbudzenia lasera o długości fali 488 nm (**Rycina 2C**). Zatem te dwa paralogi działały pro-apoptotycznie w linii TCam-2. Natomiast nadekspresja SPIN1 powodowała efekt przeciwny, to znaczy niewielkie obniżenie poziomu apoptozy, o $\sim 2,5\%$ ($p \leq 0,05$, $p = 0,0086$)

w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zatem SPIN1 wpływała anty-apoptycznie na komórki TCam-2 (**Rycina 2A i B**).

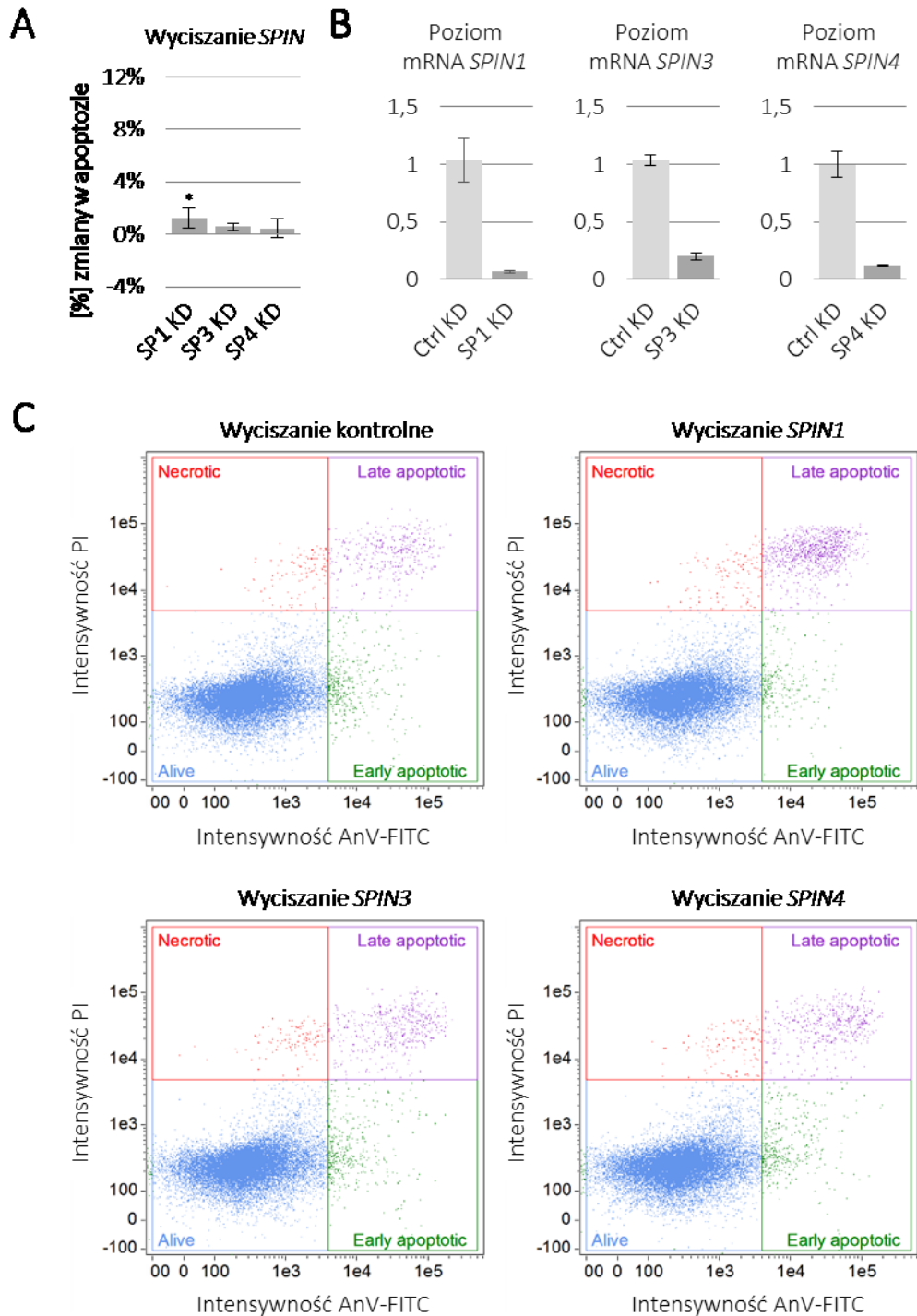
Dla potwierdzenia powyższych wyników wykonano doświadczenie odwrotne, tzn. analizowano apoptozę po uprzednim wyciszeniu ekspresji genów *SPIN1*, *3* i *4* w komórkach TCam-2. Sprawdzono, że poziom mRNA wszystkich trzech *SPIN* w komórce pod wpływem specyficznego wyciszenia przy użyciu technologii siRNA ulegał znacznemu obniżeniu: o ~93,38% dla *SPIN1*, o ~80,38% dla *SPIN3* i o ~88,09% dla *SPIN4* (**Rycina 3B**). Uzyskany wpływ na apoptozę w przypadku *SPIN1* był zgodny z oczekiwaniem i był statystycznie istotny. Doszło mianowicie do wzrostu liczby komórek wybarwionych AnV-FITC (**Rycina 3C**), czyli do podniesienia poziomu apoptozy o ~1,2% ($p \leq 0,05$, $p = 0,026$) i było to spójne z wynikiem z nadekspresji (**Rycina 3A vs. 2A**).

Natomiast wyciszenie siRNA ekspresji genów *SPIN3* i *SPIN4* nie wpłynęło na apoptozę komórek TCam-2 (**Rycina 3A i C**). Ów brak efektu mógł być spowodowany niskim endogennym poziomem ekspresji genów *SPIN3* i *SPIN4* w komórkach TCam-2. Mianowicie poziom transkryptów *SPIN3* i *SPIN4* wynosił odpowiednio 2,59 i 3,10 w wartościach FPKM (ang. *Fragments Per Kilobase per Million*) i był on znacząco niższy, w porównaniu do poziomu transkryptu *SPIN1*, który wynosił 14,65. Dane te pochodzą z trzykrotnie przeprowadzonego tzw. głębokiego sekwencjonowania transkryptomu komórek linii TCam-2 metodą RNA-Seq (ang. *RNA Sequencing*), przy użyciu sekwencjonowania nowej generacji NGS (ang. *Next-Generation Sequencing*) [Śmiałek i wsp., dane nieopublikowane].

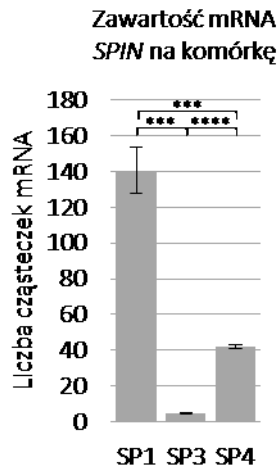
By sprawdzić powyższe dane uzyskane metodą RNA-Seq, dodatkowo poziom ekspresji *SPIN* zmierzono ilościowo przy pomocy metody RT-qPCR. Pokazano, że poziom mRNA *SPIN1* wynosił ~140,5 cząsteczki na μl cDNA, *SPIN3* ~4,5 cząsteczki, a *SPIN4* ~42 cząsteczki (**Rycina 4**). Jak można zauważyć, poziom mRNA *SPIN3* był najniższy (w porównaniu do *SPIN1*, $p = 0,00006$ i *SPIN4*, $p = 0,000001$), a *SPIN4* był znacznie niższy od *SPIN1* ($p = 0,00021$).



Rycina 2. Wpływ nadekspresji białek SPIN na apoptozę komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 4 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF SPIN (oznaczono SP1, SP3 i SP4) lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC). Komórki barwiono i mierzono intensywność fluorescencji Aneksyny V skoniugowanej z FITC (AnV-FITC). A – Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora (na wykresie wartość 0). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,00005$). B – Analiza Western blot z nadekspresji SPIN. Po prawej stronie strzałkami zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom SPIN i białku WINKULINIE, będącej kontrolą ilości białka w ścieżkach (ang. *loading control*). C – Wykresy dwuparametrowe (scatter plot) zależności intensywności jodku propidyny (PI) do AnV-FITC służące do analizy poziomu apoptozy. Zaznaczono komórki: żywe – na niebiesko, we wczesnej apoptozie – na zielono, w późnej apoptozie – na fioletowo, oraz martwe na czerwono. Pokazano, że SPIN1 (SP1) obniżała, podczas gdy SPIN3 (SP3) i SPIN4 (SP4) wzmacniały apoptozę komórek.



Rycina 3. Wpływ wyciszenia (ang. *knockdown* – KD) ekspresji genów *SPIN* na apoptozę komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 2 niezależnych powtórzeniach siRNA specyficznym dla *SPIN* (oznaczono SP1 KD, SP3 KD i SP4 KD) lub kontrolnym siRNA (Ctrl KD). Komórki barwiono i mierzono intensywność fluorescencji Aneksyny V skoniugowanej z FITC (AnV-FITC). A – Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – kontrolnego siRNA (na wykresie wartość 0). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$). B – Analiza RT-qPCR z wyciszenia ekspresji *SPIN* względem wyciszenia kontrolnego. C – Wykresy dwuparametrowe (scatter plot) zależności intensywności jodku propidyny (PI) do AnV-FITC służące do analizy poziomu apoptozy. Zaznaczono komórki: żywe – na niebiesko, we wczesnej apoptozie – na zielono, w późnej apoptozie – na fioletowo, oraz martwe na czerwono. Pokazano, że wyciszenie ekspresji *SPIN1* (SP1 KD) podnosiło apoptozę komórek TCam-2, podczas gdy wyciszenie ekspresji *SPIN3* (SP3 KD) i *SPIN4* (SP4 KD) nie miało efektu.

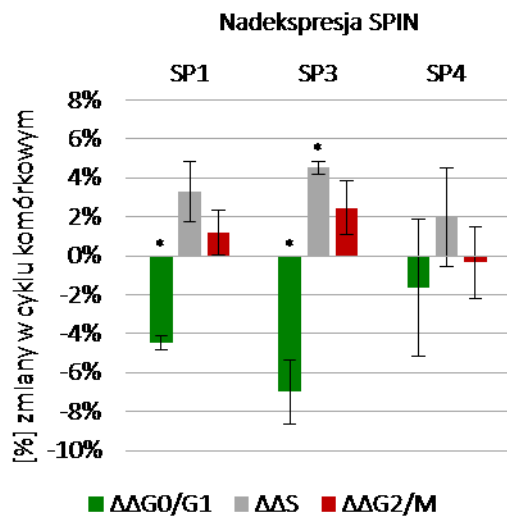
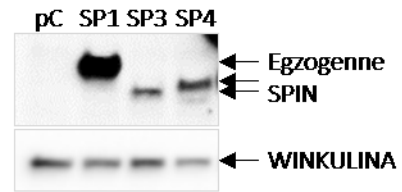
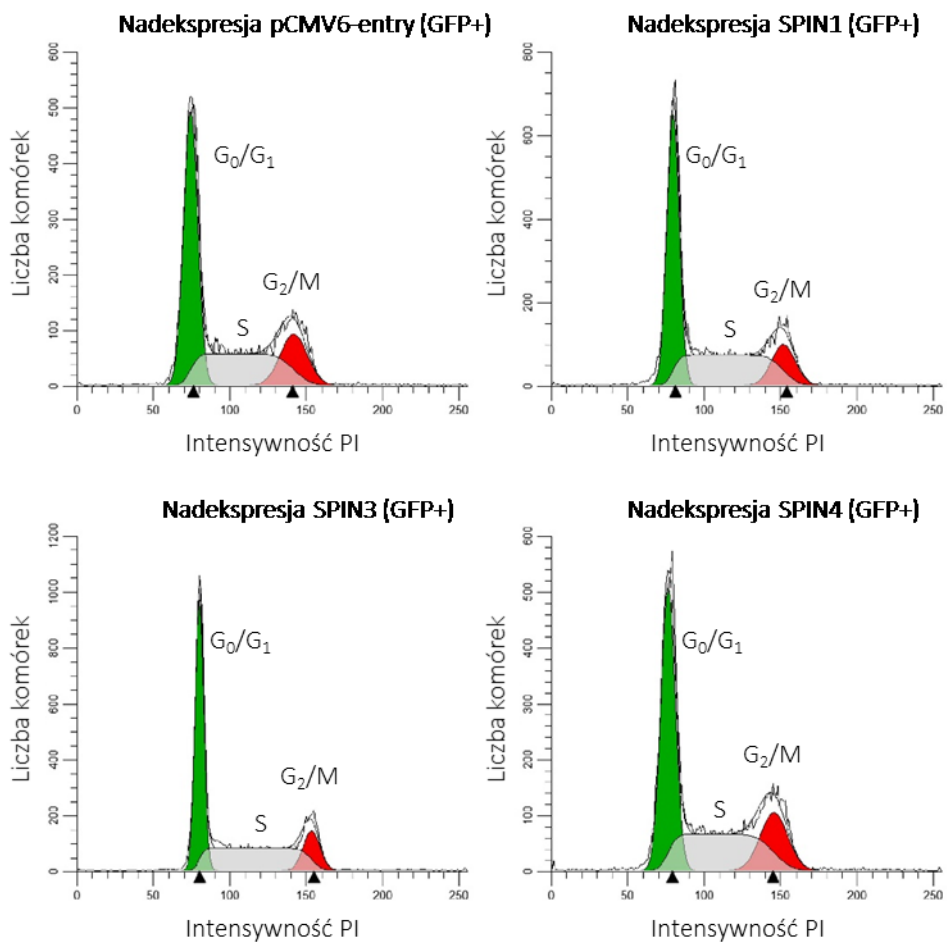


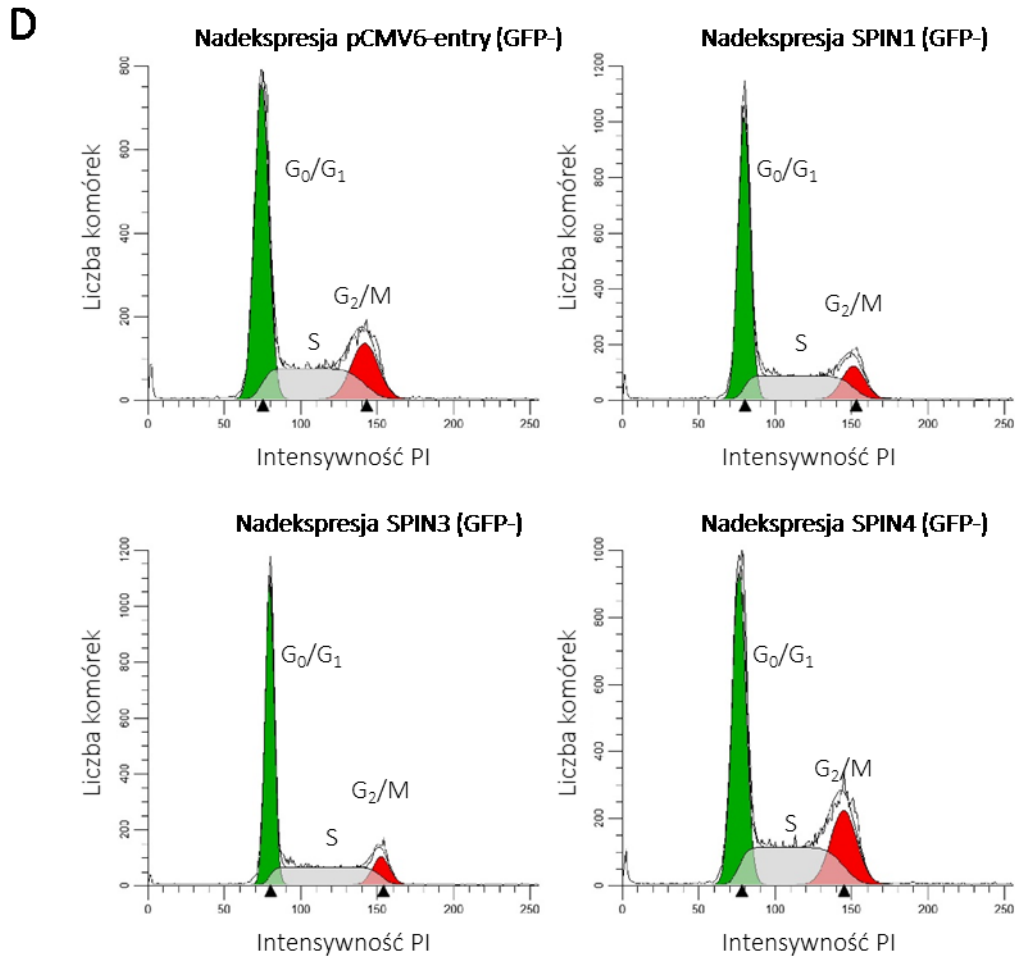
Rycina 4. Ilościowa ocena zawartości cząsteczek mRNA *SPIN* na komórkę TCam-2. Przy pomocy metody RT-qPCR pokazano, że liczba cząsteczek mRNA *SPIN1* (SP1) na komórkę wynosiła ~140,5; mRNA *SPIN3* (SP3) ~4,5; a mRNA *SPIN4* (SP4) ~42. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (***) $p \leq 0,0005$; **** $p \leq 0,00005$).

6.3. SPIN1 i SPIN3 przyspieszają cykl komórkowy

Skoro stała nadekspresja białka SPIN1 w ludzkiej linii HeLa i mysiej linii fibroblastów NIH3T3 powodowała przyspieszenie cyklu komórkowego [Gao Y. i wsp., 2005; Zhang P. i wsp., 2008] postanowiono sprawdzić, czy zmiana intensywności proliferacji komórek TCam-2 obserwowana pod wpływem nadekspresji SPIN, mogła być spowodowana ich wpływem na cykl komórkowy. Ze względu na to, że nie dysponowano systemem stałej nadekspresji SPIN, który w tym doświadczeniu byłby bardziej odpowiedni, zastosowano jak poprzednio przejściową nadekspresję białek SPIN, względem pustego wektora pCMV6-entry w obecności GFP. Pokazano w trzech niezależnych eksperymentach, że nadekspresja SPIN1 i SPIN3 powodowała istotne przyspieszenie cyklu komórkowego. Następował spadek liczby komórek w fazie G_0/G_1 o odpowiednio ~4,5% ($p \leq 0,05$, $p=0,026$) i ~7% ($p \leq 0,05$, $p=0,013$) oraz proporcjonalny wzrost w fazie S o ~3,3% i ~4,5% ($p \leq 0,005$, $p=0,0012$) oraz G_2/M o ~1,2% (dla SPIN1) i ~2,5% (dla SPIN3) (**Rycina 5**). Natomiast nadekspresja SPIN4 nie miała istotnego wpływu na cykl komórkowy.

W doświadczeniu przeciwnym, tzn. pod wpływem wyciszania siRNA ekspresji genów w dwóch niezależnych eksperymentach pokazano, że zgodnie z oczekiwaniem wyciszanie *SPIN1* powodowało zwolnienie cyklu komórkowego. Zaobserwowano mianowicie wzrost o ~5% liczby komórek w fazie G_0/G_1 ($p \leq 0,05$, $p=0,041$) oraz proporcjonalne obniżenie w fazie S o ~1,5% ($p \leq 0,05$, $p=0,045$) i G_2/M o ~3,5% ($p \leq 0,05$, $p=0,039$).

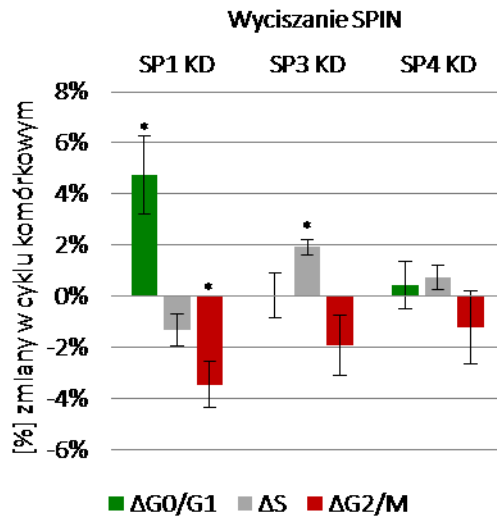
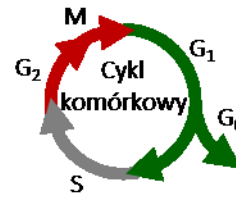
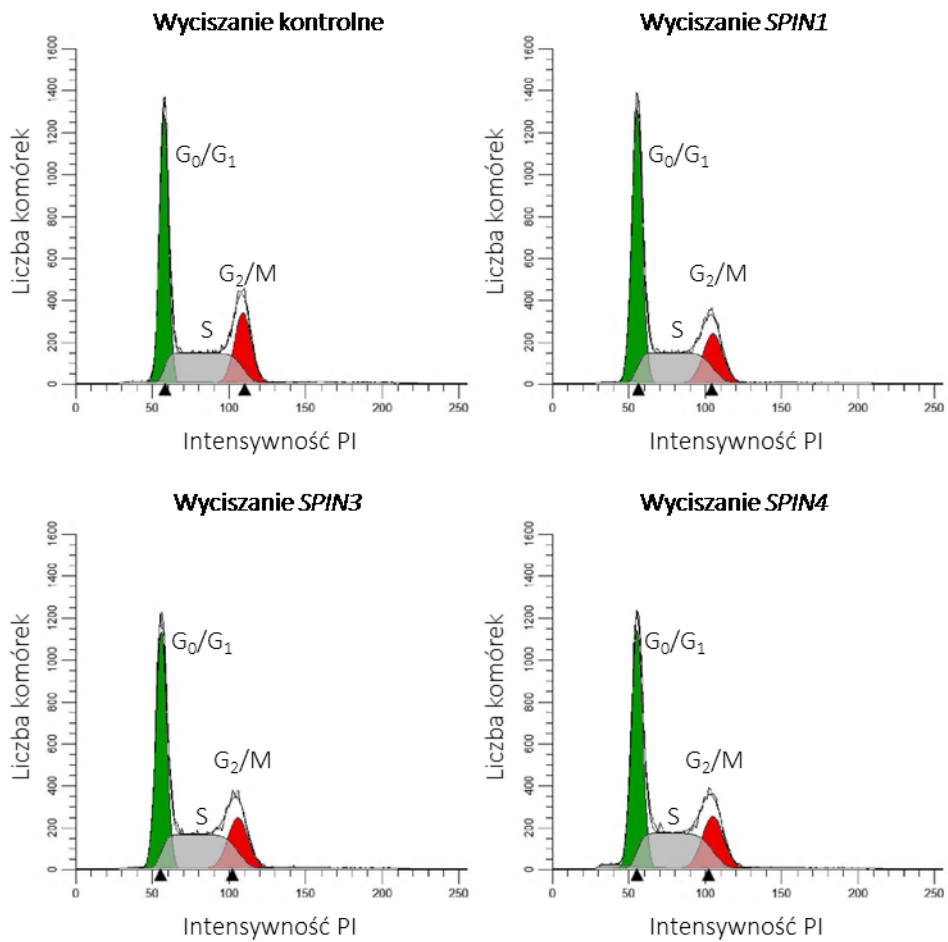
A**B****C**



Rycina 5. Wpływ nadekspresji białek SPIN na cykl komórkowy. Komórki transfekowano w 3 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF SPIN (oznaczone SP1, SP3 i SP4) lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC). Komórki utrwalano, barwiono i mierzono intensywność fluorescencji jodku propidyny (PI) A – Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (na wykresie wartość 0). B – Analiza Western blot poziomu nadekspresji SPIN. Po prawej stronie strzałkami zaznaczono prążki odpowiadające białkom SPIN i białku WINKULINIE, będącej kontrolą ilości białka w ścieżkach. C i D – Histogramy wygenerowane przez program ModFit LT służące do analizy cyklu komórkowego. Zaznaczono kolejne fazy cyklu: G_0/G_1 – na zielono, S – na szaro i G_2/M – na czerwono. Pokazano, że nadekspresja SPIN1 i SPIN3 powodowała przyspieszenie cyklu komórkowego, natomiast SPIN4 nie wpływała.

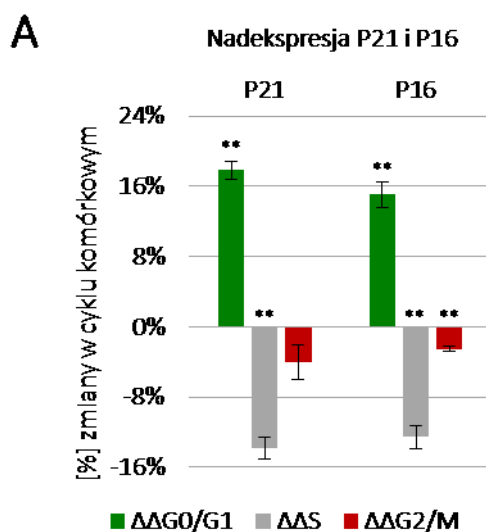
Oznacza to, że SPIN1 powoduje przyspieszenie cyklu komórkowego (**Rycina 6**). Jednak efekt ten był znacznie słabszy w porównaniu do wcześniejszych doniesień literaturowych [Gao, 2005; Zhang, 2008]. Z kolei, wyciszenie ekspresji genów *SPIN3* (oprócz wzrostu w fazie S o $\sim 2\%$, $p \leq 0,05$, $p = 0,023$) i *SPIN4* nie spowodowało statystycznie istotnej zmiany (**Rycina 6**).

Jako kontrolę pozytywną w analizie cyklu komórkowego używano komórek z nadekspresją białka P21 lub P16, które zostały opisane jako zwalniające cykl inhibitory kinaz zależnych od cyklin (ang. *Cyclin-Dependent Kinases* – CDK). Taki sam wpływ miały one również na komórki TCam-2 (**Rycina 7**). Zauważono, że pod wpływem

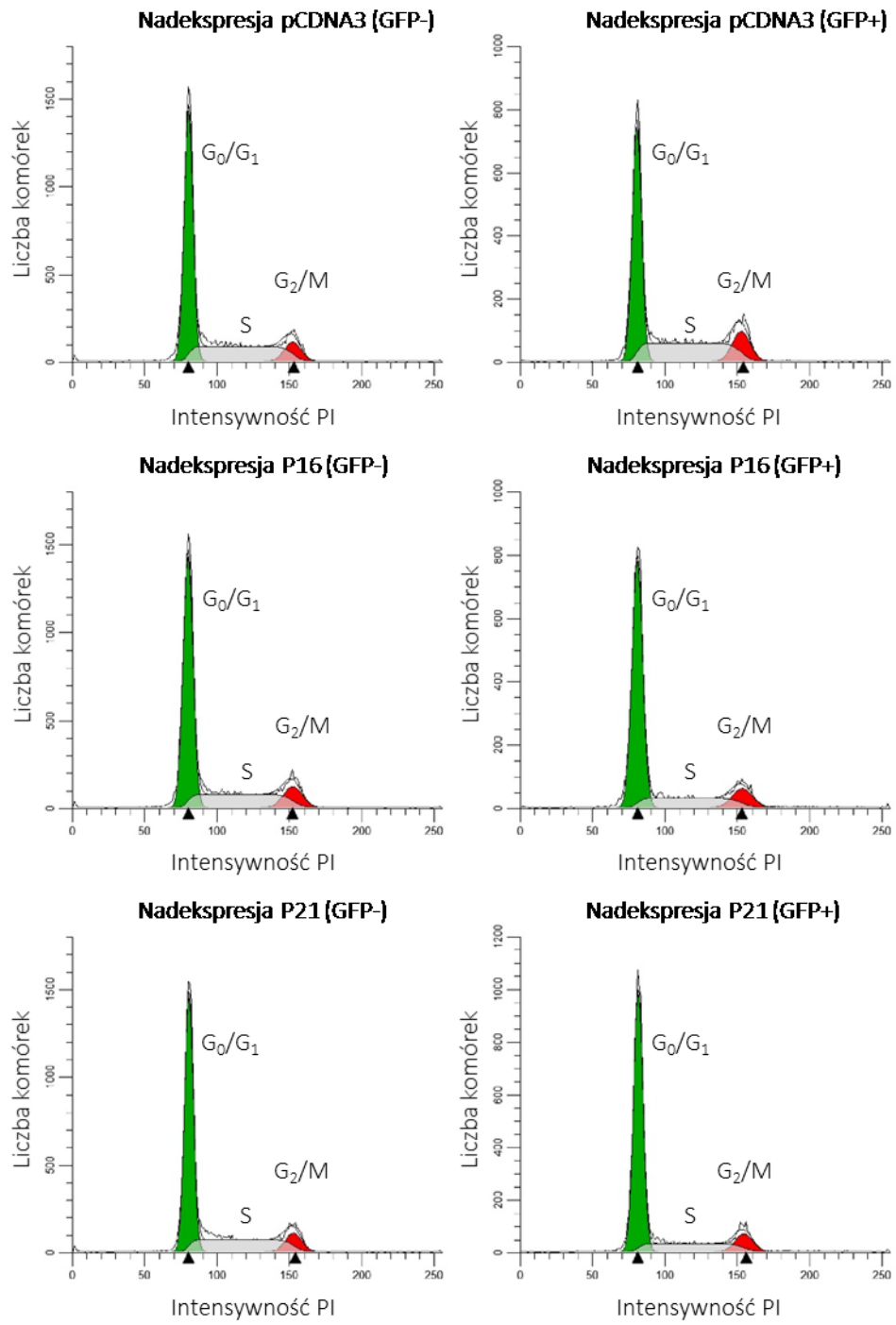
A**B****C**

Rycina 6. Wpływ wyciszania (KD) ekspresji genów *SPIN* na cykl komórkowy. Komórki transfekowano w 2 niezależnych powtórzeniach specyficznym siRNA docelowym dla *SPIN* (oznaczono SP1 KD, SP3 KD i SP4 KD) lub kontrolnym siRNA (Ctrl KD). Komórki utrwalano, barwiono i mierzono intensywność fluorescencji jodku propidyny (PI) A –Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – wyciszania kontrolnego siRNA (na wykresie wartość 0). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$) B – Schemat przebiegu cyklu komórkowego z zaznaczeniem odpowiednich faz. C – Histogramy wygenerowane przez program ModFit LT służące do analizy cyklu komórkowego. Zaznaczono kolejne fazy cyklu: G_0/G_1 – na zielono, S – na szaro i G_2/M – na czerwono. Pokazano, że wyciszanie ekspresji *SPIN1* (SP1 KD) powoduje wzrost liczby komórek w fazie G_0/G_1 i obniżenie liczby komórek fazach S i G_2/M . Oznacza to, że *SPIN1* przyspiesza cykl komórkowy. Natomiast wyciszanie ekspresji *SPIN3* (SP3 KD) i *SPIN4* (SP4 KD) nie wpłynęło na cykl komórkowy.

nadekspresji P21 względem pustego wektora pCDNA3 następuje wzrost o ~18% liczby komórek w fazie G_0/G_1 ($p \leq 0,005$, $p = 0,0009$) oraz proporcjonalne obniżenie w fazie S o ~14% ($p \leq 0,005$, $p = 0,002$) i G_2/M o ~4%. Dodatkowo pod wpływem nadekspresji P16 odnotowano wzrost o ~15% liczby komórek w fazie G_0/G_1 ($p \leq 0,005$, $p = 0,002$) oraz proporcjonalne obniżenie w fazie S o ~12,5% ($p \leq 0,005$, $p = 0,003$) i G_2/M o ~2,5% ($p \leq 0,005$, $p = 0,003$).

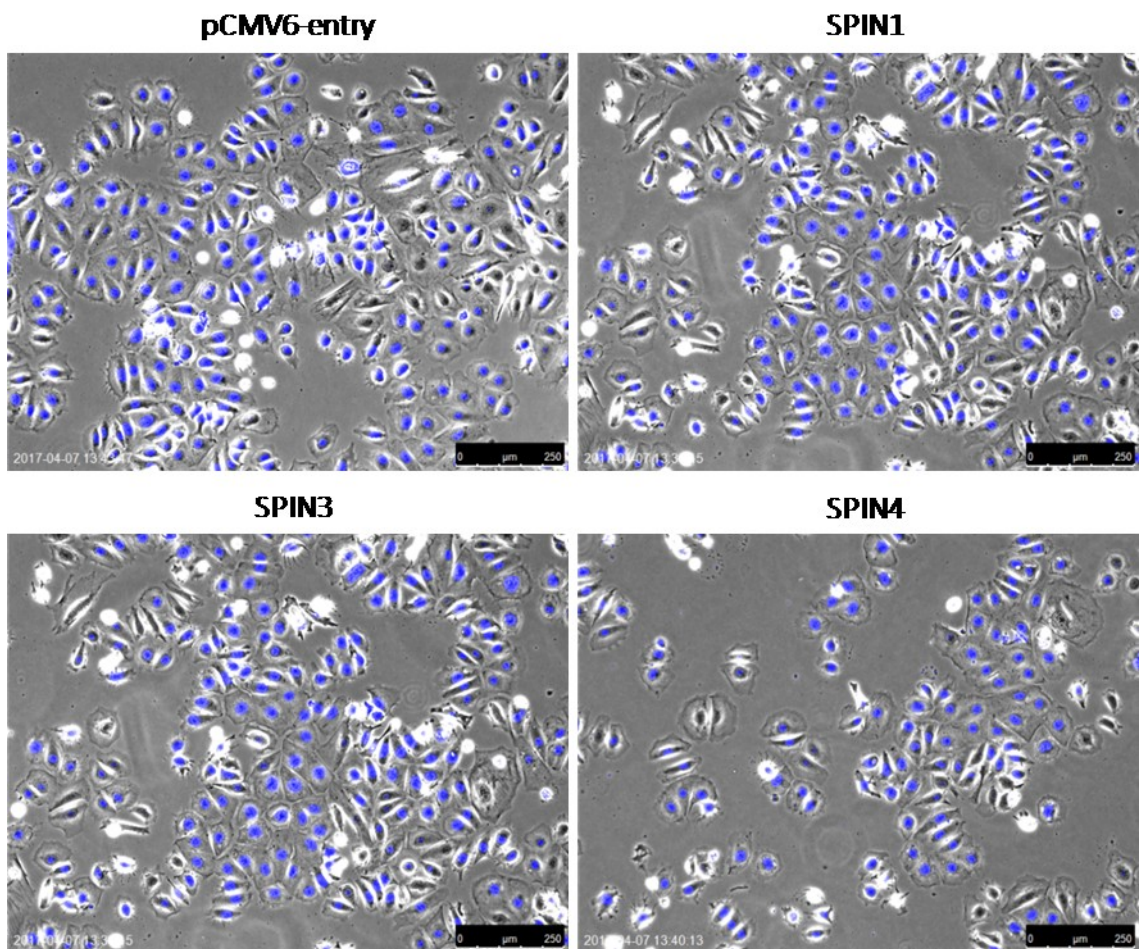


Rycina 7. Wpływ nadekspresji białek P21 i P16 na cykl komórkowy (kontrola pozytywna). Komórki transfekowano w 3 niezależnych powtórzeniach plazmidem kodującymi ORF P21 i P16 lub pustym wektorem pCDNA3. Komórki utrwalano, barwiono i mierzono intensywność fluorescencji jodku propidyny (PI) A –Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora pCDNA3 (na wykresie wartość 0). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (** $p \leq 0,005$). B – Histogramy wygenerowane przez program ModFit LT służące do analizy cyklu komórkowego. Zaznaczono kolejne fazy cyklu: G_0/G_1 – na zielono, S – na szaro i G_2/M – na czerwono. Pokazano, że nadekspresja P21 i P16 powoduje wzrost liczby komórek w fazie G_0/G_1 i obniżenie liczby komórek fazach S i G_2/M , co oznacza, że P21 i P16 zwalnia cykl komórkowy.

B

6.4. Nadekspresja SPIN1, SPIN3 i SPIN4 nie wpływa na morfologię komórek

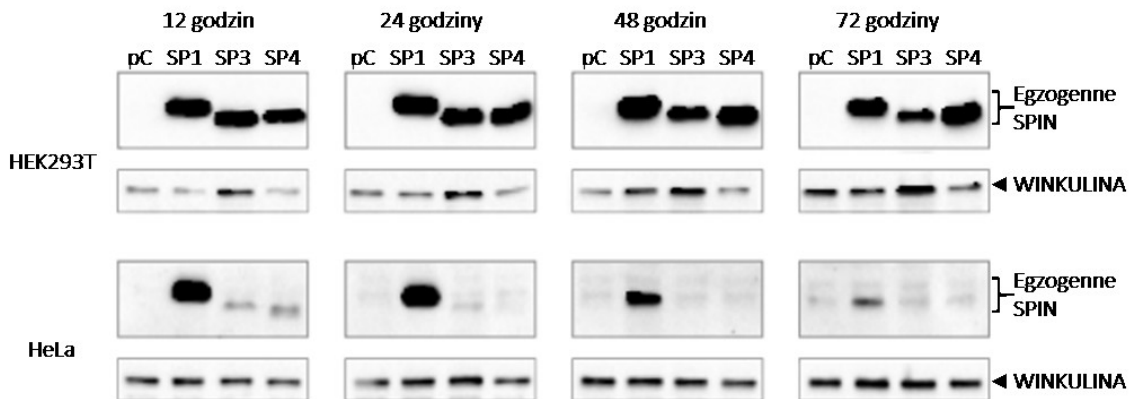
Stała nadekspresja mysiej Spin1 w mysich komórkach NIH3T3 powodowała uszkodzenie wrzeciona podziałowego, co skutkowało niestabilnością chromosomów, pojawieniem się komórek wielojądrzastych oraz starzeniem. Podobny efekt uzyskano przy stałej nadekspresji ludzkiej SPIN1 w komórkach HeLa (Yuan H. i wsp., 2008; Zhang P. i wsp., 2008). Postanowiono zatem sprawdzić, czy wzrost poziomu SPIN wywołuje analogiczny efekt w komórkach TCam-2. Jednak przeciwnie do oczekiwań, nadekspresja SPIN1, 3 i 4 aż do 72 godz. po transfekcji nie powodowała żadnych widocznych zmian w morfologii tych komórek (**Rycina 8**).



Rycina 8. Analiza wpływu nadekspresji białek SPIN na morfologię komórek TCam-2. Komórki transfekowano plazmidami kodującymi ORF SPIN lub pustym wektorem pCMV6-entry. Następnie barwiono przyżyciowo odczynnikiem Hoechst33258 i wykonywano zdjęcia przy użyciu mikroskopu Leica DMI8 IVD, w świetle widzialnym i ultrafioletowym. Jądra komórkowe fluoryzowały na niebiesko. Pokazano, że nadekspresja SPIN1, 3 i 4 nie wpływała na morfologię komórek TCam-2.

6.5. Profil nadekspresji białek SPIN1, SPIN3 i SPIN4 jest różny w komórkach nowotworowych w porównaniu z nienowotworowymi

Skoro zaobserwowano, że poziom nadekspresji białek SPIN jest odmienny w komórkach TCam-2 (**Rycina 1**) (ulegały one nadekspresji na wysokim poziomie 12 godz. po transfekcji, natomiast przy dłuższym czasie hodowli do 72 godz., nadekspresja SPIN3 i SPIN4 obniżała się znacznie) postanowiono sprawdzić, czy jest to zależne od typu komórek w których dochodzi do nadekspresji. Stąd pod kątem analizy profilu nadekspresji białek SPIN zbadano dodatkowo dwie linie komórkowe, HEK293T – komórki embrionalne nerki (nienowotworowe) i HeLa – komórki raka szyjki macicy (nowotworowe). Pokazano, że w komórkach HEK293T białka SPIN ulegały względnie stabilnej nadekspresji od 12 do 72 godz. po transfekcji (**Rycina 9 u góry**). Natomiast w komórkach HeLa nadekspresja białka SPIN1 była na wysokim poziomie 12 i 24 godz. po transfekcji, a przy dłuższym czasie hodowli do 72 godz., obniżała się znacznie. Dodatkowo nadekspresja SPIN3 i SPIN4 była na istotnie niższym poziomie 12 godz. po transfekcji i również zanikała przy dłuższym czasie hodowli do 72 godz. (**Rycina 9 u dołu**). Wydaje się, że profil nadekspresji białek SPIN w komórkach TCam-2 jest podobny do tego zaobserwowanego w komórkach nowotworowych (HeLa).



Rycina 9. Porównanie profilu nadekspresji SPIN metodą Western blot w różnych czasach po transfekcji komórek nienowotworowych (HEK293T – u góry) i nowotworowych (HeLa – u dołu). Komórki transfekowano plazmidami kodującymi ORF SPIN lub pustym wektorem pCMV6-entry. Po prawej stronie klamrą zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom SPIN, a grotem strzałki białko WINKULINĘ, będącą kontrolą ilości białka w ścieżkach (ang. *loading control*). W przypadku komórek HEK293T wszystkie trzy SPIN ulegały równej nadekspresji w różnych czasach po transfekcji, natomiast w komórkach HeLa SPIN3 i SPIN4 ulegały niskiej nadekspresji, a po dłuższym czasie hodowli, nadekspresja wszystkich trzech SPIN obniżała się znacznie.

6.6. W regionie 3'UTR mRNA wszystkich trzech *SPIN* znajdują się potencjalne miejsca wiązania (PBE) domeny PUF białek PUM

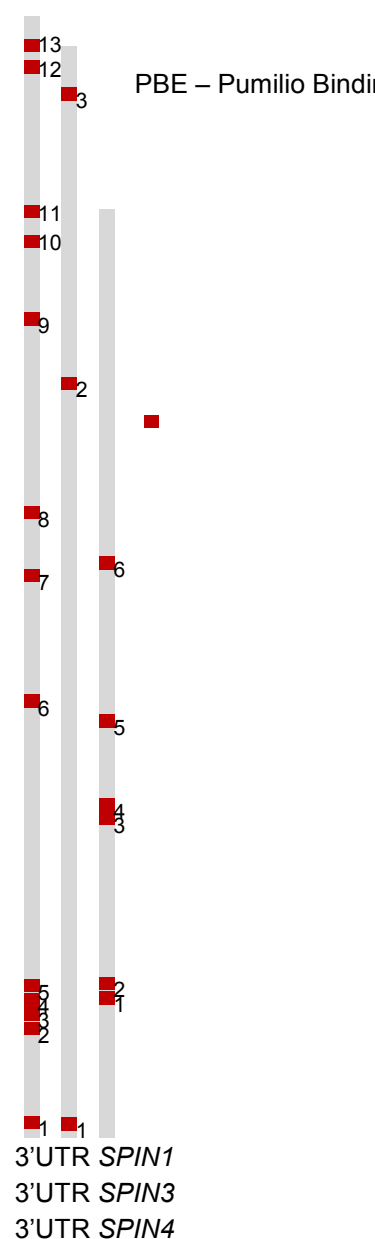
W tej części rozprawy podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu regulacji ekspresji *SPIN*. Zasugerowano wcześniej, że mRNA *SPIN1* może być potencjalnym celem regulacji dla białka PUM1. To mRNA zostało wykryte metodą RIP-Chip (ang. *RNA ImmunoPrecipitation Chip, chip – microarray*) jako wzbogacone w próbkach RNA pochodzących z immunoprecypitatu białka PUM1 w badaniach na mikromacierzach [Morris i wsp., 2008]. Białka PUM są znanymi potranskrypcyjnymi regulatorami ekspresji genów [Arvola, 2017]. Posiadają wysoce zakonserwowaną w ewolucji domenę wiązania RNA, zwaną domeną PUF (ang. *PUmilio and Fbf RNA-binding domain*) i poprzez tę domenę oddziałują z motywami PBE (ang. *Pum Binding Elements*) o sekwencji UGUANAUA (rdzeń sekwencji podkreślono). W regionach 3'UTR mRNA każdej *SPIN* wykryto co najmniej kilka motywów PBE. W 3'UTR mRNA *SPIN1* wykryto 13, *SPIN3* – 3, a *SPIN4* – 6 motywów podobnych do PBE (**Tabela 3, Rycina 10**). W **Rycinie 10** zaznaczono jedynie motywy, które zawierały rdzeń sekwencji UGUA oraz co najmniej dwa nukleotydy zgodne z połową 3' sekwencji konsensusowej, czyli z AUA. Obecność tych motywów może oznaczać, że ekspresja *SPIN* jest regulowana potranskrypcyjnie przez białka PUM, co próbowano sprawdzić w następnej części rozprawy. Regulację potranskrypcyjną zaproponowano już wcześniej, w przypadku mRNA mysiej *Spin1*, choć w tej regulacji nie zasugerowano udziału białek Pum. Ten typ regulacji mógłby mieć istotne znaczenie w przechowywaniu mRNA *Spin1* w oocyocie i dwukomórkowym zarodku mysim, ponieważ pokazano że jest najbardziej wzbogaconym transkryptem matczynym na tym etapie rozwoju [Oh B. i wsp., 1997, Oh B. i wsp., 2000].

Tabela 3. Zestaw motywów PBE w 3'UTR mRNA każdej ze *SPIN*. Wyselekcjonowane motywy zawierały rdzeń sekwencji UGUA (podkreślono) i dodatkowo dwa zgodne nukleotydy z połowy 3' sekwencji, czyli z AUA (podkreślono). Żaden z wymienionych motywów nie posiada kompletnej sekwencji UGUANAUA.

mRNA <i>SPIN1</i> – 4535 nt, 3'UTR – 3430 nt]		
Nr	Sekwencja 5'→3' [12 nt]	Pozycja w mRNA [w 3'UTR]
1.	UUUGUAGACA <u>UA</u>	1152 [48]
2.	GAUGUAUGUA <u>UC</u>	1483 [379]
3.	UCUGUAUCU <u>ACC</u>	1493 [389]
4.	UGUGUAUACA <u>UA</u>	1517 [414]
5.	AGUGUACAC <u>ACA</u>	1552 [449]
6.	GGUGUAAGUA <u>AAU</u>	2441 [1337]
7.	CAUGUAAAC <u>ACA</u>	2827 [1723]
8.	CAUGUAAA <u>CUC</u>	3018 [1914]
9.	UAUGUAUAAA <u>AAU</u>	3612 [2508]
10.	CCUGUAUAU <u>UUG</u>	3847 [2743]
11.	GUUGUAAA <u>UGUC</u>	3939 [2835]
12.	UGUGUAGAC <u>AGU</u>	4386 [3282]
13.	UCUGUAAGUA <u>AAU</u>	4445 [3341]

mRNA <i>SPIN3</i> – 4479 nt, 3'UTR – 3359 nt]		
Nr	Sekwencja 5'→3' [12 nt]	Pozycja w mRNA [w 3'UTR]
1.	UCUGUAGAC <u>ACA</u>	1159 [40]
2.	AUUGUAAA <u>UAG</u>	3433 [2314]
3.	CAUGUAUU <u>ACA</u>	4314 [3195]

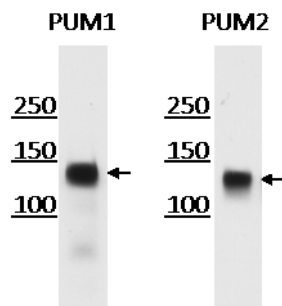
mRNA <i>SPIN4</i> – 4112 nt, 3'UTR – 2841 nt]		
Nr	Sekwencja 5'→3' [12 nt]	Pozycja w mRNA [w 3'UTR]
1.	UCUGUAAA <u>AUG</u>	1700 [430]
2.	CAUGUAGA <u>GAU</u>	1738 [468]
3.	CAUGUAUC <u>AAU</u>	2245 [975]
4.	UUUGUAGAA <u>UU</u>	2275 [1005]
5.	UUUGUAUA <u>UGGU</u>	2543 [1273]
6.	UUUGUAAU <u>AGC</u>	3031 [1761]



Rycina 10. Schematyczne przedstawienie regionów 3'UTR mRNA wszystkich trzech *SPIN* (na szaro) z uwzględnieniem potencjalnych miejsc wiązania dla białek PUM (ang. *Pum Binding Elements* – PBE, na czerwono), które ponumerowano. W 3'UTR mRNA każdej *SPIN*, wykryto występowanie co najmniej kilku motywów podobnych do PBE: w przypadku *SPIN1* – 13, *SPIN3* – 3, a *SPIN4* – 6 motywów. Obecność tych motywów może oznaczać, że ekspresja *SPIN* jest regulowana potranskrypcyjnie przez białka PUM.

6.7. mRNA *SPIN1* i *SPIN3* koimmunoprecypitują z białkami PUM1 i PUM2

Obecność motywów PBE w regionach 3'UTR mRNA wszystkich trzech *SPIN* sugerowała potranskrypcyjną regulację ekspresji przez białka PUM. W organizmach ssaków występują dwa paralogi, *PUM1* i *PUM2*. Oba ulegają endogennej ekspresji również w komórkach TCam-2. Ekspresja na podstawie analizy transkryptomu wyrażona w jednostkach FPKM wynosiła 6,31 dla mRNA *PUM1* oraz 13,84 dla *PUM2* [Śmiałek i wsp., dane nieopublikowane]. Obecność białek PUM1 i PUM2 wykryto w komórkach TCam-2 z zastosowaniem techniki Western blot oraz przeciwciał przetestowanych jako działające specyficznie (**Rycina 11**).



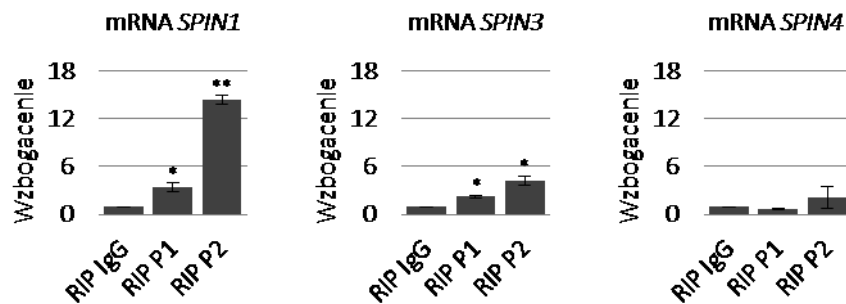
Rycina 11. Wykrywanie endogennych białek PUM w komórkach TCam-2 techniką Western blot. Kreskami po lewej stronie wskazano markery mas wyrażone w kDa, a strzałkami po prawej prążki odpowiadające poszczególnym białkom PUM1 i PUM2.

Oddziaływania mRNA *SPIN* z białkami PUM sprawdzano z zastosowaniem immunoprecypitacji RNA (ang. *RNA Immunoprecipitation* – RIP) oraz specyficznych przeciwciał anty-PUM1 i anty-PUM2 w dwóch niezależnych eksperymentach. Na początek zweryfikowano wydajność wiązania endogennych białek do kulek magnetycznych i oceniono ją jako zadawalającą (**Eluat P, Rycina 12**).



Rycina 12. Wykrywanie białek PUM na kulkach magnetycznych po immunoprecypitacji techniką Western blot. Grotami strzałek po lewej i prawej stronie wskazano prążki odpowiadające poszczególnym identyfikowanym białkom PUM1 i PUM2 (oznaczono odpowiednio P1 i P2). Marker mas wyrażony w kDa zaznaczono kreskami pośrodku ryciny.

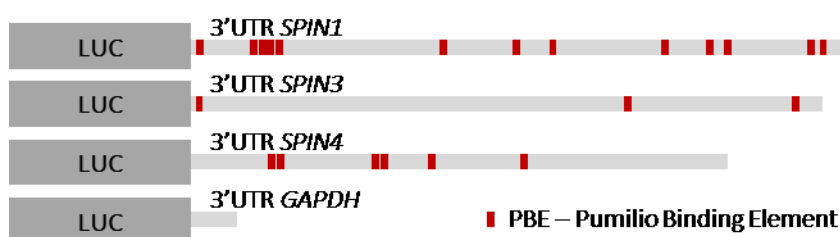
Pomiar zawartości mRNA SPIN w uzyskanych immunoprecypitatach mierzono w ilościowej reakcji RT-qPCR (ang. *Reverse Transcription – quantitative PCR*) z zastosowaniem specyficznych starterów (**Tabela 1**, Metody). Reakcje normalizowano względem trzech genów referencyjnych (*BAKTYNY*, *GAPDH* i *ARNT*). Okazało się, że mRNA *SPIN1* i *SPIN3* były wzbogacone w immunoprecypitacie anty-PUM1 (RIP P1) i anty-PUM2 (RIP P2) w porównaniu z kontrolą negatywną, którą stanowiły kulki opłaszczony frakcją IgG (RIP IgG). Wzbogacenie wyniosło odpowiednio ~3,5x ($p \leq 0,05$, $p = 0,026$) i ~14,4x ($p \leq 0,005$, $p = 0,00083$) dla mRNA *SPIN1* oraz ~2,2x ($p \leq 0,05$, $p = 0,014$) i ~4,2x ($p \leq 0,05$, $p = 0,015$) dla mRNA *SPIN3*. Natomiast w żadnym immunoprecypitacie, ani PUM1, ani PUM2 nie wykryto wzbogacenia w mRNA *SPIN4* (**Rycina 13**). Wykrycie wzbogacenia mRNA *SPIN1* i *SPIN3* może oznaczać, że ekspresja *SPIN* jest regulowana potranskrypcyjnie przez białka PUM, co sprawdzano w dalszej części rozprawy.



Rycina 13. Wzbogacenie mRNA *SPIN* w immunoprecypitatach anty-PUM1 (RIP P1) i anty-PUM2 (RIP P2) względem kontroli negatywnej – podłoże opłaszczony IgG (RIP IgG) zmierzono ilościową reakcją RT-qPCR. Przedstawione wyniki pochodzą z dwóch niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$). Pokazano, że mRNA *SPIN1* i *SPIN3* były wzbogacone w obu immunoprecypitatach. Wykrycie wzbogacenia może oznaczać, że ekspresja *SPIN* jest regulowana potranskrypcyjnie przez białka PUM.

6.8. PUM1 i PUM2 powodują silną represję mRNA *SPIN1*, *SPIN3* i *SPIN4*

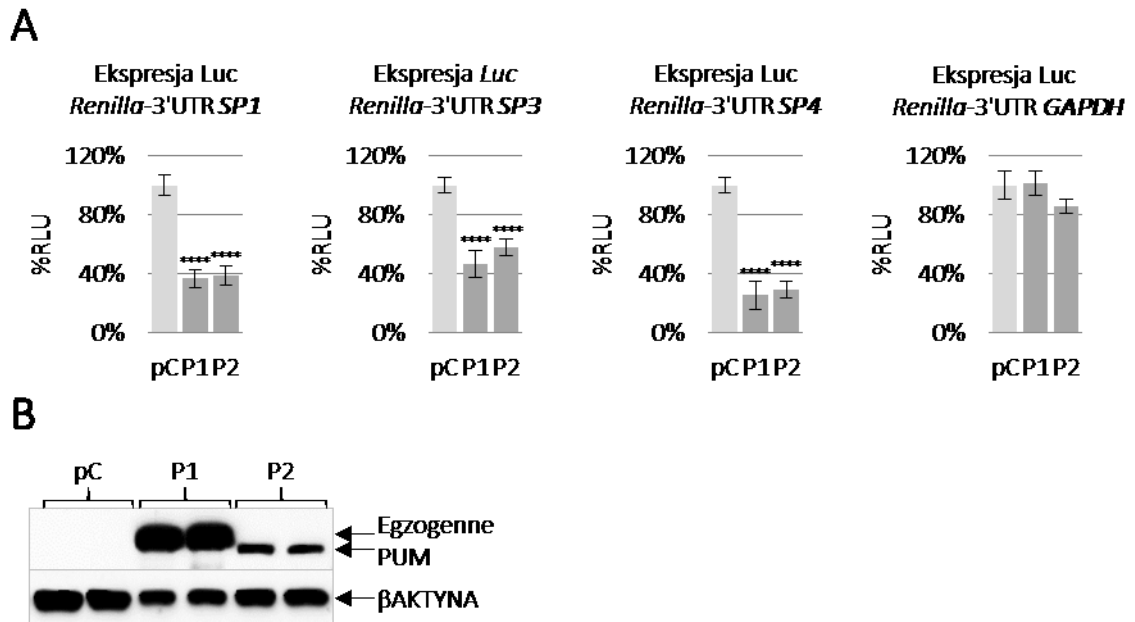
Pomimo stwierdzenia braku istotnego wzbogacenia mRNA *SPIN4* w immunoprecypitatach białek PUM1 i PUM2 postanowiono poddać dalszej analizie mRNA wszystkich trzech *SPIN*, by sprawdzić czy są regulowane przez te białka. Zakładano bowiem, że brak wzbogacenia mRNA *SPIN4* w immunoprecypitatach anty-PUM1 i anty-PUM2 mógł być spowodowany, np. niekorzystną strukturą przestrzenną regionu 3'UTR *SPIN4*, która w zastosowanych warunkach doświadczenia mogła spowodować niedostępność motywów PBE dla białek PUM. Do transfekcji komórek TCam-2 zastosowano reporterowe plazmidy kodujące ORF lucyferazy *Firefly* (miareczkującej) i *Renilla* (badanej, na schemacie oznaczono LUC) w fuzji z całymi regionami 3'UTR *SPIN1*, *SPIN3* lub *SPIN4*, w wektorze psiCheck2 (Materiały, podrozdział 4.6) (**Rycina 14**) oraz plazmidy kodujące ORF dla białek PUM w wektorze pCMV6-entry (Materiały, podrozdział 4.6).



Rycina 14. Schemat plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę *Renilla* (LUC, oznaczono na ciemno szaro) w fuzji z całymi regionami 3'UTR *SPIN1*, *SPIN3*, *SPIN4* lub kontroli negatywnej *GAPDH* (oznaczono na jasno szaro) z uwzględnieniem motywów podobnych do PBE (oznaczono na czerwono).

Ekspresję plazmidu reporterowego oceniano przez pomiar luminescencji lucyferazy *Renilla* względem luminescencji lucyferazy *Firefly* w jednostkach RLU (ang. *Relative Luciferase Units*), w czterech niezależnych doświadczeniach. Dodatkowo w obrębie każdego doświadczenia wykonano trzy powtórzenia, dokonując za każdym razem dwukrotnego pomiaru. Pokazano, że nadekspresja zarówno PUM1, jak i PUM2 w znaczącym stopniu obniżała ekspresję lucyferazy *Renilla* z plazmidu reporterowego zawierającego 3'UTR *SPIN1* o odpowiednio ~63% ($p=3,99 \times 10^{-34}$) i ~61% ($p=9,32 \times 10^{-33}$), *SPIN3* o odpowiednio ~53% ($p=4,74 \times 10^{-27}$) i ~42% ($p=4,02 \times 10^{-22}$) i *SPIN4* o odpowiednio ~74% ($p=3,10 \times 10^{-34}$) i ~71% ($p=2,42 \times 10^{-39}$) (**Rycina 15A**). Oznacza to, że jednym z mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji *SPIN* może być represja przez białka PUM. Jako kontrolę negatywną zastosowano reporterowy plazmid kodujący lucyferazę *Renilla* w fuzji z pełnej długości regionem 3'UTR *GAPDH*, który nie posiada żadnego motywu PBE (**Rycina 14**). Nie zaobserwowano znaczących zmian w ekspresji

lucyferazy *Renilla* z plazmidu reporterowego zawierającego 3'UTR *GAPDH* przy nadekspresji PUM1 lub PUM2 (**Rycina 15A**). Poziom nadekspresji białek PUM pokazano w **Rycinie 15B**, przy czym nadekspresja PUM1 w komórkach TCam-2 była znacznie silniejsza niż PUM2.

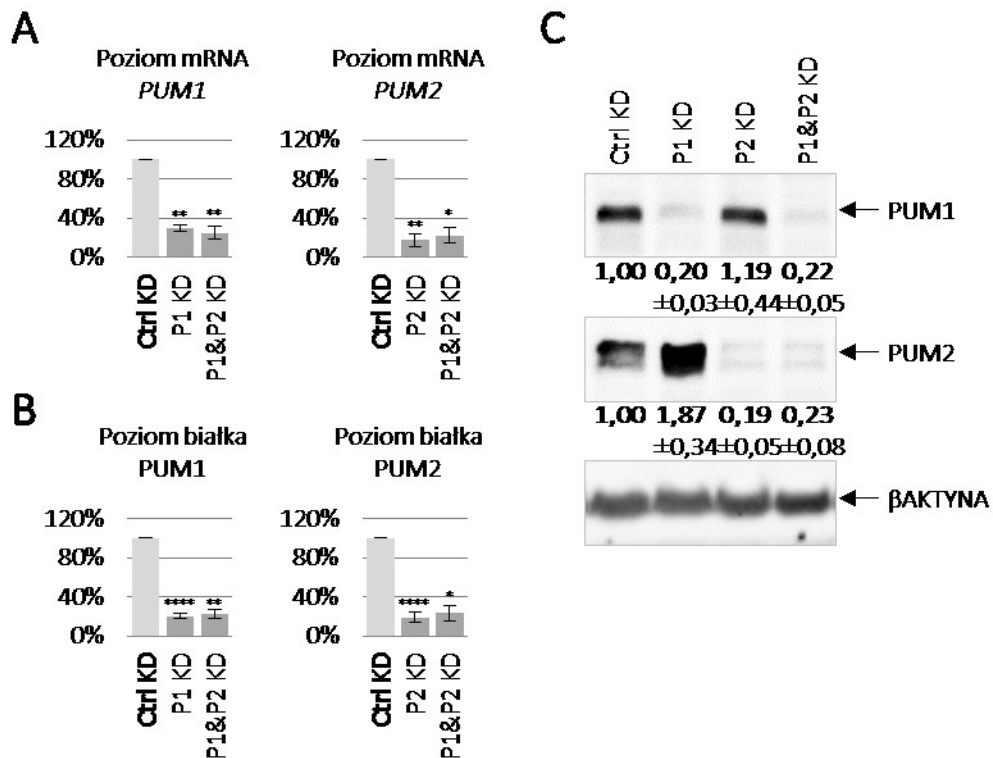


Rycina 15. Wpływ nadekspresji białek PUM (P1 i P2) względem pustego wektora pCMV6-entry (pC) na ekspresję plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę *Renilla* w fuzji z regionami 3'UTR wszystkich trzech *SPIN* (*SP1*, *SP3* i *SP4*) lub *GAPDH*, jako kontrolę negatywną. A – Ekspresja lucyferazy przy nadekspresji PUM wyrażono w procentach jednostek RLU (ang. *Relative Luciferase Units*), gdzie 100% RLU przyznano dla nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry. Przedstawione wyniki pochodzą z czterech niezależnych doświadczeń. W każdym eksperymencie wykonano trzy powtórzenia, a każde mierzone dwukrotnie. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (**** $p \leq 0,00005$). B – Wykrywanie białek PUM po nadekspresji metodą Western blot. Pokazano, że jednym z mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji *SPIN* może być represja przez białka PUM.

6.9. Wyciszenie endogennej ekspresji genów *PUM* powoduje efekt niezgodny z oczekiwaniem, tzn. niewielką represję lucyferazowych reporterów kodujących regiony 3'UTR *SPIN*

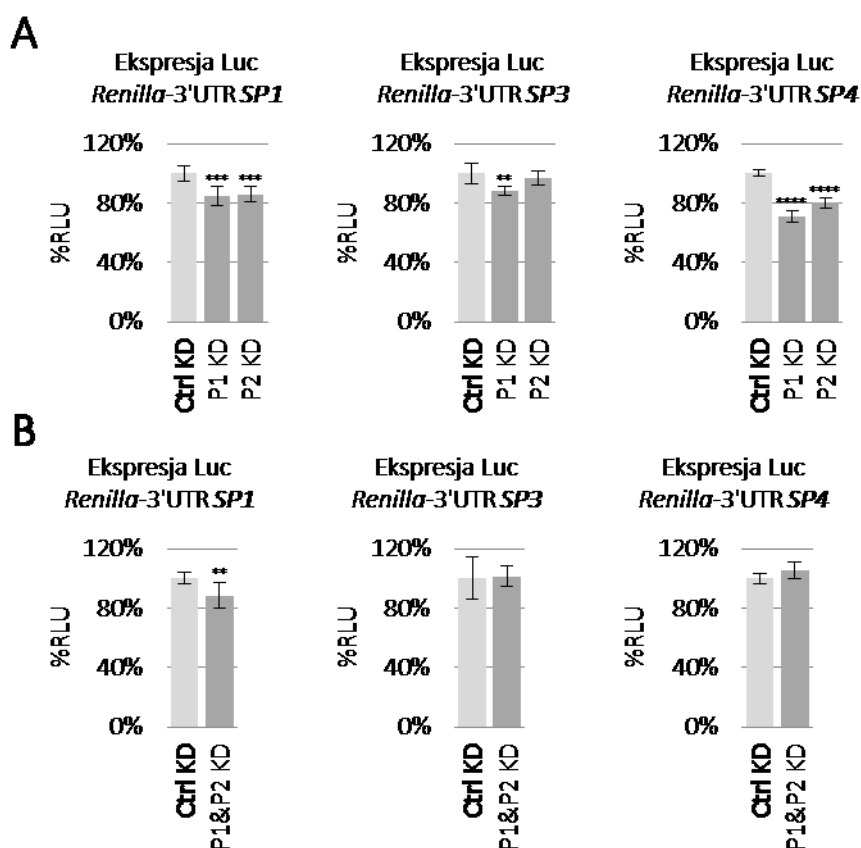
Skoro nadekspresja białek PUM powoduje obniżenie ekspresji lucyferazy *Renilla* z plazmidu reporterowego kodującego regiony 3'UTR *SPIN* postanowiono sprawdzić, czy wyciszenie endogennej ekspresji genów *PUM* spowoduje efekt odwrotny. W pierwszym etapie badano wydajność wyciszenia ekspresji genów *PUM* pod wpływem specyficznych siRNA względem siRNA kontrolnego. W ilościowej reakcji RT-qPCR sprawdzono, że pod wpływem siRNA poziom mRNA *PUM1* uległ obniżeniu o ~70% ($p \leq 0,005$, $p = 0,00082$), *PUM2* o ~82% ($p \leq 0,005$, $p = 0,0036$), a w przypadku wyciszenia obu o odpowiednio ~75% ($p \leq 0,005$, $p = 0,0030$) i ~78% ($p \leq 0,05$, $p = 0,0056$) (**Rycina 16A**).

Natomiast w póliłościowej metodzie Western blot z pięciu niezależnych eksperymentów pokazano, że poziom białka PUM1 uległ obniżeniu o ~80% ($p \leq 0,00005$, $p = 5,68 \times 10^{-12}$), PUM2 o ~81% ($p \leq 0,00005$, $p = 4,82 \times 10^{-10}$), a w przypadku wyciszenia obu genów z dwóch niezależnych doświadczeń, o odpowiednio ~78% ($p \leq 0,005$, $p = 0,0021$) i ~77% ($p \leq 0,05$, $p = 0,0055$). Pomiary poziomu białek normalizowano względem poziomu β AKTYNY (**Rycina 16B i C**).



Rycina 16. Sprawdzenie efektywności wyciszenia (KD) ekspresji genów *PUM* w komórkach TCam-2. Komórki transfekowano siRNA specyficznym dla *PUM* pojedynczo (oznaczono P1 KD i P2 KD) i razem (P1&P2 KD) lub kontrolnym siRNA (Ctrl KD). Pokazano, że wyciszenie ekspresji *PUM1* (P1 KD, P1&P2 KD) i *PUM2* (P2 KD, P1&P2 KD) było efektywne na poziomie mRNA – A (analiza RT-qPCR) oraz białka – B i C (analiza Western blot). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$ i **** $p \leq 0,00005$).

Zaobserwowano, że efektywne wyciszenie ekspresji genów *PUM1* i *PUM2* pojedynczo, powodowało efekt odwrotny do oczekiwanego, tzn. niewielką represję lucyferazy *Renilla* z plazmidu reporterowego zawierającego region 3'UTR *SPIN1* o odpowiednio ~15% ($p = 0,00025$) i ~14% ($p = 0,00017$) i *SPIN4* o odpowiednio ~29% ($p = 1,94 \times 10^{-10}$) i ~20% ($p = 4,14 \times 10^{-9}$) (**Rycina 17A**). Co więcej, w przypadku plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę *Renilla* w fuzji z 3'UTR *SPIN3*, dochodziło do niewielkiej represji tylko pod wpływem wyciszenia ekspresji *PUM1* o ~12% ($p = 0,00072$). Natomiast wyciszenie ekspresji *PUM2* nie wpływało na ekspresję tego plazmidu (**Rycina 17A**).



Rycina 17. Wpływ wyciszenia (KD) ekspresji genów *PUM* na ekspresję plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę *Renilla* w fuzji z regionami 3'UTR wszystkich trzech *SPIN*. A – Ekspresja lucyferazy przy wyciszaniu ekspresji genów *PUM* pojedynczo (P1 KD i P2 KD). B – Razem (P1&P2 KD). Ekspresję wyrażono w procentach jednostek RLU (ang. *Relative Luciferase Units*), gdzie jako 100% RLU oznaczono wyciszenie kontrolne (Ctrl KD). Pokazano, że wyciszenie ekspresji genów *PUM* pojedynczo powodowało niewielką represję lucyferazy *Renilla* z plazmidu reporterowego kodującego region 3'UTR *SPIN1* i *SPIN4*, w stosunku do kontrolnego siRNA. Natomiast ekspresja plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę *Renilla* w fuzji z 3'UTR *SPIN3* nie ulegała represji jedynie przy wyciszeniu *PUM2*. Może to oznaczać, że regulacja ekspresji mRNA *SPIN3* przez białko *PUM2* jest bardziej istotna niż *PUM1*, czyli mechanizm represji mRNA *SPIN3* przez białko *PUM1* w porównaniu z *PUM2* jest odmienny. Przedstawione wyniki pochodzą z dwóch niezależnych doświadczeń. W każdym eksperymencie wykonano trzy powtórzenia i każde mierzono dwukrotnie. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ i **** $p \leq 0,00005$).

Pomimo wyciszenia obu genów *PUM* obserwowano statystycznie istotną represję plazmidu reporterowego kodującego 3'UTR *SPIN1* o ~11% ($p=0,0048$). Natomiast w tych samych warunkach represja plazmidów zawierających 3'UTR *SPIN3* i *SPIN4* (**Rycina 17B**) nie miała miejsca. Przedstawione dane pochodzą z dwóch niezależnych doświadczeń. W każdym z nich wykonano trzy powtórzenia mierzone dwukrotnie. Można założyć, że represja lucyferazy *Renilla* plazmidu reporterowego przez endogenne białka *PUM* jest zbyt słaba, by derepresja (czyli wzrost ekspresji) pod wpływem wyciszenia ekspresji genów *PUM* mogła być zaobserwowana.

Należy zwrócić szczególną uwagę, że w przypadku wyciszania pojedynczych genów *PUM*, tylko w przypadku *PUM2*, miał miejsce efekt całkowitego braku represji plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę *Renilla* w fuzji z 3'UTR *SPIN3*. Obserwacja ta może oznaczać, że białko *PUM2* jest dla regulacji ekspresji *SPIN3* szczególnie istotne. Wydaje się, że pomimo podobieństwa struktury białka *PUM1* i *PUM2* nie są funkcjonalnie identyczne. Tę kwestię poddano analizie w następnej części wyników rozprawy.

6.10. Domena PUF białek *PUM1* i *PUM2* oddziałuje specyficznie z fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3* zawierającym motywy podobne do PBE

Skoro zaobserwowano nieco odmienną regulację mRNA *SPIN3* przez białko *PUM1* w porównaniu z *PUM2*, postanowiono przeprowadzić porównawczą analizę interakcji domen wiążących RNA, PUF1 i PUF2 (odpowiednio białka *PUM1* i *PUM2*) z 3'UTR powyższego mRNA, przy pomocy retardacji żelowej. Z powodu ograniczenia czasem, do analizy wybrano tylko fragment 3'UTR *SPIN3* zawierający motyw PBE-2 o sekwencji konsensusowej UGUAAAUU (podkreślono nukleotydy identyczne jak w klasycznym motywie PBE). Uzasadnieniem wyboru tego fragmentu było 1/ położenie motywu PBE-2 na tyle daleko od miejsca alternatywnej poliadenylacji, że nie byłby usuwany w przypadku wyboru przez maszynę transkrypcyjną proksymalnego sygnału poliadenylacji. Mogłoby to mieć miejsce np. w przypadku motywu PBE-3. 2/ W okolicy motywu PBE-2 znajdują się ponadto dodatkowe potencjalne miejsca wiązania przez białka *PUM*, podobne do PBE, zwane dalej motywami A (AUUGUA) i B (GUUGU) (**Rycina 18**).

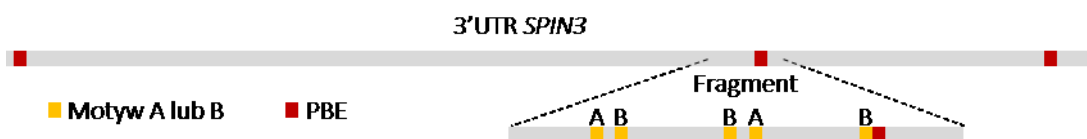
Jak wyżej wspomniano, oddziaływanie domeny PUF białek *PUM* z fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3* analizowano techniką retardacji żelowej (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay* – EMSA). Polega ona na porównaniu migracji nagiego RNA z migracją RNA inkubowanym uprzednio z badanym białkiem, w natywnym żelu poliakrylamidowym. Utworzony kompleks rybonukleoproteinowy (ang. *RiboNucleo-Protein* – RNP) migruje wolniej (ang. *retardation*) w porównaniu z RNA nagim.

Zaobserwowano, że oczyszczone domeny PUF1 i PUF2 wiązały się z fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3* (**Rycina 19A**). Jednak pomimo zastosowania takiego samego stężenia białka, wiązanie domeny PUF1 było wydajniejsze, niż PUF2. Mianowicie już w niższych stężeniach białka powstawały dwa kompleksy, szybciej migrujący RNP1 oraz wolniej migrujący RNP2 (**Rycina 19A**, lewy panel). Natomiast w przypadku domeny PUF2, nawet w wysokich stężeniach białka obecny był głównie kompleks niższego rzędu

RNP1, natomiast kompleks RNP2 był znacznie słabszy (**Rycina 19A**, prawy panel). Wynik ten uzyskiwano niezależnie od preparatów białkowych.

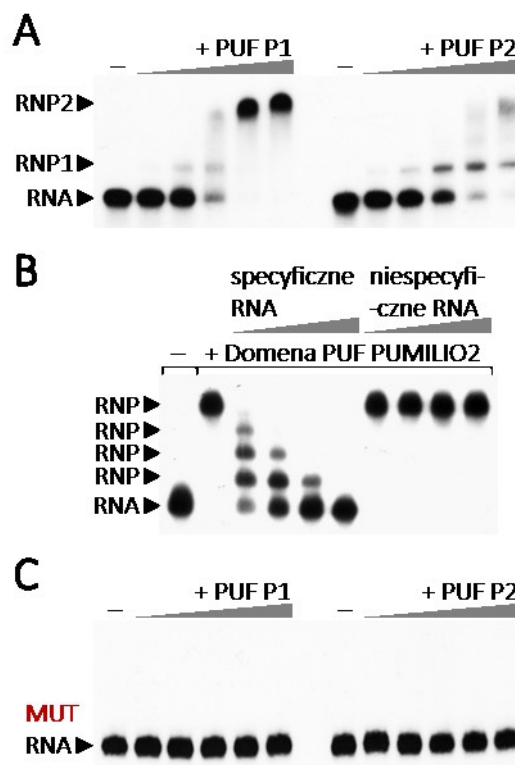
Specyficzność powyższego wiązania analizowano z zastosowaniem testu kompetycji, lecz z powodu ograniczeń czasowych jedynie dla PUF2 (**Rycina 19B**). Ów test polega na wykonaniu dwóch równoległych doświadczeń, w których stosowane są odmienne kompetytory. W pierwszym doświadczeniu, do reakcji wiązania radioaktywnego badanego RNA z białkiem dodaje się wzrastające stężenie tego samego badanego, lecz nieradioaktywnego RNA. Natomiast kompetytorem w drugim doświadczeniu był niespecyficzny, nieznakowany RNA. Stężenie kompetytorów w obu doświadczeniach powinno być identyczne. W ten sposób pokazano, że wiązanie fragmentu 3'UTR mRNA *SPIN3* było specyficzne (**Rycina 19B**). Mianowicie przy wzrastających stężeniach badanego RNA nieznakowanego, obserwowano wyraźne zanikanie prążka retardacyjnego (**Rycina 19B**, lewy panel), podczas gdy prążek ten nie zanikał w równoległym doświadczeniu, tzn. po dodawaniu niespecyficznego nieradioaktywnego RNA (**Rycina 19B**, prawy panel).

W następnym etapie postanowiono sprawdzić, czy motywy we fragmencie 3'UTR mRNA *SPIN3*, które według naszych oczekiwań mogłyby warunkować specyficznie oddziaływanie z domeną PUF rzeczywiście taką rolę pełnią. W badanym fragmencie obecny był tylko jeden motyw podobny do PBE. Występowało w nim ponadto kilka motywów o sekwencji GUUGU zwanych motywem A oraz AUUGUA zwanych motywem B. Motywy te były wcześniej opisane, jako specyficznie rozpoznawane przez domenę PUF w oddziaływaniu z mRNA *hunchback* (ABAB) i mRNA *bicoid* (ABB) Muszki owocowej [Dalby i Glover 1993, Zamore i wsp. 1997 i 1999, Gupta i wsp. 2009]. Oba motywy B w 3'UTR mRNA *hunchback* pokrywają się częściowo z później wygenerowanym konsensusem UGUANAUA. W analizowanym fragmencie 3'UTR *SPIN3* motywy A i B występowały w układzie ABBAB (**Rycina 18**). Dlatego mutagenecie postanowiono poddać wszystkie motywy A i B. Istotne, że ostatni motyw B pokrywał się częściowo z motywem PBE-2 (**Rycina 18**, zaznaczono na czerwono).



Rycina 18. Schematyczne przedstawienie sekwencji regionu 3'UTR mRNA *SPIN3* (na szaro) z uwzględnieniem potencjalnych miejsc wiązania dla białek PUM – PBE (na czerwono), A i B (na żółto). W 3'UTR mRNA *SPIN3* oprócz motywów PBE występowały motywy A i B.

Wszystkie motywy A i B we fragmencie 3'UTR mRNA *SPIN3* zmieniono przez wprowadzenie substytucji nukleotydowych z zastosowaniem ukierunkowanej mutagenazy. Stwierdzono brak wiązania domeny PUF ze zmutowanym w powyższy sposób fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3* (**Rycina 19C vs. A**). Oznacza to, że dla wiązania badanego regionu 3'UTR z domeną PUF owe motywy były istotne. A jak wpływa to na regulację w komórce?



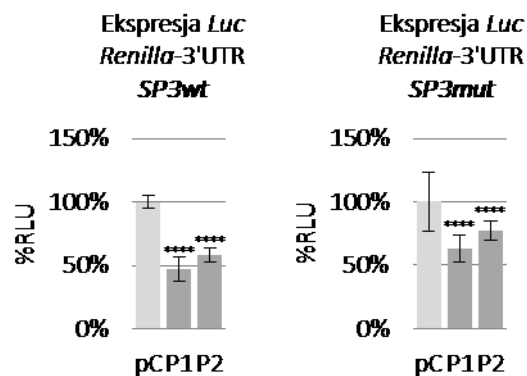
Rycina 19. Analiza wiązania fragmentu 3'UTR mRNA *SPIN3* z domeną PUF1 i PUF2 w teście retardacji żelowej. Znakowany radioaktywnie fragment 3'UTR mRNA *SPIN3* inkubowano z domeną PUF i frakcjonowano w 4% natywnym żelu poliakrylamidowym. Pokazano, że: A – domeny PUF1 i PUF2 wiązały się z fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3*, jednak kinetyka wiązania była odmienna. B – wiązanie fragmentu 3'UTR mRNA *SPIN3* przez domenę PUF2 była specyficzna w teście kompetycji. C – Zmutowany fragment 3'UTR mRNA *SPIN3* w motywach A i B nie wiązał się z domeną PUF.

6.11. Obecność wybranych motywów w regionie 3'UTR jest istotna dla represji mRNA *SPIN3* przez białka PUM

W opisanych powyżej doświadczeniach z zastosowaniem plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę, pokazano odmienny udział białek PUM w represji mRNA *SPIN3*. Biorąc pod uwagę fakt, że efekt represji w komórkach jest wieloczynnikowy, sprawdzano

na ile zależy on rzeczywiście od sekwencji regionu 3'UTR, a precyzyjniej od wyselekcjonowanych motywów, jako potencjalnie dla represji istotnych. Skoro wyniki *in vitro* uzyskane w testach retardacji żelowej wskazały, że istotne dla wiązania białek PUM z 3'UTR mRNA *SPIN3* mogą być motywy A i B, poddano je mutagenезie ukierunkowanej w plazmidzie reporterowym kodującym pełnej długości 3'UTR mRNA *SPIN3*. W ten sposób przygotowany, pozbawiony motywów A i B reporter zastosowano do testów lucyferazowych (Metody).

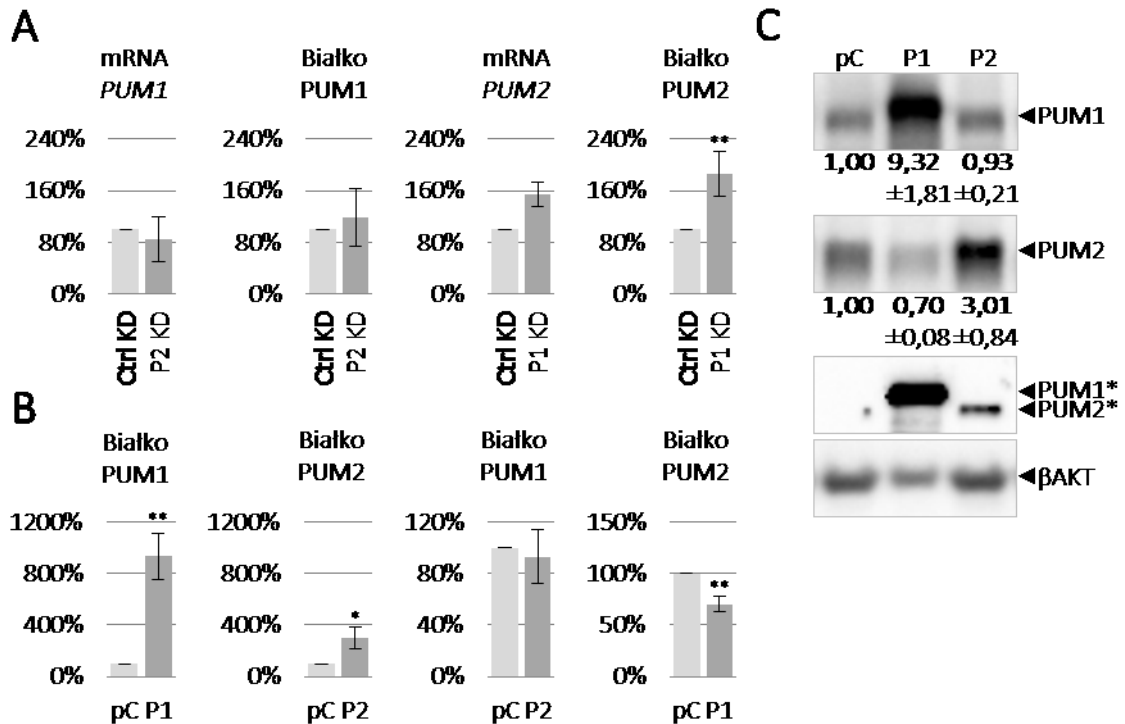
Stwierdzono, że substytucja motywów A i B spowodowała jedynie nieznaczne osłabienie represji przez PUM1 o ~16% i PUM2 o ~19% (**Rycina 20**). Wyniki zostały uzyskane z 4 niezależnych doświadczeń, w każdym wykonano 3 powtórzenia, które mierzono dwukrotnie. Jest wysoce prawdopodobne, że poza motywami A i B (w tym jednego PBE) występują jeszcze inne, które dla represji w komórce są istotne.



Rycina 20. Wpływ nadekspresji białek PUM na ekspresję lucyferazy *Renilla* zawierającej zmutowany region 3'UTR *SPIN3* – pozbawiony motywów A i B (*SP3mut*), w porównaniu z ekspresją 3'UTR typu dzikiego (*SP3wt*). Przedstawione wyniki pochodzą z 4 niezależnych doświadczeń. W każdym z nich wykonano 3 powtórzenia, z których każde mierzono dwukrotnie. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (**** $p \leq 0,00005$). Pokazano, że usunięcie motywów A i B przez wprowadzenie substytucji nukleotydowych spowodowało niewielkie osłabienie represji przez białka PUM.

6.12. Gen *PUM2* jest pod represją białka PUM1

W trakcie pracy nad tym projektem zaobserwowano, że wyciszanie ekspresji genu *PUM1* powodowało wzrost ekspresji genu *PUM2*, na poziomie mRNA o ~54 % (**Rycina 21A**) a na poziomie białka o ~87% ($p=0,00051$) (**Rycina 16C i 21A**). Ponadto nadekspresja białka PUM1 powodowała obniżenie endogennego poziomu białka PUM2 o ~30% ($p=0,0026$) (**Rycina 21B i C**). Oznacza to, że gen *PUM2* jest pod represją białka PUM1.

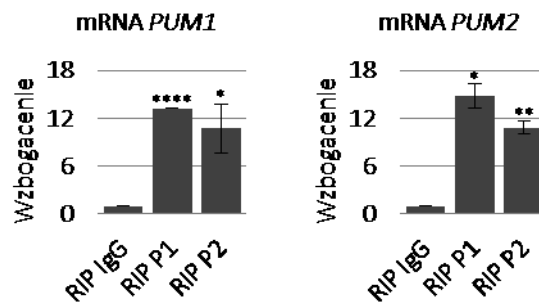


Rycina 21. Negatywny wpływ białka PUM1 na ekspresję genu *PUM2*. A – Wpływ wyciszania ekspresji genów *PUM* (P1 KD i P2 KD) na poziom mRNA i białka swojego paralogu względem wyciszania kontrolnego (Ctrl KD). B – Wpływ nadekspresji białka PUM (P1 i P2) na poziom białka swojego paralogu względem nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (pC). C – Analiza Western blot nadekspresji białek PUM. Grotami strzałek zaznaczono: P1 i P2 – endogenne białka PUM, P1* i P2* – egzogenne białka PUM. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$). Pokazano, że gen *PUM2* jest pod represją białka PUM1.

6.13. Białka PUM1 i PUM2 oddziałują z mRNA *PUM1* i *PUM2*

Skoro ekspresja genu *PUM2* jest regulowana przez białko PUM1 postanowiono sprawdzić, czy mRNA obu *PUM* były obecne w wyżej opisanych immunoprecypitatach RNA (**Wyniki, punkt 7**). Uzyskano odpowiedź pozytywną, a mianowicie w immunoprecypitatach anty-PUM1 oraz anty-PUM2 wykryto wzbogacenie mRNA *PUM1* odpowiednio 13-krotnie ($p=0,000012$) i 11-krotnie ($p=0,044$) oraz *PUM2* odpowiednio 15-krotnie ($p=0,0059$) i 11-krotnie ($p=0,0035$), w stosunku do kontroli negatywnej (**Rycina 22**). Nie było to zaskoczeniem kiedy okazało się, że 3'UTR mRNA *PUM1* zawiera jeden

motyw PBE, natomiast *PUM2* – trzy motywy PBE. Ten wynik pokazuje potencjalną potranskrypcyjną autoregulację oraz regulację wzajemną ekspresji genów *PUM*. Interesujące, że mRNA *PUM1* występuje w immunoprecypitacie anty-*PUM2*. Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, w analizach PTGR przez białka *PUM* należy uwzględnić wpływ białka *PUM1* na ekspresję *PUM2* a być może wzajemny, choć nie zostało to uwidocznione w doświadczeniu w którym wyciszano geny *PUM1* i *PUM2*.



Rycina 22. Wzbogacenie mRNA *PUM* w immunoprecypitatach anty-*PUM1* (RIP P1) i anty-*PUM2* (RIP P2), względem kontroli negatywnej – podłoże opłaszczony IgG (RIP IgG) zmierzono ilościową reakcją RT-qPCR. Przedstawione wyniki pochodzą z dwóch niezależnych doświadczeń. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,00005$). Pokazano, że mRNA *PUM1* i *PUM2* były wzbogacone w obu immunoprecypitatach. Wykrycie wzbogacenia może oznaczać potranskrypcyjną autoregulację oraz regulację wzajemną białek *PUM*.

6.14. *PUM1* powoduje zwolnienie proliferacji

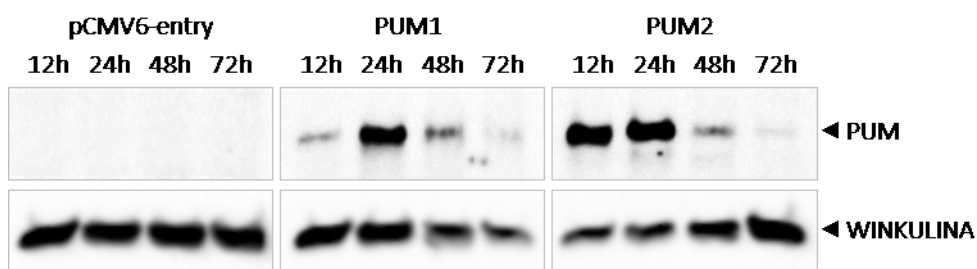
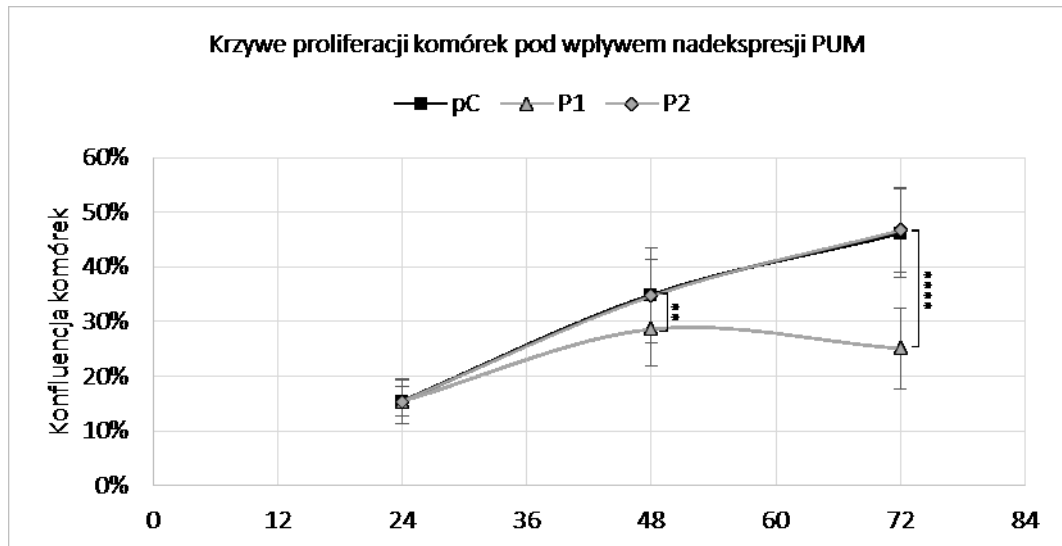
Skoro pokazano wpływ białek *SPIN* na proliferację komórek TCam-2, a ich ekspresja jest potranskrypcyjnie regulowana przez białka *PUM*, postanowiono sprawdzić, czy również białka *PUM* wpływają na proliferację komórek TCam-2. Można było oczekiwać, że skoro *PUM* powodują represję mRNA *SPIN*, ich efekty na komórki TCam-2 są w stosunku do *SPIN* przeciwne.

Na początku sprawdzono dynamikę nadekspresji białka *PUM1* i *PUM2* w różnych czasach po transfekcji komórek TCam-2. Ekspresję fuzyjnych białek *PUM* sprawdzano metodą Western blot z zastosowaniem przeciwciała anty-DDK (FLAG[®]). Okazało się, że 24 godz. po transfekcji białka te ulegały nadekspresji na wysokim poziomie, który stopniowo obniżał się w trakcie dłuższej hodowli trwającej 72 godz. (**Rycina 23, u dołu**).

Pokazano, że pod wpływem nadekspresji białka *PUM1* proliferacja komórek linii TCam-2 była w istotny sposób zwolniona, w stosunku do komórek transfekowanych pustym wektorem pCMV6-entry. Ów efekt był widoczny już w 48 godz. po transfekcji ($p \leq 0,005$, $p = 0,0021$), a w 72 godz. był jeszcze silniejszy ($p \leq 0,00005$, $p = 6,42 \times 10^{-11}$).

(Rycina 23). Natomiast nadekspresja białka PUM2 nie miała wpływu na proliferację (Rycina 23). Konfluencję mierzono tak jak w przypadku SPIN (Wyniki, punkt 1).

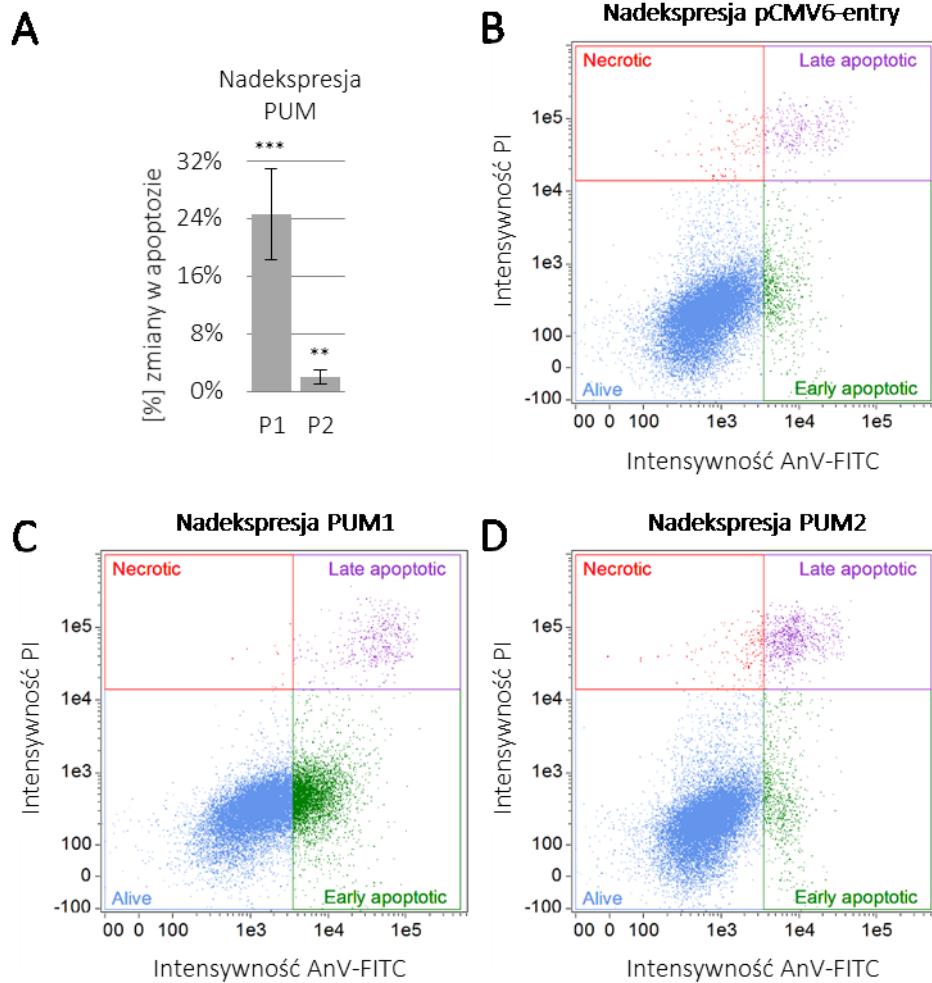
Zwolnienie proliferacji w przypadku nadekspresji PUM1 mogło być spowodowane np. represją mRNA, które proliferację przyspieszają, tzn. działających podobnie do badanej w tej rozprawie SPIN1.



Rycina 23. Wpływ nadekspresji białek PUM na proliferację komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 3 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF PUM (oznaczono P1 i P2) lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC) i mierzono konfluencję. Pomiar wykonano w trzech punktach czasowych (24, 48 i 72 godz.). U góry: wykres zależności konfluencji komórek TCam-2 z nadekspresją PUM, względem pustego wektora pCMV6-entry, do czasu po transfekcji (w godz.). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (** $p \leq 0,005$; **** $p \leq 0,00005$). U dołu: sprawdzenie poziomu nadekspresji PUM metodą Western blot względem pustego wektora pCMV6-entry w różnych czasach po transfekcji komórek. Po prawej stronie górnym strzałką zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom PUM oraz białku WINKULINIE, będącej kontrolą ilości białka w ścieżkach (ang. *loading control*). 24 godz. po transfekcji białka PUM, ulegały najwyższej nadekspresji, natomiast po dłuższym czasie hodowli, poziom ich nadekspresji obniżał się znacznie. Pokazano, że nadekspresja PUM1 (P1) zwalniała proliferację komórek TCam-2. Mogło to być spowodowane np. represją mRNA, które proliferację przyspiesza np. *SPIN1*.

6.15. PUM1 w odróżnieniu od PUM2 znacząco wzmaga apoptozę

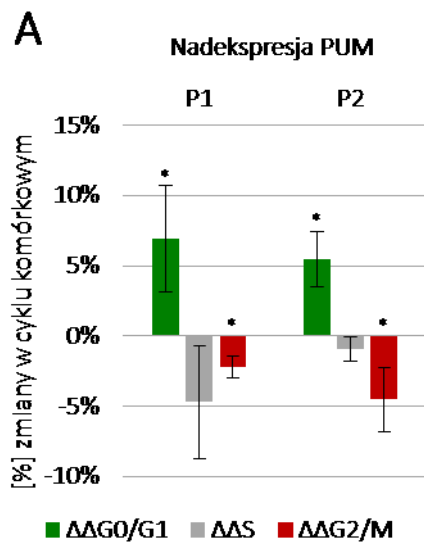
Skoro pokazano, że SPIN stanowiące cele regulacji białek PUM modulują apoptozę komórek TCam-2, postanowiono sprawdzić czy białka PUM również wpływają na ten proces. Zweryfikowano tę kwestię przeprowadzając doświadczenia analogiczne do wcześniej wykonanych dotyczących SPIN (**Wyniki, punkt 2**). Zaobserwowano, że nadekspresja białka PUM1 powodowała istotny wzrost apoptozy, który wynosił ~25% ($p \leq 0,0005$, $p = 0,00027$) (**Rycina 24A i C**), względem kontroli, czyli komórek transfekowanych pustym wektorem pCMV6-entry (**Rycina 24B**). Również nadekspresja białka PUM2 prowadziła do wzrostu apoptozy, chociaż znacznie mniejszego, bo wynoszącego zaledwie 2%. Tym niemniej, ów wzrost był statystycznie istotny ($p \leq 0,005$, $p = 0,0045$) (**Rycina 24A i D**). Co więcej, pro-apoptotyczny efekt nadekspresji białka PUM1 był spójny z negatywnym wpływem tego białka na proliferację komórek TCam-2. Pro-apoptotyczny wpływ białka PUM1 (jak i PUM2) mógłby odbywać się poprzez represję mRNA kodujących anty-apoptotyczne białka, których przykład stanowi SPIN1. Efekt obu tych białek w powiązaniu z represją mRNA SPIN1 przez PUM jest spójny. Jednak efekt ten nie był w pełni spójny z wykrytą w rozprawie negatywną regulacją ekspresji SPIN3 i 4 przez białka PUM. Skoro ekspresja genów *SPIN* jest negatywnie regulowana przez białka PUM można było się spodziewać anty-apoptotycznego działania białek PUM, bowiem SPIN3 i SPIN4 działały pro-apoptotycznie.



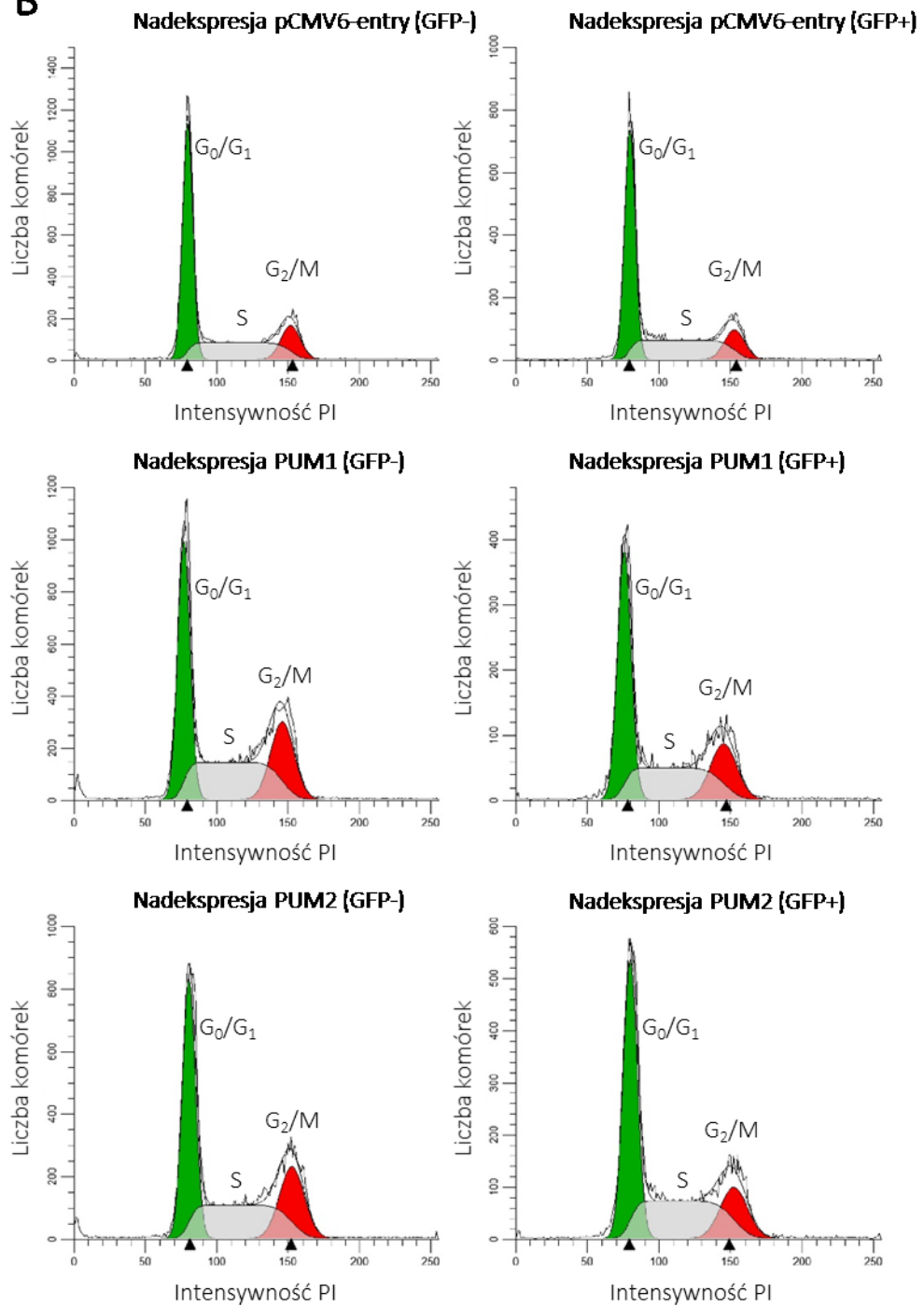
Rycina 24. Wpływ nadekspresji białek PUM na apoptozę komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 4 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF PUM (oznaczono P1 i P2) lub pustym wektorem pCMV6-entry. Komórki barwiono i mierzono intensywność fluorescencji Aneksyny V skoniugowanej z FITC (AnV-FITC). A –Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (na wykresie wartość 0). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$). B, C i D – Wykresy dwuparametrowe (scatter ploty) zależności intensywności jodku propidyny (PI) do AnV-FITC służące do analizy poziomu apoptozy. Zaznaczono komórki: żywe – na niebiesko, we wczesnej apoptozie – na zielono, w późnej apoptozie – na fioletowo, oraz martwe na czerwono. Pokazano, że PUM1 (P1) i PUM2 (choć w dużo mniejszym stopniu) promowały apoptozę komórek TCam-2. Pro-apoptotyczne działanie białka PUM1 (i w niewielkim stopniu PUM2) mogłoby odbywać się poprzez represję mRNA kodujących anty-apoptotyczne białka, tj. SPIN1 lub jej podobne.

6.16. PUM1 i PUM2 powodują nieznaczne zwolnienie cyklu komórkowego

Biorąc pod uwagę wpływ SPIN1 i SPIN3 na cykl komórkowy oraz ich regulację przez białka PUM1 i PUM2 postanowiono sprawdzić, czy również nadekspresja tych białek moduluje cykl komórkowy. Okazało się, że nadekspresja białek PUM1 i PUM2 powodowała zwolnienie cyklu komórkowego (**Rycina 25**). Mianowicie pod wpływem nadekspresji PUM1 zaobserwowano wzrost liczby komórek w fazie G_0/G_1 o $\sim 6,9\%$ ($p \leq 0,05$, $p = 0,025$) oraz proporcjonalny spadek liczby komórek w fazie S o $\sim 4,7\%$ i G_2/M o $\sim 2,2\%$ ($p \leq 0,05$, $p = 0,0077$), w porównaniu do komórek transfekowanych pustym wektorem pCMV6-entry. (**Rycina 25A i B**). Natomiast w przypadku nadekspresji PUM2 odnotowano zwiększenie liczby komórek w fazie G_0/G_1 o $\sim 5,5\%$ ($p \leq 0,05$, $p = 0,0085$) oraz proporcjonalne zmniejszenie liczby komórek w fazie S o $\sim 1\%$ i G_2/M o $\sim 4,5\%$ ($p \leq 0,05$, $p = 0,021$), w porównaniu do kontroli (**Rycina 25A i B**). Zamieszczony wynik pochodzi z czterech niezależnych eksperymentów. Ponadto jest spójny z wynikiem pokazującym pozytywny wpływ na cykl komórkowy SPIN1 i SPIN3 (**Rycina 5**), które są pod represją obu białek PUM (**Rycina 14A**).



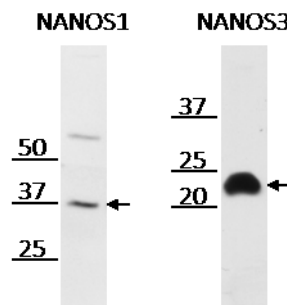
Rycina 25. Wpływ nadekspresji białek PUM na cykl komórkowy. Komórki transfekowano w 3 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF PUM (oznaczono P1 i P2) lub pustym wektorem pCMV6-entry. Komórki utrwalano, barwiono i mierzono intensywność fluorescencji jodku propidyny (PI) A – Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (na wykresie wartość 0). B – Histogramy wygenerowane przez program ModFit LT służące do analizy cyklu komórkowego. Zaznaczono kolejne fazy cyklu: G_0/G_1 – na zielono, S – na szaro i G_2/M – na czerwono. Pokazano, że nadekspresja PUM1 i PUM2 powoduje wzrost liczby komórek w fazach G_0/G_1 oraz spadek liczby komórek w fazie S i G_2/M , co oznacza, że białka te zwalniają cykl komórkowy TCam-2.

B

6.17. Białka NANOS1, NANOS2 i NANOS3 regulują ekspresję *SPIN* w odmienny sposób, w zależności od paraloga

Skoro, począwszy od Muszki owocowej (łac. *Drosophila melanogaster*) białka Nanos wielokrotnie opisano jako kofaktory białek PUM w PTGR, postanowiono sprawdzić, czy regulują one także mRNA *SPIN*. Występujący w jednej kopii u Muszki owocowej gen *nanos* ewoluował i dał początek trzem paralogom *NANOS1*, *NANOS2* i *NANOS3* u ssaków, które ulegają ekspresji głównie w męskich komórkach gametogenicznych.

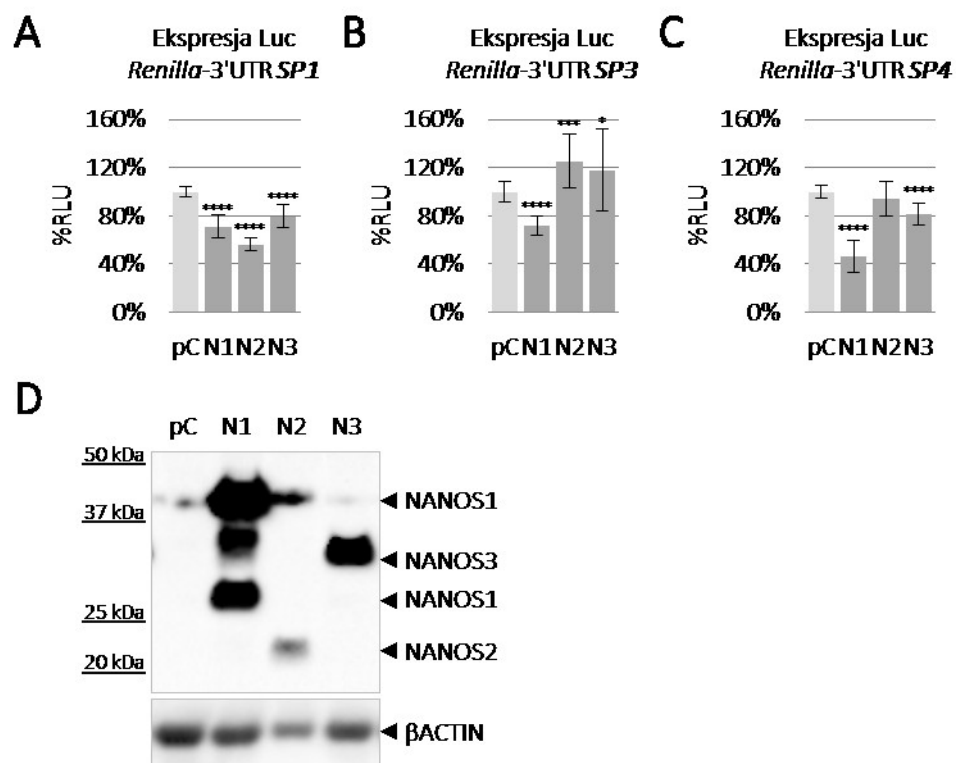
W analizie transkryptomu komórek TCam-2 pokazano, że przeciętny poziom transkryptów *NANOS1* i *NANOS3* w wartościach FPKM wynosił odpowiednio 1,77, dla *NANOS1* oraz 2,09 dla *NANOS3*. Natomiast w przypadku *NANOS2* wartość FPKM była bardzo niska (rzędu tła) i wynosiła 0,0085 [Śmiałek i wsp., dane nieopublikowane]. Zatem można przyjąć, że w komórkach TCam-2 *NANOS2* nie ulega ekspresji. Obecność endogennych białek *NANOS1* i *NANOS3* wykryto z zastosowaniem techniki Western blot oraz przeciwciał wcześniej przetestowanych jako działające specyficznie (**Rycina 26**).



Rycina 26. Wykrywanie białek *NANOS1* i *NANOS3*, w komórkach TCam-2 techniką Western blot z zastosowaniem specyficznych przeciwciał anti-*NANOS1* i anti-*NANOS3*. Kreskami po lewej stronie wskazano markery mas wyrażone w kDa a po prawej strzałkami prążki odpowiadające poszczególnym identyfikowanym białkom *NANOS1* i *NANOS3*. Zatem w komórkach TCam-2 występują oba białka *NANOS1* i *NANOS3*.

Na początek oceniano poziom nadekspresji wszystkich trzech białek *NANOS* w komórkach TCam-2 (**Rycina 27D**). Następnie przeprowadzano nadekspresję w obecności plazmidów reporterowych kodujących lucyferazę *Renilla* w fuzji z regionami 3'UTR każdej ze *SPIN*. Postanowiono sprawdzić, czy i w jakim stopniu białka *NANOS1*, *NANOS2* i *NANOS3*, wpływają na regulację ekspresji *SPIN*. Okazało się, że w przypadku 3'UTR *SPIN1*, wszystkie trzy białka *NANOS* powodowały represję lucyferazy (**Rycina 27A**). Najsilniejszy, ~44% efekt represji obserwowano dla białka *NANOS2* ($p=1,53 \times 10^{-16}$), następnie ~29% dla *NANOS1* ($p=3,14 \times 10^{-9}$) i wreszcie ~20% dla *NANOS3* ($p=8,63 \times 10^{-7}$). Podobnie, białka *NANOS1* i *NANOS3* powodowały represję

lucyferazy w przypadku 3'UTR *SPIN4*, (**Rycina 27C**), o odpowiednio ~54% ($p=1,14 \times 10^{-11}$) i ~18% ($p=3,58 \times 10^{-6}$), podczas gdy nadekspresja NANOS2 nie miała wpływu na poziom ekspresji lucyferazy. Natomiast w przypadku 3'UTR *SPIN3* uzyskano odmienne efekty w zależności od paraloga NANOS. Mianowicie przy nadekspresji NANOS1 represja wynosiła ~28%, ($p=3,73 \times 10^{-13}$), podczas gdy nadekspresja NANOS2 i NANOS3 powodowały efekt przeciwny, wzrost ekspresji lucyferazy o odpowiednio ~26% ($p=5,71 \times 10^{-5}$) i ~18% ($p=0,025$) (**Rycina 27B**). Na przykładzie 3'UTR mRNA *SPIN3* pokazano, że białka NANOS mogą przeciwstawnie wpływać na ekspresję tego samego mRNA. Mianowicie dany mRNA może być negatywnie regulowany przez danego paraloga NANOS (NANOS1) a jednocześnie aktywowany przez inne paralogi (NANOS2 i NANOS3) czego dotąd nie opisano.



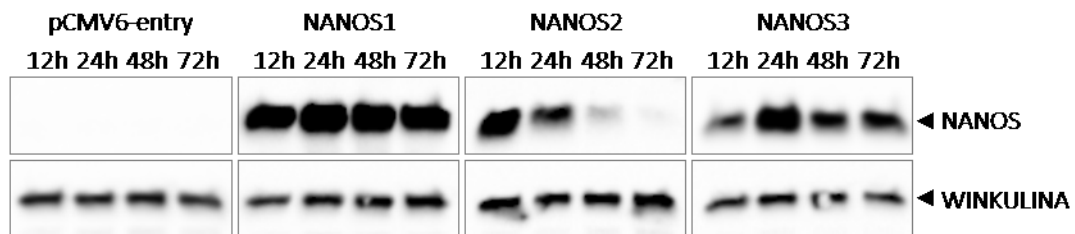
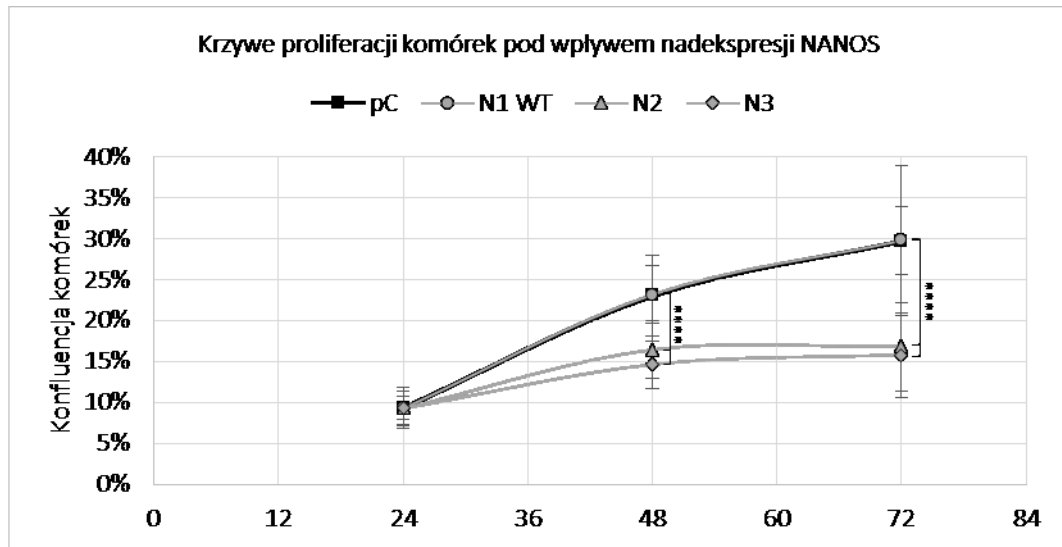
Rycina 27. Wpływ nadekspresji białek NANOS (N1, N2 i N3) względem pustego wektora pCMV6-entry (pC) na ekspresję plazmidu reporterowego kodującego lucyferazę *Renilla*, w fuzji z regionami 3'UTR wszystkich trzech *SPIN*. A – Ekspresja lucyferazy przy nadekspresji białek NANOS wyrażono w procentach jednostek RLU (ang. *Relative Luciferase Units*), gdzie 100% RLU przyznano dla nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry. Przedstawione wyniki pochodzą z dwóch dla SP1 i SP4 oraz trzech dla SP3 niezależnych doświadczeń. W każdym eksperymencie wykonano trzy powtórzenia, a każde powtórzenie mierzono dwu-krotnie. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,0005$ i **** $p \leq 0,00005$). B – Wykrywanie białek NANOS po nadekspresji metodą Western blot. Pokazano, że jednym z mechanizmów potranskrypcyjnej regulacji ekspresji *SPIN* może być represja lub aktywacja przez białka NANOS.

6.18. Białka NANOS2 i NANOS3 powodują zwolnienie proliferacji, m.in. poprzez represję mRNA *SPIN1*

Skoro pokazano, że białka SPIN wpływają na proliferację komórek TCam-2, a ich ekspresja jest potranskrypcyjnie regulowana przez białka NANOS, postanowiono sprawdzić, czy również białka NANOS wpływają na proliferację komórek. W tym celu na początku oceniono poziom nadekspresji białek NANOS1, NANOS2 i NANOS3 w linii komórkowej TCam-2 w kolejnych dniach po transfekcji. Ekspresję fuzyjnych białek NANOS sprawdzano metodą Western blot z zastosowaniem komercyjnego przeciwciała anti-DDK (FLAG[®]) (**Rycina 28, u dołu**). Okazało się, że dynamika ekspresji pomimo zastosowania tego samego wektora była dla każdego paraloga bardzo różna. Interesujące, że białko NANOS1 ulegało względnie stałej nadekspresji w czasie trwania całego eksperymentu, czyli od 12 do 72 godz. po transfekcji. Z kolei dynamika ekspresji białka NANOS2 była odmienna, tzn. najwyższa przypadła w 12 godz. a następnie bardzo silnie obniżała się i zanikała w 72 godz. po transfekcji. Natomiast nadekspresja białka NANOS3 była najwyższa w 24 godz. a następnie malała w kolejnych dniach aż do 72 godz. po transfekcji włącznie.

Pokazano, że białko NANOS1 nie miało wpływu na proliferację komórek TCam-2, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (**Rycina 28**) (krzywe nakładają się). Natomiast zaobserwowano znaczący negatywny wpływ na proliferację białek NANOS2 i NANOS3. Efekt zwolnienia proliferacji był widoczny już w 48 godz. po transfekcji ($p \leq 0,00005$; $p = 9,44 \times 10^{-6}$ i $p = 3,14 \times 10^{-8}$ odpowiednio dla NANOS2 i NANOS3), a w 72 godz. obniżenie liczby komórek było jeszcze silniejsze ($p \leq 0,00005$; $p = 1,48 \times 10^{-6}$ i $p = 2,99 \times 10^{-7}$ odpowiednio dla NANOS2 i NANOS3) (**Rycina 28**). Negatywny wpływ NANOS2 i NANOS3 na proliferację mógłby być w rzeczywistości silniejszy, biorąc pod uwagę znacznie niższy poziom nadekspresji tych białek, w porównaniu do poziomu białka NANOS1 (**Rycina 28, u dołu**). Konfluencję komórek mierzono tak jak w przypadku SPIN i PUM (**Wyniki, punkt 1 i 14**).

Zwolnienie proliferacji w przypadku nadekspresji NANOS2 i NANOS3 mogło następować poprzez represję mRNA *SPIN1* (i/lub jej podobnych) oraz zwiększenie ekspresji mRNA *SPIN3*.

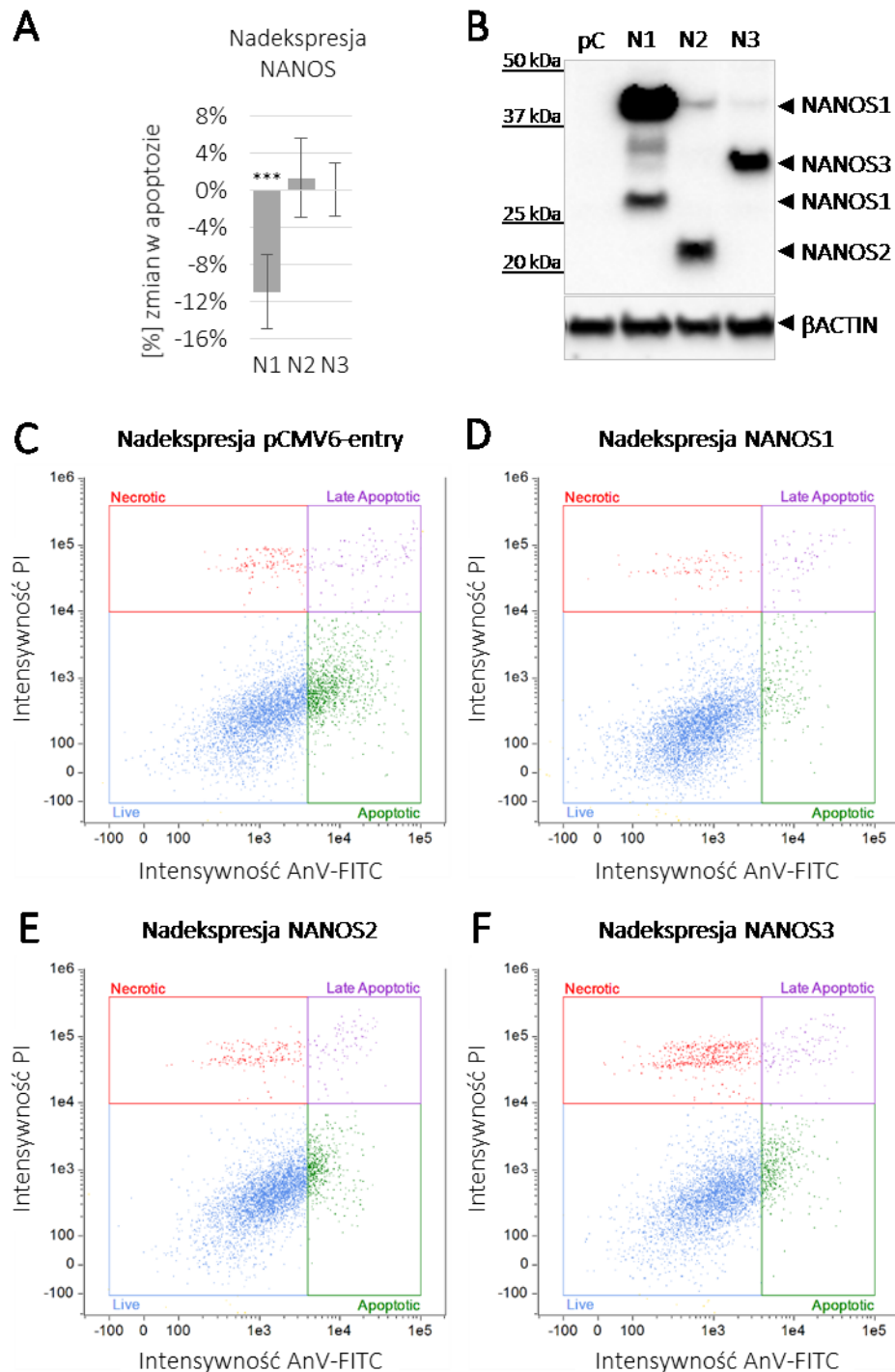


Rycina 28. Wpływ nadekspresji białek NANOS na proliferację komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 3 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF NANOS (oznaczono N1, N2 i N3) lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC) i mierzono konfluencję. Pomiar wykonano w trzech punktach czasowych (24, 48 i 72 godz.). U góry: wykres zależności konfluencji komórek TCam-2 z nadekspresją NANOS, względem pustego wektora pCMV6-entry do czasu po transfekcji (w godz.). Pokazano, że nadekspresja NANOS2 (N2) i NANOS3 (N3) zwalniała proliferację komórek TCam-2. Mogło to być spowodowane np. represją mRNA, które proliferację przyspiesza np. *SPIN1*. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (**** $p \leq 0,00005$). U dołu: sprawdzenie poziomu nadekspresji NANOS metodą Western blot względem pustego wektora pCMV6-entry w różnych czasach po transfekcji komórek. Po prawej stronie górnym strzałkami zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom NANOS i białku WINKULINIE, będące kontrolą ilości białka w ścieżkach (ang. *loading control*).

6.19. Białko NANOS1 działa anty-apoptotycznie, m.in. poprzez represję mRNA *SPIN3* i *SPIN4*

Skoro pokazano wpływ SPIN na apoptozę komórek TCam-2, a jednocześnie regulację ich ekspresji przez białka NANOS, postanowiono zbadać również wpływ nadekspresji białek NANOS na apoptozę. Doświadczenia przeprowadzono według schematu zastosowanego dla SPIN i PUM (**Wyniki, punkt 2 i 15**), w 2 niezależnych eksperymentach, w których wykonano 3 powtórzenia techniczne. Zaobserwowano, że nadekspresja białka NANOS1 powodowała spadek apoptozy aż o ~11% ($p \leq 0,0005$, $p = 0,00016$) względem komórek kontrolnych, tzn. transfekowanych pustym wektorem pCMV6-entry (**Rycina 29A, D vs. C**). Natomiast nadekspresja białek NANOS2 i NANOS3 nie miała wpływu na apoptozę komórek TCam-2 (**Rycina 29A, E i F vs. C**).

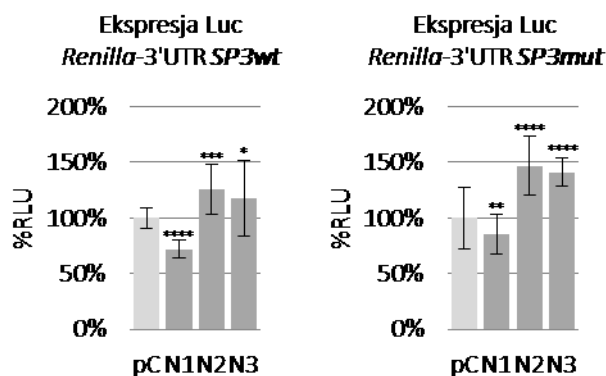
Nadekspresję białek NANOS sprawdzano metodą Western blot z zastosowaniem przeciwciała anti-DDK (FLAG[®]) (**Rycina 29B**). Skoro białka SPIN3 i SPIN4 działają proapoptotycznie, a ich ekspresja jest negatywnie regulowana przez białko NANOS1 można założyć, że obniżenie apoptozy pod wpływem białka NANOS1 mogło mieć miejsce m.in. dzięki represji mRNA *SPIN3* i *SPIN4*. Brak efektu NANOS2 i NANOS3 na apoptozę mógł być spowodowany znacznie niższym poziomem ich nadekspresji w stosunku do NANOS1 (**Rycina 29B**).



Rycina 29. Wpływ nadekspresji białek NANOS na apoptozę komórek TCam-2. Komórki transfekowano plazmidami kodującymi ORF NANOS (oznaczone N1, N2 i N3) lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC), w 2 niezależnych eksperymentach (w każdym z nich wykonano 3 powtórzenia techniczne). Komórki barwiono i mierzono intensywność fluorescencji Aneksyny V skoniugowanej z FITC (AnV-FITC). A – Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (na wykresie wartość 0). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,00005$). B – Analiza Western blot z nadekspresji białek NANOS względem pustego wektora pCMV6-entry. Po prawej stronie grotami strzałek zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom NANOS i białku β AKTYNIE, będącej kontrolą zawartości białka w ścieżkach (ang. *loading control*). C-F – Wykresy dwuparametrowe (scatter ploty) zależności intensywności jodku propidyny (PI) do AnV-FITC służące do analizy poziomu apoptozy. Zaznaczono komórki: żywe – na niebiesko, we wczesnej apoptozie – na zielono, w późnej apoptozie – na fioletowo, oraz martwe na czerwono. Pokazano, że białko NANOS1 (N1) obniżało apoptozę komórek TCam-2, co mogło być spowodowane m.in. represją mRNA *SPIN3* i *SPIN4*.

6.20. Substytucje nukleotydowe w obrębie motywów w 3'UTR *SPIN3* powodują częściowe zniesienie represji wywołanej przez białko NANOS1

Odmienne efekty poszczególnych białek NANOS na ekspresję plazmidu reporterowego kodującego 3'UTR *SPIN3* wydawały się interesujące by poddać je dalszym badaniom. Postanowiono sprawdzić, czy obecność motywów A i B (choć specyficznie rozpoznawanych przez domenę PUF) była istotna dla powyższych efektów wywołanych przez białka NANOS (**Wyniki, punkt 11**). Okazało się, że zmutowanie motywów A i B w regionie 3'UTR mRNA *SPIN3* powodowało częściowe zniesienie represji wywołanej przez białko NANOS1 i wynosiło ~14% (**Rycina 30**). Natomiast usunięcie motywów A i B (przez wprowadzenie substytucji) powodowało wzrost ekspresji lucyferazy (ze zmutowanego reportera) w stosunku do reportera typu dzikiego w przypadku nadekspresji NANOS2 i NANOS3.

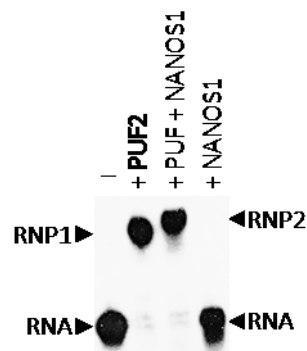


Rycina 30. Wpływ nadekspresji białek NANOS na ekspresję lucyferazy *Renilla* zawierającej region 3'UTR *SPIN3* pozbawiony motywów A i B (*SP3mut*), w porównaniu z ekspresją lucyferazy zawierającej 3'UTR typu dzikiego (*SP3*). Pokazano, że mutacja / substytucja motywów A i B powodowała częściowe osłabienie represji przez białko NANOS1. Mutageneza tych motywów była niemal wystarczająca do zniesienia represji, co może oznaczać, że pozostałe motywy w regionie 3'UTR *SPIN3* są mniej ważne. Wyniki pochodzą z 3 niezależnych doświadczeń. W każdym eksperymencie wykonano 3 powtórzenia, z których każde mierzono dwukrotnie. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ i **** $p \leq 0,00005$).

Mianowicie zmutowanie tych motywów powodowało wzrost ekspresji lucyferazy o odpowiednio ~21% i ~23%, a łączny wzrost wynosił odpowiednio ~47% ($p=2,38 \times 10^{-8}$) w przypadku NANOS2 i ~41% ($p=3,90 \times 10^{-12}$) dla NANOS3 (**Rycina 30**). Przedstawione wyniki pochodzą z 3 niezależnych doświadczeń, w każdym wykonano 3 powtórzenia, które mierzono dwukrotnie. Mogą oznaczać, że motywy A i B są ważne dla rekrutacji białka NANOS1 przez PUM. Jednak zagadnienie to wymaga dalszych badań.

6.21. Białko NANOS1 razem z domeną PUF2 tworzy potrójny kompleks z fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3* w teście retardacji żelowej

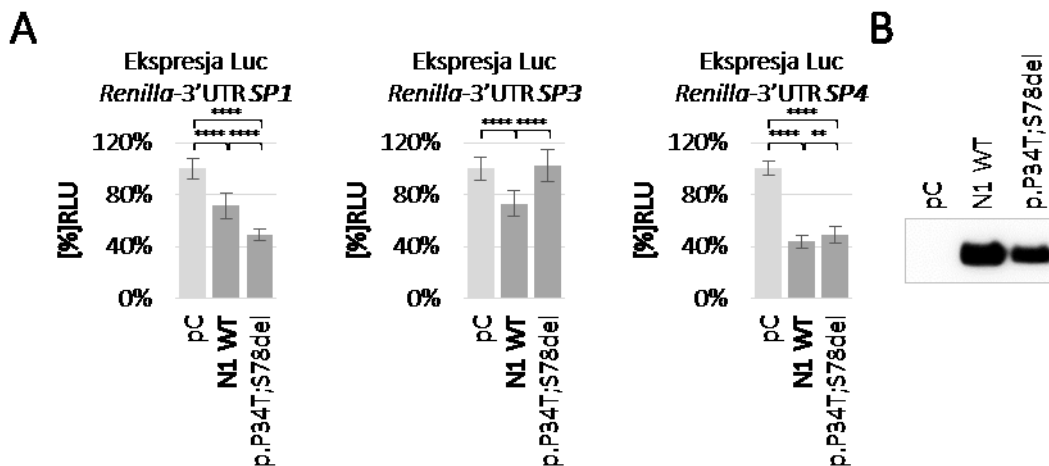
W dalszej części skupiono się na dokładniejszym wyjaśnieniu mechanizmu wiązania mRNA *SPIN3* przez białko NANOS1, ponieważ spośród trzech paralogów *NANOS*, tylko NANOS1 powodował represję mRNA *SPIN3*. Postanowiono sprawdzić, przy pomocy retardacji żelowej, czy białko NANOS1 tworzy kompleks z fragmentem tegoż 3'UTR zawierającym motywy A i B (**Rycina 18**). Pokazano, że oczyszczone białko NANOS1 tworzy potrójny kompleks z domeną PUF2 oraz fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3*. Natomiast samo białko NANOS1, w nieobecności domeny PUF2, z fragmentem 3'UTR nie wiązało się (**Rycina 31**). Oznacza to, że białko NANOS1 wymaga obecności domeny PUF2 by utworzyć RNP. Stanowiłoby to warunek współdziałania z białkami PUM w represji mRNA *SPIN3*. Z powodu ograniczeń czasowych nie wykonano tego doświadczenia dla domeny PUF1.



Rycina 31. Analiza wiązania fragmentu 3'UTR mRNA *SPIN3* z domeną PUF2 i białkiem NANOS1 w teście retardacji żelowej. Znakowany radioaktywnie fragment 3'UTR mRNA *SPIN3* inkubowano z domeną PUF2 i/lub białkiem NANOS1, a następnie frakcjonowano w 4% natywnym żelu poliakrylamidowym. Pokazano, że domena PUF2 wraz z białkiem NANOS1 tworzy potrójny kompleks z fragmentem 3'UTR mRNA *SPIN3*. Oznacza to, że białko NANOS1 mogłoby współdziałać z białkami PUM w represji mRNA *SPIN3*, poprzez interakcję z domeną PUF białek PUM.

6.22. Mutacja p.P34T;S78del białka NANOS1 powoduje zniesienie represji *SPIN3* natomiast wzmacnia represję *SPIN1*

Skoro stwierdzono ważność motywów A i B dla represji mRNA *SPIN3* przez NANOS1, wykonano doświadczenie odwrotne, jednak tym razem w komórce. Postanowiono sprawdzić, czy zmutowanie białko NANOS1 spowoduje zaburzenie regulacji mRNA *SPIN*. Cennym narzędziem w tym doświadczeniu było zmutowane białko NANOS1 wykryte u niepłodnego pacjenta, który charakteryzował się całkowitym brakiem komórek gametogenicznych w kanalikach plemnikotwórczych, co odpowiadało zespołowi samych komórek Sertolego (ang. *Sertoli Cell Only Syndrome* – SCOS) [Kusz-Zameleczyk i wsp. 2013]. Pacjent posiadał podwójnie zmutowany allel genu *NANOS1*, podczas gdy drugi allel był prawidłowy. Allel patologiczny warunkował neutralną substytucję aminokwasową, bo często występującą w ogólnej populacji p.P34T oraz drugą wykrytą wyłącznie u niepłodnych mężczyzn, która polegała na delecji seryny p.S78del. Okazało się, że zastosowanie zmutowanego białka p.P34T;S78del powodowało całkowite zniesienie represji lucyferazy *Renilla* z plazmidu reporterowego zawierającego 3'UTR *SPIN3* (o ~29%, $p=4,61 \times 10^{-10}$ w porównaniu do NANOS1 typu dzikiego). W przeciwieństwie do tego, zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del powodowało silniejszą represję lucyferazy *Renilla* z konstrukcji reporterowej kodującej 3'UTR *SPIN1* (o ~51%, $p=1,53 \times 10^{-24}$, w porównaniu do pustego wektora pCMV6-entry i o ~22%, $p=1,00 \times 10^{-11}$ w porównaniu do NANOS1 typu dzikiego). Natomiast mutacja p.P34T;S78del nie powodowała znaczących zmian w ekspresji lucyferazy *Renilla* z konstrukcji reporterowej kodującej 3'UTR *SPIN4* (**Rycina 32**). Powyższe wyniki przyniosły nową informację, a mianowicie region centralny w którym wystąpiła mutacja jest dla funkcji białka NANOS1 istotny. Ów region, w przeciwieństwie do zakonserwowanej domeny palców cynkowych, nie był dotąd zbadany. Wobec powyższego wyniku można założyć, że brak komórek gametogenicznych u pacjenta był spowodowany zaburzoną potranskrypcyjną regulacją ekspresji genów, a co za tym idzie nieprawidłowościami w proliferacji, apoptozie lub cyklu komórkowym. Podążając za tym rozumowaniem postanowiono zbadać jakie jest znaczenie mutacji p.P34T;S78del dla fenotypu komórek TCam-2 pod względem tych trzech procesów.

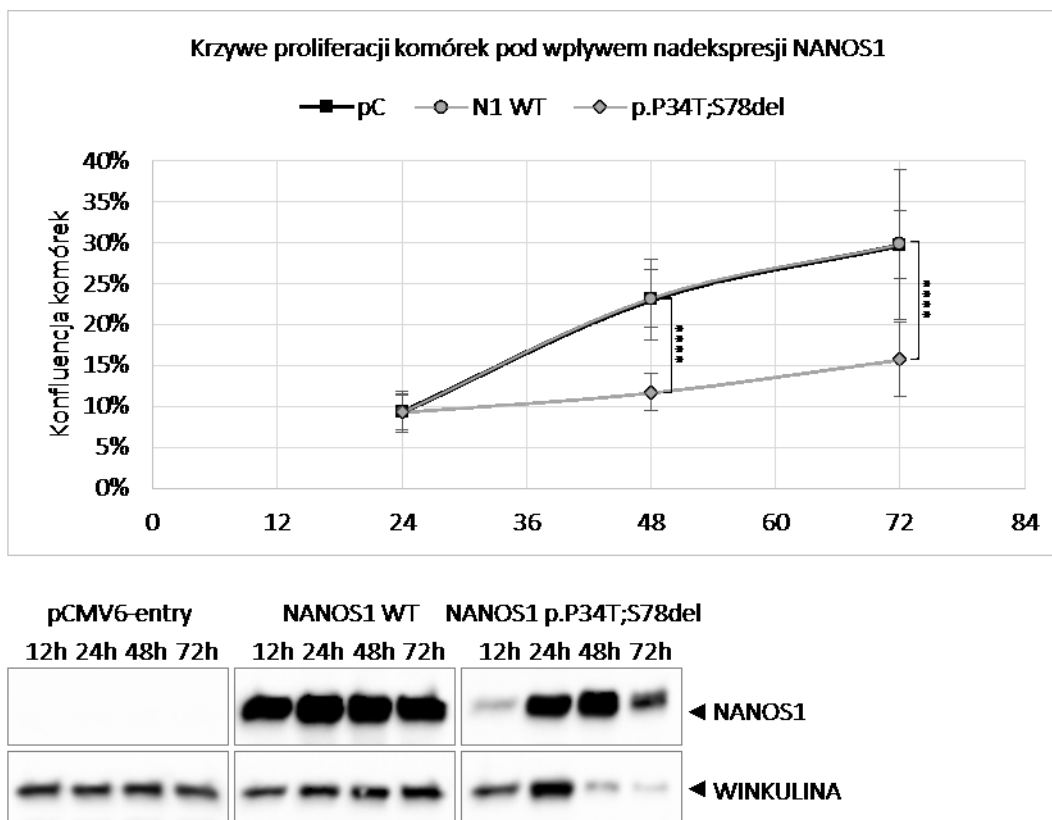


Rycina 32. Wpływ nadekspresji białek NANOS1 typu dzikiego (N1 WT) i zmutowanego (p.P34T;S78del), względem pustego wektora pCMV6-entry (pC) na ekspresję konstrukcji reporterowej kodującej lucyferazę *Renilla* w fuzji z regionami 3'UTR wszystkich trzech *SPIN*. A – Ekspresja lucyferazy przy nadekspresji białek NANOS1 wyrażono w procentach jednostek RLU (ang. *Relative Luciferase Units*), gdzie 100% RLU przyznano dla nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry. Przedstawione wyniki pochodzą z trzech niezależnych doświadczeń. W każdym eksperymencie wykonano trzy powtórzenia, a każde mierzone dwukrotnie. Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (**** $p \leq 0,00005$). B – Wykrywanie białek PUM po nadekspresji metodą Western blot. Pokazano, że zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del powodowało silniejszą represję lucyferazy z konstrukcji reporterowej kodującej 3'UTR *SPIN1*. Natomiast w przypadku 3'UTR *SPIN3* mutacja ta całkowicie znosiła represję.

6.23. Mutacja p.P34T;S78del NANOS1 powoduje zwolnienie proliferacji komórek m.in. przez represję mRNA *SPIN1*

Skoro pokazano, że białko NANOS1 potranskrypcyjnie reguluje ekspresję *SPIN*, a zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del intensywność tej represji moduluje, postanowiono sprawdzić, czy obecność tej mutacji wpływa na proliferację komórek TCam-2. W tym celu zbadano wpływ nadekspresji białka zmutowanego NANOS1 p.P34T;S78del na proliferację komórek TCam-2, w porównaniu do NANOS1 typu dzikiego.

Na początku sprawdzono nadekspresję, białka NANOS1 typu dzikiego i zmutowanego w linii komórkowej TCam-2. Tak jak wcześniej pokazano, białko NANOS1 typu dzikiego ulegało względnie stałej nadekspresji w czasie trwania całego eksperymentu. Nadekspresja zmutowanego białka NANOS1 p.P34T;S78del była na wysokim poziomie w 24 i 48 godzinach od transfekcji, jednak w trakcie dłuższej hodowli, czyli do 72 godzin, ulegała znacznemu obniżeniu. Ekspresję fuzyjnych białek NANOS sprawdzano metodą Western Blot z zastosowaniem komercyjnego przeciwciała anty-DDK (FLAG[®]) (**Rycina 33, u dołu**).



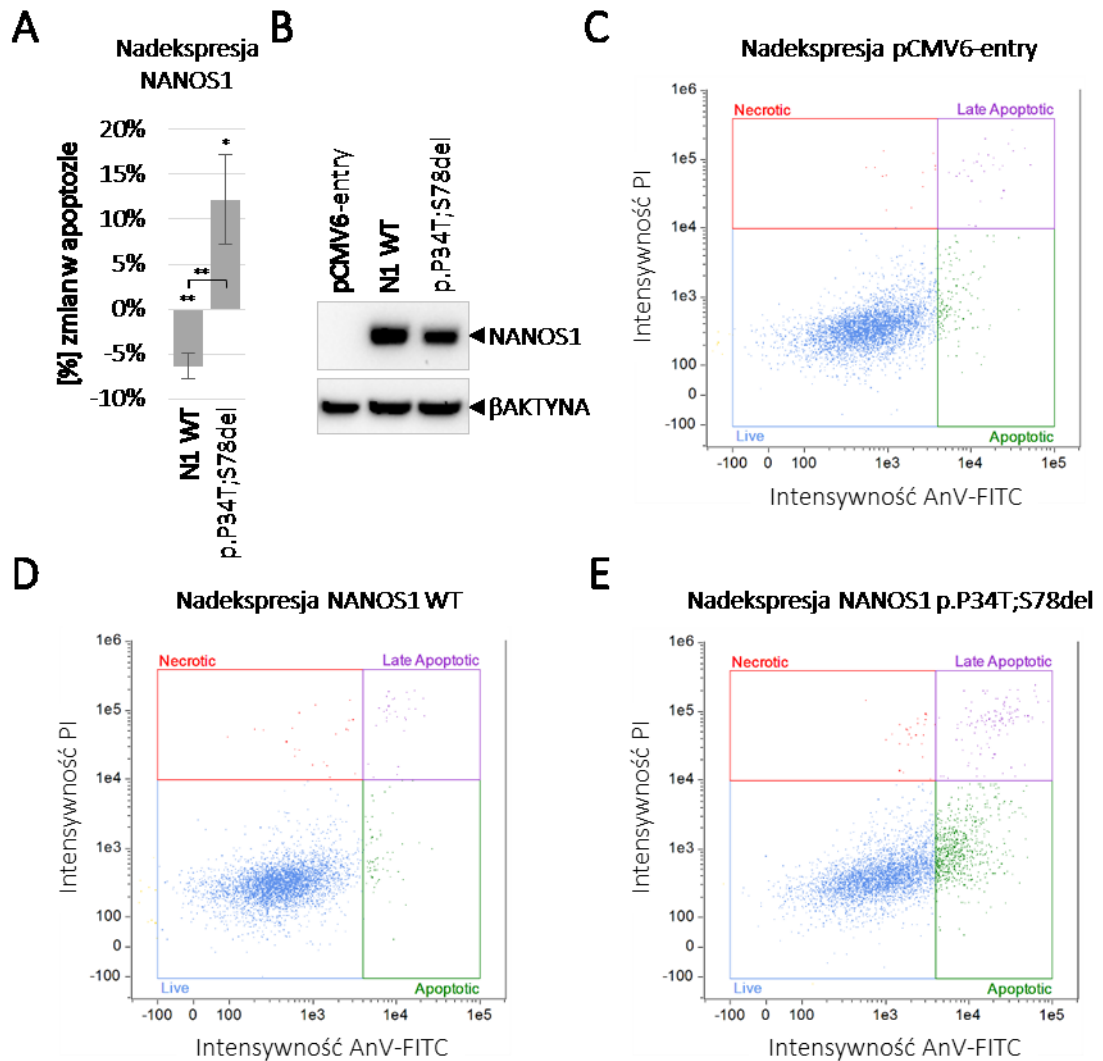
Rycina 33. Wpływ nadekspresji białek NANOS1 typu dzikiego (N1 WT) i zmutowanego (p.P34T;S78del) na proliferację komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 3 niezależnych powtórzeniach plazmidami kodującymi ORF NANOS1 lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC) i mierzono konfluencję. Pomiar wykonano w trzech punktach czasowych (24, 48 i 72 godz.). U góry: wykres zależności konfluencji komórek TCam-2 z nadekspresją NANOS1, względem pustego wektora pCMV6-entry do czasu który upłynął po transfekcji (w godz.). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (**** $p \leq 0,00005$). U dołu: sprawdzenie poziomu nadekspresji NANOS1 metodą Western blot względem pustego wektora pCMV6-entry w różnych czasach po transfekcji komórek. Po prawej stronie grotom strzałki zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom NANOS1 i WINKULINIE, będącą kontrolą zawartości białka w ścieżkach (ang. *loading control*). Pokazano, że nadekspresja NANOS1 zmutowanego (pP34T;S78del) zwalniała proliferację komórek TCam-2.

Pokazano silne zwolnienie proliferacji komórek TCam-2 pod wpływem mutacji p.P34T;S78del białka NANOS1, w porównaniu do białka NANOS1 typu dzikiego i pustego wektora (**Rycina 33**). Efekt zwolnienia proliferacji był widoczny już 48 godz. po transfekcji ($p \leq 0,00005$; $p = 9,05 \times 10^{-12}$ – względem komórek kontrolnych i $p = 4,61 \times 10^{-11}$ – względem komórek z nadekspresją NANOS1 typu dzikiego), a w 72 godz. obniżenie proliferacji komórek było jeszcze wyraźniejsze (odpowiednio: $p = 3,86 \times 10^{-9}$ i $p = 9,10 \times 10^{-10}$). (**Rycina 33**). Konfluencję mierzono tak jak poprzednio w przypadku SPIN, PUM i NANOS (**Wyniki, punkt 1, 14 i 21**).

6.24. Mutacja NANOS1 p.P34T;S78del działa pro-apoptotycznie, m.in. poprzez modulację represji mRNA *SPIN*

Skoro pokazano 1/ wpływ nadekspresji białek SPIN na apoptozę komórek TCam-2, 2/ represję SPIN przez anti-apoptotyczne białko NANOS1 oraz 3/ modulację tej regulacji przez zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del, postanowiono zbadać jaki proces odpowiada za tak drastyczny efekt na proliferację komórek pod wpływem nadekspresji zmutowanego białka. Sprawdzano zatem, czy mutacja NANOS1 p.P34T;S78del wpływa na apoptozę komórek TCam-2.

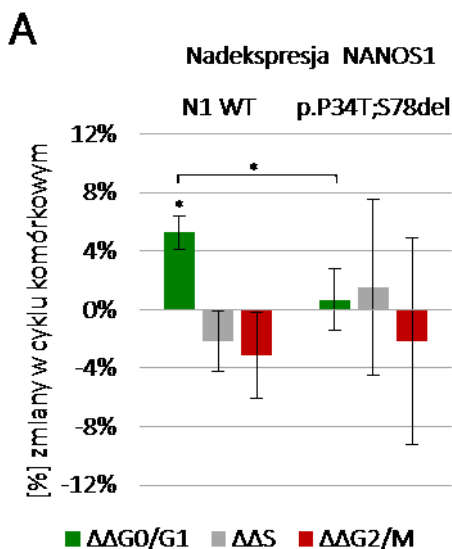
W podobnym schemacie doświadczalnym jak SPIN, PUM i NANOS (**Wyniki, punkt 2, 15 i 22**) zaobserwowano, że zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del traciło anti-apoptotyczną funkcję, w porównaniu do białka typu dzikiego (**Rycina 34A**). Mianowicie następował wzrost liczby komórek apoptotycznych o ~18% ($p \leq 0,005$, $p = 0,0014$) względem białka typu dzikiego (**Rycina 34A, D vs. E**) i o ~12% ($p \leq 0,05$, $p = 0,012$) względem pustego wektora pCMV6-entry (**Rycina 34A, E vs. C**). To doświadczenie wykonano w 3 niezależnych doświadczeniach, z 3 powtórzeniami technicznymi w każdym. Ów efekt zmutowanego białka NANOS1 p.P34T;S78del mógł być spowodowany silniejszą represją anti-apoptotycznych czynników, tj. białka SPIN1 lub/i jemu podobnych lub zniesieniem represji pro-apoptotycznych czynników, tj. białka SPIN3 lub/i jemu podobnych.



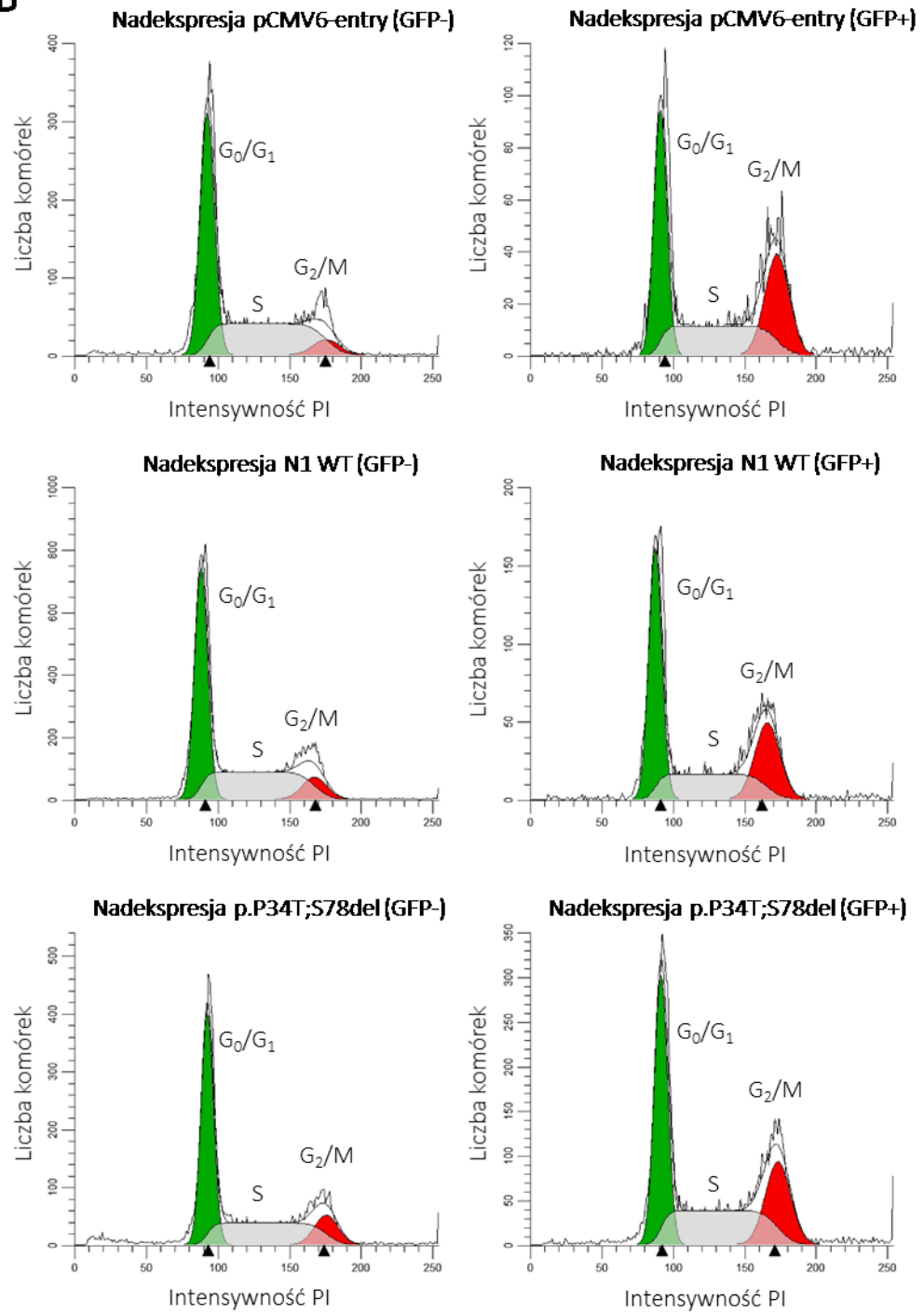
Rycina 34. Wpływ nadekspresji białek NANOS1 typu dzikiego (N1 WT) i zmutowanego (p.P34T;S78del) na apoptozę komórek TCam-2. Komórki transfekowano w 3 niezależnych eksperymentach (w których wykonano 3 powtórzenia techniczne) plazmidami kodującymi ORF NANOS1 lub pustym wektorem pCMV6-entry (pC). Komórki barwiono i mierzono intensywność fluorescencji Aneksyny V skoniugowanej z FITC (AnV-FITC). A – Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (na wykresie wartość 0). Istotność statystyczną wyników wyrażono w wartościach *p value* i oznaczono gwiazdkami na wykresie (* $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,00005$). B – Analiza Western blot z nadekspresji białek NANOS1 względem pustego wektora pCMV6-entry. Po prawej stronie grotami strzałek zaznaczono prążki odpowiadające egzogennym białkom NANOS1 i białku β AKTYNIE, będącej kontrolą zawartości białka w ścieżkach (ang. *loading control*). C-E – Wykresy dwuparametrowe (scatter ploty) zależności intensywności jodku propidyny (PI) do AnV-FITC służące do analizy poziomu apoptozy. Zaznaczono komórki: żywe – na niebiesko, we wczesnej apoptozie – na zielono, w późnej apoptozie – na fioletowo, oraz martwe na czerwono. Pokazano, że zmutowane białko NANOS1 (p.P34T;S78del) wzmagало apoptozę komórek TCam-2.

6.25. Zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del niweluje efekt zwolnienia cyklu komórkowego wywołanego przez dzikie białko NANOS1

Zaobserwowano zwolnienie cyklu komórkowego pod wpływem nadekspresji dzikiego białka NANOS1 w komórkach TCam-2, względem komórek z nadekspresją pustego wektora pCMV6-entry. Wzrost wynosił ~5,25% liczby komórek w fazie G₀/G₁ (p≤0,05, p=0,012) oraz proporcjonalne obniżenie w fazie S o ~2,12% i G₂/M o ~3,13%. Białko NANOS1 mogło powodować zwolnienie cykl komórkowego poprzez represję *SPIN1*, która cykl przyspieszała. Natomiast zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del powodowało statystycznie istotne zniwelowanie efektu zwolnienia cyklu komórkowego wywołanego przez dzikie białko NANOS1. Odnotowano mianowicie obniżenie liczby komórek w fazie G₀/G₁ o ~4,6% (p≤0,05, p=0,039) oraz proporcjonalny wzrost w fazie S o ~3,6% i G₂/M o ~1% w porównaniu do NANOS1 typu dzikiego (**Rycina 35**). Doświadczenie wykonano 3-krotnie.



Rycina 35. Wpływ nadekspresji białka NANOS1 typu dzikiego (N1 WT) i zmutowanego (p.P34T;S78del) na cykl komórkowy. Komórki transfekowano w trzech niezależnych eksperymentach plazmidami kodującymi ORF NANOS1 lub pustym wektorem pCMV6-entry. Komórki utrwalano, barwiono i mierzono intensywność fluorescencji jodku propidyny (PI) A – Wartości liczbowe znormalizowano do kontroli negatywnej – nadekspresji pustego wektora pCMV6-entry (na wykresie wartość 0). B – Histogramy wygenerowane przez program ModFit LT służące do analizy cyklu komórkowego. Zaznaczono kolejne fazy cyklu: G₀/G₁ – na zielono, S – na szaro i G₂/M – na czerwono. Pokazano, że nadekspresja NANOS1 powodowała wzrost liczby komórek w fazie G₀/G₁ oraz spadek liczby komórek w fazach S i G₂/M, co oznacza, że białko to zwalnia cykl komórkowy. Natomiast zmutowane białko NANOS1 (p.P34T;S78del) niwelowało ten efekt

B

7. DYSKUSJA

Z powodu wielowątkowości rozprawy przedyskutowano jedynie wyniki, które wydawały się najbardziej interesujące.

Apoptoza oraz proliferacja są kluczowymi procesami w rozwoju męskich komórek gametogenicznych, lecz również nowotworów, choć ich znaczenie w obu tych kontekstach jest odmienne. W komórkach gametogenicznych apoptoza i proliferacja są bardzo precyzyjnie regulowane, co zapewnia utrzymanie ich odpowiedniej liczby, a w konsekwencji płodność. Natomiast w nowotworach przeciwnie, apoptoza jest silnie obniżona, podczas gdy proliferacja wzmożona. Skutkuje to niekontrolowanym wzrostem komórek nowotworowych.

W niniejszej rozprawie pokazano po raz pierwszy funkcje nieopisanych dotąd białek SPIN3 i SPIN4, które w przeciwieństwie do poznanego wcześniej onkogennego paraloga SPIN1, hamują proliferację (**Wyniki Rycina 1**) i indukują apoptozę (**Wyniki Rycina 2**). W związku z powyższym, SPIN3 oraz SPIN4 mogłyby pełnić supresorowe role w komórkach TCam-2. W kontekście cyklu komórkowego, obserwowano przyspieszający wpływ SPIN1 (**Wyniki Rycina 1, 2 i 3**), co jest zgodne z jej wcześniej opisanymi onkogennymi funkcjami [Yue i wsp. 2004, Gao i wsp. 2005, Zhao i wsp. 2007, Yuan i wsp. 2008, Zhang i wsp. 2008, Franz i wsp. 2015, Chen i wsp. 2016, Li i wsp. 2017]. Również SPIN3 przyspieszała cykl komórkowy (**Wyniki Rycina 5**), jednak nie niwelowało to jej supresorowego efektu tzn. osłabienia proliferacji pod wpływem jej nadekspresji. Powyższe obserwacje są interesujące w kontekście linii komórkowej TCam-2, która jak wyżej wspomniano, reprezentuje komórki nowotworowe a jednocześnie męskie komórki gametogeniczne, choć zablokowane na wczesnym etapie rozwoju prenatalnego. Jest godne uwagi, że we wszystkich przedstawionych w tej rozprawie doświadczeniach nadekspresja SPIN3 i SPIN4 obniżała się znacznie szybciej, w porównaniu do SPIN1 (**Wyniki Rycina 1 dolny panel, 2, 4**). Ta ewidentna różnica profilu nadekspresji pomiędzy SPIN1 a SPIN3 i SPIN4 była również widoczna na poziomie endogennego mRNA kodującego te białka. Bowiem endogenne poziomy mRNA SPIN1 był istotnie wyższy, niż SPIN3 oraz SPIN4 (**Wyniki Rycina 4**). Nasuwa się przypuszczenie, że owa różnica poziomu ekspresji pomiędzy onkogeną SPIN1 a supresorowymi SPIN3 i SPIN4 z korzyścią dla SPIN1 odzwierciedla mechanizm, który w komórkach TCam-2 odpowiada za utrzymanie nowotworowego fenotypu. Zgodnie z tym przypuszczeniem profil nadekspresji białek SPIN w linii komórkowej HeLa, która pochodzi z nowotworu szyjki macicy jest podobny do linii TCam-2. Natomiast w linii

komórek HEK293T, która z komórek nowotworowych się nie wywodzi, profil nadekspresji wszystkich trzech SPIN był podobny (**Wyniki Rycina 9**).

Ważnym wątkiem w rozprawie jest mechanizm regulacji ekspresji genów *SPIN*, który poza doniesieniem, że w dojrzałym oocycie mysim i wczesnym embrionie zależy od regionu 3'UTR [Oh i wsp. 1997 i 2000], nie został dotąd zbadany. Wyniki uzyskane w tej rozprawie jednoznacznie wskazują na taki mechanizm regulacji i dostarczają bardziej szczegółowych danych na ten temat. Mianowicie mRNA *SPIN1*, *SPIN3* i *SPIN4* są pod kontrolą białek PUM, szeroko opisanych potranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów, specyficznie rozpoznających motywy w regionie 3'UTR (**Wyniki Rycina 10, 13, 15**). W rozprawie pokazano silną represję reportera lucyferazowego kodującego 3'UTR mRNA *SPIN1*, *SPIN3* i *SPIN4* pod wpływem białek PUM1 lub PUM2 (**Wyniki Rycina 14 i 15**). Jednak niezgodnie z oczekiwaniem, wyciszenie ekspresji pojedynczych genów *PUM1* lub *PUM2* (**Wyniki Rycina 16**) zamiast derepresji, wywołało statystycznie istotną choć niższą niż powyżej opisaną represję owych lucyferazowych reporterów (**Wyniki Rycina 17A**). Natomiast w przypadku jednoczesnego wyciszenia ekspresji genów *PUM*, wbrew oczekiwaniom, wzrostu ekspresji reporterów nie odnotowano (**Wyniki Rycina 17B**). Powyższe wyniki mogą wskazywać na inny, współistniejący i zależny od regionów 3'UTR mechanizm represji mRNA *SPIN*, efektywniejszy niż ów zależny od białek PUM. Taki współistniejący mechanizm powodowałby silniejszą represję w porównaniu do efektu represji przez endogenne białka PUM w komórkach TCam-2 (**Wyniki Rycina 17**). Przykład takiego mechanizmu regulacji mRNA *SPIN1* został ostatnio zaproponowany w powiązaniu

z miRNA miR-489, który powoduje represję *SPIN1* w raku piersi, glejaku oraz innych nowotworach [Chen i wsp. 2016, Li i wsp. 2017]. Znaczna długość regionów 3'UTR *SPIN* wynosząca ponad 3 000 nt wskazuje na obecność potencjalnych miejsc wiązania, jeszcze innych niż miR-489, oraz innych strukturalnych lub sekwencyjnych motywów różnych od PBE i rozpoznawanych przez inne niż PUM białka wiążące RNA.

Wyniki uzyskane w rozprawie wskazują, że funkcje PUM1 i PUM2, przynajmniej w kontekście mRNA *SPIN*, nie w pełni się pokrywają. Po pierwsze, podczas gdy PUM1 silnie wzmaga apoptozę (**Wyniki Rycina 24**) i zwalnia proliferację komórek TCam-2 (**Wyniki Rycina 23**), PUM2 nie ma wpływu na te procesy. Co ważne, efekt PUM1 jest zgodny z represją *SPIN1*, która działa anty-apoptotycznie i przyspiesza proliferację (**Wyniki Rycina 1, 2 i 3**). Jednak białka PUM nie różnią się istotnie pomiędzy sobą pod względem wpływu na cykl komórkowy, ponieważ oba w niewielkim stopniu go hamują

(**Wyniki Rycina 25**). Wartością tej rozprawy jest pokazanie na modelu komórek ssaków, a precyzyjniej człowieka, że PUM1 może działać supresorowo. Jest warto podkreślenia, że mRNA *SPIN1* jest prawdopodobnie jedynie przykładem wielu mRNA represjonowanych przez białko PUM1, wpływających na apoptozę, proliferację i cykl komórek TCam-2.

Po drugie, zgodnie z wynikami wyciszania ekspresji pojedynczych genów *PUM1* lub *PUM2*, wydaje się, że PUM2 może odgrywać odmienną rolę niż PUM1 w represji mRNA *SPIN3* i *SPIN4*, w porównaniu do *SPIN1* (**Wyniki Rycina 17**). Może to odzwierciedlać współdziałanie odmiennych grup specyficznych białkowych kofaktorów w represji poszczególnych *SPIN*. BOWIEM powstające kompleksy rybonukleoproteinowe w zależności od składu mogłyby współ np. z miRNA, implikować odmienne skutki w PTGR. Taki mechanizm, jak wyżej wspomniano, został niedawno pokazany dla mRNA *SPIN1*, która jest bezpośrednio regulowana przez miR-489 w komórkach raka piersi i glejaka [Chen i wsp. 2016, Li i wsp. 2017]. W sumie funkcjonalna specyficzność każdego białka PUM, współdziałające z nimi kofaktory oraz struktura 3'UTR stanowią jedynie niektóre elementy bardziej skomplikowanego mechanizmu tkwiącego u podstaw niższej endogennej ekspresji *SPIN3* i *SPIN4*, w porównaniu do *SPIN1* (**Wyniki Rycina 4**). Otóż, zaobserwowana istotna różnica w szybkości spadku poziomów SPIN po ich nadekspresji (spadek poziomu SPIN3 i SPIN4 był znacznie szybszy niż SPIN1) wskazuje na mechanizm ich regulacji, niezależny od regionów 3'UTR (**Wyniki Rycina 1**). BOWIEM plazmidy użyte do nadekspresji SPIN nie zawierały regionów 3'UTR, a jedynie same otwarte ramki odczytu (ang. *open reading frame* – ORF). Mogłoby to wskazywać na transkrypcyjny a nie potranskrypcyjny mechanizm lub ich współistnienie. Wreszcie, w opisanym funkcjonalnym porównaniu białek PUM pomiędzy sobą należy uwzględnić fakt, że ekspresja *PUM2* jest negatywnie regulowana przez białko PUM1 (**Wyniki Rycina 16C, 21, 22**).

Ważną kwestią do rozważenia jest wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej (**Wstęp Rycina 15**) oraz struktury (**Wstęp Rycina 12, 13 i 14**) białek SPIN1, SPIN3 i SPIN4, w zestawieniu z odmiennością funkcji. Najbardziej zakonserwowany region centralny tudzież koniec karboksylowy zawierają trzy wysoce zachowane w ewolucji funkcjonalne domeny zwane Tudor (**Wstęp Rycina 15**), przy czym druga z nich specyficznie rozpoznaje potrójnie metylowaną lizynę 4 w histonie 3 (H3K4me3) [Wang i wsp. 2011, Bartke i wsp. 2010, Yang i wsp. 2012, Su i wsp. 2014, Shanle i wsp. 2017, Yang i wsp. 2012, Talon i wsp. 2014]. Zatem za odrębne funkcje mógłby raczej odpowiadać koniec aminowy, który jest bardziej zróżnicowany niż region zawierający

domeny Tudor. Owe różnice mogą sugerować np. oddziaływania końców aminowych z odmiennymi, specyficznymi dla każdego białka SPIN grupami białkowych kofaktorów. Na poparcie tej hipotezy, w globalnej analizie interaktorów z komórek HEK293T przy użyciu spektrometrii mas pokazano, że faktycznie SPIN1 i SPIN3 mogą oddziaływać z odmiennymi białkami [Huttlin i wsp. 2017]. Mianowicie SPIN1, lecz nie SPIN3 oddziałuje z białkami TOPORS i PAX3, które są zaangażowane w regulację proliferacji i apoptozy. Natomiast SPIN3, lecz nie SPIN1, oddziałuje z białkami NUDT1 i PFDN4 zaangażowanymi odpowiednio, w naprawę DNA i w zwijanie białek, natomiast nie zidentyfikowano kofaktorów związanych z apoptozą lub proliferacją, co nie oznacza że kofaktorów o takiej funkcji dla SPIN3 brak w komórce.

Wydaje się, że zwielokrotnienie ancestralnego genu *SPIN* podczas ewolucji genomu, przyniosło w konsekwencji funkcjonalną dywersyfikację pomiędzy poszczególnymi paralogami. Na skutek tego, poszczególne paralogi SPIN odgrywają odmienne a nawet przeciwstawne role, np. w rozwoju męskich komórek gametogenicznych, czy TGCT w kontekście proliferacji, apoptozy i cyklu komórkowego. Zgodnie z wynikami tej rozprawy, białka PUM poprzez regulację ekspresji *SPIN*, odgrywających przeciwstawne role (SPIN1 onkogenną, podczas gdy SPIN3 i SPIN4 supresorową) mogłyby reprezentować ogniwo mechanizmu utrzymującego status nowotworowy komórek TCam-2 na niekorzyść statusu komórek gametogenicznych. Kwestia ta pozostaje interesującym przedmiotem przyszłych badań.

W potranskrypcyjnym mechanizmie regulacji ekspresji genów w komórkach gametogenicznych, białka PUM współdziałają z białkami NANOS [Jaruzelska i wsp. 2003]. Owo współdziałanie po raz pierwszy udokumentowano dla komórek gametogenicznych Muszki owocowej (praca przeglądowa Keuckelaere i wsp. 2018). Z kolei w tej rozprawie pokazano, że ludzkie białko NANOS1, homolog zachowanego w ewolucji białka wiążącego RNA, powoduje represję wszystkich trzech SPIN w komórkach TCam-2 (**Wyniki Rycina 27**). Natomiast mutacja NANOS1 p.P34T;S78del, która została niedawno zidentyfikowana u niepłodnych mężczyzn, charakteryzujących się brakiem komórek gametogenicznych w kanalikach plemnikotwórczych [Kusz-Zamelczyk i wsp. 2013], zaburza potranskrypcyjną regulację docelowych mRNA, kodujących SPIN1 i SPIN3. Otóż w testach lucyferazowych pokazano, że owa mutacja z jednej strony wzmacnia represję mRNA kodującego pro-proliferacyjną i anti-apoptotyczną SPIN1 (**Wyniki Rycina 32**), zaś z drugiej całkowicie znosi represję mRNA kodującego pro-apoptotyczną SPIN3 (**Wyniki Rycina 32**). Zaburzenie profilu ekspresji obu SPIN przez

zmutowane białko NANOS1 jest zgodne z jego efektem zwolnienia proliferacji (**Wyniki Rycina 33**) oraz wzrostu apoptozy komórek TCam-2 pod wpływem jego nadekspresji (**Wyniki Rycina 34**). Ponadto po raz pierwszy pokazano, że NANOS1 wpływa na cykl komórkowy. Powoduje jego zwolnienie, podczas gdy zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del efekt zwolnienia niweluje (**Wyniki Rycina 35**). Wpływ NANOS1 na cykl komórkowy mógł być częściowo spowodowany represją *SPIN1* i *SPIN3*, ponieważ oba te białka cykl komórkowy przyspieszają (**Wyniki Rycina 5 i 6**).

Zaobserwowana represja mRNA *SPIN1* i *SPIN3* przez białko NANOS1, oraz zaburzenie tej regulacji przez zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del może wskazywać, że NANOS1 działa na wiele docelowych mRNA, które odgrywają role w apoptozie, proliferacji i cyklu komórek TCam-2, a także w ludzkich męskich komórkach gametogenicznych. Zatem globalna identyfikacja docelowych mRNA zaangażowanych w powyższe procesy stanowi jeden z interesujących przyszłych kierunków badań nad rolą białka NANOS1. Biorąc pod uwagę, że *SPIN1* działa onkogennie, natomiast *SPIN3* supresorowo, NANOS1 może działać jako modulator ekspresji takich czynników, których *SPIN* są jedynie przykładem. Powyższa hipoteza została zasugerowana dla białek wiążących RNA w ogóle [Blackinton i Keene 2014] i stanowi interesującą kwestię do przyszłych badań.

W niniejszej pracy po raz pierwszy pokazano, zaburzenie mechanizmu potranskrypcyjnej regulacji zależnej od regionów 3'UTR jako prawdopodobną przyczynę męskiej niepłodności. Wszystkie powyższe elementy, a mianowicie 1/ utrata funkcji anty-apoptotycznej przez zmutowane białko NANOS1 p.P34T;S78del z jednoczesnych zyskaniem funkcji pro-apoptotycznej, co więcej, 2/ zwolnienie proliferacji i zniesienie wpływu na cykl komórkowy ujawniają mechanizm, który może być przyczyną niepłodności mężczyzn posiadających tę mutację [Kusz-Zamelczyk i wsp. 2013]. Ów sprawczy efekt mutacji NANOS1 p.P34T;S78del mógł być spowodowany odmienną ekspresją specyficznych docelowych mRNA kodujących czynniki ważne dla tych procesów, jak np. *SPIN*. Mutacja ta mogła spowodować zanik komórek gametogenicznych w kanalikach plemnikotwórczych, a w konsekwencji niepłodność.

8. WNIOSKI

Czy geny *SPIN1*, *SPIN3* i *SPIN4* pełnią funkcję modulatorów apoptozy, proliferacji i cyklu komórkowego w modelu nasieniaka?

1. W rozprawie pokazano po raz pierwszy funkcje nieopisanych dotąd białek SPIN3 i SPIN4.
2. Nadekspresja SPIN3 i SPIN4 powodowała obniżenie proliferacji komórek TCam-2, podczas gdy SPIN1 jej podwyższenie.
3. Nadekspresja SPIN3 i SPIN4 powodowała wzmożenie apoptozy w przeciwieństwie do obniżającej apoptozę SPIN1.
4. Potwierdzono znaną z wcześniejszych doniesień onkogeną rolę SPIN1, oraz wskazano na nieznaną dotąd supresorową rolę SPIN3 i SPIN4.
5. Przeprowadzone badania sugerują, że następstwem powielenia ancestralnego genu *SPIN* podczas ewolucji, była funkcjonalna dywersyfikacja powstałych paralogów.

Czy powyższe geny są potranskrypcyjnie regulowane przez białka PUM1, PUM2 oraz ich kofaktory białka NANOS1, NANOS2 oraz NANOS3?

6. Ekspresja genów *SPIN1*, *SPIN3* i *SPIN4* jest negatywnie regulowana przez białka PUM1 i PUM2.
7. Białka PUM poprzez regulację onkogennej *SPIN1* oraz supresorowych *SPIN3* i *SPIN4*, mogłyby stanowić element modulujący ekspresję genów typową dla komórek gametogenicznych w stosunku do ekspresji genów typowej dla komórek nowotworowych.
8. Mutacja *NANOS1* p.P34T;S78del, wcześniej zidentyfikowana u pacjenta w powiązaniu z całkowitym brakiem komórek gametogenicznych w kanalikach plemnikotwórczych, powoduje przełączenie funkcji NANOS1 z anty-apoptotycznej na pro-apoptotyczną.

9. To przełączenie odbywa się poprzez zniwelowanie represji pro-apoptotycznej *SPIN3* i jednocześnie wzmożenie represji anty-apoptotycznej *SPIN1*. Rezultatem tych zmian w regulacji mRNA *SPIN3* i *SPIN1* był wzrost apoptozy oraz obniżenie proliferacji komórek TCam-2.

10. Jest wysoce prawdopodobne, że powyższy mechanizm polegający na przełączeniu funkcji *NANOS1* z anty-apoptotycznej na pro-apoptotyczną, mógł stanowić przyczynę braku komórek gametogenicznych u mężczyzn obarczonych mutacją genu *NANOS1* p.P34T;S78del.

11. Przedstawione badania wskazują na wysoką funkcjonalną zachowawczość białek Nanos, od Muszki owocowej do człowieka, w potranskrypcyjnej regulacji mRNA odpowiedzialnych za proces apoptozy komórek gametogenicznych.

9. Manuskrypty przygotowane na podstawie uzyskanych wyników

Damian Mikołaj Janecki, Marcin Sajek, Maciej Kotecki, Maciej Jerzy Smialek, Barbara Ginter-Matuszewska, Anna Spik, Tomasz Kolanowski, Riko Kitazawa, Maciej Kurpisz, and Jadwiga Jaruzelska. SPIN1 is pro-oncogenic whereas its repressor PUM1 and SPIN3, SPIN4 paralogues are anti-oncogenic in human seminoma (praca w rewizji)

Damian Mikołaj Janecki, Maciej Kotecki, Marcin Sajek, Maciej Jerzy Smialek, Erkut Ilaslan, Barbara Ginter-Matuszewska, Anna Spik, Patryk Krainski, Kamila Kusz-Zamelczyk and Jadwiga Jaruzelska. Mutation associated with lack of germ cells switches NANOS1 activity from anti-apoptotic towards pro-apoptotic in a human male germ cell-line

10. LITERATURA

- Ahringer J., Kimble J.: Control of the sperm–oocyte switch in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites by the *fem-3* 3' untranslated region. (1991) *Nature*, 349: 346 – 348.
- Almstrup K., Hoei-Hansen C. E., Wirkner U., Blake J., Schwager C., Ansorge W., Nielsen J. E., Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E., Leffers H.: Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. (2004) *Cancer Research*, Jul 15;64(14):4736-43
- Almstrup K., Nielsen J. E., Mlynarska O., Jansen M. T., Jørgensen A., Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E.: Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. (2010) *British Journal of Cancer*, Oct 12;103(8):1269-76.
- American Cancer Society. Testicular cancer. (<https://www.cancer.org/cancer/testicular-cancer.html>) (2017)
- Arrizabalaga G., Lehmann R.: A Selective Screen Reveals Discrete Functional Domains in *Drosophila* Nanos. (1999) *Genetics*, 153: 1825 – 1838.
- Asaoka M., Sano H., Obara Y., Kobayashi S.: Maternal Nanos regulates zygotic gene expression in germline progenitors of *Drosophila melanogaster*. (1998) *Mechanisms of Development*, 78: 153 – 158.
- Asaoka–Taguchi M., Yamada M., Nakamura A., Hanyu K., Kobayashi S.: Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. (1999) *Nature Cell Biology*, 1: 431 – 437.
- Atkin N. B., Baker M. C.: Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? (1982) *Lancet*, Dec 11;2(8311):1349
- Bachorik J. L., Kimble J.: Redundant control of the *Caenorhabditis elegans* sperm–oocyte switch by PUF–8 and FBF–1, two distinct PUF RNA–binding proteins. (2005) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31): 10893 – 10897.
- Barrios F., Filipponi D., Pellegrini M., Paronetto M. P., Siena S. D., Geremia R., Rossi P., De Felici M., Jannini E. A., Dolci S.: Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on *Nanos2* expression and meiotic entry of mouse germ cells. (2010) *Journal of Cell Science*, 123(6): 871 – 880.
- Bartke T., Vermeulen M., Xhemalce B., Robson S. C., Mann M., Kouzarides T.: Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. (2010) *Cell*, Oct 29;143(3):470-84
- Bernstein D., Hook B., Hajarnavis A., Opperman L., Wickens M.: Binding specificity and mRNA targets of a *C. elegans* PUF protein, FBF–1. (2005) *RNA*, 11(4): 447 – 458.
- Beumer T. L., Roepers-Gajadien H. L., Gademan I. S., van Buul P. P., Gil-Gomez G., Rutgers D. H., de Rooij D. G.: The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. (1998) *Cell Death and Differentiation*, 5: 669-77.
- Bhandari D., Raisch T., Weichenrieder O., Jonas S., Izaurrealde E.: Structural basis for the Nanosmediated recruitment of the CCR4–NOT complex and translational repression. (2014) *Genes and Development*, 28(8):888-901
- Bhat K. M.: The Posterior Determinant Gene *nanos* Is Required for the Maintenance of the Adult Germline Stem Cells During *Drosophila* Oogenesis. (1999) *Genetics*, 151: 1479 – 1492.
- Biermann K., Göke F., Nettersheim D., Eckert D., Zhou H., Kahl P., Gashaw I., Schorle H., Büttner R.: c-KIT is frequently mutated in bilateral germ cell tumours and down-regulated during progression from intratubular germ cell neoplasia to seminoma. (2007) *The Journal of Pathology*, Nov;213(3):311-8.
- Blackinton J. G., Keene J. D.: Post-transcriptional RNA regulons affecting cell cycle and proliferation. (2014) *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Oct;34:44-54
- Chen X., Wang Y. W., Xing A. Y., Xiang S., Shi D. B., Liu L., Li Y. X., Gao P.: Suppression of SPIN1-mediated PI3K–Akt pathway by miR-489 increases chemosensitivity in breast cancer. (2016) *The Journal of Pathology*, Aug;239(4):459-72
- Choi J. W., Zhao M. H., Liang S., Guo J., Lin Z. L., Li Y. H., Jo Y. J., Kim N. H., Cui X. S.: Spindlin 1 is essential for metaphase II stage maintenance and chromosomal stability in porcine oocytes. (2017) *Molecular Human Reproduction*, Mar 1;23(3):166-176
- Cook M. B., Akre O., Forman D., Madigan M. P., Richiardi L., McGlynn K. A.: A systematic review and meta-analysis of perinatal variables in relation to the risk of testicular cancer - experiences of the mother. (2009) *International Journal of Epidemiology*, Dec;38(6):1532-42

- Crittenden S. L., Bernstein D. S., Bachorik J. L., Thompson B. E., Gallegos M., Petcherski A. G., Moulder G., Barstead R., Wickens M., Kimble J.: A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. (2002) *Nature*, 417: 660 – 663.
- Curtis D., Treiber D. K., Tao F., Zamore P. D., Williamson J. R., Lehmann R.: A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. (1997) *The EMBO Journal*, 16(4): 834 – 843.
- Dalby B., Glover D. M.: 3' non-translated sequences in *Drosophila cyclin B* transcripts direct posterior pole accumulation late in oogenesis and peri-nuclear association in syncytial embryos. (1992) *Development*, 115: 989 – 997.
- Dalby B., Glover D. M.: Discrete sequence elements control posterior pole accumulation and translational repression of maternal *cyclin B* RNA in *Drosophila*. (1993) *The EMBO Journal*, 12 (3): 1219 – 1227.
- de Jong J., Stoop H., Gillis A. J., Hersmus R., van Gorp R. J., van de Geijn G. J., van Drunen E., Beverloo H. B., Schneider D. T., Sherlock J. K., Baeten J., Kitazawa S., van Zoelen E. J., van Roozendaal K., Oosterhuis J. W., Looijenga L. H.: Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. (2008) *Genes Chromosomes Cancer*, 47: 185-96.
- Draper B. W., McCallum C. M., Moens C. B.: *nanos1* is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. (2007) *Developmental Biology*, 305: 589 – 598.
- Edwards T. A., Pyle S. E., Wharton R. P., Aggarwal A. K.: Structure of Pumilio Reveals Similarity between RNA and Peptide Binding Motifs. (2001) *Cell*, 105: 281 – 289.
- Evans T. C., Crittenden S. L., Kodoyianni V., Kimble J.: Translational Control of Maternal *glp-1* mRNA Establishes an Asymmetry in the *C. elegans* Embryo. (1994) *Cell*, 77: 183 – 194.
- Forbes A., Lehmann R.: Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. (1998) *Development*, 125: 679 – 690.
- Fox M. S., Urano J., Reijo Pera R. A.: Identification and characterization of RNA sequences to which human PUMILIO-2 (PUM2) and Deleted in AZoospermia-Like (DAZL) bind. (2005) *Genomics*, 85: 92 – 105.
- Franz H., Greschik H., Willmann D., Ozretić L., Jilg C. A., Wardelmann E., Jung M., Buettner R., Schüle R.: The histone code reader SPIN1 controls RET signaling in liposarcoma. (2015) *Oncotarget*, Mar 10;6(7):4773-89
- Galgano A., Forrer M., Jaskiewicz L., Kanitz A., Zavolan M., Gerber A. P.: Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. (2008) *PLoS One*, 3(9): e3164.
- Gao Y., Yue W., Zhang P., Li L., Xie X., Yuan H., Chen L., Liu D., Yan F., Pei X. T.: Spindlin1, a novel nuclear protein with a role in the transformation of NIH3T3 cells. (2005) *Biochemical and Biophysical Research Communications*
- Gerber A. P., Herschlag D., Brown P. O.: Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. (2004) *PLoS Biology*, 2(3): E79.
- Gerber A. P., Luschnig S., Krasnow M. A., Brown P. O., Herschlag D.: Genome-wide identification of mRNAs associated with the translational regulator PUMILIO in *Drosophila melanogaster*. (2006) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12): 4487 – 4492.
- Gerstberger S., Hafner M., Tuschl T.: A census of human RNA-binding proteins. (2014) *Nature Reviews. Genetics*, Dec;15(12):829-45
- Ginter-Matuszewska B., Spik A., Rembiszewska A., Koyias C., Kupryjańczyk J., Jaruzelska J.: The SNARE-associated component SNAPIN binds PUMILIO2 and NANOS1 proteins in human male germ cells. (2009) *Molecular Human Reproduction*, 15(3):173 – 179.
- Goddard N. C., McIntyre A., Summersgill B., Gilbert D., Kitazawa S., Shipley J.: KIT and RAS signalling pathways in testicular germ cell tumours: new data and a review of the literature. (2007) *International Journal of Andrology*, Aug;30(4):337-48.
- Gupta Y. K., Lee T. H., Edwards T. A., Escalante C. R., Kadyrova L. Y., Wharton R. P., Aggarwal A. K.: Co-occupancy of two Pumilio molecules on a single *hunchback* NRE. (2009) *RNA*, 15:1029 – 1035.
- Hafner M., Landthaler M., Burger L., Khorshid M., Hausser J., Berninger P., Rothballer A., Ascano M. Jr, Jungkamp A. C., Munschauer M., Ulrich A., Wardle G. S., Dewell S., Zavolan M., Tuschl T.: Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. (2010) *Cell*, Apr 2;141(1):129-41.

- Hashimoto H., Hara K., Hishiki A., Kawaguchi S., Shichijo N., Nakamura K., Unzai S., Tamaru Y., Shimizu T., Sato M.: Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. (2010) *EMBO reports*, 11(11): 848 – 853.
- Haslene-Hox H., Oveland E., Woie K., Salvesen H. B., Tenstad O., and Wiig H.: Distribution volumes of macromolecules in human ovarian and endometrial cancers – effects of extracellular matrix structure. (2015) *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Jan 1;308(1):H18-28.
- Hayashi Y., Hayashi M., Kobayashi S.: Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28): 10338 – 10342.
- Huttlin E. L., Bruckner R. J., Paulo J. A., Cannon J. R., Ting L., Baltier K., Colby G., Gebreab F., Gygi M. P., Parzen H., Szpyt J., Tam S., Zarraga G., Pontano-Vaites L., Swarup S., White A. E., Schwappe D. K., Rad R., Erickson B. K., Obar R. A., Guruharsha K. G., Li K., Artavanis-Tsakonas S., Gygi S.P., Harper J. W.: Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. (2017) *Nature*, May 25;545(7655):505-509
- Jaruzelska J., Kotecki M., Kusz K., Spik A., Firpo M., Reijo Pera R. A.: Conservation of a Pumilio–Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. (2003) *Development, Genes and Evolution*, 213: 120 – 126.
- Joly W., Chartier A., Rojas-Rios P., Busseau I., Simonelig M.: The CCR4 deadenylase acts with Nanos and Pumilio in the fine-tuning of Mei-P26 expression to promote germline stem cell self-renewal. (2013) *Stem Cell Reports*, 1: 411-24.
- Jura C., Klag J.: Podstawy embriologii zwierząt i człowieka. Tom 1 i 2, *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa 2005.
- Kadyrova L. Y., Habara Y., Lee T. H., Wharton R. P.: Translational control of maternal *Cyclin B* mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. (2007) *Development*, 134: 1519 – 1527.
- Kawakami T., Zhang C., Okada Y., Okamoto K.: Erasure of methylation imprint at the promoter and CTCF-binding site upstream of H19 in human testicular germ cell tumors of adolescents indicate their fetal germ cell origin. (2006) *Oncogene*, Jun 1;25(23):3225-36.
- Kaymak E., Wee L. M., Ryder S. P.: Structure and function of nematode RNA-binding proteins. (2010) *Current Opinion in Structural Biology*, 20: 305 – 312.
- Kedde M., van Kouwenhove M., Zwart W., Oude Vrielink J. A. F., Elkon R., Agami R.: A Pumilio-induced RNA structure switch in p27–3' UTR controls miR–221 and miR–222 accessibility. (2010) *Nature Cell Biology*, 12(10): 1014 – 1020.
- Keene J. D., Tenenbaum S. A.: Eukaryotic mRNPs May Represent Posttranscriptional Operons. (2002) *Molecular Cell*, 9: 1161 – 1167.
- Keene J.D.: RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. (2007) *Nature Reviews. Genetics*, 8(7): 533 – 543.
- Keuckelaere E. D., Hulpiau P., Saeys Y., Berx G., van Roy F.: *Nanos* genes and their role in development and beyond. (2018) *Cellular and Molecular Life Sciences*. Feb 3.
- Kobayashi S., Yamada M., Asaoka M., Kitamura T.: Essential role of the posterior morphogen *nanos* for germline development in *Drosophila*. (1996) *Nature*, 380: 708 – 710.
- Köprunner M., Thisse C., Thisse B., Raz E.: A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. (2001) *Genes & Development* 15: 2877 – 2885.
- Kraemer B., Crittenden S., Gallegos M., Moulder G., Barstead R., Kimble J., Wickens M.: NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm-oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. (1999) *Current Biology*, 9: 1009 – 1018.
- Kristensen D. G., Nielsen J. E., Jørgensen A., Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E., Almstrup K.: Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis. (2014) *British Journal of Cancer*. Feb 4;110(3):668-78.
- Kuersten S., Goodwin E. B.: The Power Of The 3'UTR: Translational Control And Development. (2003) *Nature*, 4: 626 – 637.
- Kusz K. M., Tomczyk L., Sajek M., Spik A., Latoś-Bieleńska A., Jędrzejczak P., Pawełczyk L., Jaruzelska J.: The highly conserved NANOS2 protein: testis-specific expression and significance for the human male reproduction. (2009b) *Molecular Human Reproduction*, 15(3): 165 – 171.

- Kusz K., Tomczyk L., Spik A., Latoś-Bieleńska A., Jędrzejczak P., Pawelczyk L., Jaruzelska J.: *NANOS3* Gene Mutations in Men With Isolated Sterility Phenotype. (2009a) *Molecular Reproduction and Development*, 76: 804.
- Kusz-Zamelczyk K., Sajek M., Spik A., Glazar R., Jędrzejczak P., Latoś-Bieleńska A., Kotecki M., Pawelczyk L., Jaruzelska J.: Mutations of *NANOS1*, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-asthenoteratozoospermia. (2013) *Journal of Medical Genetics*, 50(3):187-93
- Laval S. H., Reed V., Blair H. J., Boyd Y.: The structure of DXF34, a human X-linked sequence family with homology to a transcribed mouse Y-linked repeat. (1997) *Mammalian Genome*, Sep;8(9):689-91.
- Lee M. H., Hook B., Pan G., Kershner A. M., Merritt C., Seydoux G., Thomson J. A., Wickens M., Kimble J.: Conserved Regulation of MAP Kinase Expression by PUF RNA-Binding Proteins. (2007) *PLoS Genetics*, 3 (12): e233, 2540 – 2550.
- Lee S., Kopp F., Chang T. C., Sataluri A., Chen B., Sivakumar S., Yu H., Xie Y., Mendell J. T.: Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. (2016) *Cell*. Jan 14;164(1-2):69-80
- Lehner C. F., O'Farrell P. H.: The Roles of *Drosophila* Cyclins A and B in Mitotic Control. (1990) *Cell*, 61(3): 535 – 547.
- Li Y., Ma X., Wang Y., Li G.: miR-489 inhibits proliferation, cell cycle progression and induces apoptosis of glioma cells via targeting SPIN1-mediated PI3K/AKT pathway. (2017) *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Sep;93:435-443.
- Lin H., Spradling A. C.: A novel group of *pumilio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. (1997) *Development*, 124: 2463 – 2476.
- Looijenga L. H., Stoop H., de Leeuw H. P., de Gouveia Brazao C. A., Gillis A. J., van Roozendaal K. E., van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider D. T., Kononen J., Sauter G., Oosterhuis J. W.: POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. (2003) *Cancer Research*, May 1;63(9):2244-50.
- Lu G., Hall T. M.: Alternate modes of cognate RNA recognition by human PUMILIO proteins. (2011) *Structure*, 19(3):361-7
- Miles W. O., Korenjak M., Griffiths L. M., Dyer M. A., Provero P., Dyson N.J.: Post-transcriptional gene expression control by *NANOS* is up-regulated and functionally important in pRb-deficient cells. (2014) *EMBO Journal*, 33(19):2201-15
- Miles W. O., Tschop K., Herr A., Ji J.Y., Dyson N.J.: *Pumilio* facilitates miRNA regulation of the *E2F3* oncogene. (2012) *Genes and Development*, 26: 356-68.
- Minami K., Chano T., Kawakami T., Ushida H., Kushima R., Okabe H., Okada Y., Okamoto K.: DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. (2010) *Clinical Cancer Research*, May 15;16(10):2751-9.
- Mizuno Y., Gotoh A., Kamidono S., Kitazawa S.: [Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2)]. (1993) *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*, Jul;84(7):1211-8. [w języku japońskim]
- Møller H., Skakkebaek N. E.: Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study. (1999) *BMJ*, Feb 27;318(7183):559-62.
- Moore F. L., Jaruzelska J., Fox M. S., Urano J., Firpo M. T., Turek P. J., Dorfman D. M., Reijo Pera R. A.: Human *Pumilio-2* is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with *DAZ* (Deleted in AZoospermia) and *DAZ-Like* proteins. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2): 538 – 543.
- Morris A. R., Mukherjee N., Keene J. D.: Ribonomic Analysis of Human *Pum1* Reveals cis-trans Conservation across Species despite Evolution of Diverse mRNA Target Sets. (2008) *Molecular And Cellular Biology*, 28(12): 4093 – 4103.
- Murata Y., Wharton R. P.: Binding of *Pumilio* to Maternal *hunchback* mRNA Is Required for Posterior Patterning in *Drosophila* Embryos. (1995) *Cell*, 80: 747 – 756.
- Nakahata S., Katsu Y., Mita K., Inoue K., Nagahama Y., Yamashita M.: Biochemical Identification of *Xenopus* *Pumilio* as a Sequence-specific *Cyclin B1* mRNA-binding Protein That Physically Interacts with a

- Nanos Homolog, Xcat-2, and a Cytoplasmic Polyadenylation Element-binding Protein. (2001) *The Journal Of Biological Chemistry*, 276(24): 20945 – 20953.
- Nettersheim D., Heukamp L. C., Fronhoff s F., Grewe M.J., Haas N., Waha A., Honecker F., Waha A., Kristiansen G., Schorle H.: Analysis of TET expression/activity and 5mC oxidation during normal and malignant germ cell development. (2013) *PLoS One*, Dec 26;8(12):e82881.
- Netto G. J., Nakai Y., Nakayama M., Jadallah S., Toubaji A., Nonomura N., Albadine R., Hicks J. L., Epstein J. I., Yegnasubramanian S., Nelson W. G., De Marzo A. M.: Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. (2008) *Modern Pathology*, Nov;21(11):1337-44.
- Nolde M. J., Saka N., Reinert K. L., Slack F. J.: The *Caenorhabditis elegans* pumilio homolog, *puf-9*, is required for the 3'UTR-mediated repression of the *let-7* microRNA target gene, *hbl-1*. (2007) *Developmental Biology*, 305: 551 – 563.
- Oh B., Hampl A., Eppig J. J., Solter D., Knowles B. B.: SPIN, a substrate in the MAP kinase pathway in mouse oocytes. (1998) *Molecular Reproduction and Development*, Jun;50(2):240-9
- Oh B., Hwang S. Y., McLaughlin J., Solter D. and Knowles B. B.: Timely translation during the mouse oocyte-to-embryo transition. (2000) *Development*, Sep;127(17):3795-803.
- Oh B., Hwang S. Y., Solter D. and Knowles B. B.: *Spindlin*, a major maternal transcript expressed in the mouse during the transition from oocyte to embryo. (1997) *Development*, Jan;124(2):493-503.
- Oosterhuis J. W., Castedo S. M., de Jong B., Cornelisse C. J., Dam A., Sleijfer D. T., Schraffordt Koops H.: Ploidy of primary germ cell tumors of the testis. Pathogenetic and clinical relevance. (1989) *Laboratory Investigation*, Jan;60(1):14-21.
- Parisi M., Lin H.: Translational repression: A duet of Nanos and Pumilio. (2000) *Current Biology*, 10(2) R81 – R83.
- Qiu C., McCann K. L., Wine R. N., Baserga S. J., Hall T. M.: A divergent Pumilio repeat protein family for pre-rRNA processing and mRNA localization. (2014) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52):18554-9
- Quenault T., Lithgow T., Traven A.: PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. (2011) *Trends in Cell Biology*, 21(2): 104 – 112.
- Racki W. J., Richter J. D.: CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse. (2006) *Development*, Nov;133(22):4527-37.
- Raff J. W., Whitfield W. G. F., Glover D. M.: Two distinct mechanisms localise *cyclin B* transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. (1990) *Development*, 110: 1249 – 1261.
- Raisch T., Bhandari D., Sabath K., Helms S., Valkov E., Weichenrieder O., Izaurralde E.: Distinct modes of recruitment of the CCR4-NOT complex by *Drosophila* and vertebrate Nanos. (2016) *EMBO Journal*. May 2;35(9):974-90.
- Rajpert-De Meyts E., McGlynn K. A., Okamoto K., Jewett M. A. S., Bokemeyer C.: Testicular germ cell tumours. (2016) *Lancet*, Apr 23;387(10029):1762-74.
- Rosen A., Jayram G., Drazer M., Eggen S. E.: Global trends in testicular cancer incidence and mortality. (2011) *European Urology*, 60: 374-9.
- Saga Y.: Function of Nanos2 in the male germ cell lineage in mice. (2010) *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 3815 – 3822.
- Saga Y.: Sexual development of mouse germ cells Nanos2 promotes the male germ cell fate by suppressing the female pathway. (2008) *Development, Growth and Differentiation*, 50(Suppl. 1): S141 – S147.
- Sano H., Mukai M., Kobayashi S.: Maternal Nanos and Pumilio regulate zygotic *vasa* expression autonomously in the germ-line progenitors of *Drosophila melanogaster* embryos. (2001) *Development, Growth and Differentiation*, 43: 545 – 552.
- Sato K., Hayashi Y., Ninomiya Y., Shigenobu S., Arita K., Mukai M., Kobayashi S.: Maternal Nanos represses *hid/skl*-dependent apoptosis to maintain the germ line in *Drosophila* embryos. (2007) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18): 7455 – 7460.
- Shanle E. K., Shinsky S. A., Bridgers J. B., Bae N., Sagum C., Krajewski K., Rothbart S. B., Bedford M. T., Strahl B. D.: Histone peptide microarray screen of chromo and Tudor domains defines new histone lysine methylation interactions. (2017) *Epigenetics & Chromatin*, Mar 14;10:12.

- Skotheim R. I., Lind G. E., Monni O., Nesland J. M., Abeler V. M., Fosså S. D., Duale N., Brunborg G., Kallioniemi O., Andrews P.W., Lothe R.A.: Differentiation of human embryonal carcinomas *in vitro* and *in vivo* reveals expression profiles relevant to normal development. (2005) *Cancer Research*, Jul 1;65(13):5588-98.
- Smiraglia D. J., Szymanska J., Kraggerud S. M., Lothe R. A., Peltomäki P., Plass C.: Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors. (2002) *Oncogene*, May 30;21(24):3909-16.
- Sonne S. B., Almstrup K., Dalgaard M., Juncker A. S., Edsgard D., Ruban L., Harrison N. J., Schwager C., Abdollahi A., Huber P. E., Brunak S., Gjerdrum L. M., Moore H. D., Andrews P. W., Skakkebaek N. E., Rajpert-De Meyts E., Leffers H.: Analysis of gene expression profiles of microdissected cell populations indicates that testicular carcinoma *in situ* is an arrested gonocyte. (2009) *Cancer Research*, Jun 15;69(12):5241-50.
- Sonoda J., Wharton R. P.: Recruitment of Nanos to *hunchback* mRNA by Pumilio. (1999) *Genes & Development*, 13: 2704 – 2712.
- Spasov D. S., Jurecic R.: Cloning and comparative sequence analysis of *PUM1* and *PUM2* genes, human members of the *Pumilio* family of RNA-binding proteins. (2002) *Gene*, 299: 195–204.
- Spik A., Oczkowski S., Olszak A., Formanowicz P., Błażewicz J., Jaruzelska J.: Human fertility protein PUMILIO2 interacts *in vitro* with testis mRNA encoding Cdc42 effector 3 (CEP3). (2006) *Biology of Reproduction*, 6(2): 103 – 113.
- Srikannathasan V., Gileadi C., Johansson C., Shrestha L., Tallon R, Burgess-Brown N. A., von Delft F., Arrowsmith C. H., Bountra C., Edwards A., Oppermann U.: Crystal structure of human Spindlin3. (2015) *Protein Data Bank in Europe EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/5A1H>)
- Strome S., Lehmann R.: Germ Versus Soma Decisions: Lessons from Flies and Worms. (2007) *Science*, 316: 392 – 393.
- Su X., Zhu G., Ding X., Lee S. Y., Dou Y., Zhu B., Wu W., Li H.: Molecular basis underlying histone H3 lysine-arginine methylation pattern readout by Spin/Ssty repeats of Spindlin1. (2014) *Genes & Development*, Mar 15;28(6):622-36.
- Subramaniam K., Seydoux G.: *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. (1999) *Development*, 126: 4861 – 4871.
- Suh N., Crittenden S. L., Goldstrohm A., Hook B., Thompson B., Wickens M., Kimble J.: FBF and its dual control of *gld-1* expression in the *Caenorhabditis elegans* germline. (2009) *Genetics*. Apr;181(4):1249-60
- Suzuki A., Igarashi K., Aisaki K., Kanno J., Saga Y.: NANOS2 interacts with the CCR4–NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. (2010) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8): 3594 – 3599.
- Suzuki A., Saga Y.: Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. (2008) *Genes & Development*, 22(4): 430 – 435.
- Suzuki H., Tsuda M., Kiso M., Saga Y.: Nanos3 maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both Bax-dependent and -independent apoptotic pathways. (2008) *Developmental Biology*, 318: 133 – 142.
- Talon R., Gileadi C., Johansson C., Burgess-Brown N., Shrestha L., Von Delft F., Krojer T., Fairhead M., Bountra C., Arrowsmith C. H., Edwards A., Oppermann U.: 1.86 Å structure of human Spindlin-4 protein in complex with histone H3K4me3 peptide. (2014) *Protein Data Bank in Europe EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4UY4>)
- Tian Q., Frierson H. F. Jr, Krystal G. W., Moskaluk C. A.: Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. (1999) *American Journal of Pathology*, Jun;154(6):1643-7.
- Trabert B., Zugna D., Richiardi L., McGlynn K. A., Akre O.: Congenital malformations and testicular germ cell tumors. (2013) *International Journal of Cancer*, Oct 15;133(8):1900-4.
- Tsuda M., Sasaoka Y., Kiso M., Abe K., Haraguchi S., Kobayashi S., Saga Y.: Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. (2003) *Science*, 301: 1239 – 1241.
- Urano J., Fox M. S., Reijo Pera R. A.: Interaction of the Conserved Meiotic Regulators, BOULE (BOL) and PUMILIO-2 (PUM2). (2005) *Molecular Reproduction And Development*, 71: 290 – 298.
- Ushida H., Kawakami T., Minami K., Chano T., Okabe H., Okada Y., Okamoto K.: Methylation profile of DNA repetitive elements in human testicular germ cell tumor. (2012) *Molecular Carcinogenesis*, Sep;51(9):711-22.

- van de Geijn G. J., Hersmus R., Looijenga L.H.: Recent developments in testicular germ cell tumor research. (2009) *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 87: 96-113.
- Van Etten J., Schagat T. L., Hrit J., Weidmann C. A., Brumbaugh J., Coon J. J., Goldstrohm A. C.: Human Pumilio proteins recruit multiple deadenylases to efficiently repress messenger RNAs. (2012) *Journal of Biological Chemistry*, 287(43):36370-83
- Wang C., Dickinson L. K., Lehmann R.: Genetics of *nanos* localization in *Drosophila*. (1994) *Developmental Dynamics*, 199: 103 – 115.
- Wang J. X., Zeng Q., Chen L., Du J. C., Yan X. L., Yuan H. F., Zhai C., Zhou J. N., Jia Y. L., Yue W., Pei X. T.: SPINDLIN1 promotes cancer cell proliferation through activation of WNT/TCF-4 signaling. (2012) *Molecular Cancer Research*, Mar;10(3):326-35.
- Wang W., Chen Z., Mao Z., Zhang H., Ding X., Chen S., Zhang X., Xu R., Zhu B.: Nucleolar protein Spindlin1 recognizes H3K4 methylation and stimulates the expression of rRNA genes. (2011) *EMBO Reports*, Oct 28;12(11):1160-6.
- Wang X., McLachlan J., Zamore P. D., Tanaka Hall T. M.: Modular Recognition of RNA by a Human Pumilio–Homology Domain. 2002 *Cell*, 110: 501 – 512.
- Wang X., Zamore P. D., Tanaka Hall T. M.: Crystal Structure of a Pumilio Homology Domain. (2001) *Molecular Cell*, 7: 855 – 865.
- Weidmann C. A., Goldstrohm A. C.: *Drosophila* Pumilio protein contains multiple autonomous repression domains that regulate mRNAs independently of Nanos and brain tumor. (2012) *Molecular Cell Biology*, 32(2):527-40
- Wermann H., Stoop H., Gillis A. J., Honecker F., van Gurp R. J., Ammerpohl O., Richter J., Oosterhuis J. W., Bokemeyer C., Looijenga L. H.: Global DNA methylation in fetal human germ cells and germ cell tumours: association with differentiation and cisplatin resistance. (2010) *The Journal of Pathology*, Aug;221(4):433-42.
- West J. A., Viswanathan S. R., Yabuuchi A., Cunniff K., Takeuchi A., Park I. H., Sero J. E., Zhu H., Perez-Atayde A., Frazier A. L., Surani M. A., Daley G. Q.: A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. (2009) *Nature*, Aug 13;460(7257):909-13.
- Wharton R. P., Sonoda J., Lee T., Patterson M., Murata Y.: The Pumilio RNA–Binding Domain Is Also a Translational Regulator. (1998) *Molecular Cell*, 1: 863 – 872.
- Whitfield W. G. F., González C., Sánchez–Herrero E., Glover D. M.: Transcripts of one of two *Drosophila* cyclin genes become localized in pole cells during embryogenesis. (1989) *Nature*, 338: 337 – 340.
- Wilinski D., Qiu C., Lapointe C. P., Nevil M, Campbell Z. T., Tanaka Hall T. M., Wickens M.: RNA regulatory networks diversified through curvature of the PUF protein scaffold. (2015) *Nature Communication*, Sep 14;6:8213.
- Wreden C., Verrotti A. C., Schisa J. A., Lieberfarb M. E. and Strickland S.: *Nanos* and *pumilio* establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of *hunchback* mRNA. (1997) *Development*, 124: 3015 – 3023.
- Yang N., Wang W., Wang Y., Wang M., Zhao Q., Rao Z., Zhu B., and Xu R. M.: Distinct mode of methylated lysine-4 of histone H3 recognition by tandem tudor-like domains of Spindlin1. (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Oct 30;109(44):17954-9.
- Yang N., Wang W., Wang Y., Wang M., Zhao Q., Rao Z., Zhu B., Xu R. M.: Crystal structure of human Spindlin1 in complex with a histone H3K4(me3) peptide. (2012) *Protein Data Bank in Europe EMBL-EBI* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4H75>)
- Yin Y., Stahl B. C., DeWolf W. C., Morgentaler A.: P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis. (2002) *Journal of Andrology*, 23: 64-70.
- Yuan H., Zhang P., Qin L., Chen L., Shi S., Lu Y., Yan F., Bai C., Nan X., Liu D., Li Y., Yue W., Pei X. T.: Overexpression of SPINDLIN1 induces cellular senescence, multinucleation and apoptosis. (2008) *Gene*, Feb 29;410(1):67-74.
- Yue W., Sun L. Y., Li C. H., Zhang L. X., Pei X. T.: [Screening and identification of ovarian carcinomas related genes]. (2004) *Ai Zheng*, Feb;23(2):141-5. (w języku chińskim)
- Zamore P. D., Bartel D. P., Lehmann R., Williamson J. R.: The PUMILIO–RNA Interaction: A Single RNA–Binding Domain Monomer Recognizes a Bipartite Target Sequence. (1999) *Biochemistry*, 38(2): 596 – 604.

- Zamore P. D., Williamson J. R., Lehmann R.: The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. (1997) *RNA*, 3: 1421 – 1433.
- Zhang B., Gallegos M., Puoti A., Durkin E., Fields S., Kimble J., Wickens M. P.: A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line. (1997) *Nature*, 390: 477 – 484.
- Zhang P., Cong B., Yuan H., Chen L., Lv Y., Bai C., Nan X., Shi S., Yue W., Pei X. T.: Overexpression of Spindlin1 induces metaphase arrest and chromosomal instability. (2008) *Journal of Cell Physiology*, Nov;217(2):400-8.
- Zhao Q., Qin L., Jiang F., Wu B., Yue W., Xu F., Rong Z., Yuan H., Xie X., Gao Y., Bai C., Bartlam M., Pei X., and Rao Z.: Structure of human SPINDLIN1. Tandem tudor-like domains for cell cycle regulation. (2007) *The Journal of Biological Chemistry*, Jan 5;282(1):647-56.

Finansowanie badań:

Narodowe Centrum Nauki nr 2011/01/B/NZ2/04833:

„Potranskrypcyjna kontrola potencjalnych regulatorów cyklu komórkowego SIAH1, SPINDLIN3 oraz TSC22D1 przez białko PUMILIO2, w modelu seminoma człowieka”

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 0144/IP1/2011/71:

„Współdziałanie białek PUMILIO2 i NANOS1 oraz mikroRNA w kontroli regulatorów cyklu komórkowego z rodziny SPINDLIN, w modelu nasieniaka człowieka”

Narodowe Centrum Nauki nr 2013/09/B/NZ1/01878:

„Globalna regulacja mRNA przez PUMILIO oraz rola MAELSTROM, składnika nuage oraz markera nowotworów jądra, w nasieniuaku człowieka”