



RAČUNALNO PREDVIĐANJE UTJECAJA 5' NTR VARIJANATA GENA BRCA2 NA SEKUNDARNU STRUKTURU MOLEKULE mRNA



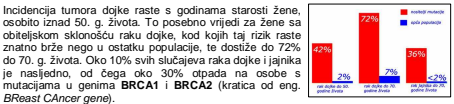
ČOVJEK
(od stanice do organizma)

P. Ozretić, M. Sabol, D. Car

Laboratorij za nasljedni rak, Zavod za molekularnu medicinu, IRB

1) GENI BRCA1 I BRCA2 I NASLJEDNI RAK DOJKE I JAJNIKA

Rak dojke je najučestaliji tumor u žena u Hrvatskoj, i drugi najučestaliji tumor uopće. Godišnje se pojavi oko 2.300 novih slučajeva raka dojke a nažalost oko 900 žena godišnje umre od ove opake bolesti. Rak jajnika je nešto manje učestalost, sa oko 490 novih i 1288 smrtnih slučajeva godišnje.



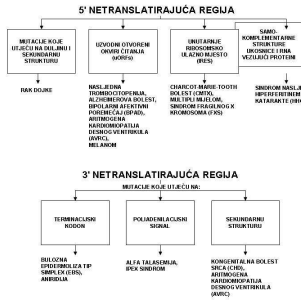
Nasljedna sklonost raku dojke određuje se praćenjem mutacija u ta dva gena. Laboratorij za nasljedni rak Instituta "Ruđer Bošković" provodi genetičko testiranje sofisticiranim molekularno-genetičkim metodama, certificiranim od strane The European Molecular Genetics Quality Network (EMQN). Međutim, gotovo polovica svih dosad pronađenih genskih promjena označeno je kao varijante nepoznatog kliničkog značaja. Tumačenje ih nekvalificiranih varijanata je glavni problem kod procjene rizika prilikom genetičkog savjetovanja. U tim slučajevima, za brzu procjenu kliničkog značaja često se koriste različite računalne metode. Većina njih uglavnom predviđa učinak varijanata nadenih u kodirajućim regijama gena ili nadenih na granicama eksona i introna. Cilj našeg istraživanja je pronaći prikladnu računalnu metodu za procjenu štetnosti genskih varijanata koje su pronađene u 5' netranslatirajućoj regiji gena BRCA2.

2) POVEZANOST NETRANSLATIRAJUĆIH REGIJA GENA I BOLESTI

Netranslatirajuće regije (NTR) su dijelovi zrele molekule mRNA i nalaze se prije mjesta početka sinteze proteina (5' NTR) te nakon terminacijskog STOP kodona (3' UTR). Prepisuju se (transkribiraju) zajedno s kodirajućim regijom u molekulu mRNA ali se ne prevode (translatiraju) u polipeptidni lanac. NTR posjeduju nekoliko regulatornih uloga kao što su pravila lokalizacije molekule mRNA u stanice te regulacija učinkovitosti prevodjenja gena. **Funkcioniranje NTR-ova osim o nukleotidnom slijedu ovisi i o njihovoj sekundarnoj strukturi.**

Sve je veći broj bolesti čija je molekularna osnova promjena (mutacija) u nukleotidnom slijedu NTR-ova. Na primjer, za 5' NTR ljudskog gena BRCA1 pokazano je da igra važnu ulogu u regulaciji učinkovitosti prevodjenja gena u protein. Dvije nukleotidne promjene (točkaste mutacije) u toj regiji (c.-35>C i c.-29>T), pronađene u vrlo agresivnim oblicima sporadičnih tumora dojke, dramatično smanjuju količinu proteina BRCA1. Uloga 5' NTR gena BRCA2 u post-transkripcijskoj regulaciji učinkovitosti prevodjenja gena dosad nije dovoljno poznata. Do sada je samo za varijantu c.-26G>A eksperimentalno pokazano da povećava razinu prevodjenja gena u proteinski produkt i da ovisno o genotipu (homozigotni ili heterozigotni oblik) predstavlja rizik ili zaštitu u sporadičnim oblicima raka dojke.

POVEZANOST RAZLIČITIH REGULATORNIH ELEMENTANA 5' I 3' NT REGIJA S BOLESTIMA

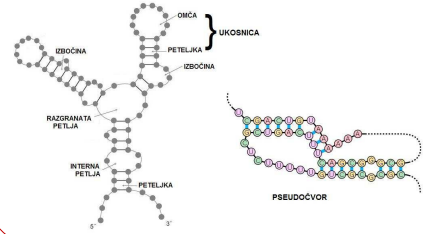


3) SEKUNDARNA STRUKTURA MOLEKULE RNA

Molekula RNA je nukleinska kiselina, polimer sastavljen od monomera koje nazivamo nukleotidima (dušičnim bazama). Kod RNA ostoje 4 vrste nukleotida: adenin (A), guanin (G), uracil (U) i citozin (C). Adenin i uracil te guanin i citozin su komplementarni parovi nukleotida što znači da je između njih moguće povezivanje vodikovim vezama. Sekundarna struktura molekule RNA nastaje unutarmolekulskim sparivanjem nukleotidnih baza. Uz Watson-Crickove parove baza (G-C, C-G, A-U i U-A) mogući su i nešto labaviji G-U i U-G parovi

Kod RNA molekula postoji nekoliko karakterističnih oblika sekundarne strukture. Najrasprostranjeniji je oblik **ukosnice** (eng. *hairpin*). U nešto manjoj mjeri pojavljuju se oblici **izbočina** (eng. *bulge*), **internih petlji** (eng. *internal loop*) i **pseudocvorova** (eng. *pseudoknot*). Struktura ukosnice je struktura do koje dolazi uglavnom kod palindromskih sekvenci kada se komplementarne baze povežu i formiraju dvostruki lanac u obliku **peteljke** (eng. *stem*) s **omčom** (eng. *loop*) na kraju. Pseudocvor je nešto kompliciranija struktura kod koje dolazi do spajanja dvije ukosnice i to tako da omča prve formira dio peteljke druge ukosnice.

OBILIK I ELEMENTI SEKUNDARNE STRUKTURE MOLEKULE mRNA

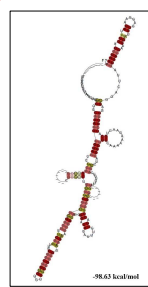
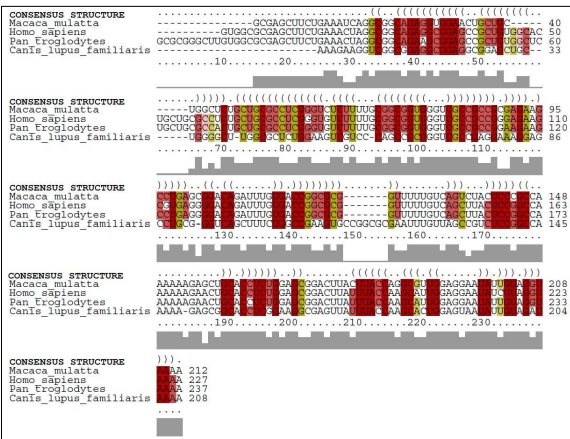


5) METODA ZA PREDVIĐANJE SEKUNDARNE STRUKTURE MOLEKULE RNA

Sekundarna struktura molekule RNA računalno se predviđa računanjem strukture s minimalnom slobodnom energijom (eng. *minimum free energy, MFE*) za različite kombinacije vodikovih veza i domena čime se traže optimalni parovi baza. Struktura s MFE se smatra najstabilnijom. Parametri minimalnih slobodnih energija za Watson-Crick parove baza, G-U parove i regije s omčama su empirijski dobiveni kalorimetrijskim eksperimentima. Najjednostavniji način da se pronađe struktura s MFE je da se generiraju sve moguće strukture i izračuna njihova MFE. Međutim, broj mogućih struktura eksponencijalno raste porastom duljine molekule RNA. Stoga se algoritmi za predviđanje sekundarne strukture koriste dinamičkim programiranjem i stohastičkom kontekstno-neovisnom gramatikom (eng. *stochastic context-free grammar, SCFG*). Najpoznatiji programi koji se koriste za predviđanje sekundarne strukture s najmanjom slobodnom energijom su **mfold** i **RNAfold**.

6) KONSENZUS SEKUNDARNA STRUKTURA 5' NETRANSLATIRAJUĆE REGIJE (5' NTR) GENA BRCA2

Krenuvši od pretpostavke da su funkcionalno značajni elementi sekundarne strukture evolucijski očuvani, prvo smo na osnovu višestrukog srađivanja sekvenci BRCA2 5' NT regije iz 4 organizama izgradili konsenzus sekundarnu strukturu 5' NT regije gena BRCA2, koristeći **RNAfold** web server. Taj algoritam upoređuje više otolognih sekvenci radi pronažanjenja obrasca koevolucije između pojedinih baznih parova, a koji bi mogli ukazivati na kompenzacijske mutacije nastale u svrhu očuvanja komplementarnog spajanja baza (npr. U-A → C-A → C-G). To rezultira konsenzus sekundarnom strukturom s najmanjom slobodnom energijom, koja je zajednička većini sekvenci u višestrukome srađivanju.

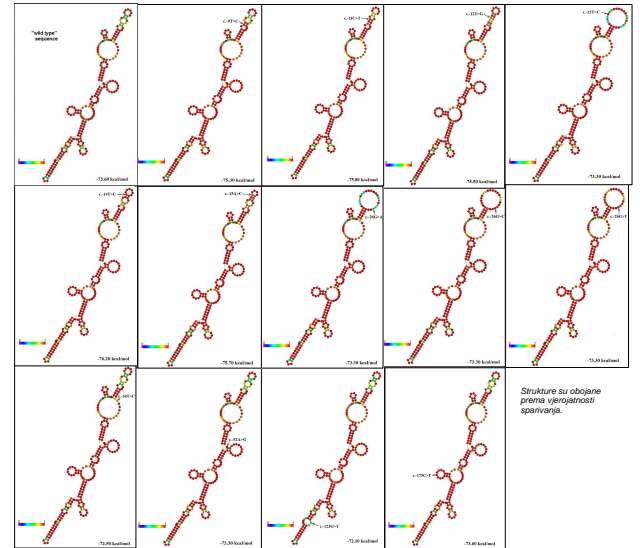


Klasičan grafički prikaz konsenzus sekundarne strukture 5' NT regije gena BRCA2 sa minimalnom slobodnom energijom (-98,65 kcal/mol). Pozicije nukleotida koji se razlikuju u pojedinim organizmima su zaokružene. Boja u pozadini slova ukazuje na broj različitih načina sparivanja baza na toj poziciji. Crvena boja ukazuje da postoji samo jedan način sparivanja baza (npr. G-U), dok oker boja ukazuje da su kod tog sparivanja moguća dva različita para baza (npr. G-U ili A-U). Ukoliko u pojedinoj sekvenci sparivanje na tom mjestu nije moguće, boje su prikazane u svjetlijim nijansama.

Konsenzus sekundarna struktura 5' NT regije gena BRCA2 prikazana je u prvij liniji pomoću točaka (nespareni nukleotidi) i zagrada (spareni nukleotidi). Struktura je izgrađena na temelju višestrukog srađivanja sekvenci iz četiri različita organizma (čovjek, čimpanza, rezus majmun i pas). Svi stupci ispod srađivanja sekvenci prikazuju stupanj evolucijske konzerviranosti pojedinog mjesta unutar 5' NT regije. Boja u pozadini slova ukazuje na broj različitih načina sparivanja nukleotida na toj poziciji. Crvena boja ukazuje da postoji samo jedan način sparivanja nukleotida (npr. G-U), dok oker boja ukazuje da su kod tog sparivanja moguća dva različita para nukleotida (npr. G-U ili A-U). Ukoliko u pojedinoj sekvenci sparivanje na tom mjestu nije moguće, boje su prikazane u svjetlijim nijansama.

7) UTJECAJ POJEDINIH 5' NTR VARIJANATA GENA BRCA2 NA KONSENZUS SEKUNDARNU STRUKTURU

Utjecaj 5' NTR varijanata gena BRCA2 na konsenzus sekundarnu strukturu istražen je tako da je za svaku pojedinu varijantu sekvence 5' NT regije ponovno predviđana sekundarna struktura s minimalnom slobodnom energijom, ali ovaj put koristeći konsenzus strukturu kao kalup (eng. *constraint-directed folding*). Ako je tako predviđena struktura znatno različita od strukture slobodnog tipa "divilieg tipa" 5' NTR gena BRCA2, može se smatrati da ta varijanta ima funkcionalni značaj. U tu svrhu koristili smo **RNAfold** web server.



Upoređujući sekundarne strukture pojedinih 5' NTR varijanata sa strukturom sekvence tzv. "divilieg tipa" može se zaključiti da od ukupno 13 pronađenih, varijante c.-12T>C, c.-26G>A, c.-26G>C i c.-26G>T najviše remete konsenzus strukturu. Sve četiri varijante se nalaze na 3' kraju 5' NT regije, što je blizu mjesta početka sinteze proteina (AUG kodon). Kao što je već prije eksperimentalno pokazano za varijantu c.-26G>A, stvaranjem manje stabilnih struktura (s višim MFE) može se povećati učinkovitost ekspresije proteina BRCA2 i time dovesti do nepravilnosti u njegovoj regulaciji i funkcioniranju. Stoga smatramo da su varijante c.-12T>C, c.-26G>C i c.-26G>T potencijalno klinički značajne i pogodne za daljnju eksperimentalnu funkcionalnu karakterizaciju.