

PRACA DOKTORSKA

Projektowanie i charakterystyka wektorów shmiR,
wykorzystujących proces interferencji RNA
do wyciszania ekspresji ludzkich genów

Paulina Gałka-Marciniak

Praca wykonana pod opieką promotora
Prof. dr hab. Włodzimierza J. Krzyżosiaka

oraz promotora pomocniczego
Dr Marty Olejniczak

Zakład Biomedycyny Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2015

*Serdecznie dziękuję
Panu Profesorowi Włodzimierzowi Krzyżosiakowi
za ukierunkowanie zainteresowań, przekazaną wiedzę
oraz uwagi w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy.*

*Pani Doktor Marcie Olejniczak
dziękuję za wsparcie i szczerą pomoc w każdej chwili, cenne dyskusje
w trakcie prowadzenia badań oraz opiekę w trakcie realizacji tej pracy.*

*Serdecznie dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biomedycyny Molekularnej
za pomoc, wsparcie oraz pozytywną i motywującą atmosferę w pracy.
W szczególności Julii Starega-Roślan za budujące dyskusje w trakcie prowadzenia badań.*

*Adamowi
dziękuję za pomoc, cierpliwość oraz niezłomną wiarę we mnie.*

SPIS TREŚCI

| | |
|--|-----------|
| I. WSTĘP | 5 |
| 1. Wprowadzenie | 5 |
| 2. Regulacja ekspresji genów przez miRNA | 6 |
| 2.1. Biogeneza miRNA | 7 |
| 2.2. Mechanizm działania ludzkich miRNA | 10 |
| 2.3. Różnorodność cząsteczek miRNA | 12 |
| 2.4. Budowa i działanie białek wchodzących w skład kompleksu Mikroprocesora | 14 |
| 2.5. Budowa i działanie RNazy Dicer | 16 |
| 3. Technologia interferencji RNA | 19 |
| 3.1. Wachlarz narzędzi technologii interferencji RNA | 21 |
| 3.2. Efekty niespecyficzne reagentów technologii RNAi | 26 |
| 3.3. Charakterystyka reagentów technologii RNAi typu shmiR | 31 |
| 3.3.1. Aspekty związane z projektowaniem oraz optymalizacją reagentów shmiR | 33 |
| II. CEL BADAŃ | 39 |
| III. WYNIKI | 40 |
| 1. Wstęp | 40 |
| 2. Opracowanie oraz optymalizacja systemu do analizy reagentów typu shmiR | 41 |
| 2.1. Pierwotne prekursorzy miRNA jako nośniki siRNA w technologii RNAi | 41 |
| 2.2. Projektowanie reagentów shmiR | 46 |
| 2.3. Charakterystyka mysiego i ludzkiego pri-miR-155 | 47 |
| 2.4. Konstrukcja trzech serii reagentów shmiR różniących się typem pri-miRNA | 50 |
| 2.5. Opracowanie systemu eksperymentalnego do badania efektywności działania reagentów shmiR | 52 |
| 2.6. Wybór linii komórkowej do badania reagentów shmiR | 53 |
| 2.7. Wpływ ekspresji reagentów shmiR na poziom endogennych miRNA | 55 |
| 3. Charakterystyka reagentów shmiR wykorzystujących najczęściej stosowane pri-miRNA | 56 |
| 3.1. Analiza obróbki reagentów shmiR i charakterystyka uwalnianych siRNA | 56 |
| 3.2. Badanie efektywności działania siRNA uwalnianych z reagentów shmiR | 61 |
| 4. Ocena możliwości wykorzystania pri-miRNA uwalniających homogenne miRNA w technologii RNAi | 63 |
| 4.1. Wybór nośnikowego pri-miRNA uwalniającego homogenne miRNA | 64 |
| 4.2. Wpływ cech struktury na precyzję cięcia reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer | 72 |
| 4.2.1. Wpływ motywów strukturalnych pri-miR-136 na proces jego obróbki | 72 |
| 4.2.2. Wpływ motywów strukturalnych na efektywność działania reagentów shmiR | 79 |
| 4.2.3. Wpływ motywów strukturalnych na strukturę przestrzenną reagentów shmiR | 80 |
| 4.3. Wpływ cech sekwencji nukleotydowej na precyzję cięcia reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer | 85 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.1. Częstość występowania nukleotydów w miejscach cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer _____ | 85 |
| 4.3.2. Wpływ zmian sekwencji na precyzję cięcia reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer _____ | 90 |
| 4.3.3. Wpływ zmian w sekwencji nukleotydowej na efektywność działania reagentów shmiR _____ | 98 |
| IV. Dyskusja _____ | 100 |
| 1. Charakterystyka reagentów shmiR, wykorzystujących najczęściej stosowane nośnikowe pri-miRNA (pri-miR-30a oraz pri-miR-155) _____ | 102 |
| 2. Znaczenie homogenności miRNA oraz siRNA _____ | 105 |
| 3. Wpływ elementów struktury na sposób obróbki reagentów shmiR _____ | 107 |
| 3.1. Znaczenie jednonukleotydowego wypełnienia _____ | 110 |
| 3.2. Znaczenie pętli wewnętrznej _____ | 111 |
| 3.3. Znaczenie struktury przestrzennej _____ | 113 |
| 4. Wpływ sekwencji nukleotydowej na sposób obróbki reagentów shmiR _____ | 114 |
| 4.1. Etap cięcia przez RNazę Drosha _____ | 115 |
| 4.2. Etap cięcia przez RNazę Dicer _____ | 117 |
| 5. Znaczenie uzyskanych wyników oraz ocena możliwości adaptacji prekursorów uwalniających homogenne miRNA w technologii RNAi _____ | 119 |
| V. Wnioski _____ | 121 |
| VI. Streszczenie _____ | 122 |
| VII. Abstract _____ | 124 |
| VIII. Materiały i metody _____ | 126 |
| IX. Bibliografia _____ | 150 |
| X. Wykaz wybranych skrótów _____ | 161 |
| XI. Wykaz publikacji _____ | 162 |
| XII. Źródła finansowania badań _____ | 163 |

I. WSTĘP

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój badań nad biogenezą oraz funkcjonowaniem cząsteczek mikroRNA (miRNA). Opisane zostały główne etapy powstawania miRNA przy udziale komórkowej maszyny białkowej, jednak szczegóły tego procesu nie są jeszcze do końca poznane. Naturalny szlak regulacji poziomu ekspresji genów przez miRNA wykorzystywany jest przez technologię interferencji RNA (RNAi) do wyciszania ekspresji poszczególnych genów w komórce. Technologia ta dysponuje szerokim wachlarzem reagentów, włączających się w naturalny szlak biogenezy miRNA na jego różnych etapach. Reagenty te różnią się m.in. czasem, w którym utrzymują swoją aktywność czy sposobem dostarczania do komórek. Z tego względu do projektowania efektywnych reagentów technologii RNAi konieczne jest pogłębienie wiedzy dotyczącej procesów obróbki, którym poddawane są wprowadzane do komórek reagenty, a w szczególności specyficzności działania RNaz Drosha i Dicer zaangażowanych w powstawanie cząsteczek miRNA oraz siRNA.

W niniejszej pracy doktorskiej skupiono się na grupie reagentów technologii RNAi typu shmiR, wykorzystujących całą ścieżkę biogenezy miRNA, włączających się do niej na początkowym etapie. Reagenty shmiR bardzo często wykorzystywane są w podejściach terapeutycznych ze względu na wysoką aktywność wyciszania ekspresji docelowych genów oraz bezpieczeństwo stosowania, związane z niskim ryzykiem wzbudzenia efektów ubocznych.

Podobnie jak w przypadku endogennych miRNA, pewne aspekty związane z procesem obróbki reagentów shmiR w komórkach nie zostały jeszcze poznane. W związku z powyższym, projektowanie i stosowanie tych reagentów wiąże się z trudnościami w precyzyjnym „sterowaniu” procesem obróbki tych cząsteczek w komórkach. Z tego względu istnieje potrzeba dokładnego poznania tych procesów w celu opracowania reguł projektowania efektywnych i bezpiecznych reagentów shmiR.

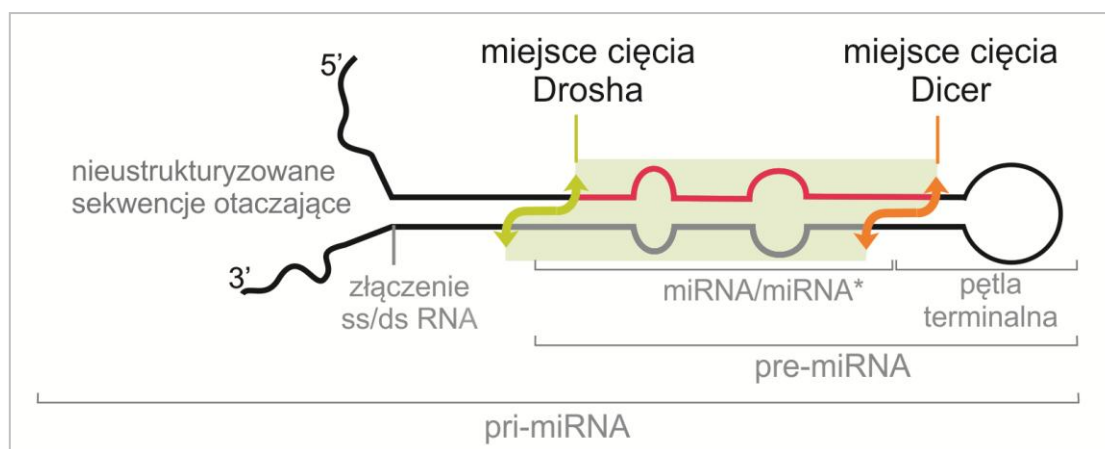
2. Regulacja ekspresji genów przez miRNA

Małe niekodujące RNA eukariontów stanowią grupę cząsteczek długości od 20 do 30 nt, których funkcją jest regulacja ekspresji endogennego oraz egzogenego materiału genetycznego w komórkach (Ghildiyal i Zamore 2009; Wilson i wsp. 2015). Oprócz niewielkiej długości ich wspólną cechą jest również oddziaływanie z białkami z rodziny AGO (ang. Argonaute family proteins). W obrębie grupy małych RNA zwierzęcych można wyodrębnić trzy podstawowe klasy, różniące się sposobem powstawania oraz funkcją komórkową (Kim i wsp. 2009). Należą do nich mikroRNA (miRNA), krótkie interferujące RNA (siRNA) oraz RNA oddziałujące z białkami PIWI (piRNA) (Ha i Kim 2014).

Ludzki genom koduje ponad dwa tysiące miRNA, kontrolujących ekspresję tysięcy genów na drodze interferencji RNA (RNAi) (Sorefan i wsp. 2012; Kozomara i Griffiths-Jones 2014). Szacuje się, że regulacja przez miRNA dotyczy więcej niż połowy genów kodujących białka, a cząsteczki te zaangażowane są w regulację niemal wszystkich poznanych dotąd procesów komórkowych (Friedman i wsp. 2009). Ekspresja miRNA jest zależna od rodzaju komórek oraz tkanek jak i od stadium rozwoju organizmu. Cząsteczki te działają na etapie post-transkrypcyjnym, hamując ekspresję genu poprzez oddziaływanie z sekwencją jego mRNA, najczęściej w regionie 3' UTR (ang. untranslated region). Prowadzi to do zahamowania powstawania białka i degradacji mRNA w sposób zależny od stopnia komplementarności miRNA z sekwencją mRNA.

2.1. Biogeneza miRNA

Biogeneza miRNA jest kilkietapowym procesem, w wyniku którego powstają dojrzałe cząsteczki miRNA. Geny większości kanonicznych miRNA człowieka zlokalizowane są w intronach genów kodujących jak i nie kodujących białka. Rzadziej spotykane są miRNA kodowane przez sekwencje egzonowe (Kim i wsp. 2009). Ekspresja genów miRNA prowadzi do powstania na terenie jądra komórkowego pierwotnego transkryptu miRNA (pri-miRNA) długości od kilkuset do kilku tysięcy nukleotydów (Saini i wsp. 2007). pri-miRNA powstają w wyniku transkrypcji przez polimerazę RNA II (Pol II RNA) (Lee i wsp. 2004), rzadziej przez polimerazę RNA III (Pol III RNA) (Borchert i wsp. 2006). W budowie pri-miRNA wyróżnić można otoczoną regionami jednoniciowymi strukturę typu spinki długości około trzech skrętów helisy RNA (33–35 pz), zakończoną pętlą terminalną (*Ryc. 1*). W przypadkach gdy *loci* miRNA położone są bardzo blisko siebie mogą ulegać ekspresji w postaci jednego, policistronowego transkryptu zgrupowanych miRNA tzw. klastra miRNA (Lee i wsp. 2002), zawierającego struktury kilku spinek.



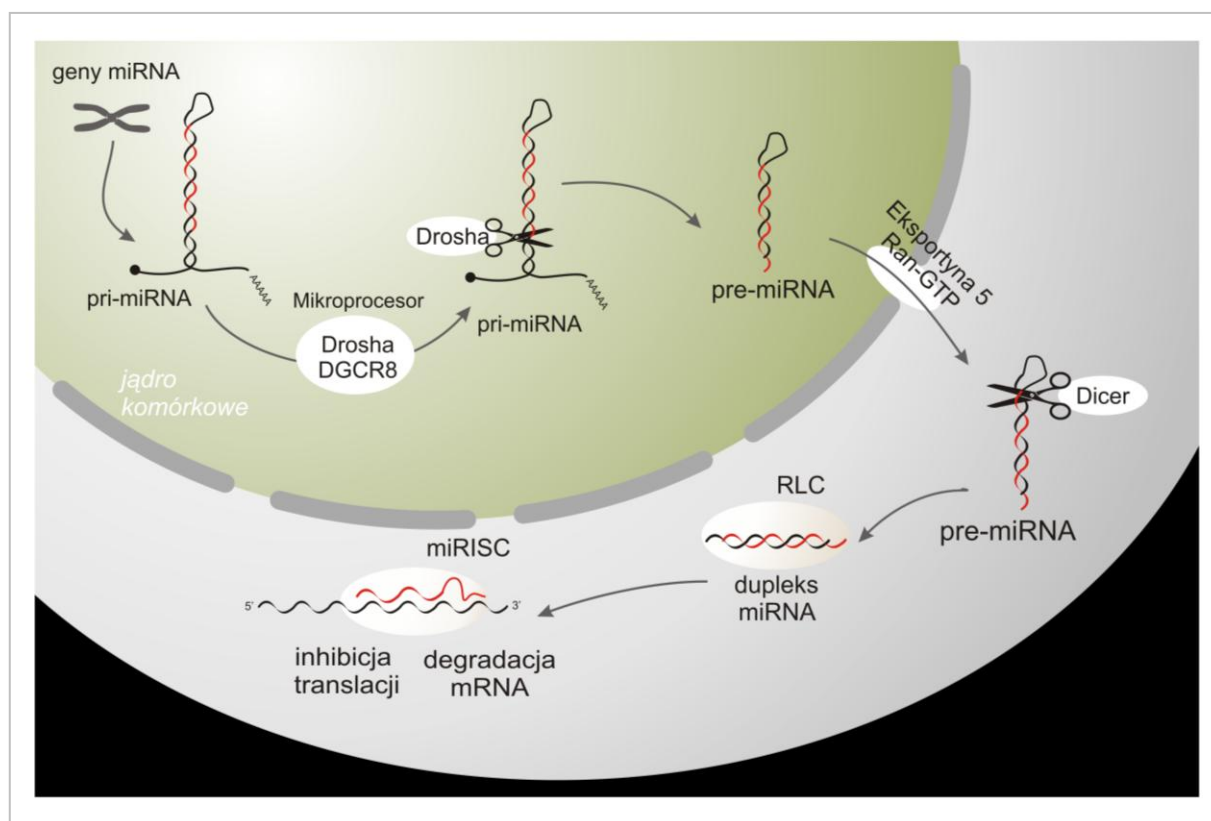
Ryc. 1. Budowa pierwotnego transkryptu miRNA (pri-miRNA).

Dupleks miRNA/miRNA przedstawiono na zaciemnionym polu. Nić wiodąca miRNA przedstawiona w kolorze różowym, a nić pasażerska (*) w kolorze szarym.*

Na terenie jądra komórkowego pri-miRNA rozpoznawany jest przez kompleks zwany Mikroprocesorem, którego trzon stanowią rybonukleaza (RNaza) Drosha oraz białko DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Protein 8). Jest to ważny etap, gdyż decyduje on o skierowaniu tylko niektórych RNA, posiadających struktury typu spinki na ścieżkę biogenezy miRNA. Etap ten kontrolowany jest rygorystycznie przez współdziałające białka

kompleksu Mikroprocesora, biorące udział w rozpoznawaniu różnych cech RNA charakterystycznych dla pri-miRNA (Feng i wsp. 2011).

Pierwszym etapem obróbki pri-miRNA jest odcięcie sekwencji otaczających 5' oraz 3' przez RNazę Drosha, a następnie uwolnienie około 60 nt prekursora (pre-miRNA) przez kompleks Mikroprocesora (Ryc. 2) (Wilson i Doudna 2013).



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie procesu biogenezy miRNA w komórkach zwierzęcych. W wyniku transkrypcji genów miRNA pod kontrolą promotorów Pol II RNA, na terenie jądra komórkowego powstaje pri-miRNA, który następnie podlega pierwszemu cięciu przez kompleks Mikroprocesora. Powstały pre-miRNA jest następnie transportowany do cytoplazmy, gdzie podlega cięciu przez RNazę Dicer, w wyniku, którego uwolniony zostaje dupleks miRNA. Nić wiodącą siRNA zaznaczono kolorem czerwonym.

pri-miRNA ulega rozpoznaniu przez dwa dimery białka DGCR8, jeden wiążący strukturę złączenia ss/sdRNA u podstawy spinki, a drugi wiążący pętlę terminalną prekursora. DGCR8 umożliwia następnie pozycjonowanie RNazy Drosha na związanym RNA, uczestnicząc w wyznaczeniu miejsca jego cięcia, oddalonego o około jeden skręt helisy od złączenia ss/dsRNA (Ryc. 1 oraz Ryc. 2). Powstały pre-miRNA ulega następnie wyeksportowaniu z jądra do cytoplazmy przez Eksportynę 5 w kompleksie z białkiem Ran-GTP. Cechą umożliwiającą efektywny eksport pre-miRNA jest rozpoznanie struktury typu

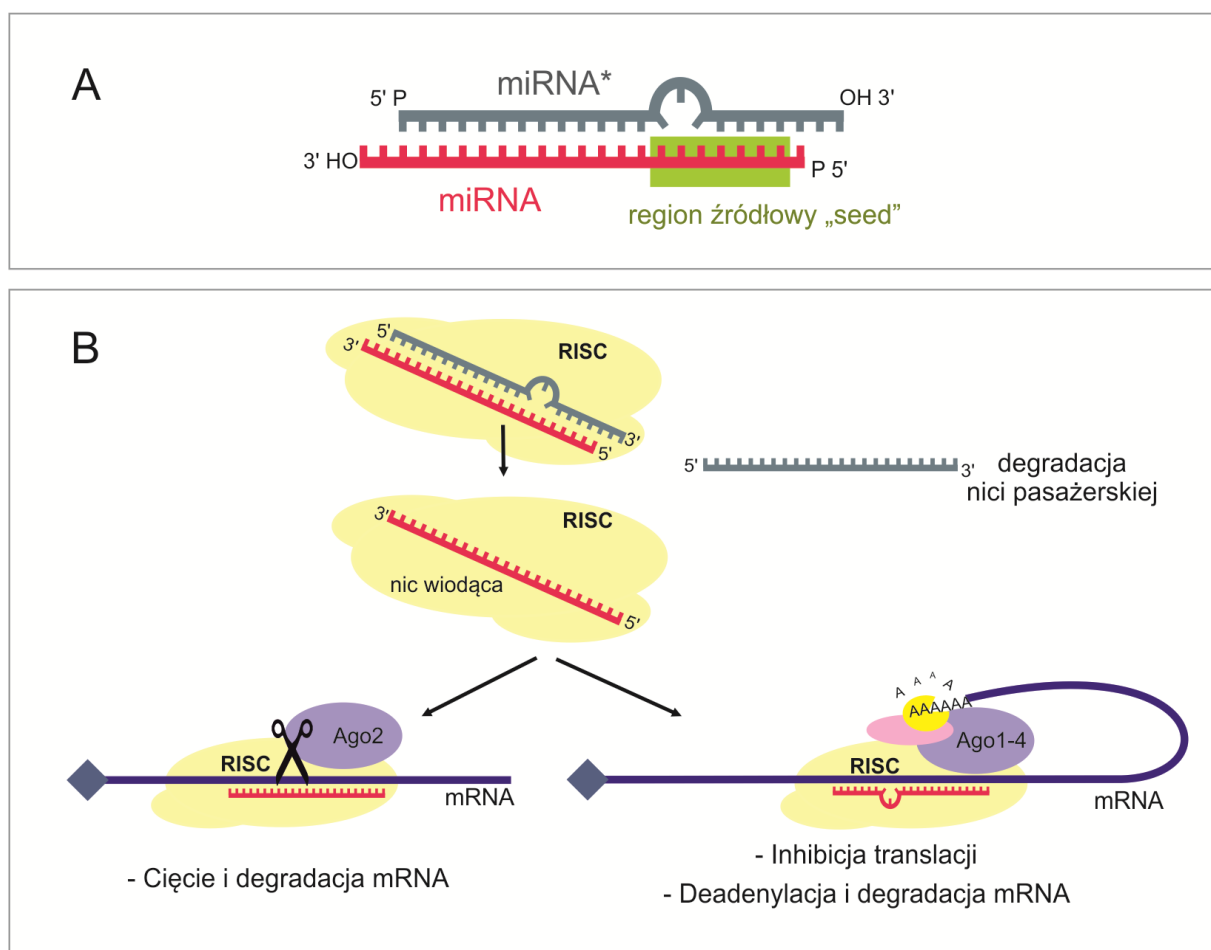
spinki, posiadającej dwunukleotydowe wystające końce 3'. Na terenie cytoplazmy pre-miRNA związany zostaje przez komponenty kompleksu RLC (ang. RISC loading complex) oraz podlega kolejnemu cięciu, tym razem przez RNazę Dicer, działająca w kompleksie z partnerami białkowymi TRBP (ang. *TAR RNA binding protein*) i AGO. Po związaniu pre-miRNA przez RNazę Dicer odmierza ona dystans około 22 nt i odcina pętlę terminalną prekursora, uwalniając tym samym dupleks miRNA/miRNA* (gdzie miRNA oznacza nić aktywną-wiodącą (ang. guide strand) a miRNA* nić pasażerską (ang. passenger strand)).

Pri-miRNA różnią się pod względem długości trzonu jak i różnorodności motywów rozluźniających strukturę trzonu tj. pętli wewnętrznych i wybrzuszeń. Na podstawie badań bioinformatycznych wykazano, że statystycznie na jeden pre-miRNA przypada 2,7 takich motywów, a częstość ich występowanie obniża się wraz z wielkością motywu (Kozłowski i wsp. 2008). Zaobserwowano podobną częstość występowania motywów symetrycznych (głównie pojedynczych niesparowań) jak i asymetrycznych (głównie jednonukleotydowych wybrzuszeń), jednak o różnej dystrybucji w pre-miRNA. Częstość występowania motywów symetrycznych maleje, podczas gdy częstość motywów asymetrycznych rośnie w kierunku od podstawy trzonu do pętli terminalnej. Wykazano również, że najczęstsze motywy asymetryczne, którymi są pojedyncze wybrzuszenia, występują częściej w ramieniu 5' niż 3' prekursorów. Obecność motywów struktury wprowadzających lokalne zaburzenia regularności helisy dsRNA jest istotna dla oddziaływania oraz rozpoznawania cząsteczek RNA przez białka biorące udział w ich komórkowej obróbce (Starega-Roslan i wsp. 2011a; Starega-Roslan i wsp. 2011b).

Przedstawiony szlak biogenezy jest kanonicznym sposobem powstawania miRNA w komórkach zwierzęcych. Jednak istnieje również grupa miRNA powstająca w niekanoniczny sposób, z pominięciem jednego z etapów docinania cząsteczek RNA. W przypadku miRNA, powstających w sposób niezależny od RNazy Drosha, takich jak mirtrony, cięcie przez tę RNazę zostaje zastąpione przez wycięcie intronu zawierającego strukturę pre-miRNA (Sibley i wsp. 2012). Istnieją również cząsteczki prekursorów miRNA, których trzon jest zbyt krótki aby był efektywnie cięty przez RNazę Dicer (np. miR-451) (Cheloufi i wsp. 2010). Prekursory takie w celu uwolnienia cząsteczki miRNA podlegają w cytoplazmie docinaniu przez białko AGO2 (Cifuentes i wsp. 2010).

2.2. Mechanizm działania ludzkich miRNA

Powstały w wyniku cięcia prekursora przez RNazy Drosha oraz Dicer około 22 nt dupleks miRNA/miRNA* posiada najczęściej dwunukleotydowe wystające końce 3' oraz grupę fosforanową na końcach 5' obydwu nici (Ryc. 3A). miRNA funkcjonują w komórkach w kompleksie białkowym miRISC (ang. miRNA-induced silencing complex), w obrębie którego dupleks ulega rozpleceniu (Ryc. 3B). W skład kompleksu RISC wchodzi białko o aktywności helikaz, nukleaz oraz białko wiążące się z dsRNA.



Ryc. 3. Budowa miRNA i mechanizm ich działania w komórkach zwierzęcych.

A-Budowa dupleksu miRNA/miRNA*, nić aktywną (wiodącą) miRNA zaznaczono kolorem różowym, nić pasażerską - kolorem szarym. Zielony prostokąt wskazuje region źródłowy miRNA, który stanowią nukleotydy 2-8 nici wiodącej. **B-** Mechanizmy działania miRNA w zależności od stopnia komplementarności z sekwencją docelową oraz rodzaju zaangażowanego białka AGO.

Ponieważ w aktywnym kompleksie RISC może pozostać tylko jedna nić pochodząca z miRNA, konieczna jest ich dyskryminacja na tym etapie. Wybór nici wiodącej, która będzie definiowała sekwencję wyciszanych transkryptów jest dokonywany na podstawie stabilności końców dupleksu i jako nić wiodąca wybierana jest nić o niższej stabilności fragmentu struktury tworzonej przez koniec 5' w duplesie. Na tym etapie jedno z białek z grupy Argonaute (AGO) wiąże nić wiodącą miRNA, natomiast nić pasażerska zostaje usunięta z kompleksu i podlega degradacji. Najważniejszym czynnikiem białkowym kompleksu RISC jest jedno z czterech zidentyfikowanych w ludzkich komórkach białek AGO (AGO1-4) uczestniczących w inhibicji translacji związanego przez kompleks RISC mRNA, doprowadzając najczęściej do jego deadenylacji a następnie degradacji (Ha i Kim 2014). Spośród ludzkich białek AGO tylko AGO2 ma zdolność katalitycznego przecinania transkryptów w pełni komplementarnych do miRNA.

Kompleks RISC załadowany nicią wiodącą miRNA reguluje ekspresję genów, posiadających sekwencję mRNA komplementarną do miRNA. Najczęściej miejsca wiązania miRNA występują w regionach UTR genów (głównie 3' UTR), jednak najnowsze doniesienia wskazują również na istotną rolę miejsc wiązania miRNA w obrębie ORF (Stroynowska-Czerwinska i wsp. 2014). Do efektywnej regulacji poziomu ekspresji genów wymagane jest zazwyczaj kilka miejsc wiązania miRNA w obrębie danego transkryptu. Pełna komplementarność miRNA-mRNA występuje bardzo rzadko w przypadku zwierzęcych miRNA, ponieważ dla regulacji kluczowe jest parowanie sekwencji regionu źródłowego miRNA (ang. seed region) tworzonego przez nukleotydy w pozycjach 2-8, licząc od końca 5' nici wiodącej (Ryc. 3A). Po zaprogramowaniu RISC przez nić wiodącą dochodzi do „wyszukiwania” komplementarnych sekwencji w mRNA oraz do związania kompleksu, co prowadzi do inhibicji translacji mRNA zwykle w wyniku jego deadenylacji i degradacji. W przypadku wystąpienia pełnego sparowania miRNA z sekwencją dochodzi do przecięcia mRNA przez białko AGO2 pomiędzy 10 i 11 nukleotydem, licząc od końca 5' miRNA, co jest mechanizmem działania charakterystycznym dla typowych cząsteczek siRNA (Elbashir i wsp. 2001b) oraz roślinnych miRNA (Jones-Rhoades i wsp. 2006). Inhibicja translacji przez miRISC może zachodzić zarówno na etapie inicjacji translacji jak i na dalszych jej etapach, a oddysocjowanie rybosomów może zainicjować skierowanie transkryptu do ciałek P (ang. P-bodies), gdzie będzie on podlegał degradacji (Liu i wsp. 2005). Do obniżenia poziomu transkryptu dochodzi głównie w wyniku indukcji procesu

deadenylacji mRNA przez związany kompleks RISC (Guo i wsp. 2010), mogący rekrutować białka GW182, PABC1 oraz kompleks CAF1-CCR-NOT1. Związanie tych dodatkowych białek umożliwia skrócenie ogona poli(A) transkryptu, usunięcie struktury kap (ang. cap) z jego końca 5' i w konsekwencji jego egzonukleolityczną degradację (Fabian i wsp. 2010). Kompleks miRISC oddysocjowuje następnie od mRNA i w sposób cykliczny „poszukuje” kolejnych transkryptów, zawierających sekwencje docelowe.

2.3. Różnorodność cząsteczek miRNA

Dojrzałe miRNA występują w komórkach w postaci nieznacznie różniących się długością (lub posiadających przesuniętą sekwencję) izoform zwanych izomirami (Neilsen i wsp. 2012; Ameres i Zamore 2013) (Ryc. 4). Głównym źródłem obserwowanej różnorodności cząsteczek miRNA jest nieprecyzyjne cięcie pri-miRNA oraz pre-miRNA przez RNazy szlaku biogenezy, które mogą prowadzić cięcie prekursorów w kilku sąsiadujących pozycjach (Neilsen i wsp. 2012; Seong i wsp. 2014). Występowanie izomirów 5' (wariantów miRNA różniących się sekwencją końca 5') ma większe konsekwencje funkcjonalne, gdyż wiąże się z przesunięciem regionu źródłowego cząsteczek i ze zmianą sekwencji docelowej. Izomiry 3' (warianty różniące się sekwencją końca 3') zazwyczaj oddziałują z tą samą sekwencją docelową, mogą natomiast różnić się intensywnością efektu wyciszenia, czasem półtrwania w komórkach oraz zmianą preferencji wyboru nici wiodącej przez białko AGO (ang. miRNA arm switching) (Griffiths-Jones i wsp. 2011; Wilson i wsp. 2015).



Ryc. 4. Różnorodność wariantów nici wiodącej miRNA powstających z jednego pre-miRNA

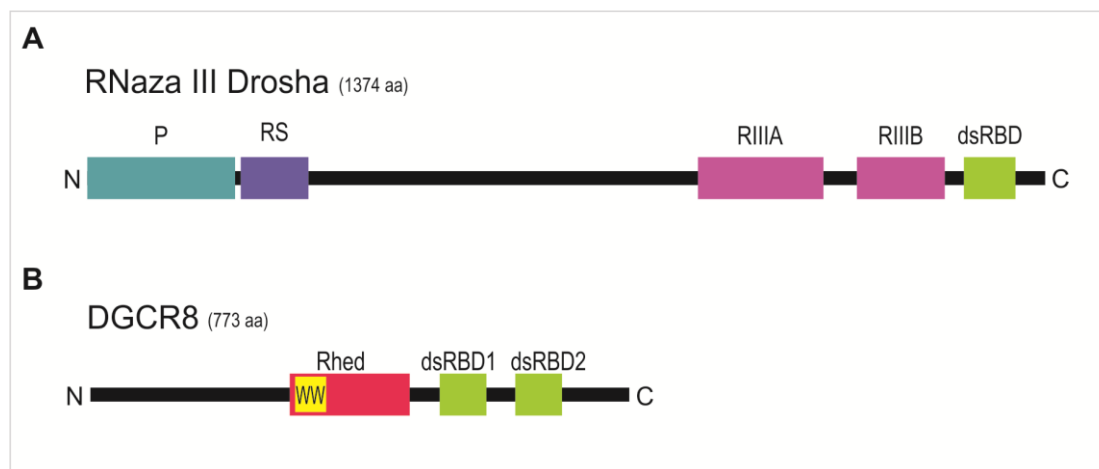
Powstawanie różnych izomirów zależy od rodzaju komórek, stadium rozwojowego, a także od występujących czynników stresowych. Ich funkcjonalność została potwierdzona w systemie lucyferazowym oraz w eksperymentach z immunoprecypitacją kompleksów białka AGO (Tan i wsp. 2014). Wykazano, że izomiry 5' mogą regulować ekspresję częściowo różnej grupy transkryptów niż regulowane przez główny wariant miRNA oraz że inne warianty dominują w różnych typach komórek. Na przykładzie miR-9 pokazano, że zmiana końca 5' cząsteczki miRNA może znosić zdolność do wyciszania jego kanonicznej sekwencji docelowej jednocześnie poszerzając pulę genów regulowanych przez miRNA.

Zwiększenie puli wariantów miRNA może być pogłębione przez modyfikacje końców uwalnianych cząsteczek. Zarówno pre-miRNA jak i dupleksy miRNA/miRNA* mogą podlegać w komórce modyfikacjom, takim jak skracanie końca 3' (ang. trimming) lub dodawanie do niego nukleotydów przez terminalne transferazy (ang. tailing), czy deaminacja adenozyne do inozyny (Newman i wsp. 2011; Wyman i wsp. 2011). Działanie terminalnych transferaz (ang. Terminal Uridyl Transferases) związane jest z dodaniem nukleotydów niematrixowych (ang. non-templated), najczęściej A lub U do końca 3' cząsteczek pre-miRNA lub miRNA. Zjawisko to dotyczy jednak około 16% miRNA (Zhou i wsp. 2012). Do terminalnych transferaz zaangażowanych w regulację puli powstających miRNA należą m.in. TUT4, TUT7 oraz TUT2 (Hagan i wsp. 2009; Heo i wsp. 2009). Jak pokazano na przykładzie cząsteczki pre-let-7 modyfikacje wprowadzane przez białka TUT4 oraz TUT7, w zależności od obecności białka LIN28, mogą hamować lub promować obróbkę prekursora na etapie cięcia przez RNazę Dicer. Natomiast białko TUT2 poprzez dołączenie nukleotydu A do końca 3' miRNA może zwiększać jego stabilność w komórkach. Zwiększenie stabilności miRNA przez modyfikacje końca 3' pokazano na przykładzie miR-122, jednak nie w każdym przypadku wydłużenie miRNA o nukleotyd A wywiera taki efekt (Burroughs i wsp. 2010). Skracanie końca 3' przez 3'-5' egzozukleazę Nibbler wykazano dla grupy cząsteczek miRNA u *D.melanogaster* oraz przez jej ortolog MUT-7 u *C.elegans*. Działanie tego typu mechanizmów w komórkach ludzkich wymaga jeszcze potwierdzenia (Han i wsp. 2011) ale istnieją pierwsze doniesienia o ich funkcjonowaniu (Ameres i wsp. 2010; Boele i wsp. 2014). Najrzadszym rodzajem modyfikacji miRNA, wykrywanym prawie na granicy błędu sekwencjonowania, jest deaminacja adenozyne do inozyny przez enzym ADAR (ang. adenosine deaminase acting on RNA) (Kawahara i wsp. 2007; Ebhardt i wsp. 2009). Białko to ulega podwyższonej ekspresji w tkance nerwowej i z tego względu edytowane przez nie cząsteczki miRNA wykrywane są najczęściej w tej właśnie tkance.

2.4. Budowa i działanie białek wchodzących w skład kompleksu Mikroprocesora

Kompleks Mikroprocesora wykrywany jest w ludzkich komórkach w dwóch różnych formach. Mały kompleks tworzony przez białko Drosha oraz DGCR8 stanowi minimalną jednostkę aktywną katalitycznie *in vitro*, zdolną do produkcji pre-miRNA. Duży kompleks Mikroprocesora zawiera dodatkowe komponenty z grupy białek wiążących RNA, takie jak helikazy RNA (p68 oraz p72), hnRNPs oraz inne kofaktory regulujące jego aktywność (Krol i wsp. 2010; Macias i wsp. 2013). Istnieją doniesienia, że RNaza Drosha oraz DGCR8 kolokalizują w komórkach z transkryptami przed usunięciem z nich intronów (Kataoka i wsp. 2009). Zaobserwowano również, że po przeprowadzeniu cięcia RNaza Drosha oddysocjuje od kompleksu, podczas gdy białko DGCR8 pozostaje związane z powstałym pre-miRNA przed jego wyeksportowaniem do cytoplazmy (Bellemer i wsp. 2012).

RNaza Drosha wielkości około 160 kDa jest białkiem należącym do drugiej klasy RNaz III. Na końcu aminowym białka zlokalizowane są domeny nie wymagane do przecinania substratów pri-miRNA (Han i wsp. 2009), a odpowiedzialne za jądrową lokalizację RNazy (Ryc. 5A) (Tang i wsp. 2010). Na końcu karboksylowym białko to posiada dwie domeny RNazowe (RIIIA i RIIIB) oraz domenę wiążącą RNA (dsRBD) (Lee i wsp. 2003; Gregory i wsp. 2004). Domeny RIIIA oraz RIIIB dimeryzują tworząc pomiędzy sobą miejsce docinania substratów pri-miRNA. Domena RIIIB przecina pri-miRNA w ramieniu 5', natomiast domena RIIIA tnie ramię 3' w odległości zapewniającej dwunukleotydowe wystające końce 3' uwalnianemu pre-miRNA. Domena wiążąca RNA (dsRBD) uczestniczy we wiązaniu substratu przez RNazę Drosha, jednak nie jest ona wystarczająca do efektywnego zajścia tego procesu. Wiązanie pri-miRNA przez RNazę Drosha jest wspomagane przez wcześniejsze wiązanie substratu przez białko DGCR8, oddziałujące z centralnym regionem białka Drosha (Han i wsp. 2009; Ameres i Zamore 2013). Wspomaganie działania RNazy Drosha przez DGCR8 (Yeom i wsp. 2006) jest przykładem oddziaływania RNazy III z kofaktorem białkowym, w celu zwiększenia siły wiązania substratu RNA oraz poprawy precyzji jego docinania.



Ryc. 5. Schematycznie przedstawiona budowa domenowa białka Drosha oraz DGCR8.

DGCR8 wielkości około 90 kDa jest białkiem, posiadającym na końcu karboksylowym dwie domeny wiążące RNA (dsRBD1 oraz dsRBD2), podczas gdy jego koniec aminowy zawiera sygnał lokalizacji jądrowej (Ha i Kim 2014) (Ryc. 5B). Centralna część DGCR8 zawiera domenę wiążącą hem (Rhed), która uczestniczy w dimeryzacji białka oraz rozpoznawaniu i wiązaniu substratów pri-miRNA (Quick-Cleveland i wsp. 2014). Białko DGCR8 odpowiedzialne jest za prawidłowe „ustawienie” kompleksu Mikroprocesora na cząsteczce pri-miRNA i wyznaczenie miejsca cięcia przez RNazę Drosha (Han i wsp. 2006).

Aktywność kompleksu Mikroprocesora podlega regulacji w komórce na różnych poziomach (Krol i wsp. 2010; Ha i Kim 2014). Jednym z jej przykładów jest wzajemna regulacja DGCR8 oraz RNazy Drosha. Białko DGCR8 stabilizuje RNazę Drosha poprzez oddziaływanie typu białko-białko z jej regionem centralnym (Yeom i wsp. 2006), podczas gdy Drosha kontroluje poziom białka DGCR8 poprzez cięcie jego transkryptu w obrębie kodowanej przez egzon drugi struktury typu spinki i kierowanie mRNA na ścieżkę degradacji (Han i wsp. 2009; Kadener i wsp. 2009).

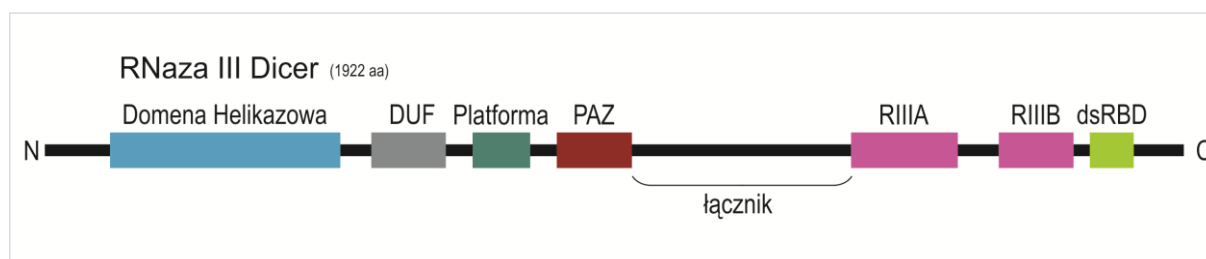
Kompleks Mikroprocesora rozpoznaje RNA posiadające struktury typu spinki i przecina je najczęściej w odległości 13 nt w ramieniu 5' oraz 11 nt w ramieniu 3' od złączenia ss/dsRNA. Wykazano również, że sekwencja nukleotydowa w określonych pozycjach pri-miRNA ma duże znaczenie dla efektywnego rozpoznania, a następnie cięcia pri-miRNA przez kompleks Mikroprocesora (Auyeung i wsp. 2013). Wykryto istnienie trzech motywów sekwencji charakterystycznych dla pri-miRNA, a zlokalizowanych poza sekwencją dojrzałego duplesu miRNA. Motyw UG zlokalizowany 13 nukleotydów poniżej miejsca

cięcia RNazy Drosha w ramieniu 5' (w kierunku sekwencji otaczających), motyw CNNC (gdzie N oznacza dowolny nukleotydy) zlokalizowany 17 nt poniżej miejsca cięcia przez RNazę Drosha w ramieniu 3' (w kierunku sekwencji otaczających) oraz motyw UGUG zlokalizowany w pętli terminalnej (Auyeung i wsp. 2013). Przynajmniej jeden z tych motywów wykrywany jest w ~79% pri-miRNA, co może świadczyć o istnieniu również dodatkowych czynników wpływających na rozpoznawanie substratów przez kompleks Mikroprocesora.

Elementem ważnym dla efektywnej obróbki prekursorów pri-miRNA są ich uwarunkowania strukturalne. Wykazano, że rozluźnienie struktury w obrębie lub poniżej miejsca cięcia przez RNazę Drosha jest elementem kluczowym dla efektywności działania tego enzymu (Beisel i wsp. 2010; Quarles i wsp. 2013).

2.5. Budowa i działanie RNazy Dicer

Białko Dicer, tak jak Drosha, należy do grupy RNaz III i pełni niezwykle ważną funkcję w powstawaniu małych RNA w komórkach wchodząc w skład kompleksu RLC. Ta RNaza wielkości około 219 kDa wraz z białkami partnerowymi rozpoznaje produkty pre-miRNA powstałe w wyniku cięcia pri-miRNA przez RNazę Drosha oraz dwuniciowe RNA będące prekursorami endogennych siRNA. Substraty RNA po związaniu przez RNazę Dicer zostają docięte do dupleksów długości zazwyczaj od 21 do 25 pz. (Bernstein i wsp. 2001), a następnie związane przez kolejne białko kompleksu RLC - AGO. Białko Dicer posiada zlokalizowaną na końcu aminowym domenę helikazową, umożliwiającą rozpoznawanie substratu pre-miRNA przez oddziaływanie z jego regionem przypętlowym oraz oddziaływanie z niektórymi białkami partnerowymi (Ryc. 6).



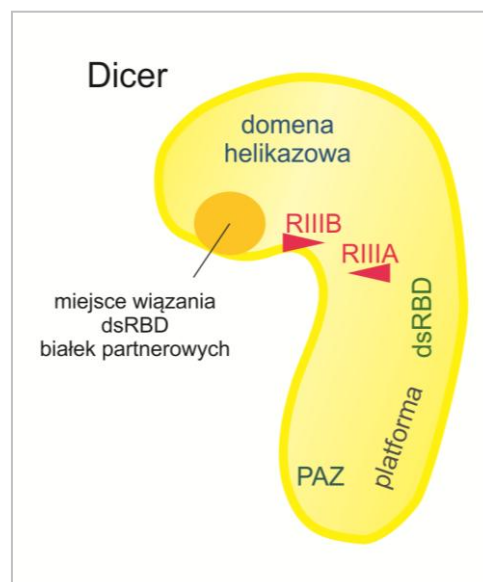
Ryc. 6. Schematycznie przedstawiona budowa domenowa białka Dicer.

Domena wiążąca dsRNA (dsRBD) znajduje się na końcu karboksylowym białka i uczestniczy w wiązaniu substratów przez RNazę Dicer (Wostenberg i wsp. 2012). Wiążąca końce pre-miRNA domena PAZ oddzielona jest od miejsca katalicznego enzymu „łącznikiem” (ang. connector helix) i to właśnie

region oddzielający domenę PAZ od miejsca katalicznego wydaje się być odpowiedzialny za „odmierzenie” odpowiedniego dystansu podczas docinania substratu przez RNazę Dicer (Macrae i wsp. 2006). W domenie PAZ wyróżniono dwie kieszenie umożliwiające związanie zarówno końca 5’ jak i wystającego końca 3’ pre-miRNA (Park i wsp. 2011; Tian i wsp. 2014). RNaza Dicer posiada również dwie domeny tnące (RNazowe) RIIIA oraz RIIIB zlokalizowane w pobliżu końca karboksylowego (Zhang i wsp. 2004). Podobnie jak w przypadku RNazy Drosha RIIIA oraz RIIIB RNazy Dicer dimeryzują tworząc miejsce kataliczne,

umożliwiające docinanie substratu z zachowaniem dwunukleotydowych wystających końców 3’ w uwalnianych cząsteczkach RNA. Badania z zastosowaniem mikroskopii elektronowej umożliwiły zaproponowanie wzajemnej orientacji poszczególnych domen RNazy Dicer w obserwowanej strukturze przestrzennej przyjmującej kształt litery L (Lau i wsp. 2009; Lau i wsp. 2012; Taylor i wsp. 2013). Domena helikazowa oraz domena PAZ ułożone zostały w przeciwległych końcach zwiniętego białka, a pomiędzy nimi znajduje się miejsce kataliczne tworzone przez domeny RNazowe. Zaproponowany układ umożliwia pełnienie przedstawionych wcześniej funkcji przez poszczególne domeny: wiązanie końca pre-miRNA przez domenę PAZ oraz rozpoznawanie pętli terminalnej przez dystalnie ułożoną domenę helikazową.

Cięcie pre-miRNA przez RNazę Dicer umożliwia uwalnianie dupleksów miRNA określonej długości około 21-22 nt, jednak jak dotąd opisano kilka możliwości wyznaczania miejsca cięcia substratu przez tę RNazę. Przedstawiony został sposób odmierzenia stałego dystansu do miejsca cięcia mierzonego od końca 3’ pre-miRNA (ang. 3’ counting rule) (Macrae i wsp. 2006) oraz od jego końca 5’ (ang. 5’ counting rule) (Park i wsp. 2011). Opisano również sposób precyzyjnego wyznaczania miejsca cięcia od pętli terminalnej lub



Ryc. 7. Orientacja domen w białku Dicer. Na podstawie (Lau i wsp. 2012)

zlokalizowanej w jej pobliżu pętli wewnętrznej (ang. loop counting rule) (Gu i wsp. 2012). Wówczas domena RIII A Dicer tnie w ramieniu 3' prekursora w pozycji oddalonej o dwa nukleotydy od pętli, a cięcie przez domenę RIIIB w ramieniu 5' występuje w pozycji umożliwiającej wytworzenie 2 nt wystającego końca 3' uwalnianemu dupleksowi miRNA.

Pomimo opisanego sposobu wyznaczania miejsca cięcia substratów przez RNazę Dicer obserwuje się powstawanie miRNA różnej długości pochodzących z różnych prekursorów (Kozomara i Griffiths-Jones 2014). Analizy przeprowadzone na ludzkich pre-miRNA wykazały, że obecność asymetrycznych wybruszeń w prekursorach miRNA bezpośrednio wpływa na długość powstających cząsteczek miRNA (Starega-Roslan i wsp. 2011b). Uzyskane przez autorów wyniki pokazują, iż podczas „odmierzenia” odpowiedniego dystansu przez RNazę Dicer uwzględniane są przede wszystkim pary zasad (również niekanoniczne), podczas gdy asymetryczne wybruszenia (nie kompensowane wybruszeniami w drugim ramieniu prekursora) nie są w ten dystans „wliczane”. W wyniku tego dochodzi do uwalniania dłuższych cząsteczek miRNA (Starega-Roslan i wsp. 2011b).

Najważniejszymi kofaktorami białkowymi RNazy Dicer w obrębie dojrzałego kompleksu RISC (~500 kDa) są wspomniane wcześniej białka z rodziny AGO oraz białko TRBP (ang. TAR RNA-binding protein) i PACT (ang. a protein activator of PKR) (Lee i wsp. 2006; Fukunaga i wsp. 2012; Lee i wsp. 2013). Funkcja białek PACT oraz TRBP w ścieżce RNAi nie jest jeszcze do końca poznana, ale wiadomo, że modulują one efektywność cięcia substratów przez RNazę Dicer, wpływając na siłę ich wiązania (Wilson i Doudna 2013; Acevedo i wsp. 2015). Najnowsze wyniki sugerują, że białko TRBP uczestniczy w generowaniu izomirów oraz w zjawisku zmiany preferencji wyboru nici wiodącej przez białko AGO (Wilson i wsp. 2015). Białka TRBP oraz PACT posiadają trzy domeny dsRBD, z których domena zlokalizowana na końcu karboksylowym białka odpowiedzialna jest za oddziaływanie z RNazą Dicer. Białka te podlegają dimeryzacji tworząc homodimery lub heterodimery. Wykazano również, że konkurują one ze sobą o to samo miejsce wiązania w obrębie RNazy Dicer (Wilson i wsp. 2015). Białka te stanowią również bezpośrednie połączenie szlaku biogenezy miRNA ze ścieżką sygnalizacyjną komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że kinaza białkowa aktywowana RNA (PKR) ulega aktywacji przez białko PACT, podczas gdy TRBP wywiera na nią efekt hamujący (Kok i wsp. 2007). W świetle najnowszych wyników badań przypuszcza się, że kompleks białkowy RNazy Dicer oraz kompleks RLC tworzony jest przez te same białka, które wykazują swoją aktywność na innych etapach szlaku RNAi.

3. Technologia interferencji RNA

Naturalna zdolność regulacji ekspresji genów przez endogenne miRNA znajduje swoje odzwierciedlenie w technologii interferencji RNA (RNAi) powszechnie wykorzystywanej w biologii molekularnej do wyciszania ekspresji genów poprzez selektywną degradację ich transkryptów. Występujący w komórkach mechanizm RNAi uczestniczy w nieswoistej odpowiedzi obronnej komórki, pełniąc rolę ochrony przed namnażającym się materiałem genetycznym pochodzenia wirusowego oraz przed nagromadzeniem ruchomych elementów genomu (transpozonów) (Buchon i Vaury 2006).

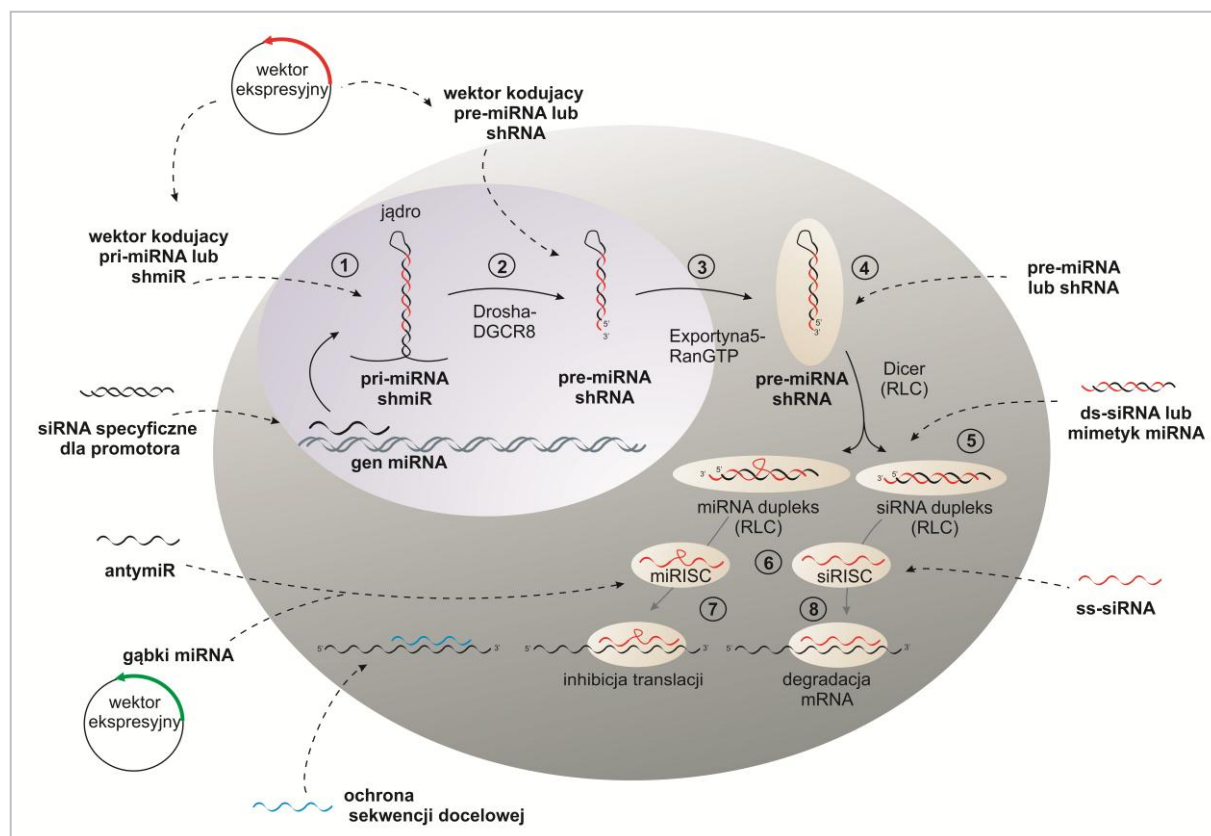
Zjawisko to po raz pierwszy opisane zostało w 1998 roku przez A. Fire oraz C. Mello, którzy za to odkrycie zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 2006 roku. W badaniach na modelu nicienia *Caenorhabditis elegans* zaobserwowali oni, że wprowadzenie różnych dwuniciowych cząsteczek RNA długości kilkuset par skutkuje wyciszeniem ekspresji kilku genów zarówno u osobników poddanych iniekcji jak i u ich potomstwa (Fire i wsp. 1998). Niedługo po tym odkryciu potwierdzono występowanie podobnego zjawiska u innych zwierząt oraz wykazano, że efektorami procesu RNAi są krótkie 21 do 22 nt dsRNA zwane krótkimi interferującymi RNA –siRNA (ang. short interfering RNAs) (Elbashir i wsp. 2001a), powstające w wyniku cięcia długich dsRNA przez RNazę Dicer (Bernstein i wsp. 2001). Kolejnym ważnym krokiem było wykazanie, że kluczowym elementem białkowym uczestniczącym w procesie RNAi jest białko AGO2 (Hammond i wsp. 2001). Indukcja zjawiska RNAi związana jest z dostarczeniem do komórek dwuniciowych cząsteczek siRNA długości około 21 nt posiadających jedną z nici komplementarną do sekwencji genu docelowego. Po związaniu siRNA przez kompleks RISC dochodzi do rozplecenia dupleksu siRNA oraz wyboru aktywnej nici zgodnie z zasadami wyboru nici wiodącej w dupleksach miRNA/miRNA*. Po załadowaniu kompleksu RISC wybraną nicią siRNA (zwaną również nicią antysensową) następuje związanie w pełni komplementarnych do niej transkryptów. Następnie związane przez kompleks mRNA przecinane są przez białko AGO2, co jest etapem inicjującym ich degradację w komórce. Cechą odróżniającą działanie egzogennych siRNA od komórkowych miRNA jest stopień komplementarności z sekwencją docelową (całkowity w przypadku siRNA), oddziaływanie z transkrytem w regionie otwartej ramki odczytu (siRNA) lub w regionach UTR (miRNA) a w konsekwencji sam mechanizm działania odpowiednio przez cięcie i degradację transkryptu lub deadenylację i następczą degradację transkryptu oraz inhibicję translacji.

Pierwsze narzędzia technologii RNAi zostały opracowane zanim uzyskano pełniejszy wgląd w mechanizmy rządzące biogenezą oraz działaniem endogennych miRNA. Jednak pomimo ciągłego ich ulepszania wraz z postępem wiedzy dotyczącej biogenezy miRNA, wciąż istnieje wiele problemów, których rozwiązanie mogłoby przyspieszyć dalszy rozwój tej technologii.

Obecnie technologia RNAi stosowania jest w wielu dziedzinach biologii molekularnej m.in. w poznawaniu funkcji genów, roli białek oraz funkcjonowania ścieżek sygnałowych, poprzez selektywne wyciszanie ekspresji poszczególnych ich komponentów. Wykorzystanie RNAi umożliwia poznanie sposobów regulacji ekspresji genów w komórkach oraz wyłączanie ekspresji tych wadliwie działających. Powyższe fakty sprawiają, że technologia RNAi może stanowić w przyszłości podstawę podejść terapeutycznych w wielu chorobach człowieka, o podłożu zarówno genetycznym jak i wirusowym. Jak dotąd istnieje grupa terapeutycznych cząsteczek technologii RNAi, która testowana jest w fazie badań klinicznych, obejmujących opracowanie podejść terapeutycznych m.in. w AIDS, WZW typu C, hipercholesterolemii, oraz wielu typach nowotworów (Kanasty i wsp. 2013). Jednak pomimo wysokiej efektywności wyciszania genów docelowych przez reagenty RNAi do opracowania na ich podstawie efektywnych terapeutyków konieczne jest przeprowadzenie wielu dalszych badań optymalizacyjnych. Elementem kluczowym w takich podejściach jest: zapewnienie efektywnego dostarczania cząsteczek siRNA do komórek, uzyskanie odpowiedniej dawki terapeutycznej w konkretnej tkance, utrzymanie odpowiednio długiego czasu działania cząsteczek oraz ograniczenie efektów ubocznych związanych z obecnością reagentów RNAi jak i stosowanych do ich wprowadzania nośników.

3.1. Wachlarz narzędzi technologii interferencji RNA

Dynamicznie rozwijająca się technologia RNAi obejmuje zastosowanie wielu różnych typów cząsteczek, włączających się do endogennej ścieżki biogenezy miRNA na jej różnych etapach (Ryc. 8).



Ryc. 8. Różne etapy szlaku biogenezy miRNA, na których włączają się do niego reagenty technologii RNAi oraz miRNA (Olejniczak i wsp. 2010).

1- transkrypcja genów miRNA z udziałem Pol II skutkująca powstaniem pri-miRNA oraz ekspresja transkryptów shmiR, 2- jądrowe docinanie pri-miRNA lub shmiR przez kompleks Mikroprocesora do pre-miRNA lub shRNA, 3- eksport pre-miRNA i shRNA do cytoplazmy, 4- włączenie pre-miRNA lub shRNA do RLC, 5- wycięcie dupletu miRNA lub siRNA z pre-miRNA lub shRNA, 6- uwolnienie nici sensowej doprowadzające do powstania aktywnego kompleksu miRISC/siRISC, odnalezienie sekwencji docelowej; częściowa lub całkowita komplementarność sekwencji doprowadza odpowiednio do 7-inhibicji translacji mRNA, 8- cięcia i degradacji mRNA. Reagenty technologii RNAi (shmiR, shRNA, ds-siRNA i ss-siRNA oraz siRNA specyficzne dla promotora) oraz reagenty technologii miRNA (pri-miRNA, pre-miRNA, miRNA mimetyki, antymiRy, gąbki miRNA oraz „osłaniacze” sekwencji docelowej) dostarczane są jako syntetyczne cząsteczki na drodze transfekcji lub uwalniane z wprowadzanych do komórek wektorów ekspresyjnych.

Do wyciszania ekspresji genów stosowane są zarówno najprostsze cząsteczki siRNA-odpowiadające budową endogennym miRNA, shRNA - posiadające strukturę typu spinki a odpowiadające komórkowym pre-miRNA oraz cząsteczki shmiR - będące odpowiednikiem pri-miRNA. Cząsteczki te różnią się między sobą budową, czasem działania, poziomem wewnątrzkomórkowej obróbki oraz sposobem ich dostarczenia do komórek w postaci syntetycznych RNA lub wektorów genetycznych (plazmidowych oraz wirusowych) (*Tabela 1*).

Podstawowymi reagentami wykorzystywanymi bardzo powszechnie w technologii RNAi są syntetyzowane chemicznie cząsteczki siRNA (*Tabela 1*). Są to duplekisy RNA długości około 21 nt posiadające grupę fosforanową na końcu 5' oraz dwunukleotydowe wystające końce 3' z grupą 2'OH. Zasady projektowania tych cząsteczek obejmują zalecenia co do zawartości par G:C pomiędzy 30-50%, niskiej temperatury topnienia pojedynczej nici siRNA (poniżej 20°C), niższej energii wiązania końca 5' nici wiodącej niż pasażerskiej, niższej energii wiązania środkowych pozycji dupleksu siRNA (preferowane pary A:U) oraz preferencyjnego występowania nukleotydów UU lub TT na niesparowanych końcach 3' cząsteczki (Reynolds i wsp. 2004; Pei i Tuschl 2006; Bramsen i wsp. 2009). siRNA są najczęściej dostarczane do komórek w postaci syntetycznych dupleksów RNA z wykorzystaniem nośników transfekcyjnych (m.in. lipidów kationowych, poliamin lub odczynników polimerowych). Poziom syntetycznych siRNA po dostarczeniu do komórek drastycznie obniża się w czasie w wyniku ich stosunkowo szybkiej degradacji oraz podziałów komórkowych (Bartlett i Davis 2006). Wykazano, że aktywność siRNA w komórce utrzymuje się do tygodnia po podaniu (Bartlett i Davis 2006), natomiast w pierwszych 24 godzinach jego poziom spada o 50-80%, podczas gdy po siedmiu dniach stanowi zaledwie ~5% ilości wprowadzonej do komórek (Fischer i wsp. 2013). Dlatego utrzymanie stałego efektu wyciszenia wymaga wielokrotnego podawania tych cząsteczek poprzez powtarzające się transfekcje. siRNA stosowane są również w formie chemicznie modyfikowanych cząsteczek, bardziej trwałych w środowisku komórkowym, wykazujących dłuższy czas działania. Niektóre modyfikacje chemiczne mogą dodatkowo ograniczać występowanie efektów ubocznych towarzyszących reagentom technologii RNAi (Jackson i wsp. 2006; Behlke 2008). Do najczęściej wprowadzanych do siRNA modyfikacji chemicznych należą m.in. 2'OMe, 2'F, 2'deoxy oraz PS (Bramsen i wsp. 2009).




Typowe cząsteczki shRNA wykorzystywane w technologii RNAi budową przypominają pre-miRNA i podlegają w komórkach obróbce przez RNazę Dicer (*Ryc. 8* oraz

Tabela 1). Te około 50-60 nt cząsteczki RNA przyjmujące strukturę spinki, zbudowane są z trzonu o 19 do 29 pz zakończonego z jednej strony pętlą terminalną, natomiast z drugiej wystającym końcem 3'. Nić wiodąca siRNA umieszczana jest w reagentach shRNA w ramieniu 5' lub 3' struktury spinki. shRNA mogą być wprowadzane do komórek jako syntetyczne cząsteczki RNA (podobnie jak siRNA), jednak częściej stosuje się ich wewnątrzkomórkową ekspresję z wektorów plazmidowych lub wirusowych pod kontrolą promotorów Pol III RNA (m.in. H1, U6 czy 7SK) (Amarzguioui i wsp. 2005). Zasady projektowania cząsteczek shRNA nieco różnią się od reguł obowiązujących dla siRNA (Li i wsp. 2007). Preferowane jest aby pierwszym nukleotydem transkryptu shRNA była puryna (najczęściej G), natomiast na końcu kasety ekspresyjnej wprowadzana jest sekwencja terminatorowa dla Pol III RNA, którą stanowi ciąg od 4 do 6 nukleotydów T. Ulegające w komórkach ekspresji shRNA posiadają zatem wprowadzany przez Pol III trójfosforan na końcu 5' oraz ciąg kilku (najczęściej 2-3) nukleotydów U na końcu 3'. Obecność oraz długość wystającego końca 3' cząsteczek shRNA jest ważna dla ich wydajnego transportu z jądra do cytoplazmy oraz dla wiązania przez RNazę Dicer (Boudreau i wsp. 2008). Znaczenie dla funkcjonowania reagentów shRNA może mieć również zastosowana pętla terminalna choć doniesienia literaturowe opisujące jej wpływ na transport cząsteczek shRNA do cytoplazmy oraz proces ich docinania przez RNazę Dicer są niespójne (Wei i wsp. 2009; Schopman i wsp. 2010). Standardowo, w reagentach shRNA stosuje się pętle długości od 4 do 10 nt, a najczęściej wykorzystywana jest sztuczna 9-nukleotydowa pętla o sekwencji: 5'-UUCAAGAGA-3 (Brummelkamp i wsp. 2002). Korzystnie na aktywność shRNA wpływa również zastosowanie pętli terminalnych pochodzących od endogennych pri-miRNA tj: miR-30, miR-23 czy miR-26. Reagenty shRNA stosowane są również w różnych odmianach, takich jak sshRNA (ang. short short hairpin) ze skróconym trzonem struktury spinki, lshRNA (ang. long short hairpin) z wydłużonym trzonem struktury spinki czy też e-shRNA (ang. extended short hairpin), posiadające znacznie wydłużony trzon, z którego wycinane są dwa lub więcej dupleksów siRNA (Liu i wsp. 2007; Ge i wsp. 2010).

Reagenty shmiR, nazywane również shRNA II generacji, shRNA^{miR} lub artificial miRNA, włączają się w endogenną ścieżkę biogenezy miRNA na wcześniejszym etapie niż cząsteczki shRNA (*Ryc. 8* oraz *Tabela 1*) (Chang i wsp. 2006). Są one odpowiednikami endogennych pri-miRNA i podlegają w komórkach obróbce w dwóch etapach przez RNazę Drosha oraz RNazę Dicer. W reagentach shmiR sekwencja wstawki siRNA ulokowana jest w obrębie trzonu pri-miRNA i zastępuje ona sekwencję dupleksu miRNA/miRNA*. Najczęściej

reagenty te konstruowane są tak aby uwalniane z nich krótkie RNA działały jak siRNA, jednak są one stosowane również do ekspresji „sztucznych” miRNA regulujących ekspresję wielu transkryptów poprzez oddziaływanie z ich regionami 3' UTR (Arroyo i wsp. 2014). Cząsteczki shmiR dostarczane są do komórek w postaci wektorów genetycznych, a ich pierwotne transkrypty ulegają ekspresji z promotorów Pol II RNA (najczęściej CMV), rzadziej stosowane są promotory Pol III RNA. Tworzone pod kontrolą promotorów Pol II RNA transkrypty shmiR, podobnie jak endogenne pri-miRNA posiadają strukturę czapeczki na końcu 5' oraz poliadenylowany koniec 3' (Lee i wsp. 2004). Transkrypty shmiR są znacznie dłuższe (w zależności od zastosowanych długości sekwencji flankujących nawet do tysiąca nt) niż powstające w przypadku ekspresji reagentów shRNA. Wykorzystanie promotorów Pol II, oprócz bardziej naturalnego sposobu powstawania cząsteczek shmiR w komórkach, daje również możliwość stworzenia reagentów o regulowanej lub trankowo-specyficznej ekspresji (Dickins i wsp. 2005; Stegmeier i wsp. 2005; Zuber i wsp. 2011). Dodatkowo specyfika powstającego transkryptu umożliwia ekspresję tzw. zgrupowanych reagentów shmiR, zawierających wiele spinek z różnymi sekwencjami siRNA ulegających ekspresji w postaci jednego transkryptu RNA (analogicznie do ekspresji klastrów miRNA) (Liu i wsp. 2008). Cząsteczki shmiR w przeciwieństwie do syntetycznych siRNA oraz shRNA wykorzystują całą ścieżkę biogenezy miRNA, a ich wewnątrzkomórkowa ekspresja umożliwia stałe dostarczanie cząsteczek siRNA, wydłużając tym samym czas ich działania. Ważną zaletą reagentów shmiR jest fakt, iż nie prowadzą one do wysycenia białek zaangażowanych w biogenezę miRNA i ograniczają występowanie efektów ubocznych zależnych od sekwencji (typu *off-target*) towarzyszących reagentom technologii RNAi. Szczegółowy opis reagentów shmiR zawarty został w podrozdziale I.3.3. niniejszej pracy doktorskiej.

Tabela 1. Porównanie najczęściej stosowanych rodzajów reagentów technologii RNAi.

| Typ | siRNA | shRNA | shmiR |
|--|--|---|--|
| endogenny odpowiednik | miRNA | pre-miRNA | pri-miRNA |
| długość | ~21 nt | ~55 nt | ~60 nt + sekwencje otaczające (~200-300 nt do 1000 nt) |
| pochodzenie | syntetyczne | wektory genetyczne, promotor Pol III RNA | wektory genetyczne, promotor Pol II RNA |
| struktura | dupleks  | spinka RNA  | spinka RNA z sekwencjami otaczającymi  |
| poziom sparowania dupletu siRNA | pełna komplementarność | pełna komplementarność | dopuszczalne wybrzuszenia i pętle wewnętrzne |
| Ekspresja | przejściowa | przejściowa/stała | przejściowa/stała |
| Białka zaangażowane w komórkową obróbkę | - | Dicer | Drosha i Dicer |
| Mechanizm wyciszania | cięcie i degradacja mRNA | cięcie i degradacja mRNA | cięcie lub deadenylacja i degradacja mRNA |
| Modyfikacje | chemiczne modyfikacje reszt nukleotydowych | sshRNA, lshRNA, eshRNA | policistronowa ekspresja wielu spinek |

3.2. Efekty niespecyficzne reagentów technologii RNAi

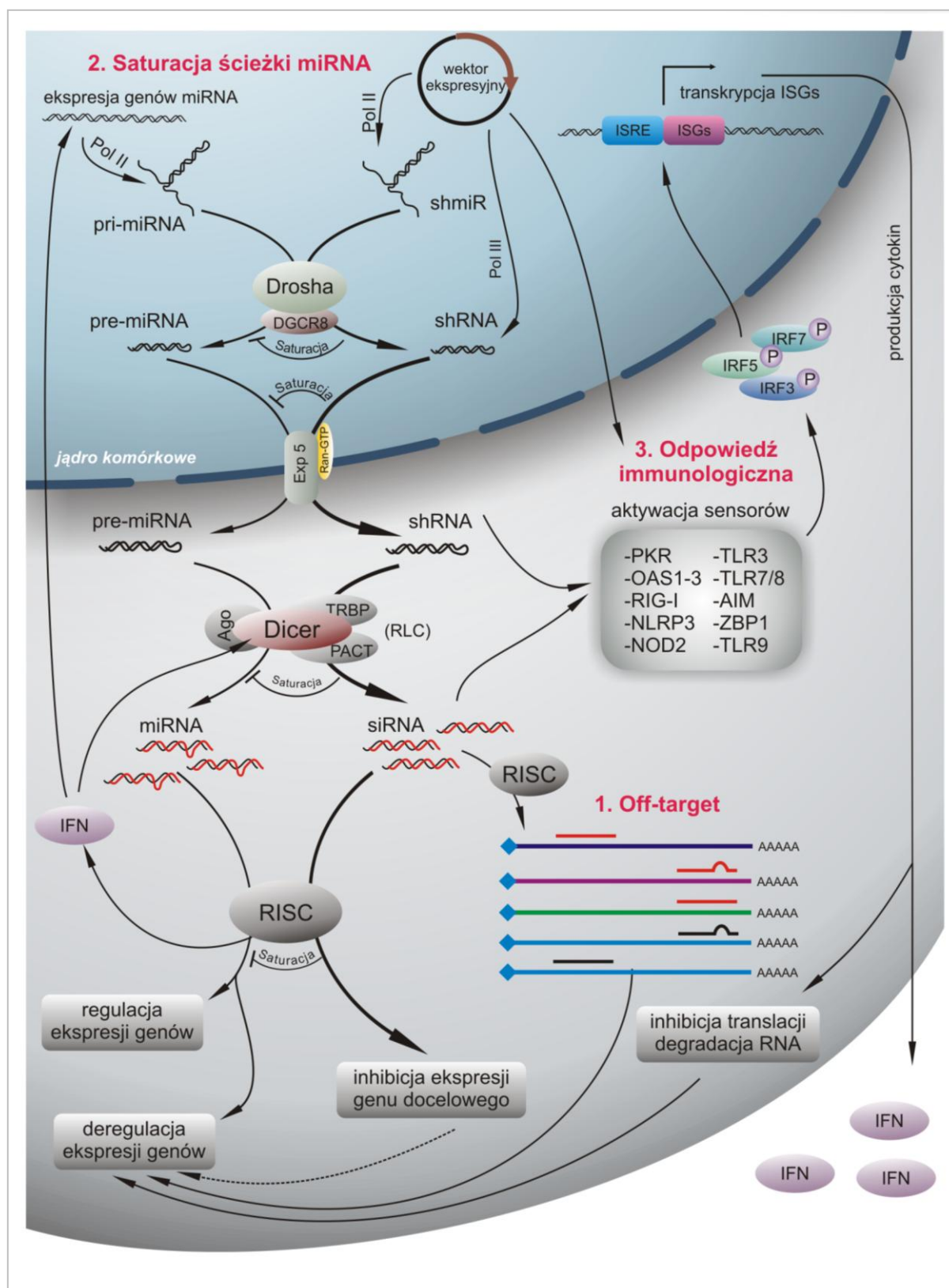
Wszystkie reagenty technologii RNAi wprowadzane do komórek w postaci syntetycznego RNA czy też w postaci wektorowej stanowią obcy materiał genetyczny i mogą wywoływać charakterystyczne dla niego niepożądane efekty uboczne o różnym stopniu nasilenia (Olejniczak i wsp. 2010). Efekty te można podzielić na związane oraz niezwiązane z sekwencją wprowadzonych cząsteczek.

Efektom ubocznym zależnym od sekwencji siRNA (syntetycznego czy też uwalnianego z wektorów genetycznych) jest indukcja efektów typu *off-target*, czyli wyciszania ekspresji innych genów niż gen docelowy, zawierających do niego bardzo podobne fragmenty sekwencji (Jackson i wsp. 2003) (Ryc. 9). Nasilenie tych efektów w znacznym stopniu zależy od ilości aktywnych cząsteczek w komórce oraz od możliwości nabywania aktywności przez nić pasażerską. Efekty *off-target* wywoływane są w przypadku gdy sekwencja siRNA wykazuje pełną lub częściową komplementarność (zwłaszcza w obrębie regionu „seed”) z sekwencjami innych komórkowych transkryptów (Boudreau i wsp. 2011). Wiązanie przez transkrypt komórkowy kompleksu RISC załadowanego nie w pełni komplementarnym siRNA, zwłaszcza do regionów UTR, może prowadzić do inhibicji jego translacji oraz kierowania na drogę degradacji z wykorzystaniem mechanizmu charakterystycznego dla działania cząsteczek miRNA. W przypadkach gdy siRNA wykazuje pełną komplementarność do transkryptów innych niż docelowy dochodzi zwykle do nasilenia efektów ubocznych poprzez znaczne obniżenie ekspresji dodatkowych genów przez cięcie i degradację ich mRNA. Efekty *off-target* wywołane są również jeżeli nić pasażerska siRNA zostaje preferencyjnie lub chociażby częściowo załadowana do kompleksu RISC rozpoznającego na jej podstawie transkrypty docelowe. Wywoływanie efektów ubocznych typu *off-target* jest silnie związane z sekwencją cząsteczek siRNA dlatego stworzone zostało oprogramowanie siSPOTR (ang. siRNA Seed Potential of Off-Target Reduction) analizujące zdolność danej sekwencji siRNA do potencjalnej regulacji dodatkowych genów (Boudreau i wsp. 2013). Informacje o liczbie potencjalnie regulowanych transkryptów umożliwiają ograniczenie efektów typu *off-target* już na etapie projektowania cząsteczek technologii RNAi. Aby ograniczyć tego typu efekty stosuje się również chemiczne modyfikacje cząsteczek siRNA (Jackson i wsp. 2006) oraz podawanie niskich stężeń wielu siRNA posiadających inne sekwencje docelowe w obrębie tego samego transkryptu (Jackson i Linsley 2010). Sumaryczne stężenie takiego „koktajlu” siRNA umożliwia uzyskanie

znacznego wyciszenia genu docelowego podczas gdy efekty *off-target*, inne dla każdej sekwencji siRNA, pozostają na niskim poziomie (Kittler i wsp. 2007). Jednak nie zawsze działanie pulą cząsteczek siRNA przynosi korzystne efekty. Reagenty wektorowe, które podlegają komórkowej obróbce przez RNazy Drosha i/lub Dicer mogą być obarczone nieprecyzyjnym działaniem tych RNaz, skutkującym powstawaniem niejednorodnej puli cząsteczek siRNA z tego samego prekursora (Gu i wsp. 2012). Podobnie jak w przypadku izomirów 5' oraz 3', różne warianty uwalnianych siRNA mogą regulować ekspresję dodatkowych genów oraz wpływać na wybór aktywnej nici siRNA, w znacznym stopniu zwiększając skalę wzbudzenia efektów typu *off-target*.

Efektom niezwiązanym z sekwencją RNA jest wysycenie endogennych szlaków biogenezy miRNA przez nadmiar egzogennych substratów (Ryc. 9). Po wprowadzeniu do komórek reagentów RNAi dochodzi do ich konkurencji z endogennymi miRNA o dostęp do białek zaangażowanych zarówno w ich powstawanie (Drosha, Dicer), transport (Eksportyna-5, Ran-GTP) jak i działanie (RISC w tym białka AGO) (Grimm i wsp. 2006). Wykazano, że ekspresja cząsteczek shRNA prowadzi do znacznego obniżenia poziomów niektórych miRNA w komórkach poprzez zahamowanie eksportu ich prekursorów z jądra do cytoplazmy oraz przez wysycenie RNazy Dicer (Castanotto i wsp. 2007; Borel i wsp. 2011; van Gestel i wsp. 2014). Wysycenie endogennej ścieżki biogenezy miRNA przez reagenty RNAi może prowadzić do deregulacji komórkowego poziomu ekspresji cząsteczek miRNA, a w konsekwencji zaburzać poprawne funkcjonowanie genów pozostających pod ich kontrolą. Efekt saturacji endogennej maszyny białkowej jest najmniejszy dla reagentów shmiR ulegających ekspresji na dość niskim poziomie oraz włączających się w ścieżkę biogenezy miRNA na jej wczesnym etapie (Castanotto i wsp. 2007; Maczuga i wsp. 2014).

Do efektów ubocznych niezależnych od sekwencji należy również indukcja odpowiedzi interferonowej związana z traktowaniem przez komórkę wprowadzonych reagentów technologii RNAi jako obcego materiału genetycznego (Ryc. 9). Cechą wspólną wszystkich stosowanych reagentów technologii RNAi jest fakt, że są one egzogennym RNA lub DNA, mającym zdolność pobudzania komórkowych sensorów rozpoznających wzorce związane z patogenami (PAMPs, *Patogen associated molecular patterns*) (Marques i wsp. 2006; Reynolds i wsp. 2006).



Ryc. 9. Efekty niespecyficzne wywoływane przez reagenty technologii RNAi.

1. Efekty typu off-target związane z wyciszaniem dodatkowej grupy genów. **2-** Saturacja endogennego szlaku biogenezy miRNA. Reagenty RNAi konkurują z endogennymi miRNA o dostęp do białek zaangażowanych w ich powstawanie, transport oraz funkcjonowanie w komórkach. **3-** Indukcja odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację komórkowych sensorów obcego RNA oraz DNA, oraz endotoksyn bakteryjnych.

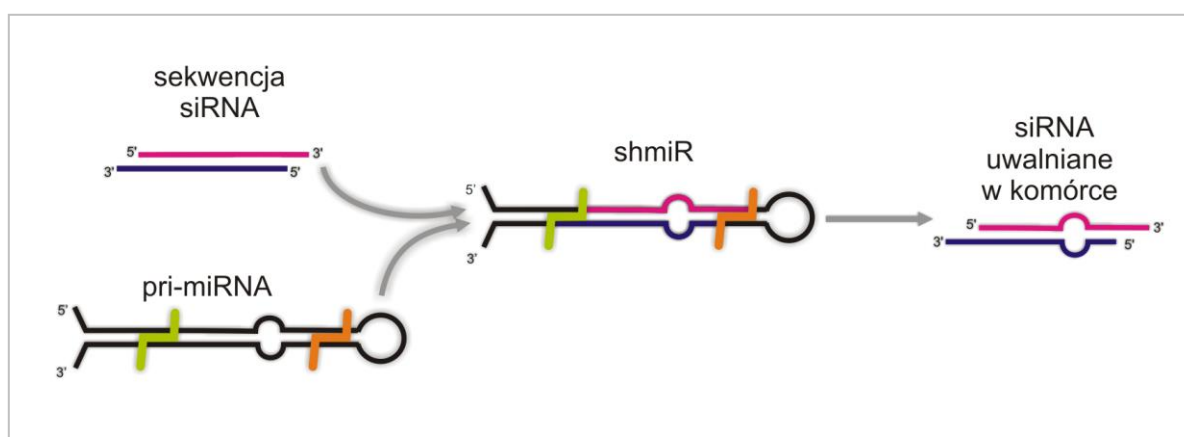
W cytoplazmie komórek występuje szereg sensorów rozpoznających dwuniciowy RNA (Gantier i Williams 2007; Sioud 2010), z których najlepiej poznane to białka PKR (ang. IFN-inducible dsRNA-activated protein kinase), OAS1-3 (ang. 2'-5'-oligoadenylate synthetase), helikazy RIG-I (ang. retinoic acid inducible gene I) i MDA5 (ang. melanoma differentiation associated gene-5), oraz niektóre białka z rodziny NLR (ang. NOD-like receptors). Obecne są również endosomalne receptory z rodziny TLR (TLR 3, 7, 8) (ang. *Toll-like receptors*), które mogą być aktywowane przez RNA dostarczany do tego kompartmentu komórkowego w wyniku transfekcji przy pomocy lipidów kationowych. Coraz więcej uwagi poświęca się również komórkowym sensorom obcego DNA tj. TLR9, rozpoznający niemetylowane wyspy CpG, jak również białka AIM2 (ang. absent in melanoma 2) oraz ZBP1 (ang. Z-DNA binding protein 1) (Unterholzner 2013; Mansur i wsp. 2014). Na rozpoznanie reagentów technologii RNAi jako obcych może wpływać również ich nienaturalna lokalizacja komórkowa, cechy struktury, długość, modyfikacje chemiczne, obecność motywów immunostymulujących oraz towarzyszące im zanieczyszczenia np. pochodzenia bakteryjnego w przypadku wektorów plazmidowych (Olejniczak i wsp. 2010; Olejniczak i wsp. 2011).

Aktywacja sensorów komórkowych indukuje transdukcję sygnału poprzez aktywację kaskady kolejnych mediatorów wewnątrzkomórkowych, doprowadzając do ekspresji grupy genów stymulowanych interferonem (*ISG - Interferon Stimulated Genes*). Indukowane w ten sposób białka odgrywają główną rolę w odpowiedzi immunologicznej komórki prowadząc do ogólnego obniżenia poziomu syntezy białek w komórce, a w końcowym etapie nawet do śmierci komórki na drodze apoptozy. Opisane w literaturze efekty immunologiczne wywoływane przez reagenty technologii RNAi oraz miRNA zostały zebrane w postaci internetowej bazy danych RNAimmuno (Olejniczak i wsp. 2012). Częstoczkami o najniższym poziomie aktywacji odpowiedzi immunologicznej są siRNA, natomiast o najwyższym reagenty shRNA, ulegające ekspresji z wektora DNA i posiadające 5' trójfosforan, będący wzorcem rozpoznawanym przez niektóre sensory komórkowe. Stosowanie reagentów shmiR ulegających ekspresji z wektorów plazmidowych również związane jest z wprowadzaniem do komórek obcego DNA, jednak w tym przypadku powstające transkrypty posiadają cechy charakterystyczne dla komórkowych RNA, przez co nie są rozpoznawane jako „obce”.

Znajomość ryzyka związanego z występowaniem wymienionych efektów niespecyficznych towarzyszących stosowaniu reagentów RNAi jest niezwykle ważna, zwłaszcza w terapeutycznych zastosowaniach tej technologii (Boudreau i wsp. 2009a). Należy brać je pod uwagę również w badaniach podstawowych, gdyż efekty te mogą zniekształcać wyniki prowadzonych badań lub być przyczyną ich błędnej interpretacji przypisującej obserwowany efekt wyciszeniu konkretnego genu docelowego a nie towarzyszącym mu efektom ubocznym (Robbins i wsp. 2008).

3.3. Charakterystyka reagentów technologii RNAi typu shmiR

Jak wspomniano już wcześniej reagenty shmiR wykorzystują struktury endogennych pri-miRNA jako nośniki dla sekwencji siRNA. Reagenty te zbudowane są ze sztucznej wstawki siRNA wkomponowanej pomiędzy sekwencje otaczające oraz pętlę terminalną naturalnego pri-miRNA (Ryc. 10).



Ryc. 10. Schemat budowy reagentów shmiR.

nić wiodąca (antysensowa) –zaznaczona kolorem różowym, nić pasażerska (sensowa) – kolorem granatowym, elementy pri-miRNA –kolorem czarnym, miejsca cięcia przez RNazy Droscha – kolorem jasnozielonym, oraz Dicer- kolorem pomarańczowym.

Wykorzystanie tego typu reagentów zostało po raz pierwszy opisane w 2002 roku przez grupę Bryana R. Cullena (Zeng i wsp. 2002). Stworzono wówczas pierwsze reagenty shmiR nazywane „sztucznymi miRNA” (ang. artificial miRNAs) w oparciu o strukturę pri-miR-30a. Prekursor ten został wybrany w tym celu jako jedna z najlepiej scharakteryzowanych wówczas cząsteczek miRNA, dla której wykazano możliwość nadekspresji dojrzałych miRNA w ludzkich komórkach w wyniku wprowadzenia do nich wektorów plazmidowych uwalniających sekwencję pierwotnego transkryptu. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy stwierdzili, że wymiana sekwencji w obrębie trzonu pri-miR-30a nie wpływa negatywnie na jego obróbkę dzięki czemu możliwa jest wymiana sekwencji miRNA na siRNA. W tym samym roku potwierdzono także aktywność tego rodzaju cząsteczek w komórkach po podaniu w formie syntetycznych RNA (McManus i wsp. 2002). Doniesienia te wykazały również, iż mechanizm działania tej nowej klasy reagentów jest typowy dla

cząsteczek siRNA a nie miRNA i związany jest z degradacją transkryptu docelowego. Warto nadmienić, że w owym czasie wiedza dotycząca mechanizmów rządzących biogenezą miRNA była w początkowej fazie rozwoju i wiele jej aspektów pozostawało nieznanymi. Reagenty shmiR szybko znalazły zwolenników, co zaowocowało utworzeniem bibliotek, zawierających cząsteczki shmiR pokrywające sekwencje ludzkiego oraz mysiego genomu (Silva i wsp. 2005; Stegmeier i wsp. 2005). W niedługim czasie grupa Davida L. Turnera zaproponowała wykorzystanie mysiego prekursora miR-155 jako kolejnego nośnika, umożliwiającego wewnątrzkomórkową ekspresję cząsteczek siRNA (Chung i wsp. 2006). Reagenty shmiR są do dzisiaj bardzo często stosowane w badaniach *in vivo* ze względu na wysoką efektywność działania przy stosunkowo niskiej ilości uwalnianych w komórkach cząsteczek siRNA, skutkującej również niskim poziomem efektów ubocznych (Boudreau i wsp. 2009a; Boudreau i wsp. 2009b; Borel i wsp. 2011; Liu i wsp. 2013; Rodriguez-Lebron i wsp. 2013).

3.3.1. Aspekty związane z projektowaniem oraz optymalizacją reagentów shmiR

Do konstrukcji reagentów shmiR wykorzystano dotychczas niewielką grupę spośród znanych pri-miRNA, w tym również prekursorzy pochodzące z niekanonicznej ścieżki biogenezy miRNA niezależne od RNazy Drosha lub Dicer (Yang i wsp. 2010b; Seow i wsp. 2012). Zdecydowanie najczęściej stosowane są reagenty skonstruowane na podstawie pierwszych zaproponowanych nośników: hsa-pri-miR-30a oraz mmu-pri-miR-155. W Tabeli 2 przedstawiono różnice w sposobie konstruowania opisanych w literaturze reagentów shmiR tworzonych z wykorzystaniem pri-miR-30a oraz pri-miR-155.

Tabela 2. Sposób konstrukcji reagentów shmiR z wykorzystaniem najczęściej stosowanych nośnikowych pri-miRNA.

| | nośnikowy pri-miR-155 | nośnikowy pri-miR-30a |
|--|---|---|
| lokalizacja nici wiodącej siRNA | ramię 5' | ramię 5' lub 3' |
| długość siRNA | 21 nt siRNA + 3nt sekwencji prekursora =24 nt | 22, 23 nt siRNA |
| trzon spinki | 2 nt wybrzuszenie w obrębie nici wiodącej w ramieniu 5' (nukleotydy w pozycjach 12 oraz 13), rzadziej w pełni sparowany | najczęściej w pełni sparowany ale też 2 nt wybrzuszenie w ramieniu 5' (nukleotydy w pozycjach 12 oraz 13) |
| miejsce cięcia przez Drosha | zachowanie słabych par w miejscach cięcia | kluczowe niesparowanie w miejscu cięcia Drosha |
| miejsce cięcia przez Dicer | najczęściej niezmienione, w ramieniu 5' możliwa zmiana U/C tuż przed miejscem cięcia Dicer | częsta zamiana dwóch par przy pętli terminalnej z par G:C na A:U |

Zastosowanie promotorów Pol II RNA w kasetach ekspresyjnych reagentów shmiR, umożliwia ich ekspresję na niższym - bardziej naturalnym poziomie. W konsekwencji uwalniane z nich cząsteczki siRNA pojawiają się w komórkach w znacznie (od ~10 do 80 razy) mniejszych ilościach niż w przypadku typowych reagentów shRNA (Boudreau i wsp. 2008; Ely i wsp. 2008; Borel i wsp. 2011; Maczuga i wsp. 2012; Maczuga i wsp. 2013). Z tego względu ekspresja reagentów shmiR nie prowadzi do drastycznego wysycenia komórki krótkimi cząsteczkami RNA (zarówno shRNA jak i siRNA), ograniczając tym samym ingerencję w jej naturalny metabolizm. Pomimo znacznie mniejszej ilości siRNA uwalnianych z reagentów shmiR, ich aktywność w komórkach jest wciąż bardzo wysoka nawet przy zastosowaniu jednej kopii konstruktów zintegrowanego w genomie (Stegmeier i wsp. 2005). Doniesienia o efektywności reagentów shmiR w porównaniu ze standardowymi shRNA nie są spójne. Wydaje się jednak, że reagenty shmiR umożliwiają uzyskanie podobnego (lub tylko trochę niższego) poziomu wyciszenia jak shRNA przy znacznie mniejszej ilości uwalnianych cząsteczek siRNA (Boden i wsp. 2004; Boudreau i wsp. 2008; McBride i wsp. 2008; Borel i wsp. 2011; Maczuga i wsp. 2012; Maczuga i wsp. 2013). Istnieją również doniesienia z badań *in vivo*, iż efekt wyciszenia przez reagenty shmiR jest bardziej długotrwały niż wywołany przez analogiczne reagenty shRNA (Maczuga i wsp. 2013). Różnice w działaniu cząsteczek siRNA, pochodzących z tych dwóch typów reagentów technologii RNAi mogą być związane z ich funkcjonowaniem w kompleksach białkowych o różnym składzie. Znaczenie może mieć również odmienna obróbka ich prekursorów przez komórkowe RNazy, skutkująca uwalnianiem cząsteczek siRNA o nieznacznie różniącej się sekwencji (podobnie jak w przypadku powstawania izomirów).

Niższy poziom cząsteczek siRNA uwalnianych z reagentów shmiR oraz dwuetapowy proces ich nukleolitycznej obróbki w komórkach skutkuje również zminimalizowaniem efektów niespecyficznych, wywoływanych ekspresją cząsteczek siRNA w komórkach. Również ze względu na zastosowanie promotorów Pol II RNA o niższej aktywności cząsteczki te pojawiają się w komórce w bardziej naturalnych ilościach, nie prowadząc do wysycenia zarówno białek uczestniczących w ich obróbce jak i transporcie do cytoplazmy (Eksportyna-5) (Castanotto i wsp. 2007; Lo i wsp. 2007; Beer i wsp. 2010; Borel i wsp. 2011). Podobieństwo reagentów shmiR do naturalnych pri-miRNA w znacznym stopniu ogranicza indukcję odpowiedzi interferonowej w hodowlach komórkowych (mierzonej jako poziom mRNA OAS1 oraz aktywnej Caspazy-3) (Bauer i wsp. 2009) oraz *in vivo* (wyrażonej jako poziom wydzielanych cytokin oraz hepatotoksyczności) (Liu i wsp. 2013).

Niezwykle istotną rolę dla efektywności działania siRNA uwalnianych z reagentów shmiR ma sposób umiejscowienia wstawki siRNA w obrębie pri-miRNA. Ponieważ sekwencje naturalnych miRNA, ze względu na obecność wybrzuszeń, są dłuższe niż standardowe duplekty siRNA, przeprowadzono badania nad różnymi sposobami usytuowania sekwencji siRNA w reagenie shmiR. Sekwencje siRNA wstawiano od końca 5', od końca 3', pośrodku sekwencji nici wiodącej miRNA lub też wydłużano ją do długości 23-24 nt. Uzyskane wyniki pokazały, że największą efektywność działania zapewnia umiejscowienie sekwencji siRNA długości 19-21nt bezpośrednio od końca 5' nici wiodącej miRNA (Liu i wsp. 2008; Zhang i wsp. 2012). Przeprowadzono również działania umożliwiające efektywne tworzenie reagentów shmiR z nicią wiodącą siRNA uwalnianą preferencyjnie z ramienia 3' prekursora (Stegmeier i wsp. 2005; Rhee i wsp. 2009). Optymalizacja ta dotyczyła zmian sekwencji w rejonie przypętlowym najczęściej stosowanego prekursora pri-miR-30a. Stosowano również reagenty shmiR ze skróconym trzonem struktury spinki (z 23 do 21 nt), poprzez usunięcie par nukleotydów w pobliżu pętli terminalnej. W niektórych przypadkach obserwowano jednak obniżenie efektywności działania takich reagentów (Boden i wsp. 2004). W przeprowadzonych badaniach nie ma jednak danych rozstrzygających czy obniżenie efektywności działania było wynikiem zaburzonej obróbki reagentów shmiR czy zmienionej siły oddziaływania uwolnionych siRNA z sekwencją docelową.

Kolejnym aspektem ważnym przy projektowaniu cząsteczek shmiR jest stopień zachowania struktury nośnikowego pri-miRNA. Naturalne pri-miRNA często posiadają w obrębie trzonu elementy zaburzające regularność helisy dsRNA, takie jak niesparowane nukleotydy, pętle wewnętrzne lub jednostronne wybrzuszenia. Wydaje się, że między innymi obecność tych elementów wprowadzających lokalne rozluźnienie struktury RNA upodabnia reagenty shmiR do endogennych pri-miRNA i zapewnia ich lepsze funkcjonowanie w komórkach. Wykazano, że reagenty shmiR posiadające niesparowane nukleotydy w obrębie sekwencji siRNA oddziałują z białkami AGO1-4 i wykazują większą efektywność działania (Wu i wsp. 2011). Jednak wpływ obecności niesparowań w poszczególnych pozycjach na efektywność działania cząsteczek siRNA może być zależny od specyficznej sekwencji reagenta (Addepalli i wsp. 2010). Korzystny wpływ niesparowań w pozycjach centralnych siRNA został potwierdzony dla procesu ładowania siRNA do kompleksu RISC (Kawamata i wsp. 2009). Natomiast ich obecność w regionie źródłowym cząsteczek poprawia efektywność rozplatania nici dupletu siRNA (Kawamata i wsp. 2009; Yoda i wsp. 2010). Również w trzonie reagentów shmiR takie rozluźnienie struktury ogranicza aktywność nici

pasażerskiej uwalnianego dupleksu siRNA, zmniejszając indukowane przez nią efekty niepożądane typu *off-target* (Aagaard i wsp. 2008). Wykazano także, że wprowadzenie wybrzuszonych nukleotydów w nici pasażerskiej wpływa na ograniczenie efektu indukcji odpowiedzi immunologicznej w komórkach (Bauer i wsp. 2009). Istotne znaczenie ma również zachowanie elementów struktury pri-miRNA nośnikowego poza regionem ulegającym wymianie na sekwencję siRNA. Ważne jest aby nie zaburzać regionów zawierających elementy kluczowe dla obróbki przez komórkową maszynę biogenezy miRNA (Zeng i Cullen 2005; Liu i wsp. 2008) i aby stosować sekwencje otaczające prekursor odpowiedniej długości, minimalnie 30-40 nt z każdej strony spinki (Chen i wsp. 2004; Zeng i Cullen 2005; Choi i wsp. 2015). Na szczególną uwagę zasługują elementy rozluźniające strukturę helisy poniżej miejsca cięcia przez RNazę Drosha, których zachowanie jest kluczowe dla efektywnego cięcia cząsteczek pri-miRNA oraz wykorzystujących je reagentów shmiR (Beisel i wsp. 2010; Quarles i wsp. 2013).

Pomimo doniesień o funkcjonalności reagentów shmiR posiadających całkowicie sztuczną sekwencję (zarówno wstawki siRNA jak i sekwencji otaczających) (Shibata i wsp. 2007), naturalna sekwencja nukleotydowa pri-miRNA może być silnym modulatorem obróbki tych reagentów w komórkach. Jak pokazała grupa Davida Bartela zarówno sekwencje otaczające jak i pętla terminalna mogą zawierać motywy ważne dla rozpoznania oraz efektywnej obróbki cząsteczek pri-miRNA w komórkach (Auyeung i wsp. 2013). Wiedza ta została szybko wykorzystana w technologii RNAi w nowszej wersji prekursora nośnikowego miR-E stworzonego na podstawie pri-miR-30a. W nowym nośnikowym pri-miRNA w sekwencji otaczającej 3' zachowany jest motyw sekwencji ważny dla rozpoznawania cząsteczek RNA przez kompleks Mikroprocesora (Fellmann i wsp. 2013). We wcześniejszych podejściach motyw ten został zaburzony przez wprowadzenie miejsca restrykcyjnego ułatwiającego konstrukcję kaset ekspresyjnych reagentów shmiR w wektorach pSMS2 (Stegmeier i wsp. 2005). Grupa Patricka Salmona przeprowadziła kolejną optymalizację nośnikowego pri-miRNA tworząc miR-GE będący hybrydą dwóch pri-miRNA. Ten nowy nośnikowy pri-miRNA posiada sekwencje otaczające aż do miejsca cięcia przez RNazę Drosha oraz strukturę trzonu pri-miRNA-16, podczas gdy pętla terminalna pochodzi z pri-miR-30a (Myburgh i wsp. 2014). Wyniki przeprowadzonych porównań sugerują, że miR-GE wykazuje lepszą dyskryminację pomiędzy nicią wiodącą i pasażerską oraz bardziej precyzyjne cięcie przez RNazę Drosha w stosunku do wyjściowego pri-miR-30a. Podczas analizy około 20 tys. sekwencji shmiR pokrywających geny ssacze zaobserwowano,

że cząsteczki ulegające efektywnej obróbce w komórkach wykazują pewne wspólne cechy sekwencji (Fellmann i wsp. 2011). Reagenty efektywnie cięte przez RNazę Drosha posiadały nukleotydy A/U w pozycji 13/14 oraz G w pozycji 20/21, podczas gdy cząsteczki nie cięte na tym etapie wykazywały zwiększoną częstość nukleotydów C w pozycji 20 (Fellmann i wsp. 2011). Wyniki tych badań posłużyły również do ulepszenia algorytmów do projektowania cząsteczek shmiR, wykorzystujących nośnikowy pri-miR-30a (Matveeva i wsp. 2012). Jak dotąd brak jest jednak narzędzi umożliwiających zautomatyzowane projektowanie reagentów shmiR, wykorzystujących różne pri-miRNA nośnikowe do zastosowań w komórkach zwierzęcych. Dotychczas tego typu oprogramowanie zostało stworzone dla reagentów shmiR wykorzystujących roślinne pri-miRNA (Warthmann i wsp. 2013).

Promotory Pol II RNA stosowane w wektorach kodujących reagenty shmiR umożliwiają powstawanie długiego transkryptu RNA. Cecha ta została wykorzystana do ekspresji wielu reagentów shmiR w postaci jednego policistronowego transkryptu (ang. multiple artificial miRNAs) wzorowanego na ekspresji klastrów endogennych miRNA (Chung i wsp. 2006; Sun i wsp. 2006; Zhu i wsp. 2007; Chen i wsp. 2011). Podejście to jest szeroko wykorzystywane w strategiach przeciwwirusowych, gdzie jednoczesna ekspresja kilku cząsteczek siRNA celujących w różne sekwencje genomu wirusa utrudnia mu „ucieczkę” od hamowania jego ekspresji przez czynniki wyciszające (Aagaard i wsp. 2008; Liu i wsp. 2008; Ely i wsp. 2009; Yang i wsp. 2010c; Zhang i wsp. 2012). Najczęściej wykorzystywane w tym celu są klastry: miR-106b-25, miR-17-92 oraz zgrupowania wielu spinek pri-miR30a lub pri-miR-155 (Chung i wsp. 2006; Aagaard i wsp. 2008; Liu i wsp. 2008). Ważnym aspektem przy projektowaniu tego typu cząsteczek jest zachowanie odpowiedniej odległości pomiędzy poszczególnymi spinkami. Wykazano, że sekwencje otaczające długości 30 nt z każdej strony spinki są wystarczające dla efektywnej obróbki multimerycznych reagentów shmiR (Choi i wsp. 2015), jednak najczęściej pomiędzy spinkami umieszcza się sekwencje długości około 130 nt. Ważnym problemem jest również obniżenie poziomu ekspresji siRNA w zależności od liczby spinek oraz ich umiejscowienia w transkrypcie (Liu i wsp. 2008; Choi i wsp. 2015).

Uzyskane dotychczas wyniki analizy obróbki reagentów technologii RNAi w komórkach sugerują, iż reagenty te, podobnie jak endogenne miRNA, docinane są w komórkach nieprecyzyjnie. Pierwsze dowody na heterogenność cząsteczek siRNA uwalnianych z wektorów shmiR uzyskano stosując hybrydyzację typu *northern* (Ely i wsp. 2008). Efekt taki zaobserwowany został również z wykorzystaniem reakcji typu 3'RACE (ang. Rapid Amplification of cDNA Ends) oraz Sekwencjonowania Nowej Generacji (NGS) (Boudreau i wsp. 2008; Maczuga i wsp. 2013). Uwalnianie heterogennej puli cząsteczek siRNA niesie za sobą ryzyko wywoływania opisanych we wcześniejszym rozdziale efektów ubocznych (m.in. zwiększenia efektu *off-target* oraz zwiększonej aktywności nici pasażerskiej). Technologia RNAi wykorzystywana jest również w tych szczególnych podejściach terapeutycznych, w których kluczową rolę odgrywają odpowiednie pozycje niesparowań siRNA z sekwencją docelową. Do takich strategii należą alleloselektywne podejścia, zakładające celowanie w regiony zawierające polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP- ang. Single Nucleotide Polymorphism) lub w regiony różniące się długością powtórzeń mikrosatelitarnych (STR ang. Short Tandem Repeats). W takich przypadkach nawet drobna zmiana w sekwencji powstających siRNA może wywierać negatywny wpływ na powodzenie strategii alleloselektywnego wyciszania genów (Fiszer i Krzyzosiak 2014).

Cząsteczki shmiR łączą w sobie najlepsze cechy endogennych prekursorów miRNA, zapewniając niską toksyczność tych reagentów oraz wysoką efektywność degradacji mRNA charakterystyczną dla egzogennych siRNA. Reagenty te charakteryzują się efektywnym wyciszaniem sekwencji docelowej w standardowych zastosowaniach technologii RNAi. Jednak nieznane są dokładne zasady projektowania tych cząsteczek oraz czynniki wpływające na ich komórkową obróbkę. Dlatego dalsze działania optymalizacyjne powinny zmierzać w kierunku obniżenia efektów niepożądanych zwiększając tym samym potencjał terapeutyczny reagentów shmiR oraz w kierunku ich przystosowania do specyficznych zastosowań technologii RNAi takich jak alleloselektywne wyciszanie ekspresji genów.

II. CEL BADAŃ

Zjawisko interferencji RNA jest obecnie szeroko wykorzystywane w biologii molekularnej do selektywnego wyciszania ekspresji wybranych genów. Spośród reagentów technologii RNAi na szczególną uwagę zasługują cząsteczki shmiR, które włączają się w endogenną ścieżkę biogenezy miRNA na jej wczesnym etapie, dzięki czemu podlegają naturalnym etapom obróbki przez RNazy Drosha i Dicer. Reagenty te łączą w sobie najbardziej pożądane cechy endogennych prekursorów miRNA oraz syntetycznych siRNA zapewniające im niską toksyczność oraz wysoką efektywność degradacji mRNA docelowego genu.

Pierwszym celem badań, opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, było scharakteryzowanie wcześniej stosowanych reagentów shmiR oraz uwalnianych z nich siRNA. Jak dotąd do konstrukcji reagentów shmiR wykorzystywana jest niewielka grupa prekursorów pri-miRNA, w której zdecydowanie dominują zaproponowane ponad dekadę temu pri-miR-30a oraz pri-miR-155.

Kolejnym celem badań przedstawionych w tej pracy było sprawdzenie czy wykorzystanie innych pri-miRNA, charakteryzujących się wysoką precyzją obróbki w komórkach może przynieść korzyści dla niektórych zastosowań technologii RNAi. Ocena reagentów shmiR prowadzono na podstawie analiz efektywności oraz specyficzności ich obróbki przez RNazy Drosha i Dicer oraz na podstawie analiz efektywności uwalnianych cząsteczek siRNA w wyciszaniu sekwencji docelowej.

Cele pracy były osiągane przez realizację następujących głównych zadań:

- charakterystykę jakościową oraz ilościową shRNA oraz siRNA uwalnianych z najczęściej stosowanych prekursorów nośnikowych,
- ocenę możliwości adaptacji prekursorów uwalniających homogenne miRNA w technologii RNAi (na przykładzie pri-miR-136),
- zbadanie znaczenia cech struktury reagentów shmiR dla sposobu (efektywności oraz precyzji) obróbki przez RNazy Drosha oraz Dicer,
- zbadanie znaczenia cech sekwencji nukleotydowej reagentów shmiR w pobliżu miejsc ich cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer dla efektywności oraz precyzji ich obróbki,
- sformułowanie wniosków dotyczących znaczenia uzyskanych wyników dla rozwoju wiedzy z zakresu biogenezy miRNA oraz technologii RNAi.

III. WYNIKI

1. Wstęp

Przedstawione w niniejszej pracy badania przeprowadzone były w jednolitym systemie eksperymentalnym, którego główne elementy przedstawiają się następująco:

- W badaniach wykorzystano linie komórkowe: HEK – linia embrionalnych komórek nerki (ang. Human Embryonic Kidney) oraz HeLa- linia komórek raka szyjki macicy.
- Do komórek dostarczano reagenty technologii interferencji RNA (shmiR) oraz prekursor pri-miRNA w postaci wektorów plazmidowych. Wszystkie testowane cząsteczki ulegają ekspresji pod kontrolą promotora polimerazy II RNA (CMV).
- Wektory z kasetami ekspresyjnymi dla reagentów shmiR lub cząsteczek pri-miRNA jak i syntetyczne siRNA dostarczane były do komórek na drodze lipofekcji z wykorzystaniem komercyjnego lipidu kationowego Lipofectamine 2000. Efektywność dostarczania reagentów wektorowych do komórek kontrolowana była poprzez monitorowanie ekspresji białka zielonej fluorescencji (eGFP) kodowanego przez sekwencję wektora ekspresyjnego.
- Analizy cząsteczek RNA uwalnianych w komórkach z testowanych wektorów prowadzone były po 24 godzinach od transfekcji. Do detekcji oraz identyfikacji tych cząsteczek zastosowano wysokorozdzielczą hybrydyzację typu *northern* oraz sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) z wykorzystaniem platformy Illumina/Solexa.
- Analiza efektywności wyciszania ekspresji docelowego genu przez testowane reagenty shmiR prowadzona była w systemie lucyferazowym.

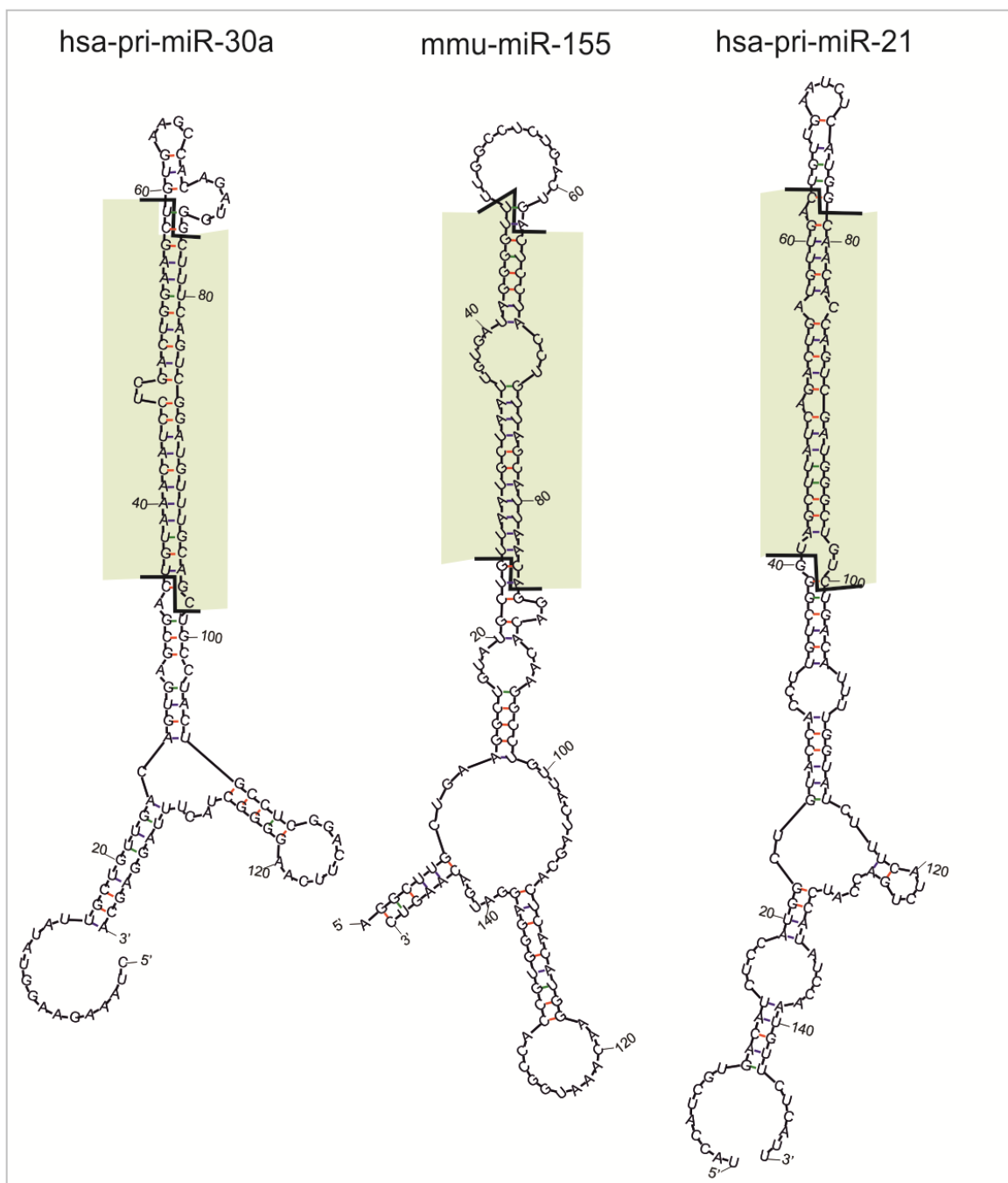
2. Opracowanie oraz optymalizacja systemu do analizy reagentów typu shmiR

2.1. Pierwotne prekursor miRNA jako nośniki siRNA w technologii RNAi

Pierwszym etapem projektowania cząsteczek typu shmiR jest wybór odpowiedniego pri-miRNA, który posłuży w komórkach jako „nośnik” dla cząsteczki siRNA. W celu zidentyfikowania pri-miRNA najczęściej wykorzystywanych do tworzenia reagentów shmiR przeprowadzono szeroki przegląd literatury.

Na podstawie zebranych informacji wybrano dwa pierwotne prekursor miRNA najczęściej wykorzystywane do wyciszania ekspresji genów w komórkach zwierzęcych: hsa-pri-miR-30a, oraz mmu-pri-miR-155. Dla porównania badano również dobrze poznany i ulegający ekspresji we wszystkich ludzkich tkankach, hsa-pri-miR-21. Prekursor ten jest rzadko wykorzystywany do konstrukcji reagentów shmiR, jednak istnieją doniesienia, że może być on dobrym nośnikiem dla cząsteczek siRNA (Yue i wsp. 2010; Huang i Jia 2013; Choi i wsp. 2015).

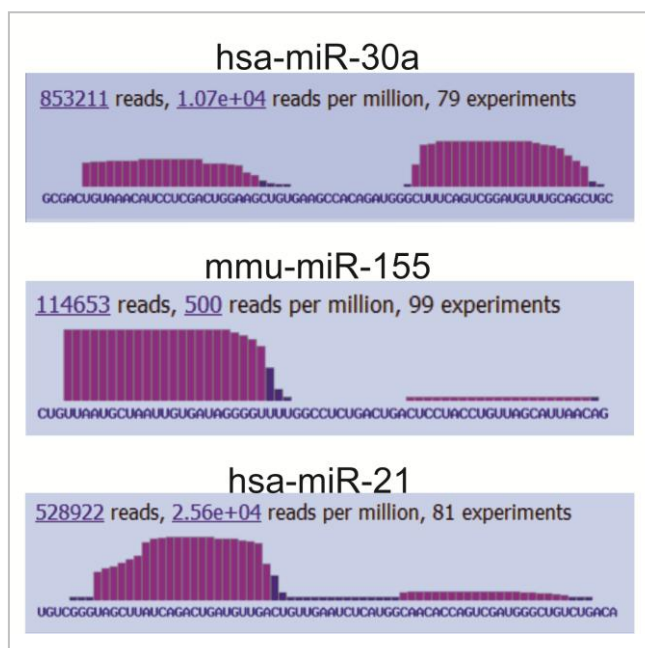
Przewidywane struktury drugorzędowe wybranych pri-miRNA przedstawiono na *Ryc. 11*. Różnią się one zarówno pod względem struktur tworzonych przez sekwencje otaczające prekursor pre-miRNA, obecności motywów strukturalnych wprowadzających lokalne rozluźnienia podwójnej helisy RNA w obrębie trzonu struktury spinki, jak i wielkości pętli terminalnej.



Ryc. 11. Przewidywane struktury przyjmowane przez pierwotne prekursor miR-30a, miR-155 oraz miR-21. Zaciemniony obszar odpowiada duplesowi miRNA/miRNA*. Zaznaczono główne miejsca cięcia przez RNazy Drosha i Dicer. Przedstawione struktury obejmują fragmenty sekwencji otaczającej strukturę pre-miRNA wystarczające do ich efektywnej obróbki.

Wstępne analizy poziomu ekspresji miRNA powstających z wybranych pri-miRNA przeprowadzono na podstawie wyników NGS zdeponowanych w bazach miRBase (v.16 i v.21) oraz deepBase (Yang i wsp. 2010a; Kozomara i Griffiths-Jones 2011). Umożliwiło to scharakteryzowanie dojrzałych cząsteczek miRNA uwalnianych z tych pri-miRNA oraz identyfikację nici wiodącej (Ryc. 12).

Ryc. 12. Ekspresja endogennych miRNA 30a, 21, oraz 155 według bazy miRBase v21. Przedstawiono wyniki NGS zdeponowane w bazie.



W przypadku hsa-miR-30a zaobserwowano duży udział nici miRNA pochodzących z obu ramion, co może wskazywać na ich funkcjonalność. Również poziom ekspresji tego miRNA jest bardzo wysoki (~ 10 tys. RPM; ang. reads per million), co może pośrednio świadczyć o efektywnej obróbce tego prekursora przez RNazy Drosha i Dicer. Wysoki poziom miRNA zaobserwowano również w przypadku hsa-miR-21 (~24 tys. RPM), jednak ze zdecydowaną przewagą miRNA uwalnianego z ramienia 5' (Ryc. 12). Podobna dominacja nici wiodącej z ramienia 5' obserwowana jest w przypadku mmu-miR-155, jednak jego poziom komórkowy jest dużo niższy (~ 0,5 tys. RPM).

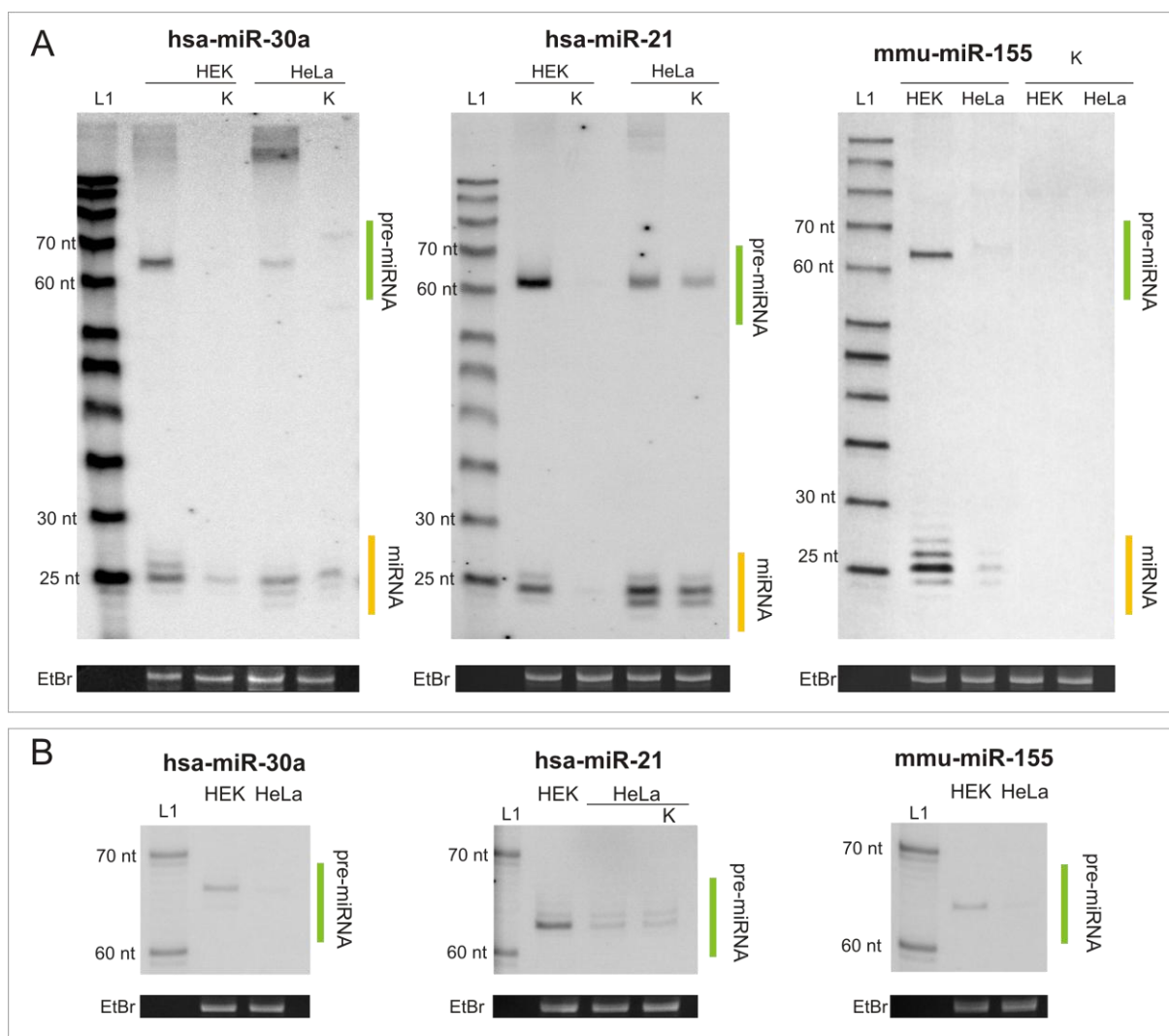
Następnym krokiem prowadzonych badań było sprawdzenie czy w wyniku nadekspresji badanych pri-miRNA w komórkach sposób ich obróbki przez RNazy Drosha i Dicer nie ulega zmianie. Jako model eksperymentalny wybrano dwie ludzkie linie komórkowe: linię HEK 293T oraz linię HeLa. Ponieważ odpowiednie skrócenie sekwencji otaczających pre-miRNA ułatwia dalsze kroki związane z konstruowaniem reagentów technologii RNAi przeprowadzono szereg przewidywań struktur cząsteczek pri-miRNA, z sekwencjami otaczającymi różnej długości. Skrócenie sekwencji otaczających pre-miRNA do około 40 nt

ze strony 5' oraz 3' zostało przeprowadzone tak aby przewidywana struktura skróconego pri-miRNA nie uległa zmianie.

Na drodze ligacji odpowiednich par oligonukleotydów (patrz Materiały i Metody) stworzono kasety ekspresyjne dla wybranych prekursorów pri-miRNA. Następnie skonstruowane kasety ekspresyjne wklonowano do dostępnego komercyjnie wektora lentiwirusowego pCDH-CMV-MCS-EF1-GFP (SBI), z którego transkrypty pri-miRNA ulegały ekspresji pod kontrolą promotora Pol II RNA(CMV).

W prowadzonych badaniach do analizy komórkowej obróbki cząsteczek RNA zastosowano dwie uzupełniające się metody: hybrydyzację typu *northern* oraz NGS. Metody te pozwalają na przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki powstających w komórkach krótkich cząsteczek RNA, dostarczając jednak odmiennych informacji. Wyniki hybrydyzacji typu *northern* z zastosowaniem radioaktywnie znakowanej sondy oligonukleotydowej oraz silnych warunków denaturujących umożliwiają wizualizację cząsteczek prekursorów jak i dojrzałych miRNA lub siRNA z jednonukleotydową rozdzielczością (Koscińska i wsp. 2011b). Dostarczają one jednak informacji na temat długości obserwowanych produktów bez możliwości wyszczególnienia ile wariantów np. miRNA o nieznacznie przesuniętej sekwencji (ale wciąż zachowanej długości) migruje w żelu w postaci jednego prążka. Taką informację dostarcza natomiast metoda NGS krótkich RNA, umożliwiającą określenie sekwencji powstających cząsteczek miRNA lub siRNA oraz przeprowadzenie analizy ilościowej. Wyniki tej metody nie zawierają jednak informacji o powstających w komórkach prekursorach pre-miRNA.

Wyniki hybrydyzacji typu *northern* na materiale po nadekspresji pri-miRNA w komórkach HEK i HeLa wykazały różne poziomy prekursorów pre-miRNA powstających z testowanych konstruktów oraz niejednorodność uwalnianych cząsteczek miRNA (Ryc. 13A). Wykrywane w tej analizie produkty odpowiadały wariantom miRNA obserwowanym w wynikach NGS (Ryc. 12). Wysokorozdzielcza analiza prekursorów pre-miRNA (Ryc. 13B) wykazała ich dużą homogenność. Jedynie w przypadku miR-21 obserwowano niewielki udział dodatkowych wariantów pre-miRNA. Prekursory endogennych miRNA w materiale z komórek kontrolnych ulegały ekspresji na znacznie niższym poziomie i były wykrywane tylko w przypadku pri-miR-21.



Ryc. 13. Badanie efektów obróbki pri-miRNA przez RNazy Drosha i Dicer po nadekspresji w komórkach HEK oraz HeLa. **A-** prekursorzy pre-miRNA powstałe w wyniku cięcia pri-miRNA przez RNazę Drosha oraz cząsteczki siRNA powstałe w wyniku cięcia prekursorów pre-miRNA przez RNazę Dicer. **B-** analiza typu northern dla prekursorów pre-miRNA; L1 - marker wielkości RNA. K – kontrolne RNA z komórek nietraktowanych

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono zmian w sposobie uwalniania dojrzałych miRNA, wynikających ze skrócenia sekwencji otaczających pre-miRNA. Potwierdzono, że w systemie nadekspresji pri-miRNA pula uwalnianych krótkich cząsteczek RNA jest podobna pod względem jakościowym do wariantów miRNA obserwowanych w naturze. Podwyższeniu ulega jedynie poziom uwalnianych cząsteczek miRNA, co ułatwia ich detekcję oraz dalszą analizę.

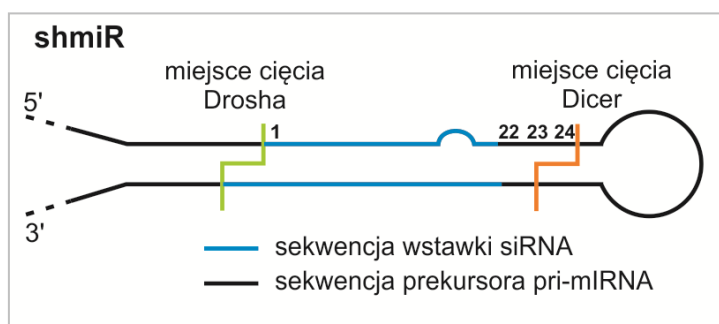
2.2. Projektowanie reagentów shmiR

W tej części pracy podjęto badania mające na celu opracowanie systemu, umożliwiającego porównawczą charakterystykę wybranych pri-miRNA pod kątem konstrukcji cząsteczek shmiR. Jak wspomniano już wcześniej analizowane konstrukty posiadały skrócone sekwencje otaczające pre-miRNA o długościach przedstawionych w *Tabela 3*.

Tabela 3. Stosowane w reagentach shmiR długości sekwencji otaczających.

| długość sekwencji otaczającej | 5' | 3' |
|-------------------------------|-------|-------|
| pri-miR-30a | 35 nt | 40 nt |
| pri-miR-155 | 24 nt | 64 nt |
| pri-miR-21 | 40 nt | 50 nt |

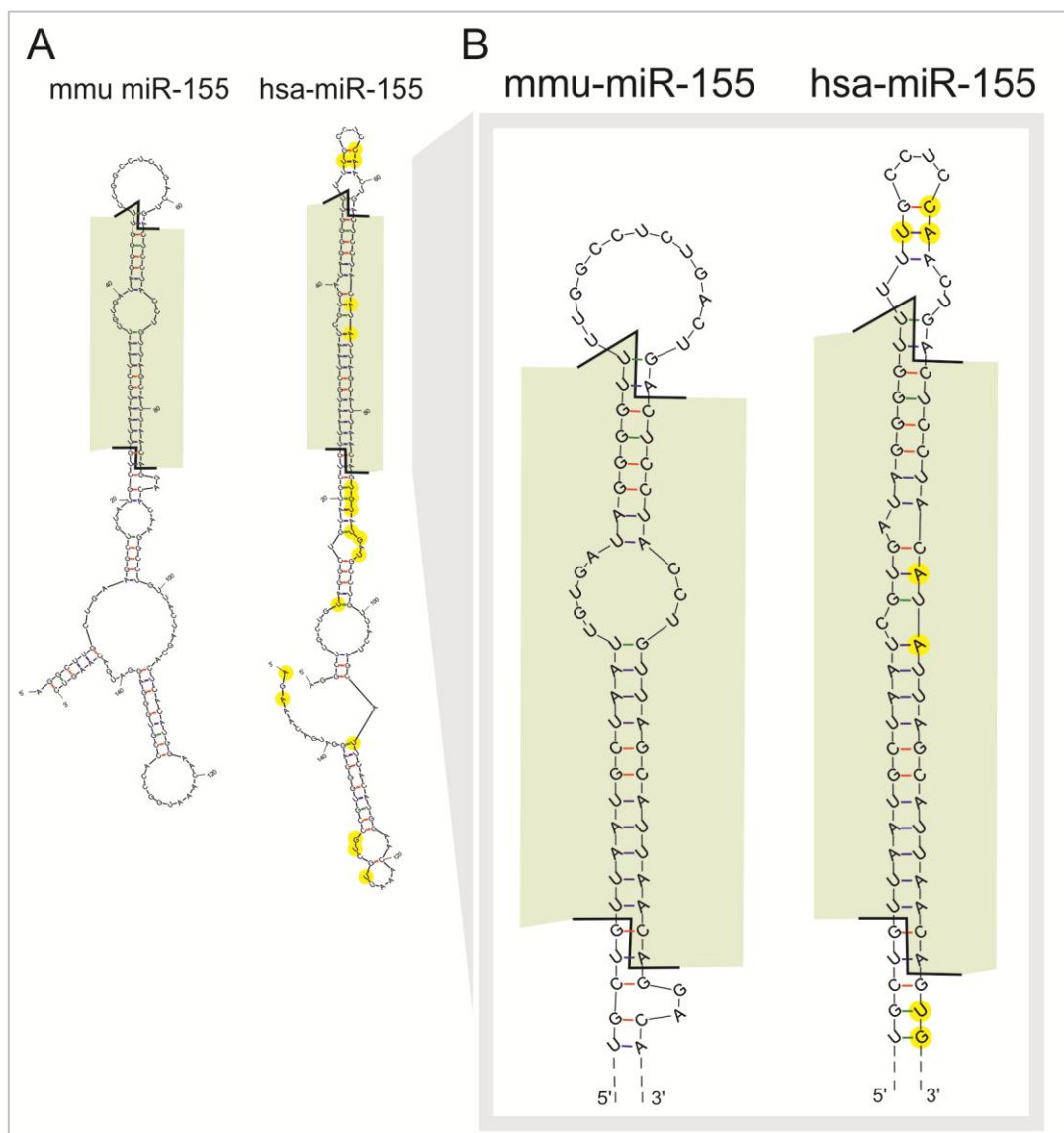
Wyniki NGS oraz doniesienia literaturowe wskazują na większą homogenność końców 5' niż 3' miRNA (Landgraf i wsp. 2007; Morin i wsp. 2008; Warf i wsp. 2011) oraz na większą precyzję cięcia przez RNazę Drosha niż Dicer (Calabrese i wsp. 2007). Z tego względu w dalszej części badań skupiono się na cząsteczkach posiadających nić wiodącą wprowadzoną do ramienia 5' reagentów shmiR, tak aby koniec 5' nici wiodącej siRNA generowany był przez RNazę Drosha. Naturalne sekwencje miRNA uwalniane z analizowanych prekursorów w wielu przypadkach są dłuższe (23 do 24 nt) niż standardowe 21-nt cząsteczki siRNA. Dodatkowo sekwencje siRNA bardzo często posiadają tylko 19 nt komplementarnych z sekwencją docelową z dołączonym dwukleotydem TT lub UU na końcu 3'. Z tego względu w stosowanym podejściu do pri-miRNA wprowadzano 21 nt sekwencje siRNA komplementarne do sekwencji docelowej. Pierwszy nukleotyd siRNA wprowadzany był w pierwszej pozycji miRNA natomiast brakujące nukleotydy w pozycji 22, 23 i/lub 24 pozostawiane były niezmienione w stosunku do wyjściowej sekwencji prekursora (*Ryc. 14*). Wyjątek stanowiły przypadki, w których konieczne było wprowadzenie zmian w celu zachowania oryginalnej struktury prekursora nośnikowego (shmiR-21-luc, HD1).



Ryc. 14. Ulokowanie siRNA w reagentach shmiR

2.3. Charakterystyka mysiego i ludzkiego pri-miR-155

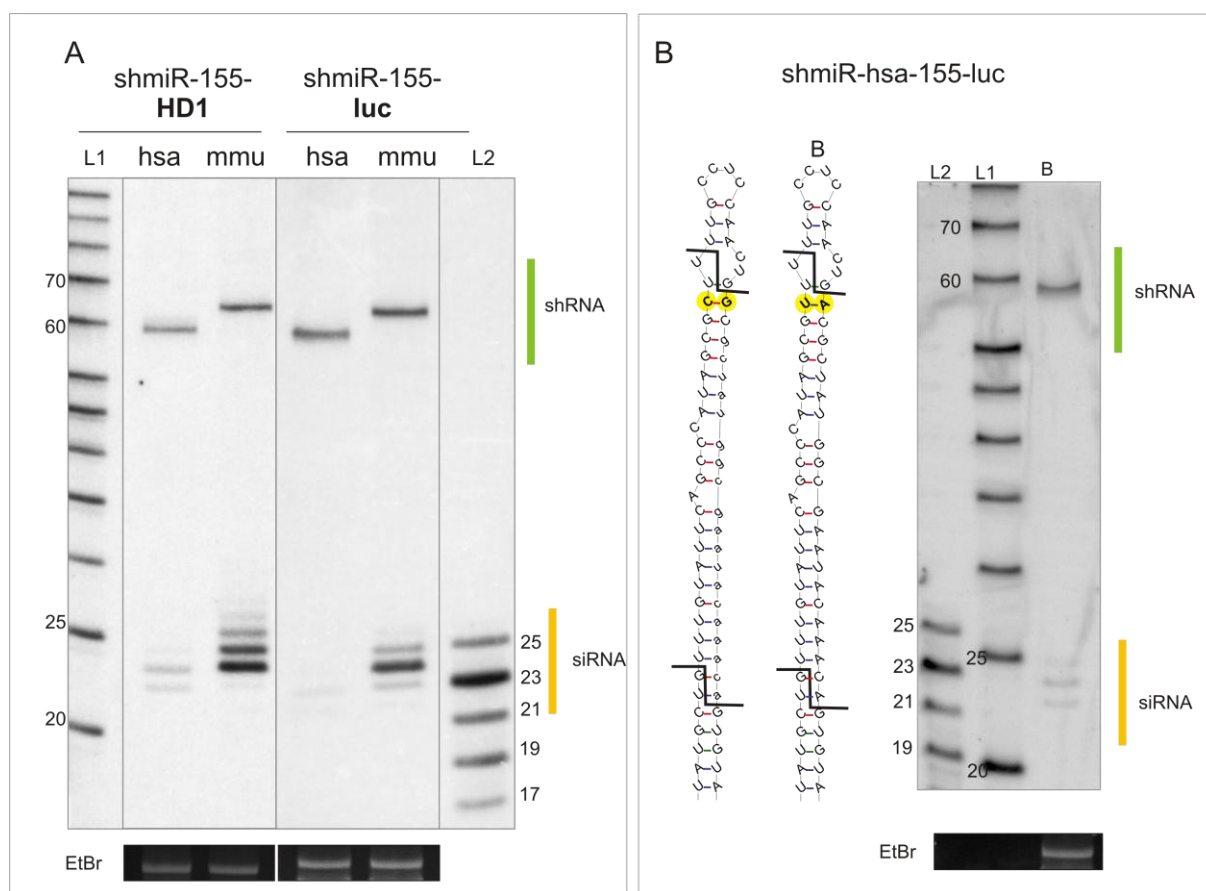
Wśród wybranych, najczęściej stosowanych pri-miRNA wykorzystywanych do konstrukcji reagentów shmiR znalazł się pri-miR-155. Co ciekawe, najczęściej opisywany w literaturze jest jego mysy odpowiednik, jednak istnieją doniesienia o efektywnym funkcjonowaniu hsa-miR-155 jako nośnika do ekspresji siRNA w komórkach (Terasawa i wsp. 2010). W ramach niniejszej pracy porównano oba ortologi pri-miR-155 w komórkach ludzkich. Obydwa prekursorzy hsa-pri-miR155 oraz mmu-pri-miR-155 uwalniają w komórkach miRNA o identycznej sekwencji nukleotydowej, posiadają natomiast różnice w sekwencji w nici pasażerskiej, pętli terminalnej oraz w sekwencjach otaczających prekursor (zaznaczone kolorem żółtym na rycinie) (Ryc. 15A oraz B).



Ryc. 15. Porównanie przewidywanej struktury mysiego oraz ludzkiego pri-miR-155. **A** – Struktury pri-miRNA wykorzystywanych do tworzenia reagentów shmiR. **B** - Powiększona sekwencja pre-miRNA. Kolorem żółtym zaznaczono nukleotydy różniące się w ludzkim ortologu w stosunku do mysiego. Zacieniony obszar odpowiada dojrzałemu dupleksowi miRNA/miRNA *

Konsekwencją różnej sekwencji nukleotydowej są zmiany w przewidywanej strukturze drugorzędowej tych pri-miRNA. Różnice występują nie tylko w obrębie pętli terminalnej oraz sekwencji otaczających ale również w obrębie trzonu struktury spinki.

W kolejnym kroku do obydwu cząsteczek pri-miR-155 wprowadzono sekwencje siRNA-HD1 oraz siRNA-luc tworząc odpowiednio reagenty shmiR-hsa-155-HD1 i shmiR-hsa-155-luc oraz shmiR-mmu-155-HD1 i shmiR-mmu-155-luc. Następnie, po ekspresji reagentów w komórkach HEK porównano efektywność ich obróbki (Ryc. 16A).



Ryc. 16 Porównanie obróbki reagentów shmiR wykorzystujących ludzki oraz mysiej pri-miRNA-155.

A-Ekspresja siRNA –HD1 oraz siRNA-luc z dwóch wersji pri-miR-155 (wyniki hybrydyzacji typu northern), **B**- Próba poprawy wydajności obróbki reagenta shmiR-hsa-155-luc. Druga wersja reagenta (**B**) shmiR-hsa-155-luc ze zmienioną sekwencją w miejscu cięcia przez RNazę Dicer. Czarna linią zaznaczono przewidywane miejsca cięcia przez RNazy. Przewidywane miejsce cięcia przez Dicer zostało przesunięte w kierunku pętli terminalnej na podstawie długości uwalnianych z wersji reagenta B produktów siRNA. L1 oraz, L2 - markery wielkości RNA.

Wyniki przeprowadzonej analizy pokazały, że we wszystkich analizowanych przypadkach obróbka reagentów shmiR na etapie cięcia przez RNazę Drosha zachodziła efektywnie. Jednak sygnały odpowiadające pre-miRNA różniły się zauważalnie

intensywnością. Prekursory shRNA cząsteczek wykorzystujących ludzki pri-miRNA wykazywały szybszą migrację elektroforetyczną związaną z przewidywaną 4nt różnicą długości (*Ryc. 16B* oraz *Materiały i Metody Ryc. 53*). Większy udział produktów shRNA powstających z mysiego pri-miRNA może świadczyć o pozytywnym wpływie rozluźnienia struktury w obrębie miejsca cięcia przez RNazę Drosha na jej aktywność (*Ryc. 15B*).

Znaczne różnice zaobserwowano na etapie efektywności obróbki cząsteczek przez RNazę Dicer. Obserwowano silne, heterogenne sygnały pochodzące od siRNA uwalnianych z mysiego pri-miRNA i słabo wykrywalne sygnały siRNA uwalnianych z ludzkiego ortologu. Większa heterogenność siRNA-HD1 niż siRNA-luc uwalnianych z mmu-pri-miR-155 może być spowodowana obecnością pary U:A przerywającej ciąg pięciu par G:C w pobliżu miejsca cięcia przez RNazę Dicer (*Materiały i Metody Ryc. 53*).

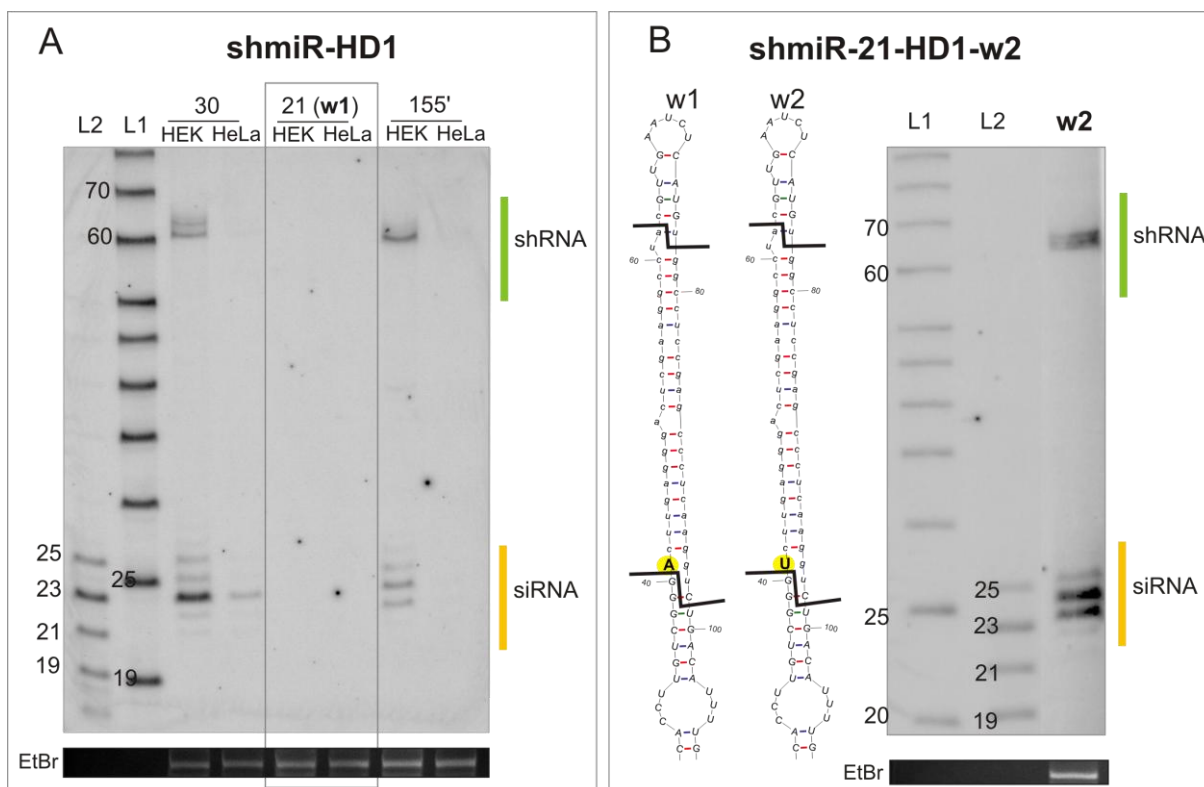
Dla reagenta shmiR-hsa-155-luc podjęto próbę poprawienia wydajności jego komórkowej obróbki. Stworzono dodatkowy konstrukt (shmiR-hsa-155-luc-B) z wprowadzoną zmianą sekwencji nukleotydowej w pobliżu miejsca cięcia przez RNazę Dicer, tak aby upodobnić cząsteczkę shmiR do endogennego prekursora miRNA (*Ryc. 16B*). Zmieniono parę C:G na „słabszą” parę U:A w miejscu cięcia przez RNazę Dicer. Zastosowana modyfikacja poprawiła efektywność obróbki reagenta w komórkach na etapie cięcia przez RNazę Dicer, jednak w porównaniu do wersji mysiej uwalniane siRNA pozostawały nadal na niskim poziomie (*Ryc. 16B*).

Wyniki przeprowadzonej analizy wykazały, że zastosowanie mmu-pri-miR-155 w ludzkich komórkach daje większe szanse na uzyskanie reagentów shmiR efektywnie uwalniających cząsteczki siRNA. Na podstawie otrzymanych wyników do dalszej części badań wybrano mysiego prekursora mmu-pri-miR-155. Obserwowana poprawa efektywności obróbki reagenta shmiR-hsa-155-lucB po zmianie sekwencji w miejscu cięcia przez RNazę Dicer, jak również różnice obserwowane pomiędzy reagentami shmiR-mmu-155 mogą sugerować, że sekwencja nukleotydowa może mieć wpływ na efektywność powstawania cząsteczek siRNA w komórkach.

2.4. Konstrukcja trzech serii reagentów shmiR różniących się typem pri-miRNA

W celu dokonania charakterystyki reagentów shmiR skonstruowano trzy serie cząsteczek (wykorzystujących różne nośnikowe pri-miRNA) z trzema różnymi sekwencjami siRNA zastępującymi endogenny dupleks miRNA/miRNA*. Sekwencje siRNA wybrano kierując się głównie ich wysoką efektywnością wyciszania sekwencji docelowej po ich podaniu do komórek w postaci syntetycznych cząsteczek (Moses i wsp. 2010; de Mezer i wsp. 2011). Wytypowane siRNA posiadają sekwencje docelowe w genie lucyferazy (siRNA-luc) oraz w genie huntingtyny (siRNA-HD1 oraz siRNA-HD2), różnią się natomiast sekwencją nukleotydową oraz zawartością par G:C.

Badając serię reagentów zawierających sekwencję siRNA-HD1 metodą *northern blot*, nie zaobserwowano produktów obróbki niektórych cząsteczek (Ryc. 17A). W przypadku reagenta shmiR-21-HD1 (w1) nie obserwowano ani dociętego prekursora shRNA ani dojrzałych cząsteczek siRNA, co mogło być spowodowane zahamowaniem jego obróbki już na etapie cięcia przez RNazę Drosha.



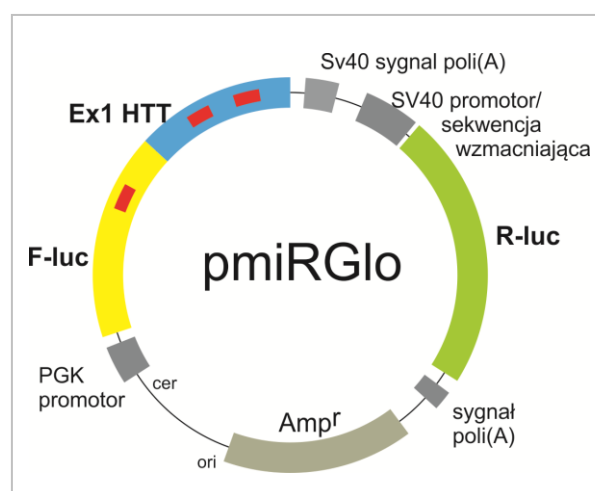
Ryc. 17. Obróbka serii reagentów shmiR z siRNA-HD1 analizowana metodą northern blot. A-komórkowa obróbka reagentów shmiR-30a-HD1, shmiR-21-HD1-w1, shmiR-155-HD1. Zaznaczona cząsteczka shmiR-21-HD1-W1 (wersja pierwsza) wykazująca bardzo niską efektywność cięcia. B- Efektywna obróbka drugiej wersji (w2) reagenta shmiR-HD1 ze zmienionym miejscem cięcia dla RNazy Drosha. L1 oraz, L2 - markery wielkości RNA.

Aby poprawić efektywność komórkowej obróbki reagenta shmiR-21-HD1, stworzono jego drugą wersję (w2) zawierającą substytucję nukleotydową w miejscu cięcia przez RNazę Drosha (Ryc. 17B). W endogennym pri-miR-21 występuje w tym miejscu niekanoniczna para nukleotydowa typu „wobble” (G:U), a w wyjściowym reagencie shmiR (w1) wprowadzona została niekanoniczna para A:G. Zastosowany w wariacie drugim (w2) reagenta shmiR powrót do pary G:U odtwarza sekwencję miejsca cięcia wyjściowego prekursora pri-miR-21. Analiza *northern blot* pokazała, że komórkowa obróbka reagenta shmiR-21-luc-w2 uległa znacznej poprawie. Zaobserwowano zarówno produkty cięcia przez RNazę Drosha jak i Dicer. Na podstawie uzyskanych wyników reagent shmiR-21-HD1-w2 został wykorzystany w dalszych badaniach opisanych w niniejszej pracy.

Podsumowując, podobnie jak w przypadku substytucji w miejscu cięcia przez RNazę Dicer, w przypadku poprawy efektywności cięcia reagenta shmiR-155-lucB opisanego w poprzednim rozdziale tak i zmiana sekwencji w miejscu cięcia przez RNazę Drosha doprowadziła do zwiększenia wydajności obróbki reagenta shmiR. Jest to kolejna przesłanka o potencjalnym znaczeniu sekwencji nukleotydowej w miejscu cięcia reagentów RNAi, tym razem przez RNazę Drosha.

2.5. Opracowanie systemu eksperymentalnego do badania efektywności działania reagentów shmiR

W celu sprawdzenia funkcjonalności testowanych cząsteczek shmiR zaadaptowano system lucyferazowy. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowych HEK 293T oraz HeLa. W badaniach wykorzystano komercyjny wektor pmiR-Glo (Promega), zawierający sekwencje genów lucyferazy, pochodzących z organizmów Firefly (*Photinus pyralis*) oraz Renilla (*Renilla reniformis*). W wektorze tym, sekwencję docelową dla testowanych cząsteczek umieszcza się bezpośrednio za genem lucyferazy firefly, natomiast produkt genu lucyferazy renilla wykorzystywany jest jako kontrola wewnętrzna. Na potrzeby prowadzonych badań do wektora pmiRGlo wklonowano pierwszy egzon genu huntingtyny zawierający sekwencje docelowe dla siRNA-HD1 oraz siRNA-HD2. Cząsteczki shmiR uwalniające siRNA-luc posiadają sekwencję docelową w obrębie genu lucyferazy firefly (Ryc. 18). Przeprowadzono optymalizację procesu kotransfekcji komórek dwoma plazmidami dotyczącą zarówno ilości wprowadzanych wektorów jak i proporcji wektora shmiR do wektora pmiRGlo (patrz Materiały i Metody).



Ryc. 18. Wektor lucyferazowy do testowania efektywności cząsteczek shmiR. Kolorem czerwonym zaznaczono miejsca docelowe dla testowanych siRNA.

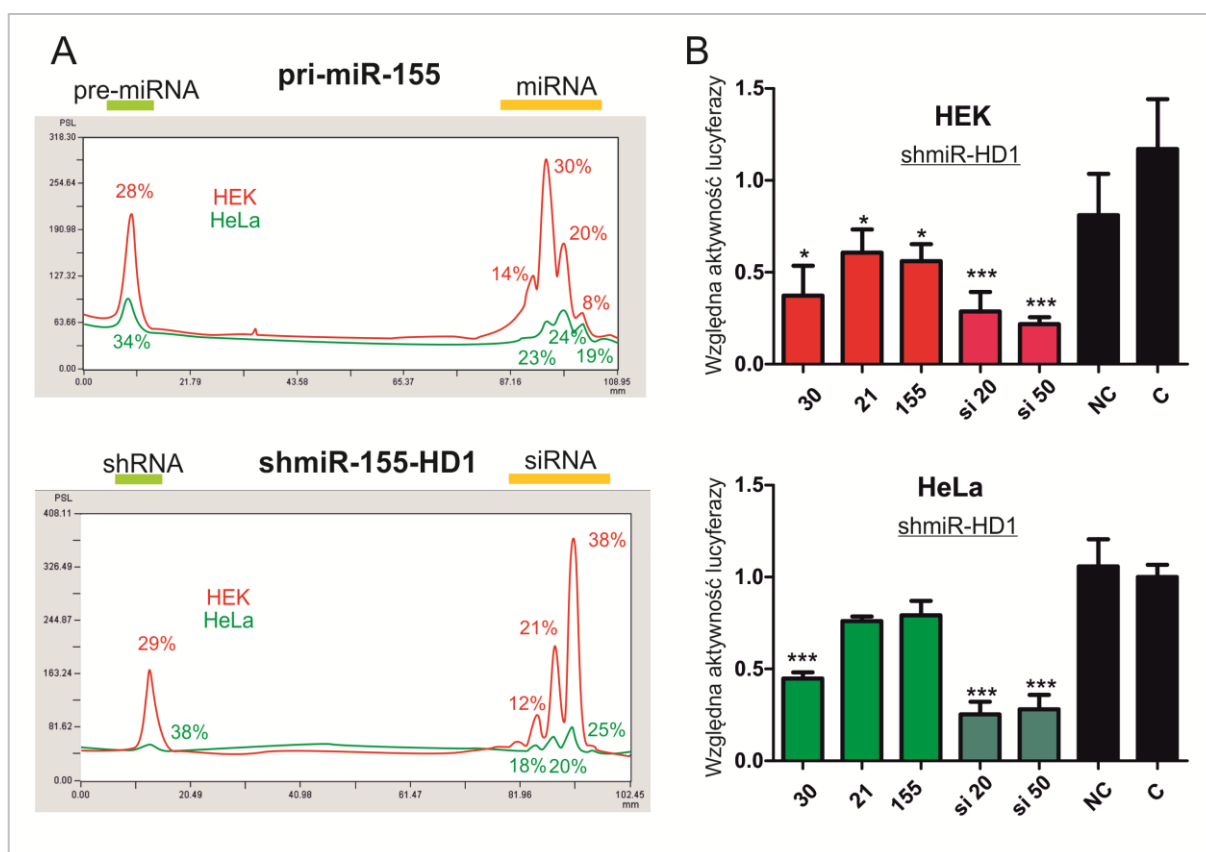
Przeprowadzone analizy pokazały, że cząsteczki siRNA uwalniane z reagentów shmiR efektywnie działają w komórkach i mogą osiągać poziomy wyciszenia zbliżone do syntetycznych cząsteczek siRNA.

2.6. Wybór linii komórkowej do badania reagentów shmiR

Końcowym etapem opracowania systemu do charakterystyki reagentów shmiR był wybór odpowiedniej linii komórkowej. W przedstawionych powyżej badaniach stosowano standardowo wykorzystywane w biologii molekularnej linie komórkowe HEK 293T oraz komórki HeLa.

W celu porównania wyników uzyskanych z zastosowaniem obu linii komórkowych przeprowadzono analizę intensywności sygnałów wykrywanych w hybrydyzacji typu *northern*, a odpowiadających różnym etapom komórkowej obróbki testowanych cząsteczek.

Zaobserwowano, że profile sygnałów pochodzących od produktów poszczególnych etapów cięcia prekursorów w obydwu liniach komórkowych są podobne natomiast różnią się intensywnością (Ryc. 19A).



Ryc. 19. Porównanie poziomów i efektywności działania reagentów shmiR w liniach komórkowych HEK oraz HeLa.

A-intensywności sygnałów obserwowanych w wynikach hybrydyzacji typu *northern* dla *mmu-pri-miR-155* oraz dla *shmiR-mmu-155-HD1* (udział procentowy intensywności sygnałów wyliczony na podstawie średniej z trzech powtórzeń). **B-** analiza efektywności działania reagentów shmiR w systemie lucyferazowym w testowanych liniach komórkowych HEK oraz HeLa. Reagenty zawierają siRNA-HD1 uwalniane z trzech różnych prekursorów nośnikowych (*pri-miR-30a*, *pri-miR-21* oraz *pri-miR-155*). Zastosowano ilości wektorów shmiR do wektora *pmiRGlo* w stosunku 3:1. Syntetyczne siRNA stosowano w dwóch stężeniach 20nM oraz 50nM, NC - pusty wektor ekspresyjny, C-kontrola nietraktowana.

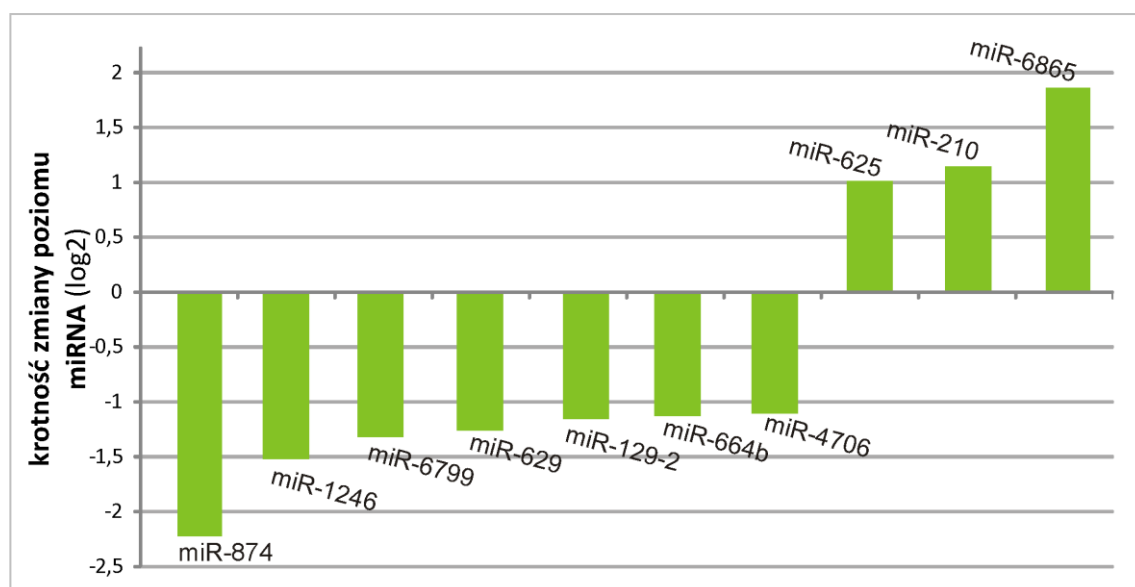
Przeprowadzono również analizy porównawcze efektywności działania reagentów w testowanych liniach komórkowych. W obydwu przypadkach profile efektywności reagentów były podobne, natomiast niewielkie różnice dotyczyły stopnia wyciszenia genów docelowych (*Ryc. 19B*).

Obserwowane różnice pomiędzy liniami komórkowymi mogą wynikać z wielu czynników, takich jak: tempo wzrostu i podziału komórek, efektywność transfekcji oraz różnice w poziomie ekspresji białek zaangażowanych w analizowane procesy.

W związku z wyraźnie niższą efektywnością obróbki reagentów sh-miR w komórkach HeLa do dalszych analiz wybrano komórki linii HEK 293T.

2.7. Wpływ ekspresji reagentów shmiR na poziom endogennych miRNA

Reagenty shmiR po ekspresji w komórce włączają się do endogennego szlaku biogenezy miRNA na jego najwcześniejszym etapie. Wykorzystują one do swojej obróbki komórkową maszynę białkową i konkurują o dostęp do niej z endogennymi prekursorami miRNA. W celu sprawdzenia w jakim stopniu ekspresja reagentów shmiR prowadzi do wysycenia białek zaangażowanych w ich obróbkę, a w konsekwencji w jakim stopniu poziomy endogennych miRNA ulegają deregulacji sprawdzono profile ekspresji miRNA w komórkach po podaniu reagentów shmiR. Przeprowadzono profilowanie ekspresji znanych miRNA z wykorzystaniem technologii NGS. Porównano profile miRNA po podaniu reagentów shmiR w stosunku do nietraktowanych komórek HEK. Największe, istotne statystycznie zmiany w poziomie ekspresji obserwowano dla 10 miRNA (Ryc. 20).



Ryc. 20. Analiza endogennych miRNA, których poziom ekspresji uległ zmianie po podaniu reagentów shmiR. Obserwowane zmiany podane w skali log2.

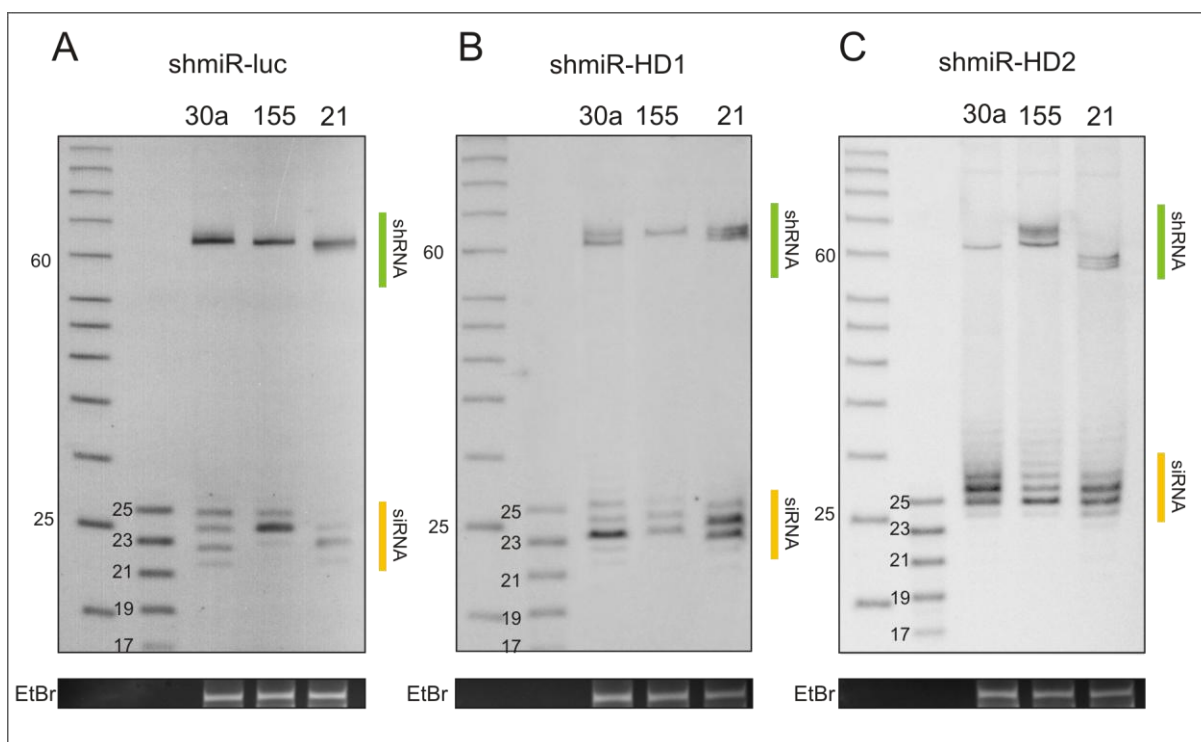
Poziom siedmiu miRNA uległ obniżeniu (od ~2 do ponad 4 razy) podczas gdy poziom trzech miRNA uległ podwyższeniu (2 do prawie 4 razy). W większości są to miRNA o nieznannej funkcji. Jednym z miRNA, którego poziom uległ podwyższeniu jest miR-210, który pełni rolę w warunkach stresowych związanych z hipoksją.

Wyniki tej analizy pokazały, iż ekspresja reagentów shmiR nie prowadzi do globalnych zaburzeń w ekspresji endogennych miRNA, przez co nie ingeruje w znaczący sposób w komórkowe ścieżki regulacji ekspresji genów.

3. Charakterystyka reagentów shmiR wykorzystujących najczęściej stosowane pri-miRNA

3.1. Analiza obróbki reagentów shmiR i charakterystyka uwalnianych siRNA

W pierwszym etapie charakterystyki reagentów shmiR postanowiono sprawdzić czy z różnych nośnikowych pri-miRNA powstają takie same produkty siRNA. W tym celu stworzono zestaw cząsteczek shmiR jak opisano we wcześniejszym rozdziale. Zestaw ten składał się z trzech serii reagentów wykorzystujących nośnikowe pri-miRNA: hsa-pri-miR-30a, mmu-pri-miR-155 oraz hsa-pri-miR-21 z trzema różnymi sekwencjami siRNA (luc, HD1 oraz HD2). Analiza obróbki tych serii reagentów przez komórkowe RNazy Drosha oraz Dicer wykazała, że uwalniane pule cząsteczek różnią się stopniem oraz wzorem heterogenności (Ryc. 21).



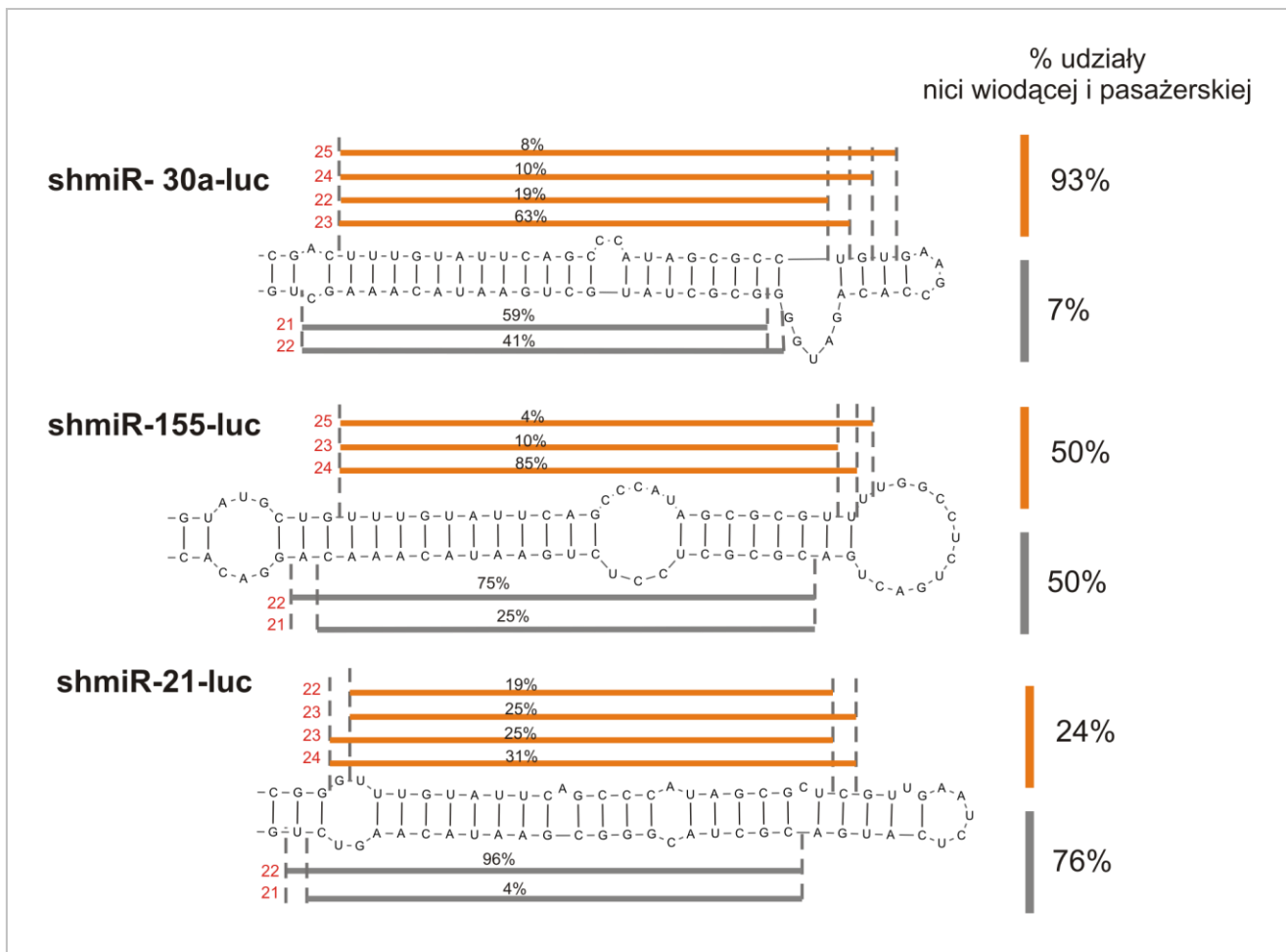
Ryc. 21. Analiza komórkowej obróbki testowanych reagentów shmiR metodą hybrydyzacji typu northern. Panele przedstawiają wyniki obróbki reagentów shmiR z sekwencjami siRNA A-luc, B-HD1, C-HD2. L1 oraz, L2 - markery wielkości RNA. Zastosowana sonda wykrywa nić wiodącą uwalnianą z ramienia 5' prekursora. EtBr- kontrola ilości nałożonego materiału RNA- barwienie bromkiem etydy.

Zaobserwowano różnice w długości powstających produktów już na etapie cięcia reagentów shmiR przez RNazę Drosha jak i w kolejnym etapie przez RNazę Dicer. Obserwowano różnice jakościowe w przypadku obróbki tej samej sekwencji siRNA uwalnianej z różnych pri-miRNA, a także zmiany zarówno jakościowe jak i ilościowe przy uwalnianiu różnych siRNA z tego samego pri-miRNA.

W przypadku reagentów shmiR-30a-HD1, shmiR-21-HD1, shmiR-155-HD2 oraz shmiR-21-HD2 obserwowano heterogenność już na etapie prekursorów shRNA powstających w wyniku cięcia przez RNazę Drosha (Ryc. 21). Niejednorodność prekursorów shRNA może bezpośrednio wpływać na zwiększenie końcowej różnorodności uwalnianych cząsteczek siRNA. W przypadku shmiR-30a-luc zaobserwowano bardzo heterogenną pulę uwalnianych siRNA, bez wyraźnej przewagi żadnego z wariantów długości. Natomiast w przypadku uwalniania innej cząsteczki siRNA z tego samego nośnikowego pri-miRNA (reagent shmiR-30a-HD1) jeden z wariantów siRNA powstawał w zdecydowanej przewadze. Wyniki te (łącznie z wynikami uzyskanymi dla shmiR-30a-HD2) pokazują, że reagenty shmiR stworzone z wykorzystaniem tego samego pri-miRNA, a niosące inną sekwencję siRNA mogą ulegać obróbce w komórkach w różny sposób, co wpływa na powstawanie puli cząsteczek siRNA o różnych długościach jak i wzorach heterogenności. Podobny efekt zróżnicowania puli uwalnianych cząsteczek zaobserwowano dla serii reagentów z sekwencją siRNA-luc (shmiR-30a-luc, shmiR-155-luc oraz shmiR-21-luc) uwalnianą z różnych nośników pri-miRNA. Zaobserwowano również wysoki stopień heterogenności siRNA-HD2 uwalnianego ze wszystkich stosowanych nośnikowych pri-miRNA. Przedstawione wyniki sugerują, że specyficzna kombinacja nośnikowego pri-miRNA oraz wstawki siRNA wpływa na sposób obróbki reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer.

Aby lepiej scharakteryzować produkty siRNA uwalniane z reagentów shmiR wykorzystano technologię NGS krótkich cząsteczek RNA. Analizie poddano grupę reagentów shmiR, z sekwencją siRNA-luc, uwalnianą z trzech różnych nośnikowych pri-miRNA. Reagenty z tej grupy w analizie typu *northern* wykazywały znaczne różnice we wzorach uwalnianych cząsteczek siRNA (Ryc. 21A) Dzięki wynikom NGS określono sekwencję nukleotydową uwalnianych cząsteczek siRNA i ich wzajemne proporcje. Umożliwiło to również określenie miejsc cięcia analizowanych reagentów shmiR przez RNazy Drosha i Dicer.

Analiza NGS wykazała w tym przypadku obecność takiej samej liczby wariantów siRNA jaką obserwowano w analizie *northern blot* (Ryc. 22). Pewne różnice dotyczyły jedynie proporcji pomiędzy wykrywanymi produktami.



Ryc. 22. Wyniki analizy NGS dla serii reagentów shmiR uwalniających siRNA-luc. Pomarańczowym kolorem oznaczono warianty nici wiodących siRNA uwalniane z ramienia 5' prekursora. Kolorem szarym oznaczono nici pasażerskie. W kolorze czerwonym, po lewej stronie każdego wariantu siRNA podana jest jego długość w nukleotyдах. Udziały poszczególnych wariantów siRNA wyrażone zostały w procentach, 100% stanowią wszystkie siRNA powstające z jednego ramienia 5' lub 3'. Wartości procentowe nie oddają wzajemnej relacji siRNA pochodzących z różnych ramion prekursora. Z prawej strony struktur podano proporcję uwalniania nici z obu ramion, kolorem pomarańczowym dla zakładanych nici wiodących oraz szarym dla pasażerskich.

W przypadku analizy typu *northern* dla reagenta shmiR-30a-luc wykryto cztery warianty uwalnianych siRNA występujące w podobnych ilościach. Natomiast wyniki NGS wykazały również obecność czterech różnych wariantów uwalnianych siRNA (22-25 nt) jednak ze znaczną przewagą cząsteczki długości 23 nt (63% wszystkich uwalnianych siRNA

z ramienia 5'). Takie rozbieżności mogą wynikać z różnic w zdolności stosowanych metod do pokazywania relacji ilościowych zwłaszcza, że metoda *northern blot* nie jest metodą typowo ilościową. Wyniki NGS pokazały również, że reagent shRNA-155-luc uwalnia w komórkach trzy warianty siRNA (23-25 nt) różniące się na końcu 3'. Główny wariant długości 24 nt stanowi 85% siRNA uwalnianych z ramienia 5' tego prekursora. W przypadku shmiR-21-luc w NGS wykryto dwa warianty siRNA długość 23 nt, których sekwencja przesunięta jest o jeden nukleotyd i stanowią razem 50% siRNA uwalnianych z ramienia 5' i wykrywane są metodą *northern blot* jako jeden główny produkt (Ryc. 21A i Ryc. 22). Wykorzystanie analiz NGS umożliwiło zatem obserwację różnych wariantów siRNA tej samej długości, których rozróżnienie nie jest możliwe za pomocą hybrydyzacji typu *northern*, gdyż produkty takie migrują podczas elektroforezy z taką samą prędkością i wykrywane są jako jeden prążek w żelu.

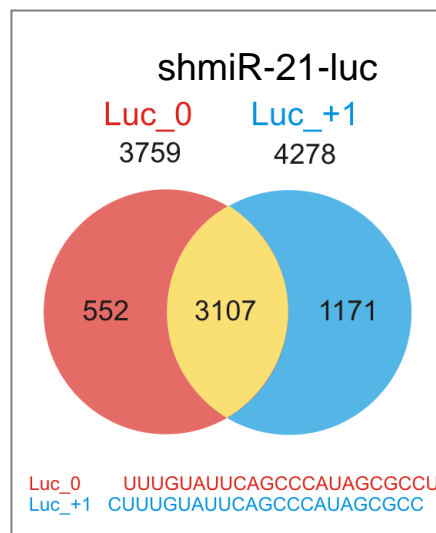
Dwa z trzech analizowanych reagentów shmiR podlegały precyzyjnemu cięciu przez RNazę Droscha, w wyniku którego wszystkie powstające cząsteczki siRNA posiadały taki sam koniec 5'. Reagent shmiR-21-luc jako jedyny z analizowanych metodą NGS wykazał uwalnianie siRNA z heterogennym końcem 5'. Nieco więcej niż połowę spośród wykrytych wariantów uwalnianych z ramienia 5' tego reagenta stanowią siRNA posiadające koniec 5' przesunięty o jeden nukleotyd w kierunku 5' (dwa warianty 23 nt oraz 24 nt). Obserwowana duża heterogenność końców 3' siRNA, uwalnianych z ramienia 5' prekursora wskazuje na powiększenie puli uwalnianych cząsteczek siRNA w wyniku nieprecyzyjnego cięcia shRNA przez RNazę Dicer.

Przesunięcie końca 5' cząsteczek siRNA wiąże się ze zmianą regionu źródłowego cząsteczki (ang. seed region) i może powodować zwiększone ryzyko wywoływania efektów niespecyficznych typu *off-target*. Oprócz efektywnego wyciszenia ekspresji docelowych genów, siRNA mogą również uczestniczyć w regulacji ekspresji innych genów, do których sekwencji wykazują częściową komplementarność. Wprowadzenie każdej cząsteczki siRNA obarczone jest zatem ryzykiem wywołania niepożądanych efektów ubocznych, a liczba genów regulowanych przez siRNA zależna jest od jego sekwencji.

Z wykorzystaniem oprogramowania siSPOTR, służącego do przewidywania genów potencjalnie regulowanych przez siRNA przeprowadzono analizę zarówno dla standardowej sekwencji siRNA-luc jak i dla siRNA z przesuniętą o jeden nukleotyd sekwencją (+1) regionu źródłowego (Ryc. 23). Wyniki tej analizy pokazują, że obie cząsteczki posiadają od około 3,7 do 4,3 tysięcy potencjalnie regulowanych genów, z czego 3,1 tys. wspólnych. Zatem pojawienie się dodatkowego wariantu siRNA ze zmienionym końcem 5' może być związane

ze znacznie zwiększoną (o ~30%) liczbą regulowanych genów. Podobny efekt występuje najprawdopodobniej również dla cząsteczek shmiR-30a-HD1, shmiR-21-HD1, shmiR-155-HD2 oraz shmiR-21-HD2, dla których obserwowano wyraźną różnorodność shRNA generowanych przez RNazę Drosha.

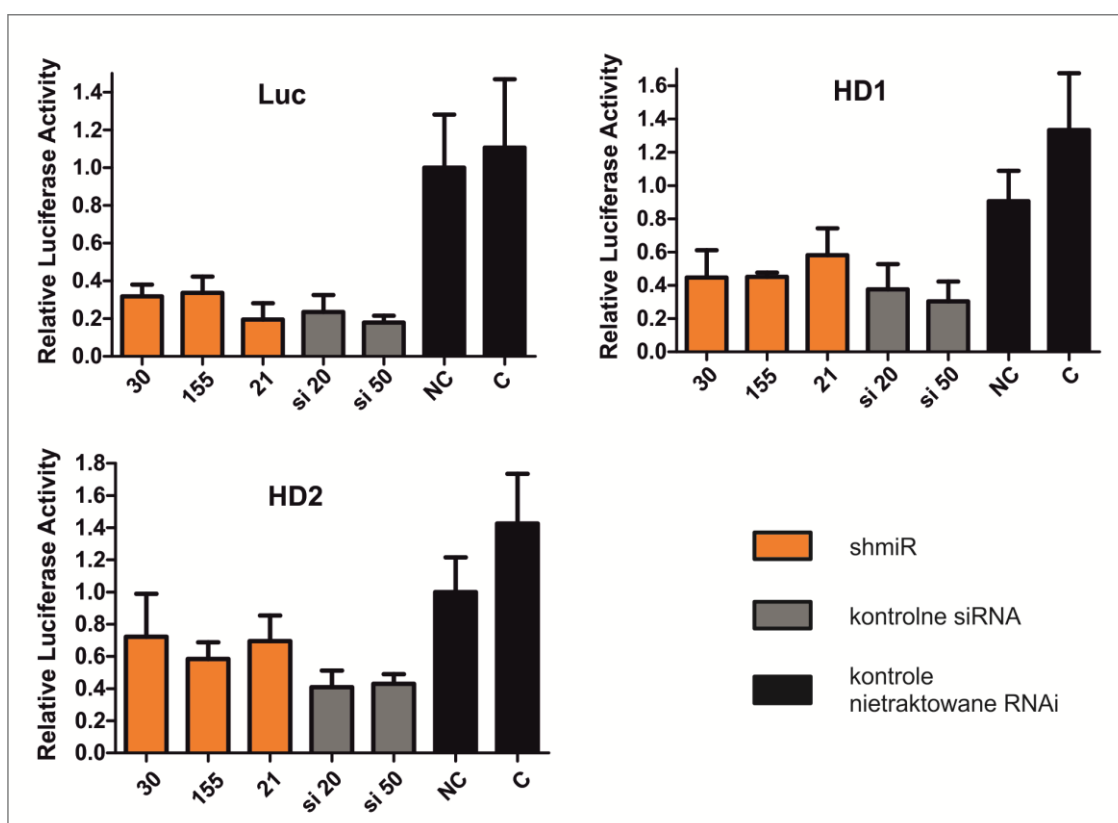
Ryc. 23. Efekty off-target związane z przesunięciem końca 5' cząsteczek siRNA. Liczba genów potencjalnie regulowanych przez wyjściowy (kolor czerwony) oraz dodatkowy (niebieski) wariant siRNA. Kolorem żółtym zaznaczono część wspólną (siSPOTR).



Kolejnym elementem wpływającym na wywoływanie efektów typu *off-target* jest pojawienie się aktywności nici pasażerskiej w wyniku zmiany końców uwalnianych cząsteczek siRNA. Wyniki analizy udziału nici wiodącej oraz pasażerskiej (Ryc. 22) sugerują, że dla danej sekwencji siRNA uwalnianej z różnych pri-miRNA występują różne preferencje wyboru nici włączanej do kompleksu RISC oraz związana z tym zwiększona degradacja nici nie chronionej przez białka i przez bezpośrednie oddziaływanie z transkryptami (Janas i wsp. 2012). W przypadku reagenta shmiR-30a-luc do kompleksu RISC włączana jest preferencyjnie zaplanowana nić wiodąca siRNA z ramienia 5' dlatego obserwowano jej zwiększony udział (93%). W przypadku reagenta shmiR-155-luc w równej proporcji wykrywano się obydwie nici siRNA, co może świadczyć o ich jednakowej zdolności wchodzenia do kompleksu RISC. Z sytuacją odwrócenia proporcji wykrywania nici siRNA mamy do czynienia w przypadku reagenta shmiR-21-luc, gdzie to zakładana nić pasażerska jest wykrywana w 76% wszystkich siRNA uwalnianych z tego konstruktów.

3.2. Badanie efektywności działania siRNA uwalnianych z reagentów shmiR

Następnym elementem charakterystyki testowanych reagentów shmiR było sprawdzenie czy heterogenność uwalnianych cząsteczek siRNA ma również wpływ na efektywność ich działania. Przeprowadzono analizy z wykorzystaniem opracowanego systemu lucyferazowego, porównujące efektywność reagentów shmiR oraz syntetycznych cząsteczek siRNA w wyciszaniu ekspresji docelowego genu (Ryc. 24).



Ryc. 24. Analiza efektywności działania trzech serii reagentów shmiR

Badanie przeprowadzono w systemie lucyferazowym z wykorzystaniem sekwencji docelowej ulegającej ekspresji z wektora pmiRGlo. Syntetyczne siRNA stosowano w dwóch stężeniach 20nM oraz 50nM, NC - pusty wektor ekspresyjny, C-kontrola nietraktowana

Wszystkie testowane reagenty shmiR prowadziły do znaczącego wyciszenia ekspresji genów docelowych w podobnym stopniu jak syntetyczne siRNA (p-value <0,001). W przypadku cząsteczek z sekwencją siRNA-HD2 uzyskiwane wyciszenie było najniższe i sięgało ~40%, podczas gdy dla cząsteczek z serii luc oraz HD1 osiągało ono 60-80%. W żadnym przypadku nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic (poprawy lub pogorszenia) w działaniu w stosunku do kontrolnych syntetycznych siRNA. Obserwowane

różnice w efektywności wyciszania genów przez poszczególne reagenty serii (luc, HD1 oraz HD2) wynikają najprawdopodobniej ze specyfiki samej sekwencji siRNA i jej funkcjonowania w systemie lucyferazowym.

Powyższe eksperymenty wykazały, że ze wszystkich testowanych nośnikowych pri-miRNA powstają heterogenne siRNA. Wzór uwalnianych cząsteczek nie jest stały ani dla zastosowanego nośnikowego pri-miRNA ani dla uwalnianej sekwencji siRNA, a stanowi wypadkową tych dwóch istotnych elementów. Wyniki NGS umożliwiły poznanie sekwencji poszczególnych wariantów uwalnianych siRNA, dzięki czemu wykazano, że w najczęściej stosowanych nośnikowych pri-miRNA (miR-30a oraz miR-155) niejednorodność produktów uwalnianych z ramienia 5' prekursora, związana jest z heterogennością końca 3' siRNA spowodowaną głównie nieprecyzyjnym cięciem przez RNazę Dicer.

Analizy siRNA uwalnianych z pri-miR-21 wykazały heterogenność cząsteczek siRNA również na ich końcu 5', skutkującą zwiększonym ryzykiem wywoływania efektów ubocznych typu *off-target*. Na podstawie eksperymentu wykonanego z sekwencją siRNA-luc pokazano, że lepszymi nośnikowymi pri-miRNA są pri-miR-30a oraz pri-miR-155 niż pri-miR-21 (gdy nie wiodąca siRNA umieszczona jest w ramieniu 5'). Natomiast odpowiedź na pytanie, czy jest to ogólna cecha tych pri-miRNA wymaga dalszych badań z wykorzystaniem większej liczby konstruktów.

Analiza działania reagentów shmiR wykazała, że obserwowane różnice w heterogenności uwalnianych cząsteczek siRNA nie wpływają w znaczny sposób na efektywność ich działania (Ryc. 22 i Ryc. 24). Może to świadczyć o nie uczestniczeniu dodatkowych wariantów siRNA w procesie wyciszania docelowego genu, w kanonicznej ścieżce wyciszania ekspresji genu poprzez cięcie i degradację transkryptu. Możliwe również, że siRNA uwalniane są w nadmiarze, który wystarcza do wysycenia białek zaangażowanych w proces wyciszania sekwencji docelowej, dlatego efektu zwiększania efektywności siRNA przez jego dodatkowe warianty nie da się zaobserwować.

4. Ocena możliwości wykorzystania pri-miRNA uwalniających homogenne miRNA w technologii RNAi

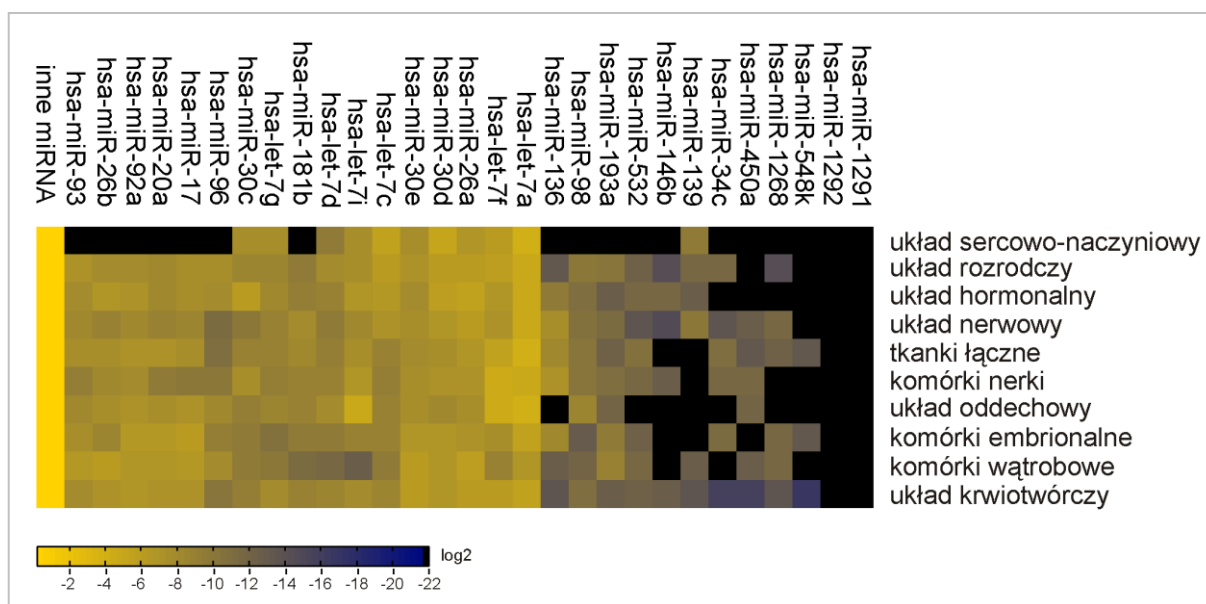
Jak wykazano powyżej pri-miRNA wykorzystywane do konstrukcji reagentów typu shmiR naturalnie uwalniają w komórkach heterogenną pulę izomirów (Ryc. 12 oraz Ryc. 13A). Ta cecha nośnikowych pri-miRNA wydaje się manifestować również w tworzonych z ich wykorzystaniem reagentach shmiR, z których powstaje wówczas heterogenna pula cząsteczek siRNA (Ryc. 21 oraz Ryc. 22). Ponadto, jak pokazały wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej, wzór docinania danego pri-miRNA nie jest stały w tworzonych na jego podstawie reagentach shmiR i podlega modyfikacji w zależności od wprowadzonej do cząsteczki shmiR sekwencji siRNA.

Znane są jednak pri-miRNA nie wykorzystywane dotychczas w technologii RNAi a uwalniające homogenne cząsteczki miRNA w komórkach. W dalszej części badań postanowiono sprawdzić czy wykorzystanie takich pri-miRNA może przynieść korzyści dla rozwoju technologii RNAi i umożliwi tworzenie reagentów shmiR precyzyjnie uwalniających homogenne siRNA w komórce. Powstawanie homogennych siRNA z cząsteczek shmiR w znacznym stopniu przyczyniło by się do ulepszenia reagentów technologii RNAi, poprzez ograniczenie wywoływanych przez nie efektów niespecyficznego typu *off-target*. Precyzyjne definiowanie końców siRNA ogranicza powstawanie dodatkowych wariantów cząsteczek posiadających inną stabilność końców mogącą powodować włączanie nici pasażerskiej do kompleksu RISC.

Aby zbadać możliwość uwalniania homogennych siRNA z reagentów shmiR, postanowiono wyeliminować jedną ze zmiennych przez zastąpienie wykorzystywanych dotychczas nośnikowych pri-miRNA (uwalniających heterogenne cząsteczki) takim pri-miRNA, który endogennie uwalnia homogenne miRNA.

4.1. Wybór nośnikowego pri-miRNA uwalniającego homogenne miRNA

Większość dojrzałych, ludzkich miRNA występuje w komórkach w postaci kilku wariantów (izomirów) nieznacznie różniących się długością lub posiadających przesuniętą sekwencję. Pośród blisko dwóch tysięcy znanych pri-miRNA istnieje jednak wąska grupa cząsteczek, które cięte są w komórkach w sposób precyzyjny, a w konsekwencji uwalniają tylko jeden wariant dojrzałego miRNA. W celu wyboru spośród tych pri-miRNA kandydatów do tworzenia cząsteczek shmiR uwalniających w komórkach homogenne cząsteczki siRNA opracowano szereg kryteriów. Analizowano stopień homogenności uwalnianych miRNA (na podstawie danych NGS z bazy miRBase oraz deepBase), proporcje uwalniania miRNA oraz miRNA*, ramię, z którego powstaje nić wiodąca miRNA (preferowane ramię 5'), powszechność oraz poziom ekspresji miRNA w różnych tkankach (na podstawie atlasu ekspresji ssaczych miRNA (Landgraf i wsp. 2007)) (Ryc. 25).



Ryc. 25. Przykładowy wynik analizy poziomu ekspresji endogennych miRNA. Analiza ekspresji grupy homogennych miRNA uwalnianych z ramienia 5' prekursora. Poziom ekspresji przedstawiony jest w postaci kodu kolorystycznego w skali \log_2 .

W obrębie zawężonej grupy miRNA, na podstawie danych literaturowych jak i dostępnych danych NGS wytypowano trzy ludzkie pri-miRNA: pri-miR-20a, pri-miR-136 oraz pri-miR-139. Spośród wybranych pri-miRNA kryterium powszechności ekspresji spełniają najbardziej pri-miR-20a oraz pri-miR-136. Ekspresja pri-miR-139 nie jest już tak powszechna ale został on wybrany do dalszych analiz ze względu na dobre scharakteryzowanie jego obróbki w komórkach (Starega-Roslan i wsp. 2011b). Jak określono

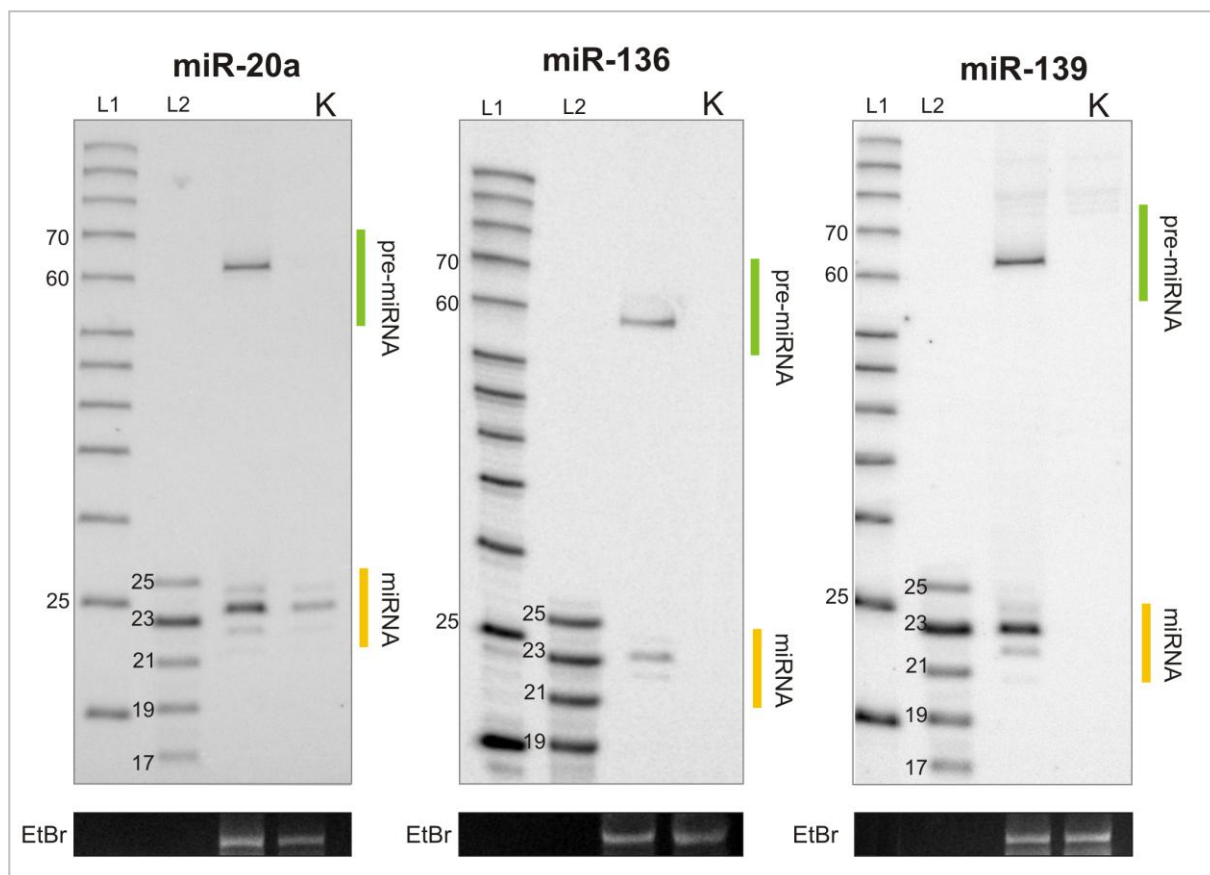
w pracy Starega-Roslan i wsp. NAR 2011 na podstawie wyników hybrydyzacji typu *northern*, dwa z wybranych pri-miRNA posiadają niski poziom heterogenności uwalnianych miRNA, a określający ją współczynnik wynosił odpowiednio 0 dla miR-136 oraz 0,073 dla miR-139 (miR-20a nie był przez autorów analizowany), podczas gdy średnia dla analizowanych 14 miRNA wynosiła 0,28 (Starega-Roslan i wsp. 2011b). Oznacza to, że w przypadku miR-136 analiza typu *northern* wykazała tylko jeden produkt miRNA stanowiący 100% sygnału. W przypadku miR-139 główny wariant miRNA stanowił około 93% wszystkich cząsteczek uwalnianych z pre-miRNA (Starega-Roslan i wsp. 2011b).

Dla wybranych miRNA skonstruowano wektory ekspresyjne zawierające sekwencje ich prekursorów wraz z sekwencjami otaczającymi, skróconymi do ~ 50 nt z każdej strony (Tabela 4).

Tabela 4. Stosowane w wektorach długości sekwencji otaczających dla analizowanych prekursorów homogennych miRNA.

| długość sekwencji otaczającej | 5' | 3' |
|--------------------------------------|-----------|-----------|
| pri-miR-20a | 60 nt | 50 nt |
| pri-miR-136 | 50 nt | 50 nt |
| pri-miR-139 | 59 nt | 50 nt |

Całkowity RNA izolowany po nadekspresji stworzonych konstruktyw w komórkach HEK, analizowano z wykorzystaniem hybrydyzacji typu *northern*. We wszystkich przypadkach poziom prekursorów pre-miRNA był podobny, natomiast poziom dojrzałych miRNA różnił się (Ryc. 26).

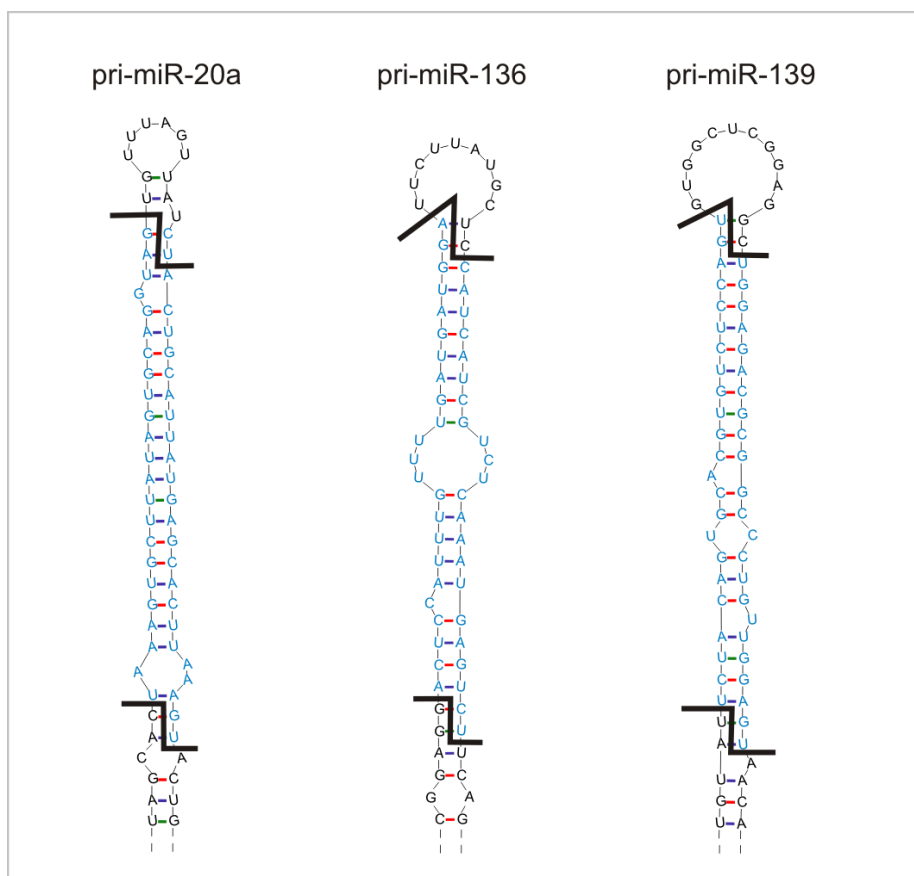


Ryc. 26 Analiza uwalniania krótkich RNA po nadekspresji homogenych miRNA w komórkach HEK 293T.

Wyniki hybrydyzacji typu *northern* z zastosowaniem sondy wykrywającej miRNA uwalniane z ramienia 5' prekursora. L1 oraz L2- wzorce długości RNA

Analiza wykazała podobny poziom komórkowy miRNA-20a oraz miRNA-139. W obydwu przypadkach stwierdzono pojawianie się dodatkowych wariantów miRNA zarówno dłuższych jak i krótszych od głównego produktu. W przypadku pri-miR-136 poziom miRNA był niższy, jednak zaobserwowano występowanie jednego głównego wariantu uwalnianego miRNA. Z punktu widzenia technologii RNAi dobry nośnikowy pri-miRNA powinien mieć budowę ułatwiającą konstrukcję na jego podstawie reagentów shmiR. Dlatego wybrane pri-

miRNA zostały przeanalizowane również pod kątem obecności elementów zaburzających tworzoną strukturę spinki (Ryc. 27).



Ryc. 27. Przewidywane struktury przyjmowane przez wybrane pri-miRNA uwalniające homogenne miRNA.

Kolorem niebieskim zaznaczono sekwencje miRNA/miRNA*, kolorem czarnym zaznaczono miejsca cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer (wg. miRBase)

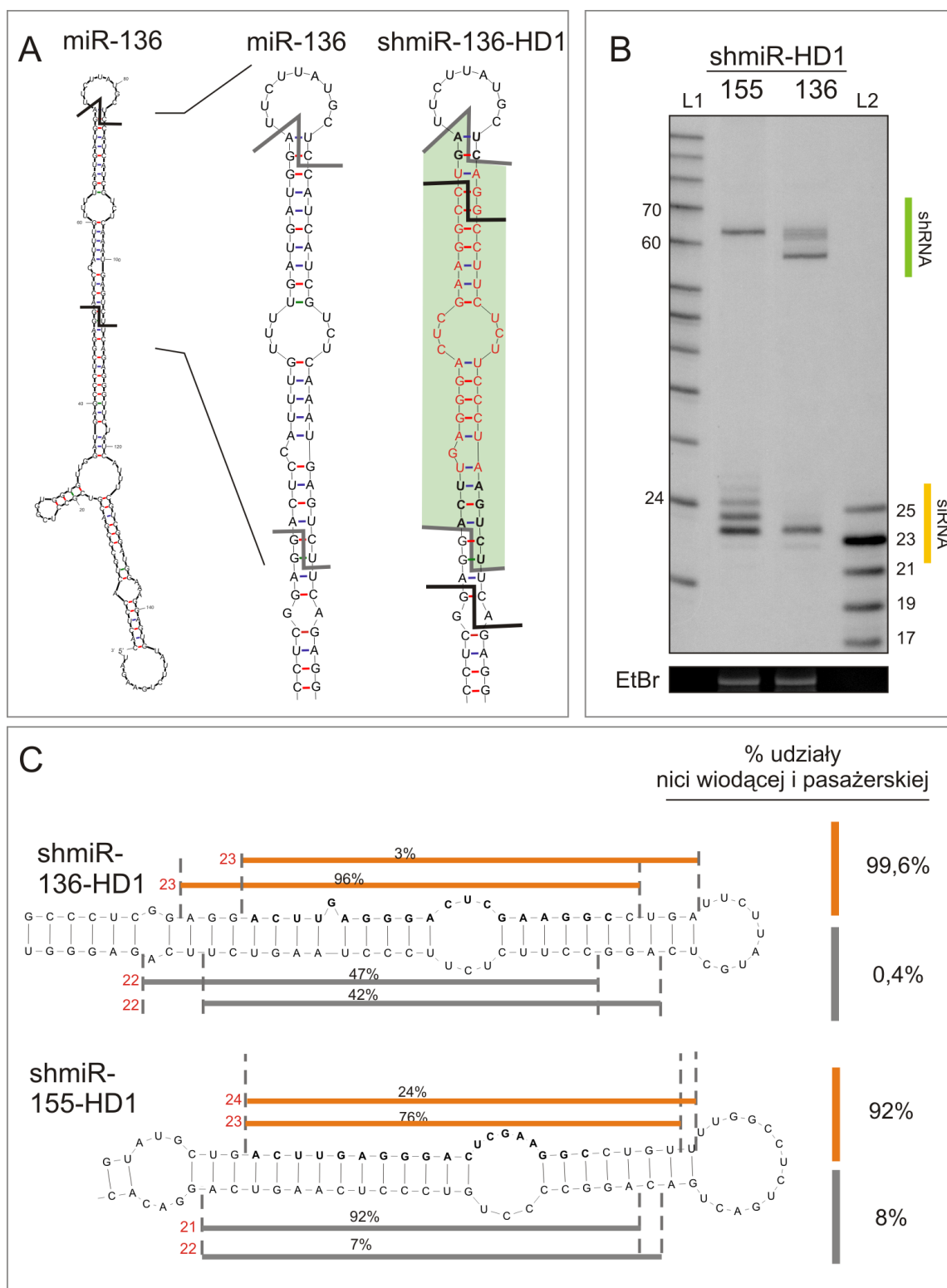
Pri-miR-20a posiada małą (6 nt) pętlę terminalną, w pobliżu której w niewielkiej odległości zlokalizowane są dwa jednonukleotydowe wybrzuszenia, pomiędzy którymi zlokalizowane jest miejsce cięcia przez RNazę Dicer. Istnieje możliwość, że obecność wybrzusczonego nukleotydu w bezpośrednim sąsiedztwie pętli terminalnej powoduje rozluźnienie struktury tego regionu (powiększenie pętli terminalnej). Również w pobliżu miejsca cięcia przez RNazę Drosha pri-miR-20a posiada asymetryczną pętlę wewnętrzną. Dodatkowo prekursor ten należy do dobrze poznanego klastra 17-92 miRNA. Pri-miR-136 posiada 9 nt pętlę terminalną oraz nie zawiera elementów strukturalnych zaburzających regularność spinki w bezpośrednim sąsiedztwie miejsc cięcia przez RNazy. W strukturze trzonu tego prekursora obecna jest symetryczna pętla wewnętrzna oraz jednonukleotydowe wybrzuszenie. W pri-miR-139 występuje większa (11 nt) pętla terminalna natomiast

u podstawy trzonu pre-miRNA występują w niewielkiej odległości dwa jednonukleotydowe wybrzuszenia (5' oraz 3') przedzielone symetryczną, jednonukleotydową pętlą wewnętrzną.

Na podstawie zebranych informacji postanowiono w dalszych analizach wykorzystać pri-miR-136 jako potencjalny, nowy pri-miRNA nośnikowy do konstrukcji reagentów shmiR.

Z wykorzystaniem precyzyjnie ciętego pri-miR-136 stworzono pierwszy reagent shmiR zawierający sekwencję siRNA-HD1 z zachowaniem elementów strukturalnych obecnych w wyjściowym pri-miRNA. Również sekwencja samej cząsteczki siRNA pozwalała na zachowanie prawie nie zmienionych miejsc cięcia reagenta shmiR przez RNazy. Na Ryc. 28A różnice w sekwencji wstawki siRNA w stosunku do sekwencji endogennego miRNA zaznaczone zostały kolorem czerwonym.

Analiza produktów komórkowej obróbki reagenta shmiR-136-HD1 ukazała heterogenność prekursora shRNA po cięciu przez RNazę Drosha. Produkt cięcia przez RNazę Dicer był jednak homogeny pod względem długości i odpowiadał 23 nt cząsteczkom siRNA. Powstawał on także ze zdecydowanie większą wydajnością niż miR-136. Dla porównania na Ryc. 28B przedstawiono również wyniki uwalniania tej samej cząsteczki siRNA z powszechnie stosowanego pri-miR-155. Zastosowanie nowego pri-miRNA nośnikowego umożliwiło znaczne zmniejszenie heterogenności uwalnianych produktów siRNA. Główny wariant siRNA powstający z shmiR-136-HD1 stanowi powyżej 80% całkowitego sygnału pochodzącego od siRNA uwalnianych z tego konstruktów podczas gdy główny wariant powstający z shmiR-155-HD1 stanowi 45%.



Ryc. 28 Wykorzystanie pri-miR-136 w konstrukcji reagentów shmiR.

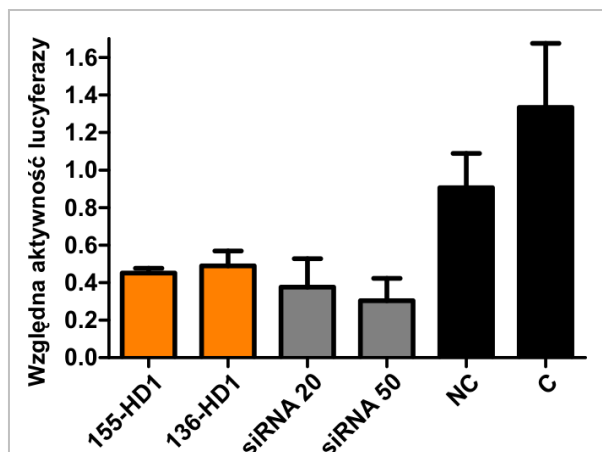
A-Struktura pri-miR-136 oraz stworzonego na jego podstawie shmiR-136-HD1. Kolorem czerwonym zaznaczono nukleotydy zmienione po wprowadzeniu sekwencji siRNA. Szarą linią zaznaczono miejsca cięcia - takie jak występujące w pri-miR-136, czarną linią miejsca cięcia określone na podstawie NGS. **B**- porównanie komórkowej obróbki reagentów shmiR-136-HD1 oraz shmiR-155-HD1 (northern blot). L1 oraz L2- wzorce długości RNA, **C**- Wyniki analizy NGS dla uwalnianych siRNA. Pogrubione nukleotydy przedstawiają sekwencję wstawki siRNA. Kolorem pomarańczowym oznaczono warianty nici wiodących siRNA uwalnianych z ramienia 5' prekursora. Kolorem szarym oznaczono nici pasażerskie. Kolorem czerwonym po lewej stronie każdego wariantu siRNA podana jest jego długość w nukleotydach. Udziały procentowe dla poszczególnych wariantów podane są w przeliczeniu na siRNA uwalniane z danego ramienia, oddzielnie dla ramienia 5' i 3'. Z prawej strony struktur podano proporcję nici uwalnianych z obu ramion.

Niespodziewanie, wyniki analizy NGS wykazały, że większość (96%) homogennego siRNA długości 23 nt uwalnianego z cząsteczki shmiR-136-HD1 jest przesunięta o 3 nt w kierunku 5' (wariant +3nt-siRNA) w stosunku do spodziewanej sekwencji siRNA (+0nt-siRNA) (Ryc. 28C). Oznacza to, że cząsteczka ta powstaje z dłuższego, niejednorodnego prekursora shRNA (widocznego jako „smuga” w wynikach hybrydyzacji typu *northern*). Natomiast wariant +0nt-siRNA (również 23 nt) stanowi zaledwie 3% wszystkich siRNA uwalnianych z ramienia 5'. Analiza ekspresji nici pasażerskiej w tym konstrukcie, wykazała że występuje ona również w dwóch najczęstszych wariantach długości 22 nt, stanowiących 47% oraz 42 % wszystkich nici uwalnianych z ramienia 3'. Wykryte sekwencje nici pasażerskich są przesunięte względem siebie o trzy nukleotydy i tworzą z wykrytymi niemi wiodącymi z ramienia 5' standardowe dupлекsy posiadające dwunukleotydowe wystające końce 3'. Analiza ekspresji tej samej cząsteczki siRNA z nośnikowego pri-miR-155 wskazuje na obecność dwóch wariantów +0nt-siRNA długości 23 i 24 nt różniących się sekwencją końca 3'. W tym przypadku wykrywane nici pasażerskie również jakościowo odpowiadały wykrywanym niciom wiodącym, tworząc z nimi dupлекsy z dwunukleotydowymi wystającymi końcami 3'. Proporcja nici siRNA uwalnianych z obydwu ramion w obu przypadkach wykazywała znaczną przewagę poziomu nici wiodących. Udział nici wiodących w puli wszystkich cząsteczek uwalnianych z obu ramion prekursora cząsteczek wynosił 99,6 % w przypadku reagenta shmiR-136-HD1 oraz 92 % w przypadku reagenta shmiR-155-HD1.

Analiza efektywności działania reagentów shmiR-136-HD1 oraz shmiR-155-HD1 nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi reagentami, ani w odniesieniu do kontroli siRNA (Ryc. 29). Zatem zubożenie puli uwalnianych cząsteczek w przypadku shmiR-136-HD1 w stosunku do shmiR-155-HD1 nie wpłynęło negatywnie na efektywność wyciszania reagenta. Może to również sugerować, że dodatkowe warianty siRNA uwalniane przez shmiR-155-HD1, jak również przez inne reagenty shmiR nie mają istotnego wpływu na efektywność działania reagentów na sekwencje docelową.

Ryc. 29. Analiza efektywności działania reagentów w systemie lucyferazowym

Przyjęte oznaczenie kolorystyczne: pomarańczowy – testowane reagenty shmiR, szary kontrolne siRNA syntetyczne w dwóch stężeniach 20nM oraz 50nM, czarny- kontrole nie traktowane RNAi; NC - pusty wektor ekspresyjny, C-kontrola nietraktowana



Uzyskany wynik może wydawać się dość zastanawiający ze względu na znaczne różnice w sekwencji uwalnianych siRNA. Analizowany reagent shmiR-136-HD1 uwalnia siRNA o sekwencji przesuniętej o 3 nt co oznacza, że część nukleotydów odpowiadająca za parowanie siRNA z sekwencją docelową nie powinna być do niej komplementarna, a w konsekwencji powinno wystąpić osłabienie lub utrata aktywności takiego reagenta. W tym przypadku mamy jednak do czynienia z sytuacją, w której nukleotydy włączane w skład siRNA w wyniku przesunięcia miejsca cięcia RNazy Drosha są wciąż komplementarne do sekwencji docelowej i posiadające je cząsteczki siRNA nadal mogą wykazywać wysoką efektywność działania.

Zatem wprowadzenie wstawki siRNA do pri-miR-136 przy zachowaniu struktury oraz sekwencji w miejscach cięcia przez RNazy skutkuje pojawieniem się dodatkowego miejsca cięcia przez RNazę Drosha przesuniętego o trzy pary zasad w kierunku sekwencji otaczających. Wpływa to na powstawanie prekursorów shRNA różnej długości, z których preferencyjnie jeden (dłuższy wariant) jest efektywnie cięty przez RNazę Dicer. Pomimo obserwowanych zmian w sposobie obróbki reagenta shmiR uwalniane siRNA są wciąż bardzo homogenne.

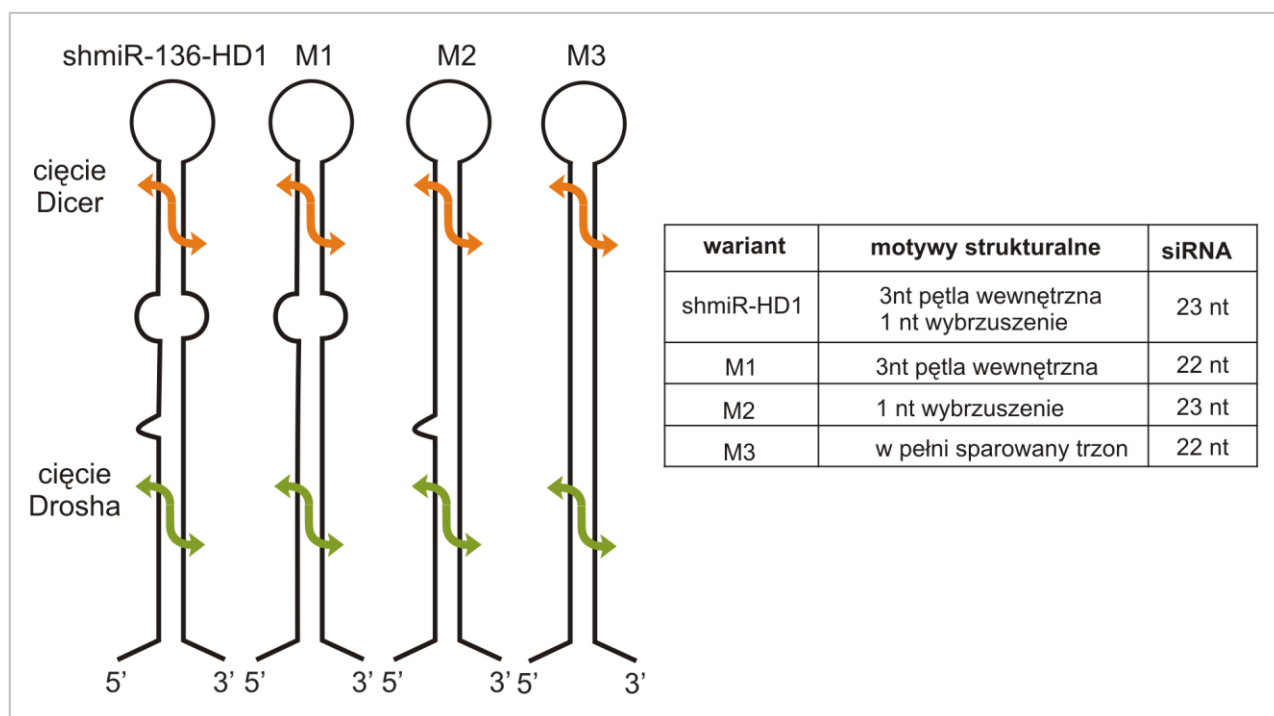
W dalszych badaniach postanowiono sprawdzić jakie cechy prekursora pri-miRNA-136 wpływają na sposób jego obróbki w komórkach oraz jakie elementy warunkują homogenność uwalnianych z niego cząsteczek.

4.2. Wpływ cech struktury na precyzję cięcia reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer

Pierwszym etapem sprawdzania jakie elementy pri-miRNA-136 warunkują uwalnianie homogennych miRNA w komórkach było przyjrzenie się jego strukturze. Naturalny pri-miR-136 posiada w obrębie trzonu dwa elementy zaburzające strukturę regularnej helisy: trójnukleotydowną-symetryczną pętlę wewnętrzną oraz jednonukleotydowe wybrzuszenie.

4.2.1. Wpływ motywów strukturalnych pri-miR-136 na proces jego obróbki

W tej części badań przeanalizowano wpływ elementów strukturalnych pri-miRNA-136 na precyzję obróbki skonstruowanych na jego podstawie reagentów shmiR. Zaprojektowano zestaw cząsteczek z wprowadzonymi mutacjami strukturalnymi (M1-M3), które polegały na kolejnym usuwaniu elementów zaburzających regularność helisy (M1 oraz M2), aż do cząsteczki z w pełni sparowanym trzonem (M3) (Ryc. 30 oraz *Materiały i Metody* Ryc. 53).

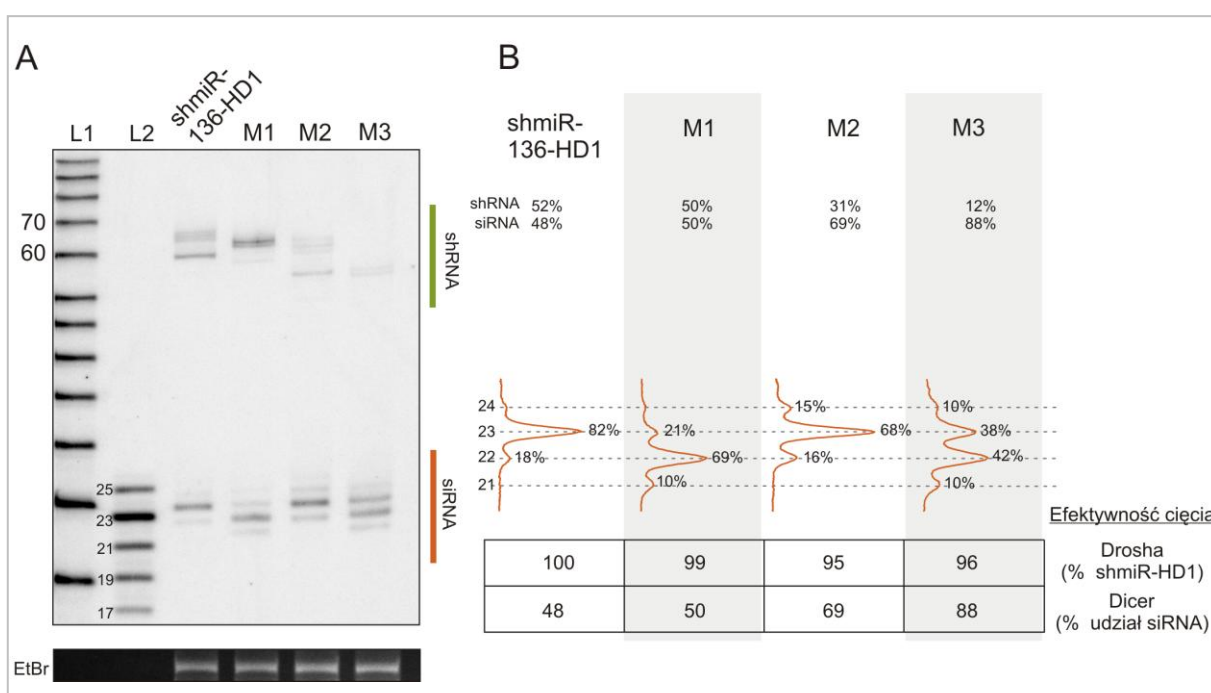


Ryc. 30. Seria cząsteczek kolejno pozbawianych motywów strukturalnych charakterystycznych dla pri-miR-136.

Tabela przedstawia obecne w poszczególnych reagentach motywy rozluźniające strukturę helisy jak i przewidywaną długość uwalnianego siRNA.

Ponieważ nie aktywna siRNA zlokalizowana jest w ramieniu 5' reagentów shmiR, aby nie zmieniać sekwencji siRNA zmiany strukturalne wprowadzane były w konstrukcjach poprzez zmianę sekwencji nukleotydowej w obrębie nici pasażerskiej. W tabeli przedstawionej na Ryc. 30 umieszczono informację o elementach rozluźniających strukturę helisy obecnych w trzonach poszczególnych reagentów shmiR z uwzględnieniem przewidywanej długości uwalnianych nici wiodących siRNA.

Przeprowadzono szczegółową analizę komórkowej obróbki reagentów z mutacjami strukturalnymi, dotyczącą zarówno prekursorów shRNA jak i dojrzałych cząsteczek siRNA (Ryc. 31A).

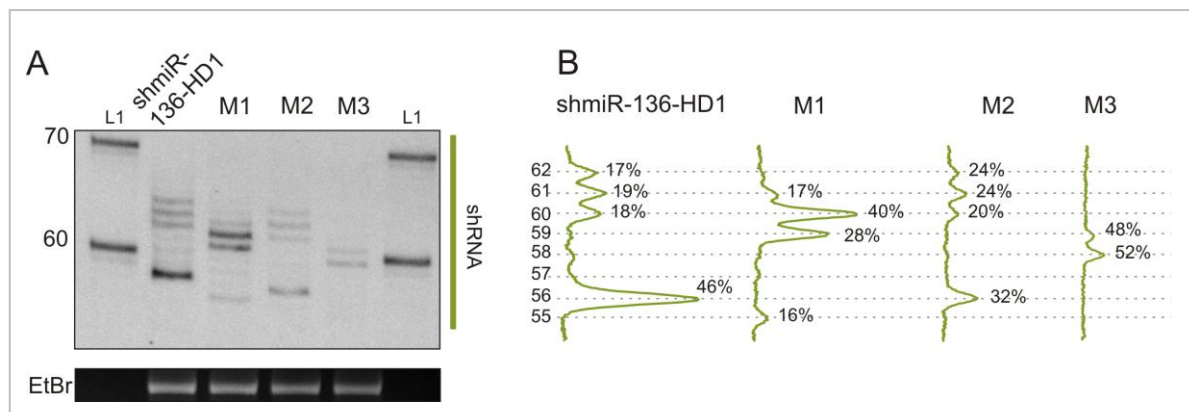


Ryc. 31. Analiza prekursorów oraz siRNA uwalnianych z serii cząsteczek shmiR z usuwanymi motywami strukturalnymi w obrębie trzonu. **A**-Przedstawiono wynik analizy typu northern, wraz z **B**- analizą intensywności sygnałów od poszczególnych wariantów siRNA L1, L2- wzorce długości RNA. Tabela przedstawia efektywność cięcia reagentów przez RNazę Drosha (100% stanowi intensywność sygnału w całej ścieżce dla reagenta shmiR-136-HD1) oraz efektywność cięcia shRNA przez RNazę Dicer wyrażoną w procentowym udziale sygnału pochodzącego od siRNA w stosunku do całości sygnału w danej ścieżce.

Cząsteczki M1 oraz M2 wykazywały nieznacznie zwiększoną heterogenność uwalnianych siRNA. Główny wariant stanowił ~70% podczas gdy w reagenście wyjściowym stanowił 82% (Ryc. 31B). W przypadku reagenta M1 zaobserwowano spodziewane skrócenie powstających siRNA do 22 nt. Natomiast dla w pełni sparowanego reagenta M3 heterogenność siRNA uległa znacznemu zwiększeniu i obserwowano dwa występujące

w podobnych ilościach warianty siRNA długości 23 i 22 nt, stanowiące około 40% każdy. Prekursory shRNA dla serii cząsteczek z mutacjami struktury wykrywane były z różną intensywnością dlatego przeprowadzono hybrydyzację typu *northern* umożliwiającą również analizę fragmentów RNA długości ~60 nt z jednonukleotydową rozdzielczością.

Analiza całkowitego RNA z komórek po nadekspresji reagentów shmiR wykazała zmiany jakościowe oraz ilościowe w obrębie wykrywanych produktów cięcia przez RNazę Droscha (Ryc. 32).



Ryc. 32. Analiza prekursorów shRNA uwalnianych z serii cząsteczek z usuniętymi zaburzeniami strukturalnymi w obrębie trzonu. A-Przedstawiono wynik hybrydyzacji typu *northern*, wraz z **B-** analizą intensywności sygnałów od poszczególnych wariantów. L1-wzorec długości RNA. Różnice w migracji cząsteczek RNA względem wzorca długości mogą wynikać z różnic w sekwencji nukleotydowej cząsteczek.

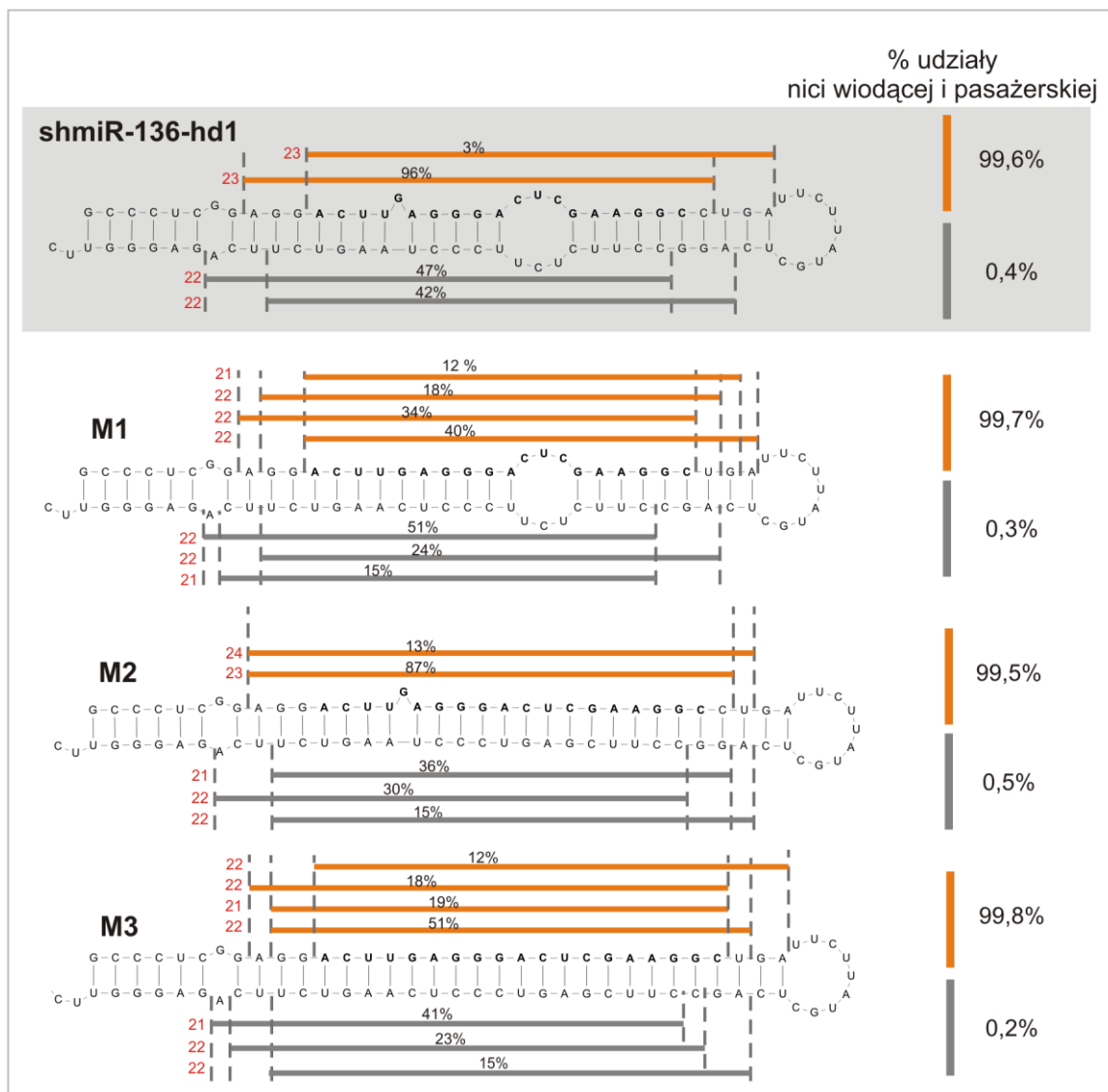
Uzyskane wyniki wykazały, że prekursor shRNA powstający z wyjściowej cząsteczki shmiR-136-HD1 daje sygnały w postaci jednego intensywnego prążka migrującego zgodnie ze spodziewaną długością 56 nt, któremu towarzyszą przynajmniej trzy dłuższe warianty różniące się między sobą długością o jeden nukleotyd (wzór 1+3) (Ryc. 32A). Wysoka jakość uzyskanego rozdziału pozwoliła na przeprowadzenie porównania intensywności sygnałów pochodzących od poszczególnych wariantów shRNA (Ryc. 32B), które pokazuje że główny wariant prekursora pochodzący z shmiR-136-HD1 stanowi 46 % całkowitego sygnału uzyskiwanego dla wszystkich shRNA pochodzących z tego reagenta. Reagent M1 pozbawiony jednostronnego wybrzuszenia uwalnia prekursor shRNA posiadające jakościowo podobny wzór (1+3), przy czym intensywność sygnałów odpowiadających dwóm spośród trzech dłuższych produktów (stanowiących 40% i 28% prekursorów M1) jest większa podczas gdy intensywność krótszego wariantu shRNA jest znacznie mniejsza. Pomimo zachowania podobnego wzoru obserwowanego w przypadku reagenta wyjściowego,

wszystkie prekursory shRNA pochodzące z konstruktów M1 migrują jako cząsteczki około 1 nt krótsze (spodziewana długość 55 nt). W przypadku konstruktów M2 pozbawionego symetrycznej pętli wewnętrznej obserwujemy znacznie niższy poziom prekursorów shRNA niż w reagentach wyjściowych, jednak zachowany jest ten sam wzór wariantów (1+3). Produkty shRNA powstające z konstruktów M3 wykrywano w mniejszych ilościach i różnią się najbardziej w stosunku do shRNA powstających z reagenta wyjściowego. Dla M3 obserwujemy dwa warianty shRNA, migrujące z szybkością odpowiadającą fragmentom długości ~60 nt podczas gdy ich spodziewana długość to 55 nt

Aby sprawdzić, czy różnice w poziomach shRNA wynikają ze słabszej obróbki niektórych konstrukcji przez RNazę Drosha czy też z szybszego cięcia powstających shRNA przez RNazę Dicer, określono intensywność całościowych sygnałów w poszczególnych ścieżkach (Ryc. 31A). Efektywność cięcia reagentów przez RNazę Drosha odnoszono do efektywności cięcia cząsteczki wyjściowej i jako 100% przyjęto sumę sygnałów prekursorów shRNA oraz siRNA uwalnianych z cząsteczki shmiR-136-HD1. Intensywność sygnałów dla pozostałych ścieżek była bardzo podobna (Ryc. 31 - tabela), co może świadczyć o braku wpływu wprowadzonych modyfikacji strukturalnych na efektywność cięcia przez RNazę Drosha. W kolejnym etapie sprawdzono efektywność cięcia shRNA przez drugą, z biorących udział w obróbce reagentów RNaz - Dicer. W tym celu policzono jaki procent sygnału całej ścieżki (prekursor + siRNA) stanowią siRNA (Ryc. 31 - tabela). 100% efektywność oznacza zatem sytuację, w której cały powstały prekursor shRNA jest szybko docinany przez RNazę Dicer (przez co jest niewykrywalny) i całość sygnału w ścieżce pochodzi od dociętych siRNA. W przypadku reagenta wyjściowego jak i M1, siRNA stanowią ~50% sygnału. Efektywność cięcia przez RNazę Dicer w przypadku reagenta M2 wynosi 69% a w przypadku M3 aż 88%. Oznacza to, że reagenty M2 oraz M3, których prekursor jest obserwowany na niższym poziomie uwalniają siRNA ze zwiększoną efektywnością spowodowaną ich wydajniejszą obróbką przez RNazę Dicer.

Aby precyzyjnie określić w jakich miejscach zachodzą cięcia w testowanych reagentach przez komórkowe RNazy szlaku biogenezy miRNA, ponownie wykorzystano technologię NGS krótkich RNA. Wyniki analizy sekwencji siRNA uwalnianych z zestawu cząsteczek z mutacjami strukturalnymi przedstawiono na (Ryc. 33). Wartości procentowe podane dla nici siRNA stanowią ich udział w puli wszystkich cząsteczek uwalnianych z danego ramienia prekursora (oddzielnie dla ramienia 5' i 3'). Dla analizowanych reagentów

poziom nici wiodących siRNA jest znacznie wyższy niż poziom nici pasażerskich i stanowi prawie 100% wszystkich cząsteczek uwalnianych z obu ramion prekursorów.



Ryc. 33. Wyniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) dla reagentów shmiR zawierających mutacje strukturalne. Pogrubione fragmenty sekwencji nukleotydowej przedstawiają sekwencję wprowadzonej wstawki siRNA. Kolorem pomarańczowym oznaczono warianty nici wiodących siRNA uwalnianych z ramienia 5' prekursora. Kolorem szarym oznaczono nici pasażerskie. Po lewej stronie każdego wariantu siRNA podana jest jego długość w nukleotydach -kolor czerwony. Udziały procentowe dla poszczególnych wariantów podane są w przeliczeniu na siRNA uwalniane z danego ramienia, oddzielnie dla ramienia 5' i 3'. Z prawej strony struktur podano proporcję uwalniania nici z obu ramion.

Dla porównania na Ryc. 33 przedstawiono również wyniki NGS dla reagenta wyjściowego shmiR-136-HD1. W przypadku mutantu M1 pozbawionego jednonukleotydowego wybrzuszenia zaobserwowano bardziej heterogenną grupę siRNA

uwalnianych z ramienia 5' niż obserwowana dla reagenta wyjściowego (Ryc. 33). 52 % stanowią sekwencje +0nt-siRNA, lecz występują one w dwóch wariantach 22 nt (40%) oraz 21 nt (12%) z różnymi końcami 3'. Wariant +3nt-siRNA występuje w tym przypadku jako 22 nt siRNA (34%). Wykryto również dodatkowy wariant przesunięty o 2 nt w kierunku 5' (+2nt-siRNA) długości 21 nt (18%). Zatem, powyżej 92% siRNA uwalnianych z reagenta M1 ma długości 22 nt, co jest zgodne z obrazem obserwowanym w wynikach hybrydyzacji typu *northern*. Analiza nici pasażerskich uwalnianych z tego reagenta pokazała, iż podobnie jak w cząsteczce wyjściowej najczęściej uwalniane warianty nici pasażerskich tworzą wraz z najczęściej wykrywanymi niemi wiodącymi standardowe dupлексы siRNA z dwunukleotydowymi wystającymi końcami 3'.

Kolejny reagent z mutacją strukturalną - M2 pozbawiony symetrycznej pętli wewnętrznej uwalnia tylko +3nt-siRNA w dwóch wariantach, różniących się końcem 3' (23 nt - 87% oraz 24 nt - 13%) (Ryc. 33). Wśród nici pasażerskich uwalnianych z tego reagenta nie tworząca standardowy dupлекс siRNA z głównym wariantem nici wiodącej stanowi tylko 30 %. Dodatkowo wykryto również warianty przesunięte w kierunku pętli o 3 nt, stanowiące razem ~50 % bez swoich odpowiedników wśród wykrytych nici wiodących.

W wyniku komórkowego docinania reagenta M3 posiadającego w pełni sparowany trzon uwalniany jest głównie wariant +2nt-siRNA stanowiący 70% i posiadający różne końce 3' (Ryc. 33). Wariant długości 22 nt stanowi 51%, a długości 21 nt 19 %. Wykrywany jest również wariant +3nt-siRNA długości 22 nt (18%). Wariant +0nt-siRNA długości 22 nt stanowi 12 % wykrywanych nici wiodących. Wykrywane nici pasażerskie tworzą z najczęściej występującymi niemi wiodącymi standardowe dupлексы siRNA, jednak ich udział procentowy nie stanowi prostego odzwierciedlenia częstości odpowiadających im nici wiodących. Może być to związane z faktem, iż nici pasażerskie we wszystkich konstrukcjach występują na bardzo niskich poziomach (poniżej 0,5% odczytów), a w takich przypadkach różnice nawet pojedynczego odczytu mogą znacznie zmieniać proporcje procentowe pomiędzy poszczególnymi wariantami.

Przeprowadzona analiza pokazuje, że w testowanych reagentach shmiR doszło do przesunięcia miejsca cięcia dla RNazy Drosha jak i Dicer. Najprawdopodobniej zastosowane mutacje strukturalne w obrębie konstrukcji wywołały powstanie dodatkowego miejsca cięcia dla RNazy Drosha, w wyniku czego powstały ~6 nt dłuższe prekursorы shRNA. Następnie podlegały one cięciu przez RNazę Dicer odmierającą odpowiedni dystans ~22 nt od końca zdefiniowanego przez RNazę Drosha. Uzyskane wyniki wykazały, że obecność nieregularności struktury w obrębie trzonu reagentów shmiR może wpływać nie tylko na

precyzję cięcia przez RNazę Drosha ale również na sam proces wyboru miejsca cięcia przez ten enzym.

Obserwowana różna siła sygnałów pochodzących od prekursorów shRNA w analizach typu *northern blot* (Ryc. 31) oraz wzajemne proporcje pomiędzy wariantami w obrębie ścieżki nie muszą w prosty sposób odzwierciedlać ilości poszczególnych produktów docinania przez RNazę Drosha. Istotnym elementem przy analizie prekursorów shRNA jest szybkość ich docinania przez RNazę Dicer. Pomimo powszechnych poglądów, że RNaza Dicer ma mniejsze wymagania przy wyborze substratów niż RNaza Drosha to jednak w tym przypadku zaobserwowano znaczne różnice w efektywności cięcia powstających z mutantów strukturalnych prekursorów shRNA. Efektywnie docinane prekursorów obserwowane są na niskim poziomie i odwrotnie, prekursorów będące nieoptymalnymi substratami dla RNazy Dicer ulegają akumulacji w komórce i pochodzące od nich sygnały są silniejsze. Efekt ten bardzo dobrze obrazuje porównanie wyników hybrydyzacji typu *northern* oraz NGS dla cząsteczek shmiR-136-HD1 oraz M1, dla których obserwowany jest wzór typu (1+3) prekursorów shRNA (Ryc. 32). W przypadku shmiR-136-HD1 obserwowany jest intensywny sygnał od krótszego wariantu prekursora oraz słaby sygnał od wariantów dłuższych. Wyniki NGS pokazują, że z tego reagenta shmiR powstają cząsteczki siRNA pochodzące z dłuższego wariantu prekursora shRNA (Ryc. 33). Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia w przypadku reagenta M1 dla którego analiza typu *northern* pokazuje intensywne sygnały pochodzące od dłuższych wariantów prekursora i słaby sygnał dla wariantu krótkiego, z którego właśnie pochodzą siRNA obserwowane w analizie NGS.

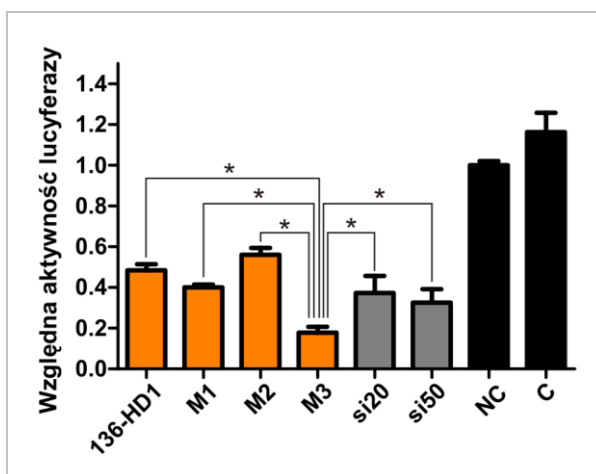
Podsumowując, po skonstruowaniu serii reagentów shmiR, bazujących na prekursorze pri-miR-136 zaobserwowano powstawanie heterogennych prekursorów shRNA, pomimo iż naturalny pierwotny prekursor uwalnia homogeny pre-miRNA. Uzyskane wyniki wykazały, że na wybór miejsca cięcia przez RNazę Drosha jak i na jego precyzję ma wpływ wymiana sekwencji miRNA na sekwencję siRNA (podczas tworzenia reagentów shmiR) jak i obecność elementów wprowadzających nieregularności struktury w obrębie trzonu shRNA. Zaobserwowano również wpływ zmian strukturalnych reagentów shmiR na efektywność ich cięcia przez RNazę Dicer oraz na wybór substratu spośród powstających różnych wariantów shRNA. Największe różnice w efektywności cięcia przez RNazę Dicer zaobserwowano pomiędzy grupą reagentów shmiR-136-HD1 i M1 a grupą M2 i M3. Wydaje się zatem, że obecność symetrycznej pętli wewnętrznej ma znaczenie dla efektywności obróbki reagentów shmiR. Reagenty pozbawione rozluźnienia struktury w postaci pętli wewnętrznej wykazują wyższą efektywność cięcia przez RNazę Dicer. Największą wydajność tego procesu

zaobserwowano dla cząsteczki M3 posiadającej w pełni sparowany trzon. Zaobserwowano również, że wraz ze wzrostem efektywności cięcia reagentów przez RNazę Dicer następuje spadek precyzji tego procesu, skutkujący powstaniem heterogennych siRNA. Przeprowadzone badania wykazały również, że obecność wybrzuszony nukleotydu ma wpływ na wybór substratów dla RNazy Dicer. W obecności tego wybrzuszenia krótsze prekursorzy shRNA nie są efektywnie cięte przez RNazę Dicer (bardzo niski poziom lub całkowity brak powstających z nich siRNA w NGS), pomimo iż powstają ze wszystkich konstruktów.

4.2.2. Wpływ motywów strukturalnych na efektywność działania reagentów shmiR

Przeprowadzono analizy w systemie lucyferazowym w celu sprawdzenia jak zmiany w obróbce reagentów, wywołane zmianami w ich strukturze wpłyną na efektywność wyciszania sekwencji docelowej przez uwalniane siRNA (Ryc. 34). Wszystkie badane cząsteczki wykazywały istotne statystycznie obniżenie ekspresji docelowego genu w stosunku do kontroli negatywnej (NC). W przypadku reagenta M3 zaobserwowano znaczne zwiększenie efektywności wyciszania w stosunku do reagenta wyjściowego jak i syntetycznego siRNA kontrolnego. Wzrost efektywności działania reagenta M3 może wynikać ze zwiększonej ilości uwalnianych cząsteczek siRNA. Interesujący jest fakt, iż w przypadku reagenta M3 w 70% wykrywany jest +2 nt-siRNA, który występuje jeszcze tylko w przypadku reagenta M1, gdzie stanowi jednak 18%. Najslabiej działającym reagentem jest M2, który jest całkowicie pozbawiony wariantu +2 nt-siRNA.

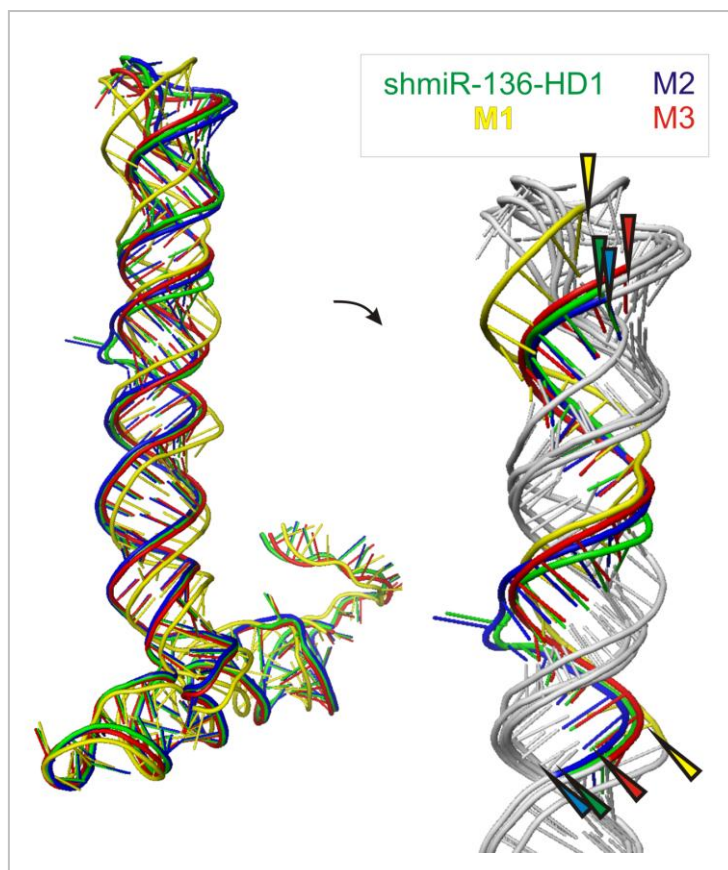
Ryc. 34. Analiza efektywności działania reagentów shmiR z mutacjami strukturalnymi w systemie lucyferazowym. Testowane reagenty shmiR – pomarańczowy, kontrolny siRNA syntetyczny w dwóch stężeniach 20nM oraz 50nM -szary, kontrole nietraktowane RNAi - czarny; NC - pusty wektor ekspresyjny, C-kontrola nietraktowana. Wszystkie testowane reagenty wykazują istotne statystycznie wyciszenie sekwencji docelowej w stosunku do kontroli NC



Na podstawie analiz przedstawionych w tym i poprzednim rozdziale wykazano, że elementy strukturalne mają bezpośredni wpływ na jakość oraz ilość cząsteczek uwalnianych z reagentów shmiR, przez co mogą wpływać na efektywność wyciszania sekwencji docelowej.

4.2.3. Wpływ motywów strukturalnych na strukturę przestrzenną reagentów shmiR

W tej części pracy podjęto próbę wytłumaczenia obserwowanych różnic w obróbce reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer w oparciu o ich strukturę przestrzenną. Do określenia struktury drugorzędowej cząsteczek wykorzystano oprogramowanie RNAfold oraz RnaComposer do przewidywania na jej podstawie struktury przestrzennej. Testowane reagenty shmiR w różnym stopniu posiadały elementy rozluźniające strukturę trzonu obecne w wyjściowym reagenście shmiR-136-HD1. Podczas wymiany sekwencji w trakcie tworzenia reagentów shmiR, dochodzi do zmian jakościowych w obrębie nukleotydów trzonu cząsteczek, w tym również w obrębie nukleotydów wchodzących w skład analizowanych motywów strukturalnych. Przewidywane struktury przestrzenne dla poszczególnych reagentów z wprowadzonymi mutacjami strukturalnymi przedstawiono na Ryc. 35.



Ryc. 35. Przewidywane struktury przestrzenne reagentów shmiR. shmiR-136-HD1-zielony, M1-żółty, M2-niebieski, M3-czerwony. Po prawej stronie przedstawiono w powiększeniu region, w którym ulokowane są nici wiodące siRNA. (Z wykorzystaniem oprogramowania RnaComposer, RNAfold oraz PyMol.)

Uzyskane wyniki sugerują, że w badanych mutantach strukturalnych (M1, M2, M3) zachowana jest geometria charakterystyczna dla wyjściowego reagenta shmiR-136-HD1. W celu porównania zbieżności struktur badanych reagentów określono lokalny parametr RMSD (ang. root-mean-square deviation) dla trzonów cząsteczek shmiR (Tabela 5). Wykonano również analizę porównawczą dla poszczególnych fragmentów analizowanych cząsteczek, uwzględniając regiony zawierające jednonukleotydowe wybrzuszenia oraz pętlę wewnętrzną wraz z zamykającymi parami nukleotydowymi. Przeprowadzone porównanie struktur wykazało, że badane cząsteczki shmiR posiadają bardzo podobne struktury przestrzenne, jednak spośród analizowanej grupy przewidywana struktura reagenta M1 najbardziej odbiega od struktury reagenta wyjściowego. We wszystkich przewidywanych strukturach w obrębie trójnukleotydowej pętli wewnętrznej „niesparowane” nukleotydy tworzą niekanoniczne pary zasad, a oddziaływania pomiędzy nimi nie wywołują znacznego zaburzenia struktury helisy.

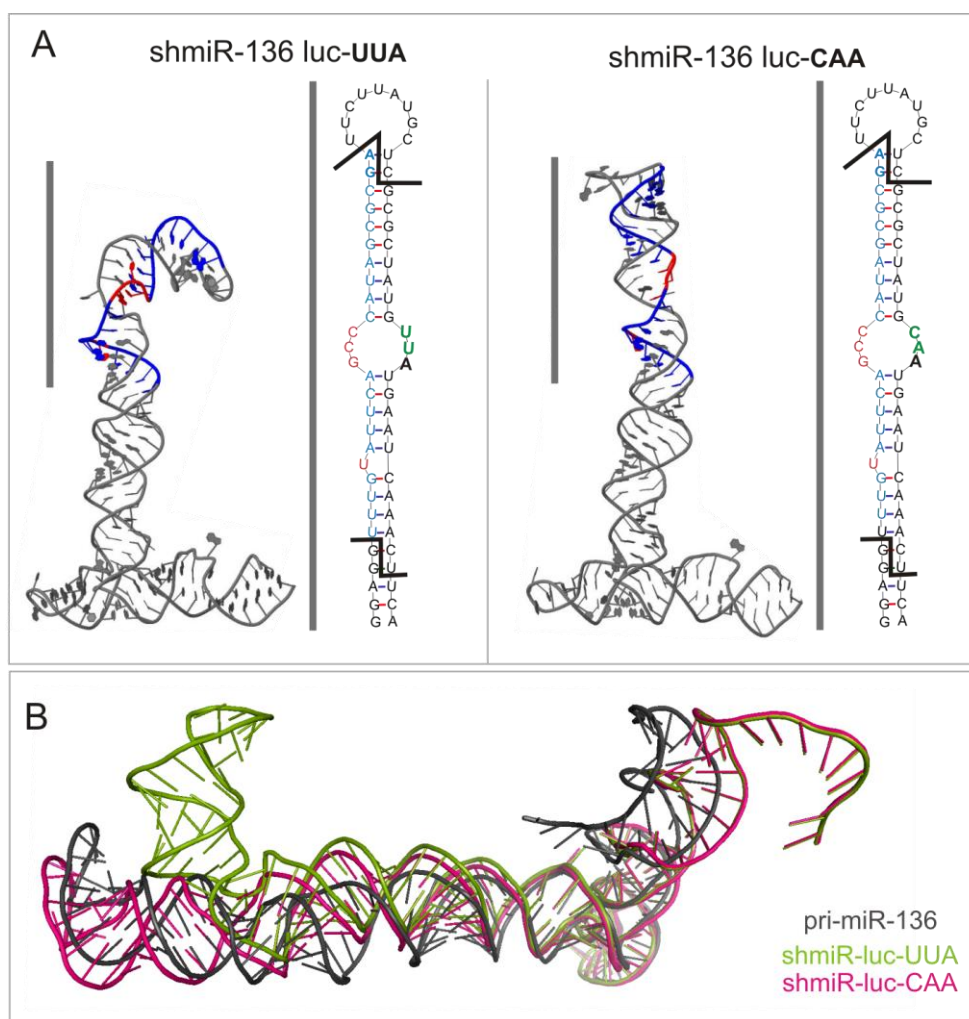
Tabela 5. Wartości parametru RMSD określającego zbieżność struktur przestrzennych analizowanych reagentów shmiR

| Wartości parametru RMSD w stosunku do shmiR-136-HD1 | | | | |
|---|----------|----------------|---------------------------|------------------------------|
| Reagent zmutowany | 1. shmiR | 2. Trzon shRNA | 3. Region z wybrzuszeniem | 4. Region z pętlą wewnętrzną |
| M1 | 4,615 | 4,146 | 2,642 | 0,465 |
| M2 | 1,056 | 1,190 | 0,312 | 1,247 |
| M3 | 2,277 | 2,289 | 2,341 | 1,254 |

Schemat przedstawia strukturę przestrzenną cząsteczki shmiR. Wykazuje ona 5' i 3' końce, trzon (2), region z wybrzuszeniem (3), region z pętlą wewnętrzną (4) oraz pętlę (1).

Podobną analizę *in silico* przeprowadzono również dla innego reagenta shmiR, wykorzystującego prekursor pri-miR-136, jednak zawierającego sekwencję innego siRNA. Reagent shmiR-136-luc posiada elementy strukturalne wyjściowego prekursora, natomiast wprowadzenie sekwencji siRNA spowodowało zmianę sekwencji nukleotydowej w pobliżu zakładanych miejsc cięcia cząsteczki przez RNazy. Analiza struktury przestrzennej wykazała, iż reagent ten posiada znacznie zmienioną geometrię cząsteczki (RMSD w stosunku do trzonu pri-miR-136 wynosi 11,287 Å). Struktura prekursora uległa „zgięciu” w obrębie trzonu struktury spinki (Ryc. 36A). Zachowanie elementów strukturalnych nośnikowych pri-miRNA

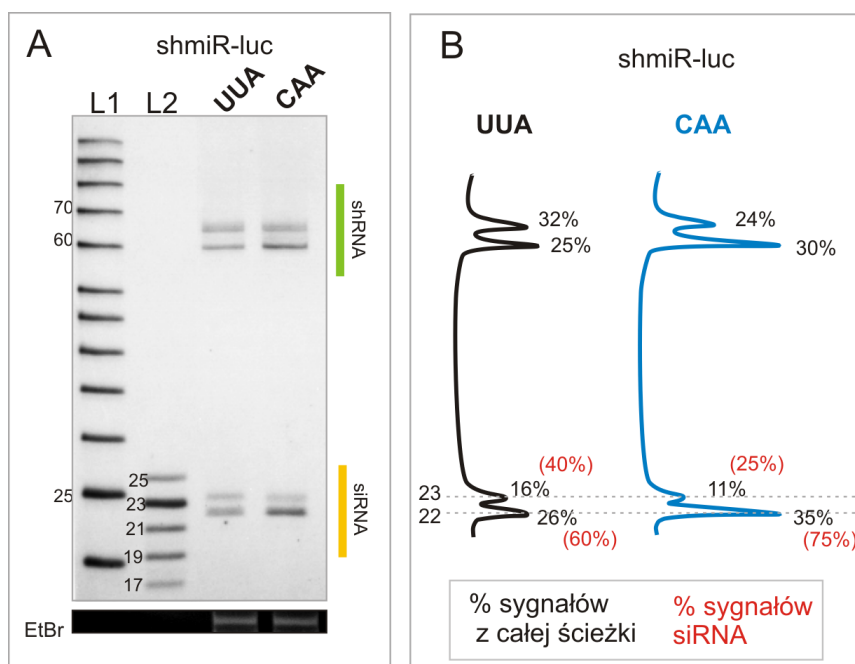
w reagentach shmiR odbywa się przez wprowadzanie zmian nukleotydowych w sekwencji nici pasażerskiej. Testowany wariant reagenta shmiR-136-luc posiadał sekwencję UUA w nici pasażerskiej w obrębie pętli wewnętrznej. Aby sprawdzić, czy obserwowana zmiana struktury przestrzennej związana jest z rodzajem niekanonicznych par zasad w obrębie motywu strukturalnego przeprowadzono przewidywanie struktury dla innej wersji tego reagenta zawierającej sekwencję CAA w nici pasażerskiej w obrębie pętli wewnętrznej (Ryc. 36A). Analiza struktury przestrzennej shmiR-136-luc-CAA wykazała przyjmowanie przez ten reagent standardowej struktury przestrzennej typu spinki, nieznacznie tylko różnej od struktury nośnikowego pri-miRNA (wartość RMSD w stosunku do trzonu pri-miR-136 wynosi 3,742 Å) (Ryc. 36A i B).



Ryc. 36. Analiza struktur przestrzennych reagentów shmiR posiadających inne niekanoniczne pary zasad w obrębie pętli wewnętrznej.

A- struktury przestrzenne reagentów shmiR-136-Luc-UUA oraz shmiR-136-Luc-CAA, niebieski-niś wiodąca siRNA-Luc, czerwony- nukleotydy nici wiodącej w obrębie motywów strukturalnych, Zielony- różne nukleotydy nici pasażerskiej w obrębie motywów strukturalnych; **B-** struktury przestrzenne pri-miR-136-szary, shmiR-136-Luc-UUA-jasnozielony, shmiR-136-Luc-CAA-różowy. (Z wykorzystaniem oprogramowania RnaComposer, RNAfold oraz PyMol.) Wartość RMSD pomiędzy waraintami shmiR-136-Luc wynosi 10,219 Å.

Postanowiono sprawdzić czy obserwowane różnice w przewidywanej strukturze przestrzennej cząsteczek RNA przekładają się na funkcjonowanie reagentów shmiR w komórkach i czy mają odzwierciedlanie w odmiennym docinaniu tych cząsteczek przez RNazy Drosha i Dicer. W tym celu skonstruowano reagenty shmiR-136-luc-UUA oraz shmiR-136-luc-CAA a następnie wprowadzono je do komórek. Wyniki hybrydyzacji typu *northern* pokazały, iż w obydwu przypadkach obserwujemy uwalnianie prekursorów shRNA o podobnym wzorze (krótki i długi wariant shRNA), jak w przypadku reagenta shmiR-136-HD1 oraz powstawanie siRNA w dwóch wariantach długości 22 i 23 nt w różnych proporcjach (Ryc. 37A i B).



Ryc. 37. Analiza obróbki reagentów shmiR-136-luc-UUA oraz shmiR-136-luc-CAA

A- Wynik hybrydyzacji typu *northern* wraz z **B-** analizą intensywności sygnałów od poszczególnych wariantów prekursorów shRNA oraz siRNA. Procentowe udziały obserwowanych produktów podano w odniesieniu do całości sygnału w ścieżce (wartości podane kolorem czarnym); dla cząsteczek siRNA podano również udziały poszczególnych wariantów w całkowitej puli obserwowanych siRNA (wartości w kolorze czerwonym). L1 oraz L2- wzorce długości RNA. EtBr- kontrola ilości nałożonego materiału RNA- barwienie bromkiem etydy.

„Zgięty” reagent shmiR-136-luc-UUA uwalnia warianty siRNA w proporcji 60% i 40% z przewagą wariantu krótszego. Podczas gdy „prosta” wersja tej cząsteczki (shmiR-136-luc-CAA) uwalnia w 75% 22 nt wariant siRNA i tylko w 25 % wariant dłuższy. Obserwuje się również zmiany proporcji pomiędzy wariantami prekursorów shRNA uwalnianych z powyższych reagentów (Ryc. 37B). Znaczna zmiana w przewidywanej geometrii cząsteczek wywołała zwiększenie uwalniania krótszego produktu siRNA,

a zarazem niewielką lecz, powtarzalną zmianę puli uwalnianych cząsteczek w kierunku zwiększenia ich homogenności (*Ryc. 37A i B*).

Uzyskane wyniki pokazały, że pomimo różnej obecności elementów lokalnie rozluźniających strukturę helisy RNA przewidywane struktury przestrzenne reagentów shmiR (shmiR-136-HD1, M1-M3) są bardzo podobne. Jednak pewne niewielkie różnice w geometrii reagentów shmiR mogą wpływać na oddziaływania tych cząsteczek z białkami uczestniczącymi w ich obróbce. Wykazano, iż reagent M1 posiada najbardziej odbiegającą od innych reagentów (shmiR-136-HD1, M1-M3) strukturę przestrzenną i jednocześnie jest jedynym z testowanych reagentów, z którego preferencyjnie powstaje wariant +0nt-siRNA (52%). Zaobserwowano również wpływ składu nukleotydowego w obrębie elementów zaburzających regularność helisy na geometrię całej cząsteczki, a w konsekwencji na sposób obróbki reagentów shmiR w komórkach.

Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie struktury analizowanych cząsteczek RNA bez uwzględnienia ich oddziaływań z białkami. Wydaje się natomiast, że białka uczestniczące w obróbce analizowanych reagentów shmiR mogą być silnym modulatorem ich struktury, zwłaszcza dla cząsteczek posiadających asymetryczne wybrzuszenia, których obecność zwiększa „giętkość” przyjmowanej struktury.

4.3. Wpływ cech sekwencji nukleotydowej na precyzję cięcia reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer

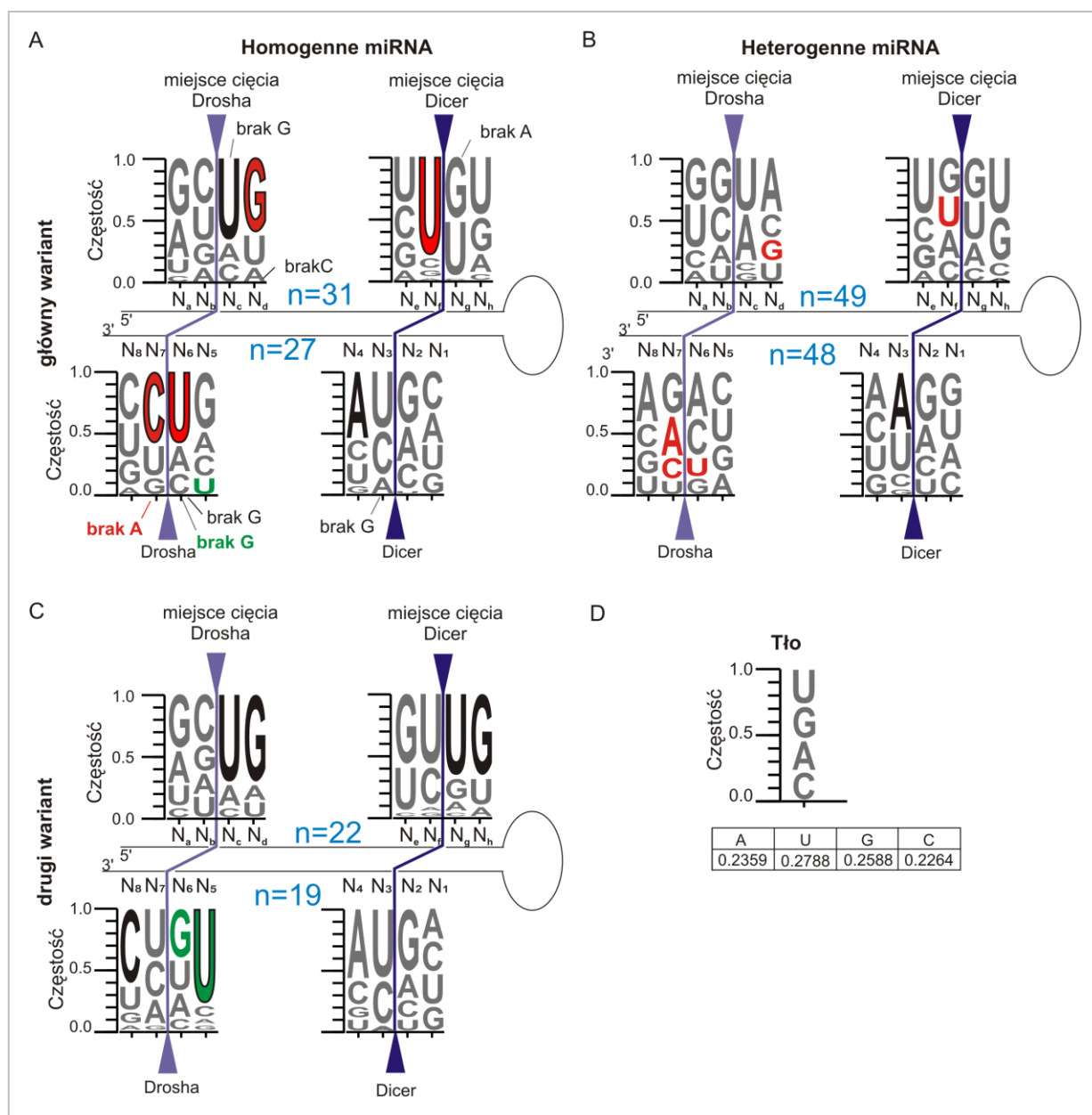
W opisanych już częściach badań próbowano powiązać obserwowane różnice w obróbce reagentów shmiR z przyjmowaną przez nie strukturą. Jednak wyniki analiz pokazują, że nie wszystkie obserwowane efekty można wytłumaczyć zmianami strukturalnymi. W przypadku wyjściowego reagenta shmiR-136-HD1 wymiana sekwencji miRNA na sekwencję syntetycznej wstawki siRNA umożliwiła zachowanie prawie nie zmienionej sekwencji w miejscach cięcia reagenta przez RNazy szlaku biogenezy miRNA (Ryc. 28A). Jest to sytuacja rzadka, ponieważ w większości przypadków sekwencje w miejscach cięcia ulegają zmianie podczas konstrukcji reagentów shmiR, tak jak w przypadku shmiR-136-luc. Wpływ sekwencji nukleotydowej w pobliżu miejsc cięcia przez RNazy na efektywność obróbki reagentów zaobserwowano już na etapie opracowywania oraz optymalizacji systemu do analizy reagentów typu shmiR (Ryc. 16B oraz Ryc. 17B). Z tego powodu postanowiono sprawdzić czy sekwencja nukleotydowa w miejscach cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer może mieć wpływ również na precyzję generowanych cięć, a w konsekwencji na uwalnianie homogennych lub heterogennych cząsteczek efektorowych.

4.3.1. Częstość występowania nukleotydów w miejscach cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer

W kolejnym etapie badań sprawdzono, czy sekwencja nukleotydowa w miejscach cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer może być istotnym czynnikiem wpływającym na sposób obróbki cząsteczek prekursorowych w komórkach (Starega-Roslan i wsp. 2015). W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę bioinformatyczną dla endogennych miRNA, ze względu na możliwość analizy dużej grupy cząsteczek o różnych sekwencjach nukleotydowych. Analizę przeprowadzono dla miRNA ulegających ekspresji w komórkach HEK 293T na danych pochodzących z NGS udostępnionych przez Dr Davida Galasa (Lee i wsp. 2010) uzyskanych na platformie Illumina/Solexa. Wszystkie miRNA, które wykazały powyżej 5 odczytów w analizie NGS zostały podzielone na grupę homogennych oraz heterogennych miRNA. Do homogennych miRNA zaliczono takie cząsteczki, których główny wariant miRNA uwalnianego z danego ramienia stanowił 90% i więcej. W grupie miRNA heterogennych znalazły się takie cząsteczki, których główny wariant stanowi poniżej 70% (od 30 do 70 %). Grupa miRNA pośrednich, których główny wariant osiąga 70-90%, jako bardzo niejednorodna nie była dalej analizowana. Wysoka częstość (w przypadku heterogennych

miRNA) oraz niska częstość lub brak (w przypadku homogennych miRNA) drugiego najczęstszego wariantu miRNA, decyduje o przyporządkowaniu cząsteczek do poszczególnych grup. Dlatego dodatkowo analiza została wykonana w obrębie grupy miRNA homogennych dla pierwszego najbardziej reprezentowanego wariantu oraz dla drugiego wariantu stanowiącego poniżej 10 % odczytów. Należy w tym miejscu podkreślić że w grupie heterogennych miRNA drugi wariant może być prawie tak samo częsty jak pierwszy i osiągać wartości blisko 50%.

W obrębie wydzielonych dwóch grup miRNA przeanalizowano częstość występowania poszczególnych nukleotydów w miejscach cięcia prekursorów przez RNazy. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w częstości nukleotydów w głównym wariacie miRNA pomiędzy grupą homogennych i heterogennych miRNA (*Ryc. 38A i B*) (oznaczone kolorem czerwonym) oraz istotne statystycznie różnice pomiędzy pierwszym a drugim wariantem w obrębie miRNA homogennych (*Ryc. 38A i C*) (oznaczone kolorem zielonym). Obserwowano również pozycje wykazujące istotną statystycznie różnicę częstości występowania nukleotydów w stosunku do tła, przedstawiającego średnią częstość nukleotydów w obrębie ludzkich pre-miRNA wg. bazy miRBase (oznaczone czarnym kolorem lub czarną obwódką liter, jeżeli w danej pozycji zaznaczona była istotność statystyczna we wcześniejszych porównaniach).



Ryc. 38. Analiza częstości występowania nukleotydów w miejscach cięcia prekursorów pri-miRNA przez RNazy Drosha oraz Dicer. Częstości nukleotydów w pobliżu miejsc cięcia przedstawiono w postaci WebLogo. Na każdym wykresie na osi Y podano częstości nukleotydów reprezentowane przez wielkość liter odpowiadających poszczególnym nukleotydom. Nukleotydy wykazujące statystycznie zmienioną częstość w stosunku do tła ($p < 0.00078$, dwustronny, dokładny test Fishera z poprawką Bonferroni) (Materiały i Metody Tabela 8) zostały zaznaczone kolorem czarnym lub czarą obwódką liter. n - reprezentuje liczbę analizowanych miRNA. Analiza dla: **A**- głównych wariantów miRNA homogenne, **B**- głównych wariantów miRNA heterogenne, **C**- drugiego wariantu miRNA homogenne. **D**- Tło zostało określone jako średnia częstość nukleotydów w obrębie ludzkich prekursorów miRNA zdeponowanych w bazie miRBase v14. Wartości istotności statystycznej (p -value) w pozycjach $N_a, N_b, N_c, N_d, N_5, N_6, N_7, N_8$ oraz $N_e, N_f, N_g, N_h, N_1, N_2, N_3, N_4$ umieszczono w rozdziale Materiały i Metody (Tabela 8).

Porównanie pomiędzy grupami homogennych i heterogennych miRNA pokazało, że występują istotne różnice w występowaniu nukleotydu G ($p=2,22 \times 10^{-4}$) w drugiej pozycji miRNA uwalnianego z ramienia 5' (nadreprezentacja w grupie homogennych i zubożenie w grupie heterogennych miRNA) oraz w występowaniu nukleotydu U ($p=2,7 \times 10^{-6}$) w ostatniej pozycji miRNA uwalnianego z ramienia 5' (Ryc. 38A i B). Zaobserwowano również różnice w występowaniu nukleotydu U ($p=2,51 \times 10^{-4}$) w ostatniej pozycji miRNA na końcu 3' w grupie homogennych miRNA uwalnianych z ramienia 3' (nadreprezentacja w grupie homogennych i zubożenie w grupie heterogennych miRNA). W pierwszej pozycji odcinanej sekwencji otaczającej pre-miRNA w ramieniu 3' w grupie homogennych miRNA, zaobserwowano zwiększoną częstość występowania C ($p=7,07 \times 10^{-4}$) oraz brak A ($p=3,07 \times 10^{-4}$), podczas gdy w grupie miRNA heterogennych częstość nukleotydów A i C w tej pozycji nie odbiegała od tła.

Porównanie pierwszego oraz drugiego najczęstszego wariantu miRNA w obrębie grupy homogennych miRNA (Ryc. 38A i C) wykazało brak nukleotydu G ($p=2,9 \times 10^{-4}$) w ostatniej pozycji głównego wariantu miRNA uwalnianego z ramienia 3' oraz niską częstość występowania nukleotydu U ($p=1,76 \times 10^{-5}$) w pozycji ją poprzedzającej (w kierunku 5'). Podczas gdy nukleotydy te w analogicznych pozycjach drugiego wariantu miRNA wykazywały wysoką częstość występowania. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o tym, że charakterystyczne cechy sekwencji wykrywane w drugim najczęstszym wariantcie miRNA homogennych są odpowiedzialne za jego niską ekspresję.

Analiza częstości nukleotydów w odniesieniu do tła (Ryc. 38D) wykazała, że w grupie homogennych miRNA występuje znacznie więcej nukleotydów o istotnie zmienionej częstości. Obserwowano brak występowania nukleotydu G ($p=1,27 \times 10^{-4}$) w pierwszej pozycji miRNA uwalnianego z ramienia 5', preferencyjne występowanie nukleotydów UG na końcu 5' cząsteczek powstających z ramienia 5' ($p=4,61 \times 10^{-6}$; $p=3,44 \times 10^{-5}$), oraz nadreprezentację nukleotydów U ($p=1,56 \times 10^{-9}$; $p=7,76 \times 10^{-4}$) na końcach 3' cząsteczek pochodzących z obydwu ramion prekursora. W grupie heterogennych miRNA wykryto tylko dwie cechy istotne statystycznie w stosunku do tła (preferencja występowania A w pierwszej pozycji miRNA uwalnianego z ramienia 3' ($p=2,41 \times 10^{-4}$) oraz bardzo niską częstość występowania nukleotydu A w drugim nukleotydzie sekwencji odcinanej przez RNazę Dicer w ramieniu 5' ($p=5,33 \times 10^{-4}$)).

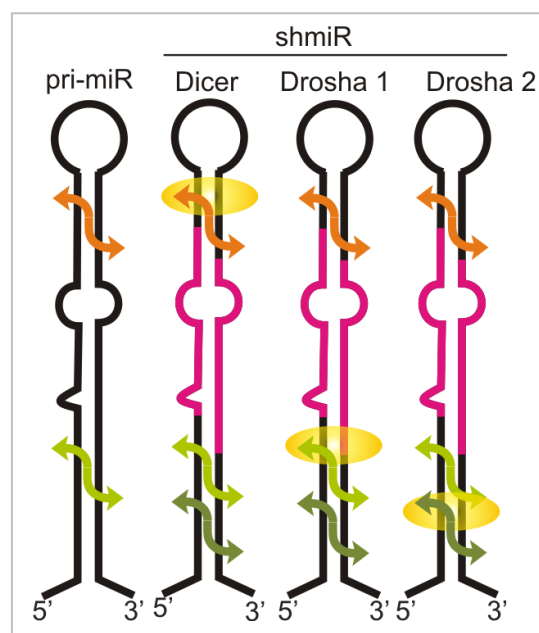
Dzięki przeprowadzonej analizie bioinformatycznej wykryto te cechy sekwencji, które różnią homogenne i heterogenne miRNA, głównie w miejscu docinania prekursorów pri-miRNA przez RNazę Drosha. Zidentyfikowano zdecydowanie więcej elementów sekwencji charakterystycznych dla homogennych miRNA, niż dla miRNA heterogennych.

We wcześniejszych rozdziałach niniejszej pracy zauważono, że w niektórych przypadkach zmiany sekwencji w miejscu cięcia powodowały obniżenie efektywności obróbki reagentów shmiR. Wyniki analizy bioinformatycznej dla pri-miRNA pozwalają natomiast sądzić, iż sekwencja w miejscach cięcia przez RNazy może wpływać również na precyzję cięcia pri-miRNA jak i konstruowanych na ich podstawie reagentów shmiR.

4.3.2. Wpływ zmian sekwencji na precyzję cięcia reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer

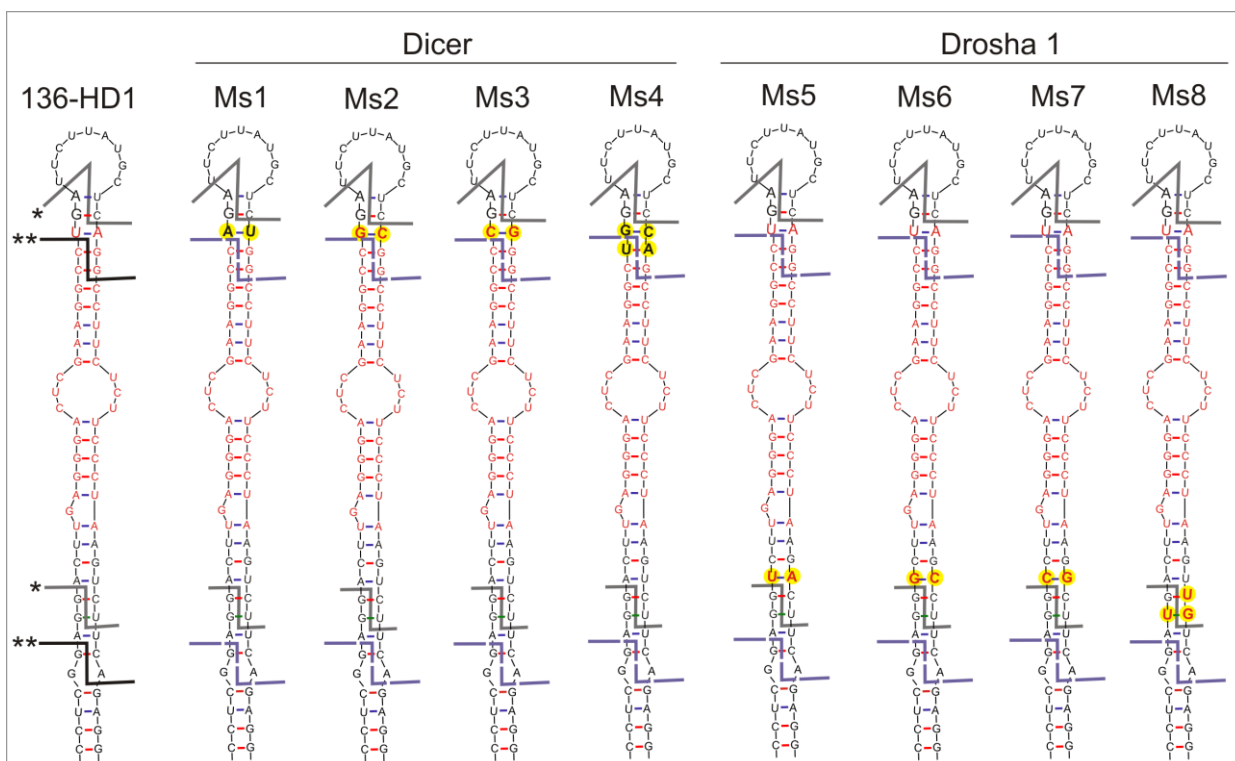
W kolejnej części pracy podjęto badania w celu wyjaśnienia wpływu sekwencji nukleotydowej na obróbkę reagentów shmiR zaobserwowanego podczas pierwszego etapu ich konstrukcji. Przeprowadzona analiza miała również pozwolić na określenie znaczenia wyników przedstawionej w poprzednim rozdziale analizy bioinformatycznej dla technologii RNAi. W tym celu skonstruowano zestaw cząsteczek zmutowanych z substytucjami nukleotydowymi wprowadzonymi w pobliżu miejsc cięcia pri-miR-136 przez RNazy Drosha oraz Dicer.

Wcześniejsze analizy typu *northern* dla reagentów shmiR, wykorzystujących sekwencje pri-miR-136 wykazały występowanie przynajmniej dwóch wariantów prekursorów shRNA (krótkich oraz dłuższych, przesuniętych o +3 nt, co w efekcie powoduje wydłużenie prekursora shRNA o maksymalnie 6 nt). Z tego względu podczas konstruowania cząsteczek z mutacjami miejsca cięcia dla RNazy Drosha stworzono dwie serie reagentów (Ryc. 39). Reagenty z mutacją wprowadzoną w pierwszej pozycji krótkiego prekursora shRNA (miejsce cięcia analogiczne jak w endogennym pri-miR-136) oznaczono jako mutanty Drosha 1, natomiast reagenty z mutacją wprowadzoną w pierwszej pozycji długiego prekursora shRNA (z którego powstają siRNA w wyjściowym shmiR-136-HD1) oznaczono jako mutanty Drosha 2. Mutanty miejsca cięcia przez Dicer posiadają substytucje nukleotydowe ułożone tak, że w zależności od wariantu prekursora shRNA występują one w miejscu cięcia przez RNazę Dicer w ramieniu 5' (w długich shRNA) lub w ramieniu 3' (w krótkich shRNA).



Ryc. 39. Serie reagentów z wprowadzonymi substytucjami nukleotydowymi.
Reagenty z mutacjami w miejscu cięcia przez RNazę Dicer (*Ms1-4*), Drosha 1 (*Ms5-8*) oraz Drosha 2 (*Mq5-8*)

Zestaw testowanych cząsteczek zmutowanych (Ms1-8), utworzonych na podstawie wyjściowego reagenta shmiR-136-HD1 wraz z wprowadzonymi w nich substytucjami przedstawiono na Ryc. 40.

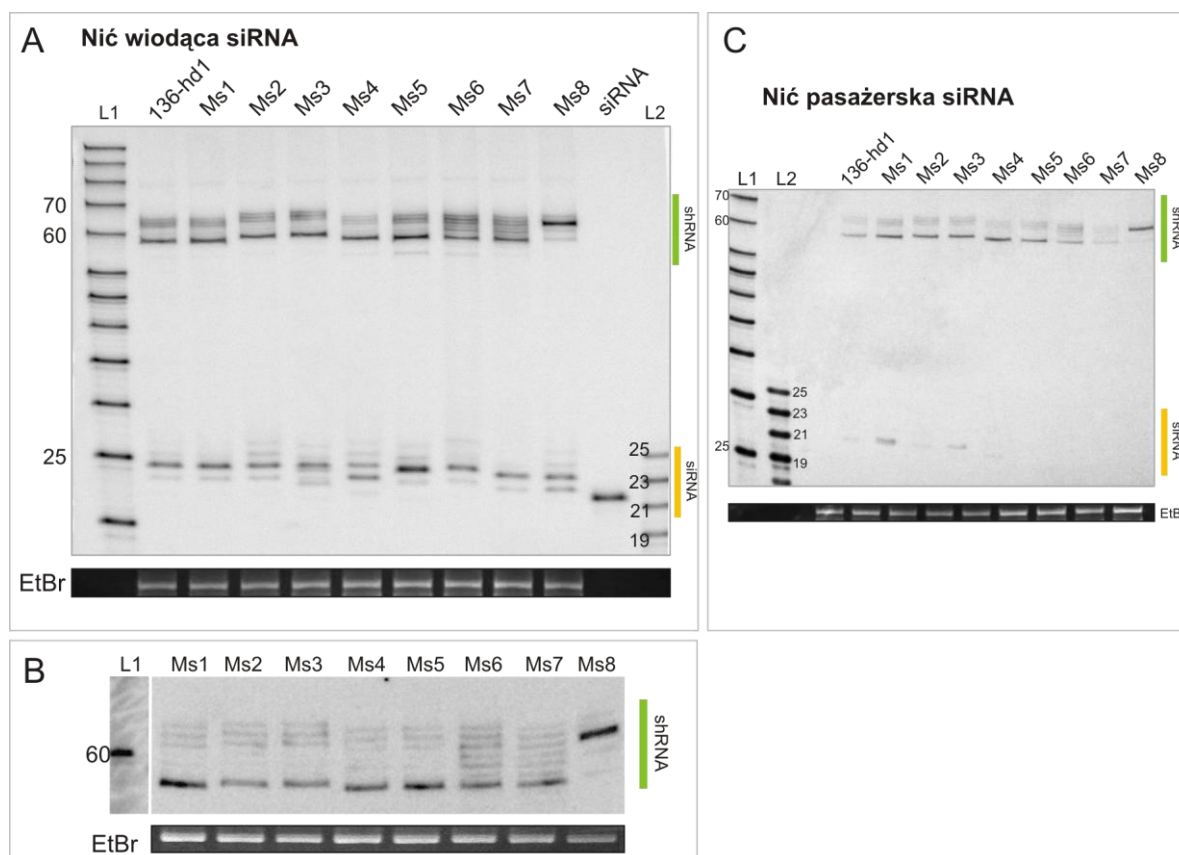


Ryc. 40. Seria cząsteczek Ms1-8 ze zmutowaną sekwencją w pobliżu miejsc cięcia przez RNazy Drosha (mutanty Drosha 1) oraz Dicer.

Kolorem żółtym zaznaczono substytucje nukleotydowe w pobliżu miejsc cięcia Ms1- Ms4 przez RNazę Dicer oraz Ms5-Ms8 przez RNazę Drosha. Kolorem czerwonym zaznaczono nukleotydy zmienione w wyniku wprowadzenia sekwencji siRNA do pri-miRNA . Szarą linią oraz symbolem * zaznaczono zakładane miejsca cięcia takie jak w pri-miRNA-136, czarną linią oraz symbolem ** dodatkowe miejsce cięcia shmiR-136-HD1 na podstawie NGS, niebieska przerywana linia reprezentuje potencjalne miejsce cięcia w reagentach Ms1-8, takie jak w shmiR-136-HD1.

Cząsteczki Ms1-Ms3 posiadają zmienioną (lub odwróconą) jedną parę nukleotydów w pobliżu miejsca cięcia przez RNazę Dicer. W przypadku reagenta Ms4 zmienione zostały dwie pary nukleotydowe w pobliżu miejsca cięcia przez Dicer w celu przerywania długiego ciągu par G:C w tym rejonie (obecnego w cząsteczkach Ms2 i Ms3). Analogicznie cząsteczki Ms5-Ms8 posiadają mutacje w obrębie miejsca cięcia przez RNazę Drosha zakładanego na podstawie endogennego pri-miR-136 (w pierwszej pozycji krótkiego wariantu prekursora shRNA - Drosha 1). Cząsteczka Ms8 posiada modyfikację sekwencji, wprowadzającą wzór sekwencji nukleotydowej nie występujący w obrębie miejsca cięcia przez RNazę Drosha w głównym wariantcie homogennych miRNA (na podstawie wyników analizy bioinformatycznej (Ryc. 38)).

Skonstruowany zestaw cząsteczek z wprowadzonymi mutacjami został przeanalizowany pod kątem zmian w obróbce przez RNazy Drosha oraz Dicer (*Ryc. 41*).



Ryc. 41. Analiza produktów shRNA oraz siRNA uwalnianych z serii reagentów z mutacjami sekwencji.

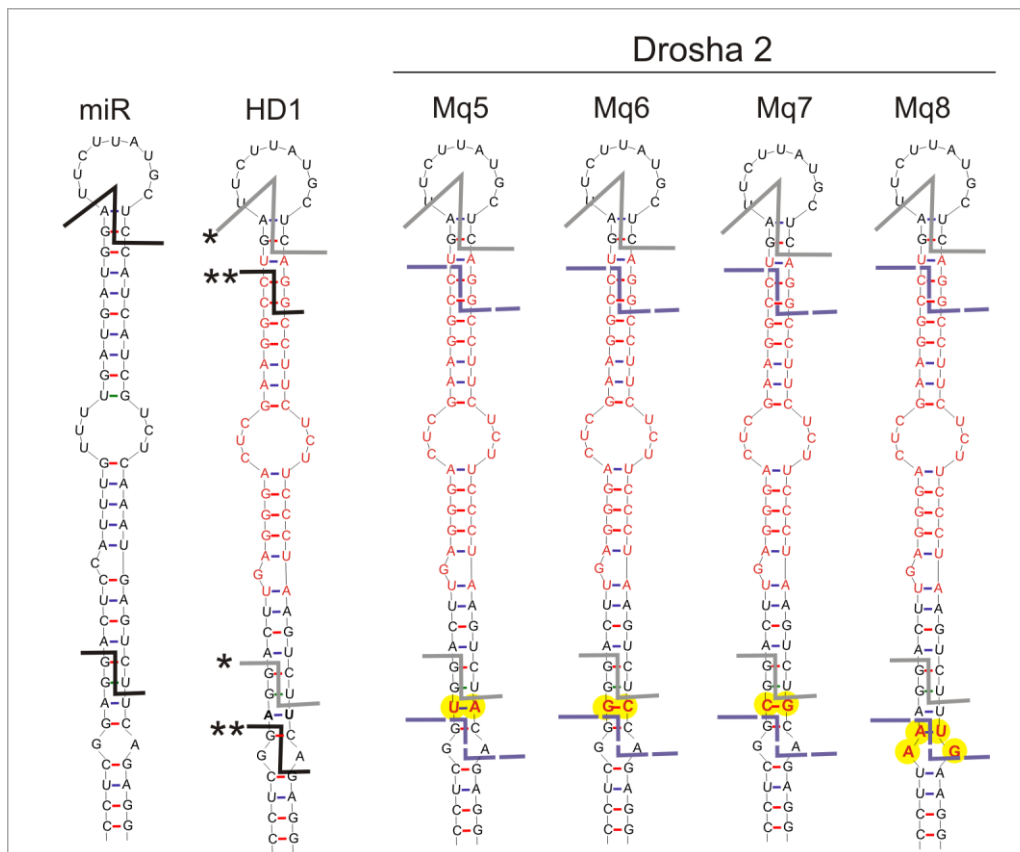
A- Analiza typu northern blot wykrywająca nici wiodące, **B-** Wynik rozdziału prekursorów shRNA. **C-** Analiza typu northern blot wykrywająca nici pasażerskie. L1- oraz L2 – wzorce długości RNA.

Tak jak się spodziewano analiza cząsteczek posiadających mutacje miejsca Dicer (Ms1-4) nie wykazała istotnych różnic w cięciu cząsteczek przez RNazę Drosha (*Ryc. 41A*). Zaobserwowano zmiany na etapie docinania reagentów przez RNazę Dicer polegające na nieznacznym zwiększeniu heterogenności siRNA uwalnianych z konstruktyw Ms2 oraz Ms3 (ale nie Ms1). W przypadku konstruktu Ms4 zaobserwowano zwiększenie heterogenności uwalnianych siRNA i pojawienie się dwóch wariantów siRNA (dodatkowy wariant długości 22 nt) w podobnych ilościach. Zmiana nukleotydowa w reagencie Ms4 miała na celu rozluźnienie struktury trzonu przy pętli terminalnej. Obserwowany wynik wskazuje, że obecność słabszej pary A:U w obrębie ciągu 6 par G:C spowodowała pojawienie się dodatkowego miejsca cięcia tej cząsteczki przez RNazę Dicer (zmniejszenie precyzji cięcia).

W analizie cząsteczek ze zmutowanym miejscem cięcia przez RNazę Drosha (Drosha 1) zaobserwowano różnice w profilach produktów shRNA uwalnianych w wyniku cięcia przez tę RNazę (*Ryc. 41A*). W przypadku reagenta Ms5 obserwowano zwiększoną ilość krótszego wariantu prekursora shRNA, natomiast dla Ms6 i Ms7 zwiększoną ilość dłuższych wariantów shRNA. Największą różnicę obserwowano w przypadku cząsteczki Ms8, gdzie najprawdopodobniej doszło do przesunięcia miejsca cięcia, a obserwowany jest bardziej homogenny produkt shRNA, migrujący jak cząsteczki dłuższe (wariant shRNA dłuższy o 4 nt powstały w wyniku przesunięcia miejsca cięcia o 2 pz a nie o 3 pz) (*Ryc. 41B*). Zmiany obserwowano również na poziomie uwalniania cząsteczek siRNA. Zwiększenie efektywności powstawania siRNA w przypadku reagenta Ms5 oraz wzrost heterogenności uwalnianych cząsteczek siRNA (pojawienie się dodatkowego krótszego wariantu) w przypadku reagenta Ms8.

Analiza poziomu nici pasażerskich w badanych reagentach (*Ryc. 41C*) wykazała, że tylko w przypadku Ms1 oraz Ms3 wprowadzone mutacje spowodowały zwiększenie intensywności ich wykrywania. Sytuacja taka jest możliwa ze względu na przypuszczalną zmianę stabilności końców uwalnianego dupleksu siRNA, związaną ze zwiększoną możliwością zatrzymywania nici pasażerskiej w kompleksie RISC oraz zwiększaniem jej trwałości poprzez wiązanie z białkami. Taka możliwość jest bardziej prawdopodobna w przypadku siRNA powstających z krótkich wersji shRNA, bo wtedy wprowadzane substytucje zmieniają końcowy nukleotyd siRNA (w najdłuższym wariantcie shRNA mutowane nukleotydy ulokowane są w obrębie odcinanej pętli terminalnej) (*Ryc. 40*).

Następnie zbadano obróbkę reagentów Mq5-8 posiadających substytucje w pierwszej pozycji długiego prekursora shRNA (mutanty Drosha 2) (Ryc. 42) analogiczne do substytucji mutantów Drosha 1.



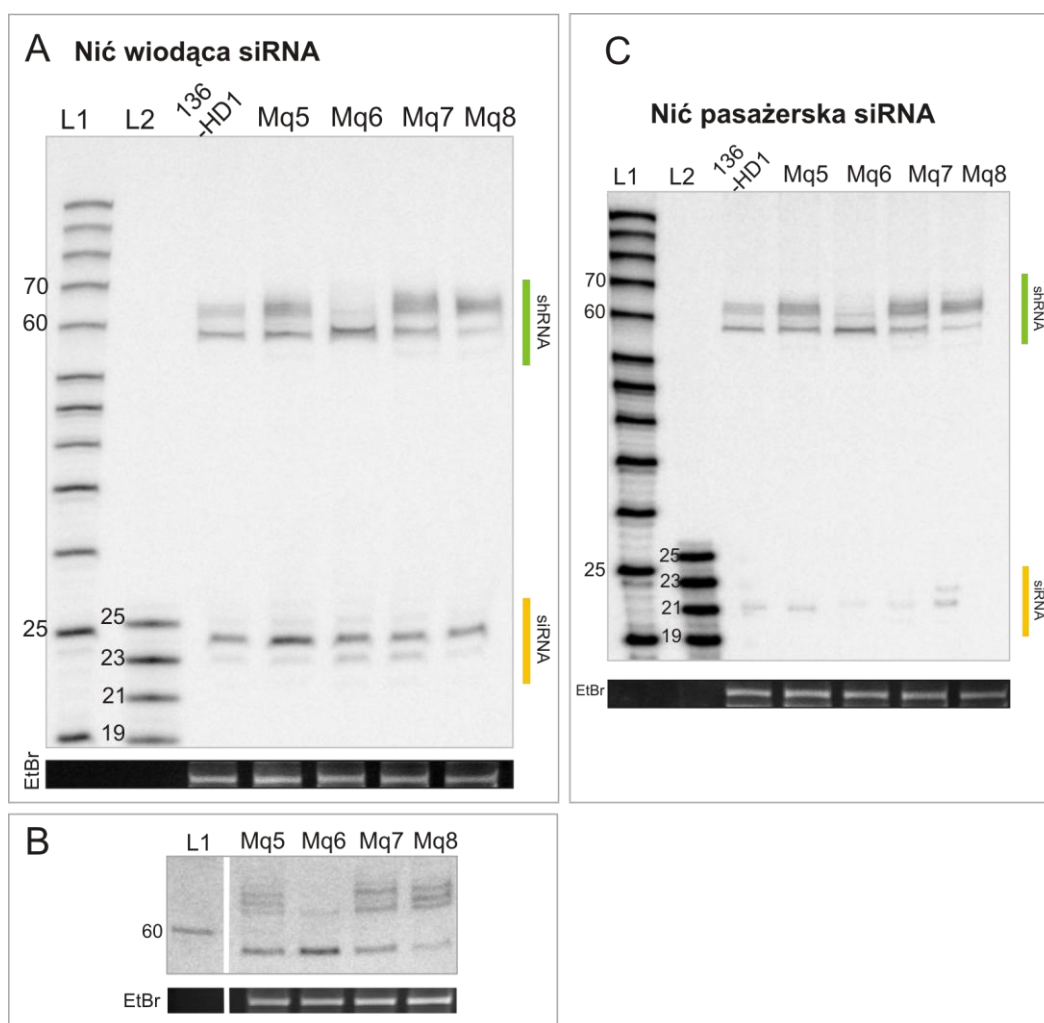
Ryc. 42. Seria cząsteczek Mq5-8 ze zmutowaną sekwencją w pobliżu miejsc cięcia przez RNazę Drosha (mutanty Drosha 2).

Kolorem żółtym zaznaczono substytucje nukleotydowe w pobliżu miejsc cięcia przez RNazę Drosha. Nukleotydy zmienione w wyniku wprowadzenia sekwencji siRNA do pri-miRNA-czerwony kolor. Szarą linią oraz symbolem * zaznaczono zakładane miejsca cięcia takie jak w pri-miRNA-136, czarną linią oraz symbolem ** zaznaczono dodatkowe miejsca cięcia shmiR-136-HD1 na podstawie NGS, niebieska przerywana linia reprezentuje potencjalne miejsce cięcia w reagentach Mq5-8 takie jak w shmiR-136-HD1.

Wyniki hybrydyzacji typu *northern* wykazały (Ryc. 43A i B), że wprowadzone mutacje wywołały zmiany w profilach obserwowanych cząsteczek shRNA uwalnianych w wyniku cięcia przez RNazę Drosha w porównaniu do reagenta wyjściowego shmiR-136-HD1.

Zaobserwowano, że intensywność sygnału od długich wariantów prekursora wzrosła dla Mq5, Mq7 oraz Mq8 podczas gdy w przypadku reagenta Mq6 znacznie spadła na korzyść zwiększonej intensywności sygnału od krótkiego wariantu shRNA w tym konstrukcie (Ryc. 43B). Zaobserwowano również nieznaczne zwiększenie heterogenności uwalnianych

cząsteczek siRNA w przypadku reagentów Mq6 oraz Mq7. W przypadku reagenta Mq5 odnotowano również zwiększenie ilości uwalnianych cząsteczek siRNA. Warto podkreślić, że w przypadku serii Mq5-8, krótkie wersje prekursorów shRNA powstające we wszystkich konstrukcjach są takie same (nie posiadają substytucji nukleotydowych). Wydaje się zatem, że wszystkie obserwowane zmiany po wprowadzeniu substytucji nukleotydowych wynikają ze zmienionej obróbki dłuższych prekursorów shRNA. Analiza ekspresji nici pasażerskich (Ryc. 43C) wykazała, że dla reagentów Mq6 oraz Mq7 ich poziom uległ obniżeniu. W przypadku reagenta Mq8 z większą intensywnością wykrywane są dwa warianty długości nici pasażerskich.

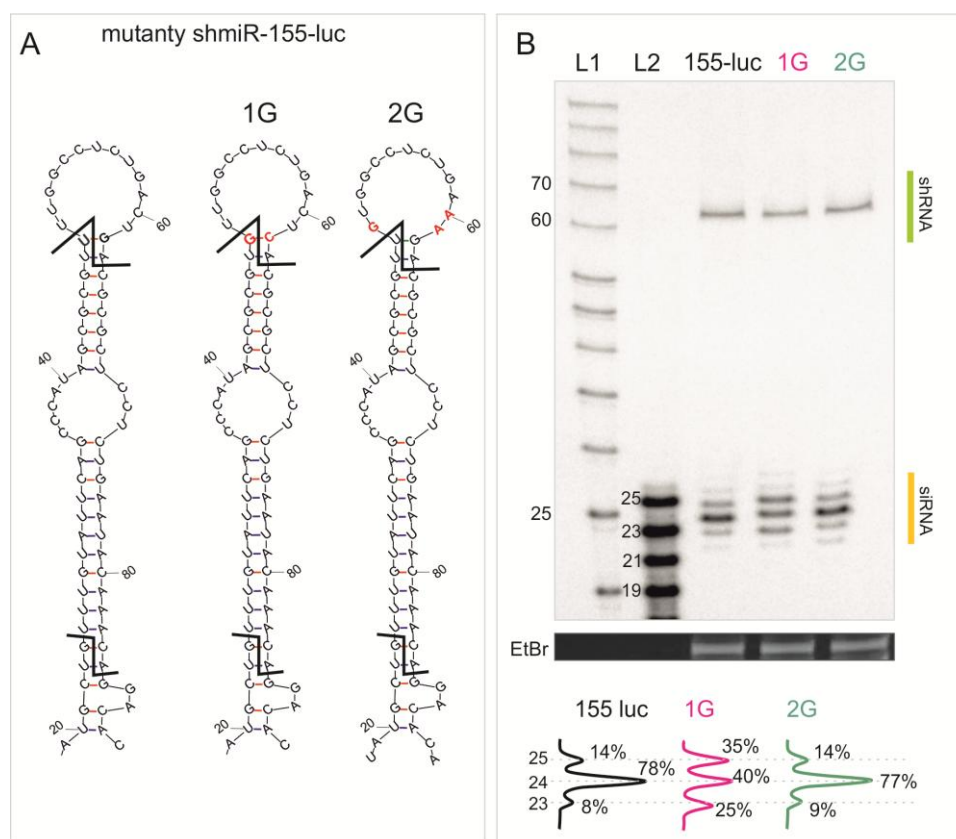


Ryc. 43. Analiza produktów shRNA oraz siRNA uwalnianych z serii reagentów z mutacjami sekwencji w miejscu cięcia przez RNazę Droscha (Droscha 2).

A- Analiza typu northern blot wykrywająca nici wiodące, **B-** Wynik rozdziału prekursorów shRNA. **C-** Analiza typu northern blot wykrywająca nici pasażerskie. L1-oraz L2 – wzorce długości RNA.

Bezpośredni wpływ substytucji nukleotydowych w miejscu cięcia przez RNazę Dicer na pulę uwalnianych siRNA jest trudny do określenia w przypadku cząsteczek posiadających

kilka wariantów prekursorów shRNA (jak w przypadku mutantów shmiR-136-HD1). Przeprowadzono zatem analizę potwierdzającą uzyskane wyniki na cząsteczce shmiR-mmu-155-luc, z której uwalniany jest w komórkach tylko jeden zdefiniowany prekursor shRNA. siRNA uwalniane z tego konstruktów zawierają jeden główny wariant długości 24 nt, stanowiący powyżej 80% odczytów w analizie NGS oraz dwa towarzyszące warianty długości (Ryc. 21A i Ryc. 22). Cięcie przez RNazę Dicer tej cząsteczki w ramieniu 5' następuje w sąsiadujących pozycjach w obrębie ciągu 4 nukleotydów U, zatem uwalniane cząsteczki posiadają zawsze końcowy nukleotyd U. Ponieważ nukleotydy U są preferowane w końcowej pozycji homogennych miRNA pochodzących z ramienia 3' prekursora (Ryc. 38A) zaprojektowano warianty zmutowane reagenta shmiR-155-luc, zamieniając jeden z nukleotydów U na nukleotyd G, występujący w tej pozycji częściej w grupie miRNA heterogennych (Ryc. 38B). Zmieniono końcowy nukleotyd głównego wariantu siRNA (reagent 1G) oraz nukleotyd najmniej reprezentowanego wariantu długości 25 nt (reagent 2G) (Ryc. 44A).



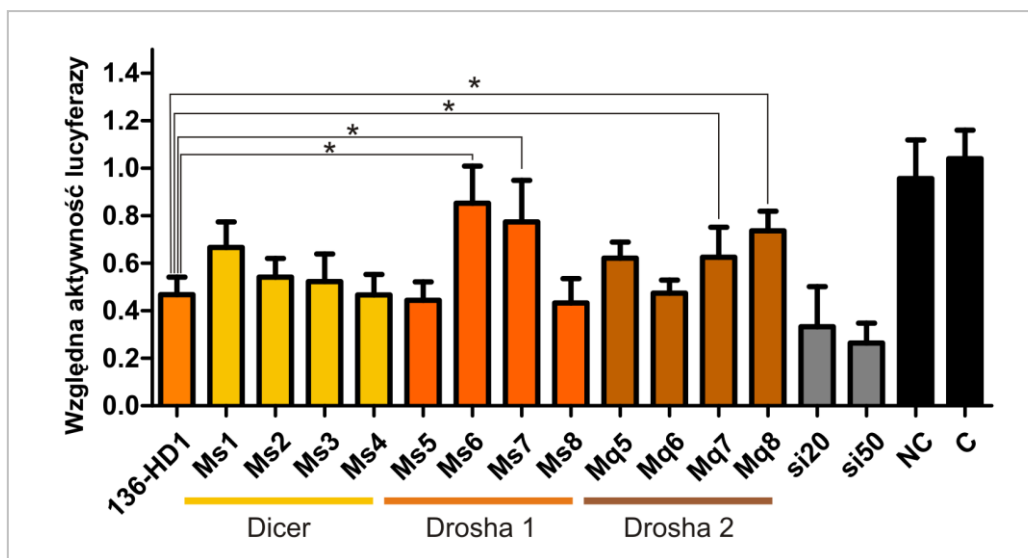
Ryc. 44. Cząsteczki ze zmutowaną sekwencją w pobliżu miejsca cięcia przez RNazę Dicer. **A-** Struktury reagentów shmiR. Kolorem czerwonym zaznaczono substytucje nukleotydowe w miejscu cięcia przez RNazę Dicer. W przypadku reagent a 2G wprowadzono dwie dodatkowe substytucje w obrębie pętli terminalnej w celu zachowania jej struktury. Czarną linią zaznaczono główne miejsca cięcia RNazy Drosha o raz Dicer. **B-** Analiza typu northern blot oraz przeprowadzona na jej podstawie analiza intensywności sygnałów od poszczególnych wariantów siRNA L1 oraz L2 – wzorce długości RNA.

Wyniki hybrydyzacji typu northern wykazały, że zmiana sekwencji nukleotydowej w głównym miejscu cięcia przez RNazę Dicer w znaczny sposób wpływa na precyzję uwalniania siRNA (Ryc. 44B). Wprowadzenie w ostatniej pozycji miRNA nukleotydu G (1G) spowodowało zwiększenie heterogenności uwalnianych cząsteczek siRNA na skutek zmniejszenia intensywności cięcia po nukleotydzie G oraz zwiększenia intensywności cięć w pozycjach go otaczających. Natomiast taka sama substytucja w pierwszej pozycji pętli terminalnej (będąca jednocześnie ostatnią pozycją wariantu siRNA o bardzo niskiej ekspresji) nie wpłynęła znacząco na uwalnianie głównego wariantu siRNA.

Wyniki powyższych analiz pokazują, że sekwencja nukleotydowa w obrębie miejsc cięcia reagentów shmiR może wpływać na precyzję ich cięcia przez RNazy, uczestnicząc jednocześnie w generowaniu różnorodnych produktów shRNA oraz siRNA.

4.3.3. Wpływ zmian w sekwencji nukleotydowej na efektywność działania reagentów shmiR

Ostatnim elementem charakterystyki cząsteczek z wprowadzonymi mutacjami sekwencji było sprawdzenie efektywności ich działania w wyciszaniu sekwencji docelowej. Analizy te zostały wykonane w systemie lucyferazowym, a uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 45.



Ryc. 45. Analiza efektywności działania reagentów z mutacjami sekwencji w miejscach cięcia przez RNazy.

Analiza w systemie lucyferazowym. Przyjęte oznaczenie kolorystyczne: odcienie koloru pomarańczowego – testowane reagenty shmiR (mutanty Dicer –Ms1-4, mutanty Drosha 1 Ms5-8 oraz mutanty Drosha 2 Mq4-8), kolor szary - kontrolne siRNA syntetyczne w dwóch stężeniach 20nM oraz 50nM, czarny- kontrole nietraktowane RNAi; NC - pusty wektor ekspresyjny, C-kontrola nietraktowana; 136-HD1 oznacza reagent wyjściowy shmiR-136-HD1

Istotnie statystycznie zmiany aktywności w stosunku do wyjściowego reagenta shmiR-136-HD1 stwierdzono w czterech przypadkach. Utratę aktywności cząsteczek siRNA uwalnianych z reagentów zmutowanych zaobserwowano w przypadku cząsteczek Ms6 oraz Ms7 posiadających substytucje w pierwszej pozycji krótkiego prekursora shRNA. Reagenty te charakteryzują się również zmienionymi wzorami uwalnianych prekursorów shRNA (Ryc. 41A i B). Wprowadzone w nich mutacje dotyczyły zmiany pary A:U w pobliżu miejsca cięcia przez RNazę Drosha na pary G:C lub C:G. Jest zatem prawdopodobne, że obserwowane

dojrzałe cząsteczki siRNA powstają w tych konstrukcjach głównie z dłuższych wersji prekursora shRNA (analogicznie jak w reagenście wyjściowym). Wówczas utrata efektywności ich działania związana jest najprawdopodobniej z występowaniem wprowadzonej mutacji (niesparowania z sekwencją docelową) w pozycji czwartej, a nie pierwszej nici wiodącej siRNA, co może w znacznym stopniu osłabiać ich aktywność. Obniżony efekt wyciszania genu docelowego zaobserwowano również dla cząsteczek zmutowanych Mq7 oraz Mq8, posiadających substytucje w pierwszej pozycji długiego prekursora shRNA.

Nieznaczne (nieistotne statystycznie) pogorszenie efektywności działania cząsteczki Ms1 można powiązać ze zwiększoną aktywnością nici pasażerskiej pochodzącej z tego reagenta (*Ryc. 41C*). Co ciekawe, nie zaobserwowano zmian w efektywności wyciszania sekwencji docelowych przez reagenty Ms4 i Ms8, które wykazywały największe różnice w komórkowej obróbce przez RNazy Drosha oraz Dicer.

Zebrane wyniki badań, dotyczących znaczenia sekwencji nukleotydowej dla obróbki reagentów shmiR pokazują, że w niektórych sytuacjach dyskretne zmiany nukleotydów w obrębie miejsc cięcia dla RNazy Drosha i Dicer wpływają na przebieg tego procesu w komórkach i w efekcie na uwalnianie różnych produktów shRNA oraz siRNA. Analiza efektywności działania reagentów z wprowadzonymi zmianami sekwencji wykazała, że niektóre modyfikacje sekwencji mogą znosić aktywność reagentów shmiR w stosunku do sekwencji docelowej.

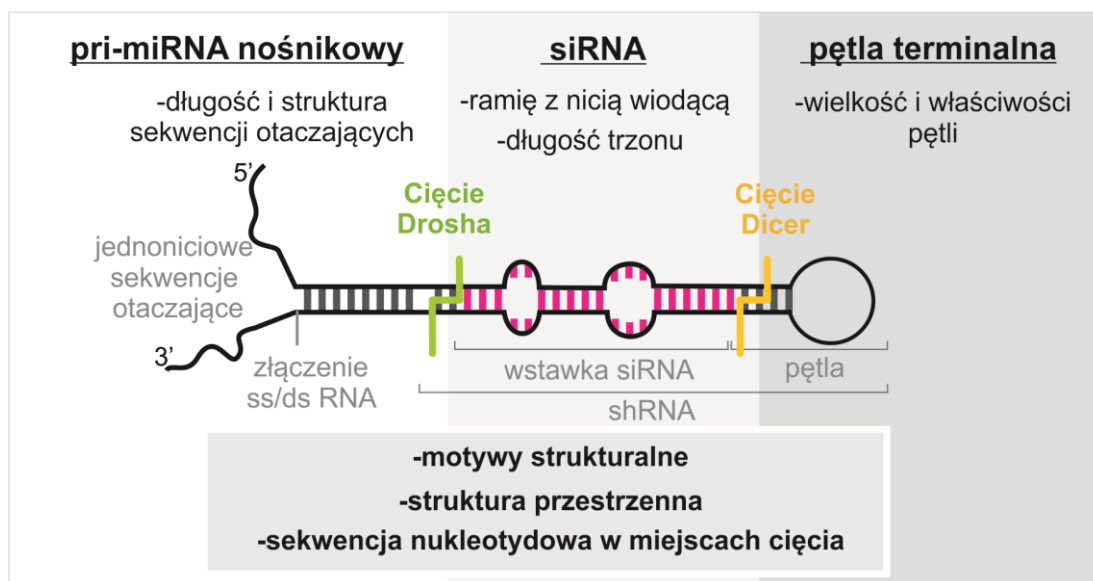
Uzyskane wyniki pokazują, iż sekwencja w miejscach cięcia reagentów shmiR będąca jednocześnie miejscem styku naturalnej sekwencji pri-miRNA i wstawki siRNA jest ważnym elementem, wpływającym na pulę uwalnianych w komórce siRNA. Jest to również czynnik, który należy brać pod uwagę przy opracowywaniu algorytmów do projektowania efektywnych reagentów technologii RNA.

IV. DYSKUSJA

W niniejszej pracy doktorskiej opisano kompleksową analizę różnych reagentów shmiR, wykorzystywanych w technologii interferencji RNA. Stosowanie tych cząsteczek zaproponowano ponad dziesięć lat temu i mimo iż podlegały one licznym procesom optymalizacyjnym wiele aspektów związanych z ich funkcjonowaniem pozostaje wciąż nie zgłębionych.

Cząsteczki shmiR uważane są za jedne z bardziej bezpiecznych reagentów technologii RNAi (Borel i wsp. 2011). Włączają się one do endogennej ścieżki biogenezy miRNA na jej wczesnym etapie, dzięki czemu uwalniane z nich siRNA pojawiają się w komórkach w bardziej naturalny sposób, podobnie do endogennych miRNA. Wewnątrzkomórkowa ekspresja oraz wieloetapowy proces dojrzewania reagentów shmiR umożliwia znaczne obniżenie efektu wysycania białek zaangażowanych w powstawanie cząsteczek miRNA przez reagenty RNAi. Analizy poziomów endogennych miRNA przeprowadzone w niniejszej pracy oraz dane literaturowe (Castanotto i wsp. 2007; Maczuga i wsp. 2014) pokazują, że reagenty shmiR nie doprowadzają do globalnych zmian w poziomach tych ważnych cząsteczek regulatorowych. Z tego względu cieszą się dużym powodzeniem w podejściach związanych z wyciszaniem ekspresji genów *in vivo*, służących opracowaniu podejść terapeutycznych wielu chorób człowieka.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że na funkcjonowanie reagentów shmiR w komórkach może mieć wpływ wiele czynników tj. wybrany pri-miRNA nośnikowy, warunkujący strukturę cząsteczki, obecność elementów rozluźniających strukturę trzonu, sekwencja nukleotydowa w miejscach cięcia reagentów przez RNazy oraz przyjmowana struktura przestrzenna. Innymi aspektami ważnymi przy projektowaniu reagentów shmiR jest również długość zastosowanych sekwencji otaczających, właściwości pętli terminalnej czy umieszczenie sekwencji siRNA w ramieniu 5' lub 3' prekursora (Ryc. 46).



Ryc. 46. Elementy ważne przy projektowaniu reagentów shmiR. W ramce zaznaczono elementy, których znaczenie dla precyzji obróbki reagentów shmiR wykazano w niniejszej pracy.

Istotnym aspektem tworzenia reagentów shmiR jest również wybranie oraz sposób wstawienia odpowiedniej sekwencji siRNA do prekursora nośnikowego. Bardzo często wprowadzane do reagentów shmiR są sekwencje wykazujące wysoką aktywność jako syntetyczne siRNA. Pojawia się jednak pytanie: czy każda cząsteczka efektywnego siRNA będzie ulegała efektywnemu uwalnianiu w komórkach z każdego pri-miRNA i czy zmiany związane z jej ekspresją z wektora i komórkową obróbką nie wpłyną na jej aktywność. Z tego względu ważne jest aby szczegółowo poznać czynniki wpływające na obróbkę reagentów shmiR aby móc kontrolować precyzję oraz efektywność uwalniania z nich cząsteczek siRNA w komórkach.

1. Charakterystyka reagentów shmiR, wykorzystujących najczęściej stosowane nośnikowe pri-miRNA (pri-miR-30a oraz pri-miR-155)

Najczęściej wykorzystywane w konstrukcji reagentów shmiR hsa-pri-miR-30a oraz mmu-miR-155 stosowane są już od ponad dziesięciu lat (Zeng i wsp. 2002; Zeng i Cullen 2005; Chung i wsp. 2006). Od czasu ich zaproponowania wiedza dotycząca biogenezy miRNA znacznie się poszerzyła i poznano wiele nowych cząsteczek miRNA. Nie wiadomo jednak, czy pośród nowopoznanych miRNA nie ma lepszych pri-miRNA nośnikowych. Jak dotąd nie przeprowadzono systematycznej analizy porównawczej, mogącej dać odpowiedź na pytanie w jakim stopniu pri-miR-30a oraz pri-miR-155 spełniają kryteria optymalnych nośników do projektowania na ich podstawie reagentów shmiR i czym charakteryzują się uwalniane z nich siRNA. Aby odpowiedzieć na te pytania w niniejszej pracy zastosowano jednolity system eksperymentalny, pozwalający na monitorowanie poszczególnych etapów obróbki reagentów shmiR z wykorzystaniem dwóch uzupełniających się metod badawczych hybrydyzacji typu *northern* oraz NGS. Przeprowadzone badania pozwoliły na scharakteryzowanie puli krótkich RNA uwalnianych z hsa-pri-miR-30a, mmu-pri-miR-155 oraz z hsa-pri-miR-21, do których wprowadzono po trzy różne wstawki siRNA. Analizie poddano zarówno efektywność cięcia reagentów shmiR na obu etapach ich obróbki jak i scharakteryzowano uwalniane siRNA pod względem jakościowym oraz ilościowym.

W pierwszej kolejności wykazano, że z naturalnych pri-miRNA zarówno endogennych jak i pochodzących z nadekspresji uwalniana jest w komórkach heterogenna pula miRNA (Ryc. 13). Zaprojektowane na podstawie tych prekursorów reagenty shmiR wydajnie uwalniają w komórkach również niejednorodne cząsteczki siRNA (Ryc. 21 i Ryc. 22), efektywnie wyciszające ekspresję genów docelowych (Ryc. 24). Zaobserwowano, że efektywność uwalniania siRNA jak i stopień ich heterogenności jest różny w zależności od konstrukcji reagenta (połączenia wstawki siRNA z pri-miRNA). Zastosowanie nowoczesnej technologii NGS umożliwiło poznanie sekwencji uwalnianych cząsteczek siRNA oraz odtworzenie miejsc cięcia reagentów shmiR przez RNazy Drosha oraz Dicer. Pokazano, że w przypadku reagentów shmiR podobnie jak dla miRNA (Morin i wsp. 2008; Warf i wsp. 2011; Starega-Roslan i wsp. 2015) końce 5' siRNA generowane przez domenę RIIIB RNazy Drosha są bardziej homogenne niż końce 3' generowane przez domenę RIIIB RNazy Dicer. Zatem heterogenność siRNA obserwowana w wynikach hybrydyzacji typu *northern* związana jest najczęściej z różnymi końcami 3' nici wiodących siRNA. Istnieje ryzyko że częściowo na pulę analizowanych cząsteczek siRNA oraz miRNA mogą mieć wpływ preferencje wiązania

białek AGO oraz modyfikacje końców cząsteczek RNA. Doniesienia o preferencyjnym wiązaniu przez białka AGO miRNA posiadających nukleotydy U lub A na końcu 5' (Frank i wsp. 2010), zwracają uwagę na możliwość zwiększenia stabilności związanych wariantów miRNA w komórce i ich preferencyjne wykrywanie. Inni autorzy wykazali jednak, że miRNA występują w komórkach w znacznym nadmiarze w stosunku do białek AGO oraz że cząsteczki nie związane przez białko (lecz oddziałujące z sekwencją docelową) są w komórkach stabilne, co umożliwia ich detekcję metodą *northern* (Janas i wsp. 2012). Wyniki te pozwalają sądzić, że dane uzyskane w analizie NGS odzwierciedlają realne proporcje powstawania różnych wariantów siRNA w komórkach. Ze względu na zjawisko modyfikacji końców krótkich RNA, w niniejszej pracy we wszystkich przedstawianych analizach NGS wykryte sekwencje miRNA oraz siRNA posiadające nukleotydy „nie-matrycowe” nie były brane pod uwagę. Istnieje jednak ryzyko, że w części modyfikacji dodawany nukleotyd jest przypadkowo zgodny z sekwencją prekursora. Na podstawie danych literaturowych (Newman i wsp. 2011; Wyman i wsp. 2011) można jednak stwierdzić, że jest to na tyle niewielka grupa przypadków iż nie zaburza ona istotności uzyskanych wyników.

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że wzór siRNA uwalnianych z reagentów shmiR zależy zarówno od zastosowanego pri-miRNA nośnikowego jak i od sekwencji wstawki siRNA, a pula uwalnianych cząsteczek jest wypadkową połączenia tych dwóch elementów. Wykazano, że zarówno siRNA o wysokim jak i niskim stopniu heterogenności wykazywały podobną efektywność wyciszania genu docelowego w typowym zastosowaniu technologii RNAi. Dlatego wydaje się, że najczęściej stosowane prekursorzy nośnikowe hsa-pri-miR-30a oraz mmu-pri-miR-155, z których uwalniane są siRNA o różnej heterogenności stwarzają duże szanse na skonstruowanie efektywnie działających reagentów shmiR dla większości zastosowań RNAi. Pomimo, iż prekursorzy te nie wykazują ewidentnych różnic w funkcjonowaniu reagentów shmiR należy mieć na uwadze, że w przypadku pri-miR-155 istnieją dodatkowe aspekty, które mogą w niektórych przypadkach w znaczny sposób zmieniać działanie wykorzystujących go reagentów shmiR. Wiadomo, że komórkowa obróbka pri-miR-155 kontrolowana jest przez białko KSRP (ang. K homology Splicing Regulatory Protein) promujące obydwa etapy docinania przez RNazy (Ruggiero i wsp. 2009). Związanie białka KSRP występuje w obrębie motywu sekwencji w rejonie pętli terminalnej. Dodatkowo miR-155 uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej komórek związanej z obecnością endotoksyny bakteryjnej LPS (lipopolisacharyd). Istnieje zatem ryzyko że obróbka reagentów shmiR, wykorzystujących pri-miR-155 będzie bardzo zmienna w zależności od rodzaju komórek, ich fizjologii oraz warunków stresowych, związanych

choćby z zabiegiem transfekcji. Dodatkowo obróbka takich reagentów może być zmieniona w liniach komórkowych lub organizmach modelowych chorób związanych z zaburzeniami komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

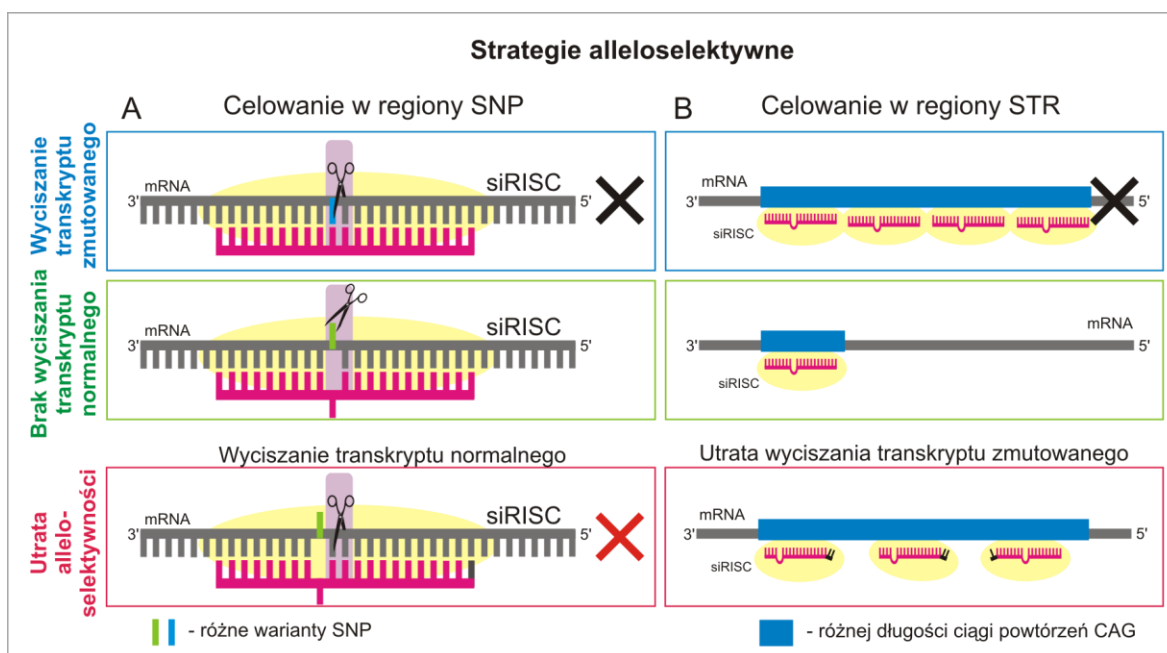
Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że w przypadku pri-miR-21 brak precyzji podczas generowania siRNA na etapie cięcia przez RNazę Drosha prowadzi do powstawania wariantów siRNA ze zmienionym końcem 5' (Ryc. 22). Oznacza to, że w niektórych przypadkach specyficzny konstrukt jakim jest reagent shmiR może wywołać zmianę precyzji cięcia oraz uwolnienie sekwencji siRNA ze zmienionym końcem 5' oraz przesuniętym regionem źródłowym. Takie zależne od sekwencji efekty *off-target* mogą zniekształcać wyniki badań z wykorzystaniem reagentów shmiR oraz prowadzić do błędnych interpretacji obserwowanych wyników, przypisując je efektom specyficznego wyciszenia genu docelowego. Zmiana sekwencji końców cząsteczek siRNA może również wpływać na wybór aktywnej nici wprowadzanej do kompleksu RISC, dodatkowo zwiększając pulę regulowanych w komórce genów.

Prekursory nośnikowe pri-miR-30a oraz pri-miR-155 pomimo ich ulepszania na przestrzeni lat, mającego na celu zwiększenie efektywności uwalniania siRNA oraz poprawienie profilu ładowania odpowiedniej nici do kompleksu RISC (Rhee i wsp. 2009; Fellmann i wsp. 2013; Myburgh i wsp. 2014) wciąż nie są doskonałe. Ich główną wadą jest brak możliwości kontrolowania uwalnianej sekwencji siRNA oraz zwiększone ryzyko wywoływania efektów ubocznych zależnych od sekwencji typu „*off-target*” (Boudreau i wsp. 2013). Natomiast w szczególnych zastosowaniach RNAi, w których ważnym aspektem jest homogenność uwalnianych siRNA stosowanie tych prekursorów nośnikowych wymaga dalszej optymalizacji lub zastąpienia ich innymi pri-miRNA, zapewniającymi wyższą homogenność uwalnianym cząsteczkom siRNA.

2. Znaczenie homogenności miRNA oraz siRNA

Wyjaśnienie dlaczego niektóre miRNA są homogenne podczas gdy zdecydowana większość tych cząsteczek jest heterogenna wymaga odpowiedzi na podstawowe pytanie. Czy „precyzja” cięcia prekursorów miRNA skutkująca uwalnianiem homogennych cząsteczek jest sytuacją idealną do której dąży „jeszcze nie doskonała” maszyna biogenezy miRNA? A może jest wręcz przeciwnie? Może homogenne miRNA są rzadkością, wynikającą z ich niedopasowania do świetnie działającego systemu ekspresji miRNA jako różnych wariantów izomirów pochodzących z tego samego prekursora? W świetle dzisiejszej wiedzy, gdzie funkcjonalność izomirów na różnych etapach rozwoju i w różnych typach komórek została dowiedziona (Fernandez-Valverde i wsp. 2010; Tan i wsp. 2014) trudno uważać heterogenność miRNA za swego rodzaju nieporządany efekt uboczny. Heterogenność miRNA jest również korzystna z punktu widzenia ekonomii komórki, bo z jednego genu pri-miRNA mogą być wytworzone różne cząsteczki, pełniące inne funkcje regulatorowe. Zatem wydaje się, że precyzyjnie wycinane w komórkach miRNA posiadają pewne cechy uniemożliwiające RNazom cięcie w kilku sąsiadujących pozycjach. Analizowany w pracy pri-miR-136 jest dobrze zachowany pomiędzy organizmami, co może sugerować, że jego ściśle określona budowa (właściwości struktury lub sekwencji) zapewnia mu bardzo precyzyjną obróbkę.

Homogenność powstających cząsteczek siRNA ma największe znaczenie w specyficznych zastosowaniach technologii RNAi, takich jak celowanie w regiony zawierające warianty SNP lub STR. Celem takich strategii jest uzyskanie alleloselektywnego wyciszania tylko jednego z dwóch wariantów genu, na podstawie różnic pojedynczych nukleotydów lub długości ciągu sekwencji powtórzonych (Fiszer i Krzyzosiak 2014). W takich przypadkach odpowiednie pozycje niesparowań nici wiodącej siRNA z sekwencją docelową umożliwiają dyskryminację pomiędzy allelami, przez co są kluczowe dla powodzenia strategii wyciszania (Ryc. 47). Obecność różnych wariantów aktywnych cząsteczek w puli heterogennych siRNA prowadzi do utraty dyskryminacji pomiędzy allelami, ponieważ nawet niewielkie przesunięcie miejsc cięcia reagentów shmiR może powodować zmianę lokalizacji kluczowych niesparowań siRNA z sekwencją docelową (Scholefield i wsp. 2009; Fiszer i wsp. 2013). Z tego względu heterogenne siRNA mogą powodować osłabienie alleloselektywności poprzez wyciszanie allelu normalnego lub obniżenie wyciszania allelu zmutowanego.



Ryc. 47. Rozróżnianie pomiędzy normalnym a zmutowanym wariantem transkryptu w alleloselektywnym wyciszaniu ekspresji genów.

A- celowanie w regiony SNP. Ekspresja wariantu zmutowanego jest wyciszana przez w pełni komplementarne siRNA, działające w obrębie RISC. W przypadku wersji normalnej genu obecność polimorficznego nukleotydu powoduje występowanie niesparowania w pozycji centralnej z siRNA uniemożliwiając wyciszenie. W przypadku wariantu siRNA o przesuniętej sekwencji dyskryminujące niesparowanie przestaje ochraniać normalną wersję transkryptu przed jego wyciszeniem przez RISC. **B-** celowanie w regiony STR. Ekspresja wariantu zmutowanego wyciszana jest przez kooperatywne wiązanie kilku nie w pełni komplementarnych cząsteczek siRNA wraz z kompleksami RISC. W przypadku wersji normalnej genu związaniu ulega tylko jeden kompleks siRISC, co nie wystarcza do zahamowania jego ekspresji. W przypadku wariantów siRNA z przesuniętą pozycją niesparowań z sekwencją docelową następuje zwykle osłabienie wiązania z transkryptem oraz utrata wyciszenia jego ekspresji przez kompleksy siRISC.

3. Wpływ elementów struktury na sposób obróbki reagentów shmiR

Pierwotne prekursor miRNA wykazują podobny zestaw cech, dzięki którym rozpoznawane są przez komponenty białkowe szlaku biogenezy miRNA. W budowie tych cząsteczek występują jednak pewne różnice, dotyczące struktury sekwencji otaczających, wielkości pętli terminalnej oraz liczby i ułożenia motywów rozluźniających trzon tych cząsteczek (Kozłowski i wsp. 2008). To zróżnicowanie budowy prekursorów miRNA znajduje odzwierciedlenie w sposobie ich obróbki w komórkach (Starega-Roslan i wsp. 2011a). Wpływ struktury prekursorów na obróbkę jest również ważny z perspektywy tworzonych z ich wykorzystaniem reagentów shmiR. Wyniki niniejszej pracy potwierdziły, że podobnie jak miRNA cząsteczki siRNA powstają z reagentów shmiR z różną efektywnością i uwalniane są w postaci puli nieznacznie różniących się wariantów. Wykazano również, że z nośnikowych pri-miRNA o różnej strukturze ten sam siRNA uwalniany jest w postaci puli cząsteczek siRNA długości od 21-24 nt o różnych wzorach heterogenności.

Istotnym elementem struktury ważnym dla efektywności cięcia pri-miRNA przez RNazę Drosha jest rozluźnienie helisy dsRNA w obrębie miejsca cięcia. Wykazano, iż efektywność cięcia ulega znacznemu obniżeniu po zwiększeniu stabilności struktury w tym rejonie (Quarles i wsp. 2013). Wyniki tych badań są zgodne z wynikami przedstawianymi w niniejszej pracy, dotyczącymi porównania reagentów shmiR, konstruowanych z zastosowaniem ludzkiego oraz mysiego wariantu pri-miR-155. Badanie to miało na celu wyjaśnienie czy faktycznie stosowanie mysiego nośnikowego pri-miRNA w ludzkich komórkach jest lepiej uzasadnionym podejściem niż wykorzystanie jego ludzkiej wersji. Jedną z istotnych różnic pomiędzy tymi pri-miRNA jest stabilność struktury bezpośrednio poniżej miejsca cięcia przez RNazę Drosha (Ryc. 15). W wariantcie mysim struktura ta jest bardziej rozluźniona przez obecność dwunukleotydowego asymetrycznego wybrzuszenia, natomiast w wariantcie ludzkim dwie niekanoniczne pary typu „wobble” w tym rejonie nie wywołują tak się silnego rozluźnienia struktury. Porównanie obróbki reagentów shmiR, tworzonych na podstawie tych wersji pri-miRNA pokazuje, że wariant mysy docinany jest przez RNazę Drosha z większą efektywnością niż jego ludzki odpowiednik. Uzyskane wyniki potwierdziły, że stosowany najczęściej w technologii RNAi wariant mysy w większym stopniu spełnia wymogi stawiane reagentom shmiR.

Wydaje się że struktura cząsteczek może mieć również istotne znaczenie dla precyzji ich cięcia przez RNazy. Podczas poszukiwań prekursorów miRNA umożliwiających

ekspresję homogennych siRNA zaobserwowano, że większość z ~30 kandydatów charakteryzujących się precyzyjną obróbką posiadała podobnie ułożone miejsce cięcia przez RNazę Dicer. Homogenne miRNA powstające z ramienia 5' prekursora powstawały w wyniku cięcia domeny RIIIB Dicer w pierwszej pozycji pętli terminalnej. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami analizy bioinformatycznej (Starega-Roslan i wsp. 2015) wykazującej, iż w grupie homogennych miRNA, powstających z ramienia 5' prekursora cięcie definiujące koniec 3' cząsteczek zachodzi najczęściej w obrębie rozluźnionego motywu strukturalnego. Również wyniki badań eksperymentalnych wskazują, że cięcie przez RNazę Dicer w ramieniu 3' prekursora jest precyzyjne jeżeli występuje w odległości dwóch nukleotydów od pętli terminalnej lub wewnętrznej (Gu i wsp. 2012). Wówczas w celu zachowania dwunukleotydowych wystających końców 3' cięcie w ramieniu 5' występuje w pierwszej pozycji pętli terminalnej.

Wyniki te pośrednio wspierają również ustalenia innych badaczy o znaczeniu odpowiedniego dystansu pomiędzy elementami struktury prekursorów dla precyzji ich obróbki. Przyjmuje się, że miejsce cięcia przez RNazę Drosha zlokalizowane jest w odległości około jednego skreću helisy dsRNA od złączenia ss/dsRNA (Han i wsp. 2006). Najnowsze prace pokazują jednak, że dystans wyznaczający to miejsce cięcia mierzony jest nie tylko od podstawy struktury spinki ale również od pętli terminalnej (Ma i wsp. 2013) lub pętli wewnętrznych (Burke i wsp. 2014). Autorzy wykazali, że odpowiedni dystans pomiędzy złączeniem ss/dsRNA a pętlą terminalną prekursora zapewnia precyzyjne cięcie przez RNazę Drosha w jednej pozycji, natomiast gdy dystans ten nie jest optymalny cięcia mogą występować w sąsiadujących pozycjach, generując niejednorodną pulę produktów (Ma i wsp. 2013). Druga grupa badawcza zwróciła dodatkowo uwagę na możliwość uczestniczenia pętli wewnętrznej w określeniu miejsca cięcia przez RNazę Drosha (Burke i wsp. 2014). Autorzy zmieniali położenie pętli wewnętrznej i wykazali, że dla różnych prekursorów może dominować inny sposób wyznaczania miejsca cięcia poprzez preferencyjne odmierzenie dystansu od jednego z elementów strukturalnych. W przypadku niektórych cząsteczek miRNA obserwowali oni cięcie w stałej pozycji względem przesuwanej pętli wewnętrznej (Burke i wsp. 2014). Wynik ten może sugerować uczestniczenie elementów strukturalnych w obrębie trzonu cząsteczek w wiązaniu elementów kompleksu Mikroprocesora, a w konsekwencji w wyborze miejsca cięcia przez RNazę Drosha. Analizy wpływu elementów strukturalnych na proces obróbki reagentów shmiR prowadzone były na zestawie cząsteczek wykorzystujących pri-miR-136 i posiadających taką samą długość trzonów oraz tę samą pozycję pętli wewnętrznej, a mimo to obserwowane jest zróżnicowanie miejsca jak i

heterogenności cięcia przez RNazę Drosha. Skrócenie długości cząsteczek miało miejsce tylko w przypadku reagentów (M1 oraz M3) pozbawionych asymetrycznego jednonukleotydowego wybrzuszenia, które jednak nie zmienia długości trzonu cząsteczki liczonego w parach zasad.

Podczas konstruowania pierwszego reagenta shmiR (shmiR-136-HD1) na podstawie pri-miR-136, wymieniono dupleks miRNA/miRNA* na sekwencje siRNA, pozostawiając obecne w prekursorze motywy rozluźniające strukturę (trójnukleotydową pętlę wewnętrzną oraz jednonukleotydowe wybrzuszenie). Jednak pomimo zastosowanych zabiegów uzyskany reagent shmiR posiada dodatkowe miejsca cięcia przez RNazę Drosha i uwalniana jest z niego pula prekursorów shRNA (wzór 1+3 obserwowany również w przypadku cząsteczek zmutowanych czy uwalniających inne sekwencje siRNA). Najprawdopodobniej przyczyną tej zmiany była zwiększona stabilność struktury trzonu reagenta shmiR w stosunku do wyjściowego pri-miRNA-136, związana z obecnością silnych par G:C (ciąg czterech par w pobliżu pętli terminalnej, oraz trzech pomiędzy motywami strukturalnymi (Ryc. 28A). Wynik ten pokazuje, że tworzenie reagentów shmiR, polegające na wymianie sekwencji miRNA na sekwencję wstawki siRNA skutkuje stworzeniem zupełnie nowej cząsteczki, której obróbkę nie zawsze można w prosty sposób przewidzieć. Pomimo obserwowanych kilku wariantów powstających prekursorów shRNA reagent ten z wysoką efektywnością uwalnia homogenne cząsteczki siRNA o przesuniętej sekwencji. Obecność tylko jednego głównego wariantu siRNA uwalnianego z shmiR-136-HD1 oznacza zatem, że jeden z produktów cięcia przez Drosha (najdłuższy uwalniany wariant shRNA) podlega preferencyjnie dalszej obróbce przez RNazę Dicer i jest dla niej lepszym substratem niż naturalny pre-miR-136. Ponieważ w prowadzonych badaniach nie zaobserwowano zjawiska silnego wysycenia białek zaangażowanych w biogenezę miRNA jest mało prawdopodobne, że brak obróbki niektórych wariantów shRNA wynika z niedostępności wolnej RNazy Dicer. Przyczyną tej sytuacji może być zatem nieefektywny eksport pozostałych shRNA z jądra do cytoplazmy związany z różną strukturą końców powstających cząsteczek. Trzy długie warianty shRNA różnią się o jeden nukleotyd, co oznacza, że nie wszystkie mają zachowane dwunukleotydowe wystające końce 3', preferowane przez białko transportowe Eksportynę-5 (Okada i wsp. 2009). Możliwe również, że pozostałe warianty shRNA po przedostaniu się do cytoplazmy nie są rozpoznawane jako substraty RNazy Dicer, nie podlegają zatem dalszej obróbce do siRNA. Wyniki te są sprzeczne z panującym przekonaniem, że to RNaza Drosha decyduje o skierowaniu cząsteczek na ścieżkę biogenezy miRNA a RNaza Dicer mniej selektywnie tnie dostarczone przez RNazę Drosha substraty (Feng i wsp. 2011). Należy jednak zauważyć,

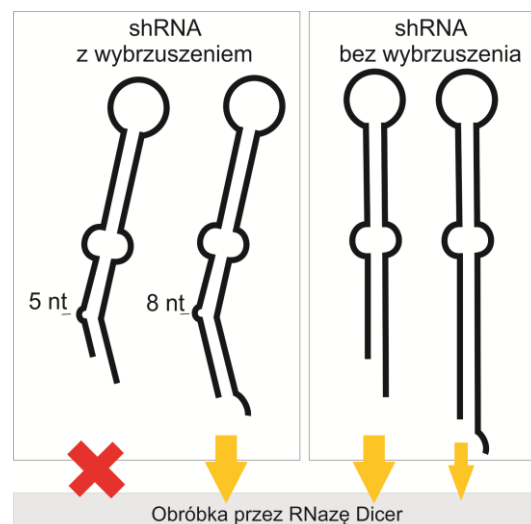
że testowane w pracy reagenty shmiR nie występują w naturze i mogą posiadać dodatkowe, niepoznane dotąd cechy wpływające na efektywność ich obróbki.

Przeprowadzone analizy wykazały, że samo zastosowanie pri-miRNA nośnikowego uwalniającego w komórkach homogenne miRNA nie gwarantuje zachowania precyzji obróbki reagentów shmiR skonstruowanych na jego podstawie, może jednak ułatwiać (jak w tym przypadku) zachowanie homogenności uwalnianych cząsteczek siRNA. Z tego względu w niniejszej pracy sprawdzono jakie cechy pri-miR-136 warunkują uwalnianie z niego homogennych cząsteczek siRNA. W pierwszej kolejności zbadano wpływ elementów rozluźniających strukturę trzonu cząsteczek shmiR poprzez sprawdzenie czy są one ważne dla efektywnej i precyzyjnej obróbki tych cząsteczek w komórkach. Struktura analizowanych cząsteczek zmutowanych M1-M3, modyfikowana była tak, aby posiadały one kolejno usuwane motywy strukturalne, aż do w pełni sparowanego trzonu (*Ryc. 30*).

3.1. Znaczenie jednonukleotydowego wypełnienia

Wyniki analizy potwierdziły wpływ jednonukleotydowego wypełnienia pochodzącego ze struktury pri-miR-136, na sposób docinania reagentów shmiR przez RNazę Dicer, a tym samym na finalną długość generowanego produktu siRNA (Starega-Roslan i wsp. 2011b). Według autorów wybrzuszenia tego typu nie są brane pod uwagę (nie liczone) przy odmierzaniu odpowiedniego dystansu do wyznaczenia miejsca cięcia przez RNazę Dicer. Efekt ten, obserwowany jest jako skrócenie uwalnianych cząsteczek siRNA w reagentach pozbawionych jednonukleotydowego wybrzuszenia (M1 oraz M3). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują również na istotny wpływ asymetrycznego wybrzuszenia na wybór substratów przez RNazę Dicer. We wszystkich przypadkach (shmiR-136-HD1, M1-M3) obserwujemy powstawanie długich i krótkich wariantów shRNA, w których wybruszony nukleotyd (jeżeli obecny) znajduje się w pozycji 5 lub w (jak w najdłuższym wariantcie shRNA) w pozycji 8. Co ciekawe, w przypadku reagentów posiadających wybrzuszenie docinany jest tylko długi prekursor shRNA, natomiast w przypadku cząsteczek pozbawionych wybrzuszenia z różną efektywnością docinane są wszystkie warianty shRNA. Wydaje się zatem, że to występowanie wybrzuszenia w pozycji 5 prekursora shRNA jest cechą niepreferowaną przez RNazę Dicer (*Ryc. 48*). Świadczyć o tym może również opisana w literaturze bardzo niska częstość występowania wybrzuszeń w tej pozycji obserwowana tylko w pięciu przypadkach spośród analizowanych ~460 pri-miRNA, z których ~150 posiadało asymetryczne wybrzuszenia tego typu (Kozłowski i wsp. 2008).

W krótkim wariantcie shRNA, tak jak w endogennym pre-miR-136, wyrzuszony nukleotyd znajduje się w pozycji 5, natomiast pętla wewnętrzna tworzona jest przez nukleotydy 11, 12, oraz 13 liczone od miejsca cięcia przez RNazę Drosha w ramieniu 5' prekursora miRNA. Co ciekawe istotność niesparowanych nukleotydów w pozycjach 5, 9-12 została potwierdzona dla efektywności docinania pri-miRNA przez RNazę Drosha (Sperber i wsp.



2014). Przeprowadzona przez badaczy analiza wykazała, że w sytuacji niedoboru RNazy Drosha

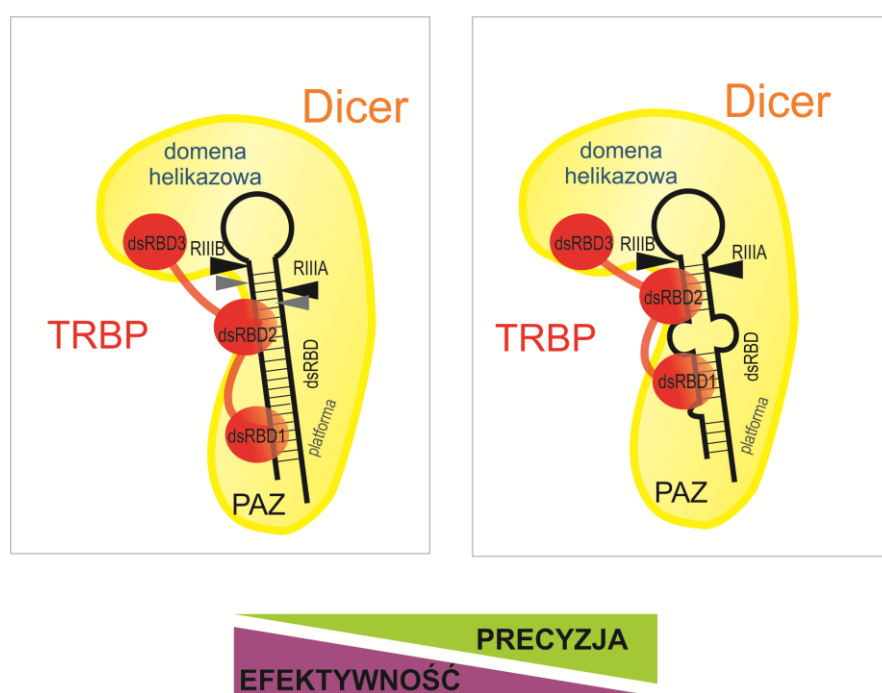
Ryc. 48. Populacja shRNA i ich obróbka przez RNazę Dicer.

bardziej efektywnie docinane są przez nią cząsteczki nie posiadające zaburzeń w tych regionach. Obserwowane w niniejszej pracy różnice w efektywności obróbki długich i krótkich prekursorów shRNA może częściowo tłumaczyć zmiana pozycji wyrzuszenia z pozycji 5 na 8. W wykorzystywanym systemie nie stosowano co prawda zabiegów obniżających poziom RNazy Drosha, jednak po ekspresji reagentów shmiR dochodzi do konkurencji pomiędzy jej substratami, co może wpływać na dostępność wolnego białka.

3.2. Znaczenie pętli wewnętrznej

Analiza obróbki reagentów różniących się obecnością pętli wewnętrznej nie wykazała istotnego znaczenia tego elementu struktury dla funkcjonowania kompleksu Mikroprocesora. Wydaje się zatem, że obecna w części testowanych reagentów (shmiR-136-HD1 oraz M1) pętla wewnętrzna zlokalizowana jest w zbyt dużej odległości od miejsca cięcia przez RNazę Drosha aby uczestniczyć w jego pozycjonowaniu określanym na podstawie dystansu od pętli wewnętrznej (Burke i wsp. 2014). Przedstawiane w pracy wyniki analiz typu *northern* oraz NGS wykazały, że cząsteczki pozbawione pętli wewnętrznej wykazują wyższą efektywność docinania przez RNazę Dicer. Reagent M3 – pozbawiony obydwu motywów strukturalnych podlegał najefektywniejszej obróbce i w związku ze zwiększoną ilością uwalnianych siRNA wykazywał zwiększoną efektywność wyciszania sekwencji docelowej. Uzyskany wynik jest zgodny z najnowszymi doniesieniami literaturowymi dotyczącymi znaczenia elementów rozluźniających trzon prekursorów dla wiązania białka TRBP będącego kofaktorem RNazy Dicer (Acevedo i wsp. 2015). Autorzy pracy wykazali, że obecność symetrycznych

elementów zaburzających regularność helisy RNA wpływa na zmniejszenie powinowactwa białka TRBP do wiązania prekursorów miRNA. Postulowana jest zatem rola TRBP jako białka wykrywającego elementy rozluźniające helisę i wiążącego się do dsRNA w ich otoczeniu. W wyborze miejsca cięcia przez RNazę Dicer największe znaczenie wydaje się mieć odmierzenie odpowiedniego dystansu, o czym świadczy często używane w literaturze angielskiej określenie RNazy Dicer jako „molecular ruler”. Proces ten może być jednak modulowany przez właściwości RNA (Gu i wsp. 2012; Starega-Roslan i wsp. 2015) jak i przez białka partnerowe (Koscianska i wsp. 2011a; Fukunaga i wsp. 2012; Lee i wsp. 2013). Wyniki niniejszej pracy pokazują, również, że wraz ze wzrostem efektywności obróbki reagentów shmiR pozbawionych elementów zaburzających regularność helisy obserwowany jest spadek homogenności uwalnianych siRNA. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że ograniczone możliwości różnych sposobów wiązania RNA przez TRBP mogą być potencjalną przyczyną wzrostu homogenności siRNA uwalnianych z reagentów posiadających pętle wewnętrzne (Ryc. 49).



Ryc. 49. Hipotetyczny model obrazujący wpływ obecności pętli wewnętrznej na efektywność i precyzję cięcia shRNA przez RNazę Dicer. Kolorem czerwonym zaznaczono białko TRBP z wyróżnieniem trzech domen wiążących RNA (dsRBD), kolorem żółtym zaznaczono RNazę Dicer wraz z wyszczególnionymi domenami.

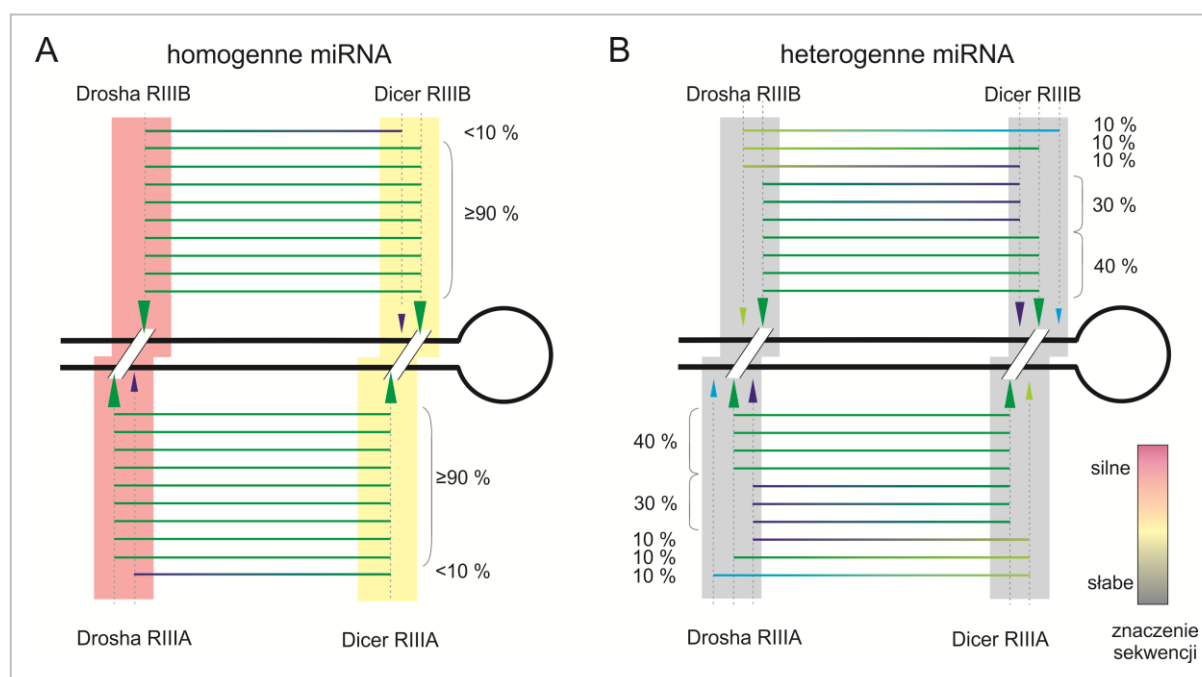
Obecność elementów jednonicowych w trzonie cząsteczek RNA zmniejsza powinowactwo TRBP do wiązania, jednak umożliwia dokładniejsze ulokowanie substratu w obrębie RNazy Dicer, skutkujące mniej efektywną lecz bardziej precyzyjną obróbką (Ryc. 49). Przeprowadzone analizy nie umożliwiają jednak określenia jak silny jest wpływ pętli wewnętrznej, umożliwiają natomiast określenie kierunku wywoływanych przez nią zmian.

3.3. Znaczenie struktury przestrzennej

Obecność różnych elementów zaburzających regularność struktury trzonu reagentów shmiR może wpływać na przyjmowaną przez nie strukturę przestrzenną. Przeprowadzone analizy umożliwiły porównanie przewidywanych struktur trójwymiarowych cząsteczek shmiR różniących się obecnością motywów rozluźniających strukturę trzonu. Wykazano, że spośród analizowanych cząsteczek konstruowanych z wykorzystaniem pri-miR-136 (shmiR-136-HD1, M1-M3) przewidywana struktura reagenta M1 najbardziej odbiega od reszty cząsteczek z analizowanej grupy. Ciekawy wydaje się fakt, że jest to jedyny reagent, z którego preferencyjnie uwalniany jest wariant +0 siRNA (Ryc. 33). Wykazano również, że niewielkie różnice w składzie nukleotydowym pętli wewnętrznej reagentów mogą w znaczny sposób wpływać na ich przewidywaną strukturę przestrzenną. Zaobserwowano, że silne „zgięcie” w obrębie trzonu struktury spinki związane jest z nieznacznie zwiększoną heterogennością obróbki reagenta przez RNazę Dicer. Porównując otrzymane struktury analizowanych reagentów shmiR zaobserwowano, że we wszystkich przypadkach zwiększona rozbieżność struktur w stosunku do struktury cząsteczki wyjściowej (wyższy parametr RMSD) wiąże się z pogorszeniem precyzji obróbki reagentów, a w konsekwencji ze zwiększeniem heterogenności uwalnianych cząsteczek siRNA. Jak dotąd podobne analizy badające wpływ zmian geometrii przewidywanej struktury przestrzennej prekursorów miRNA opisano w przypadku obecności pętli wewnętrznych, zlokalizowanych w pobliżu miejsca cięcia pri-miRNA przez RNazę Drosha (Burke i wsp. 2014). Wyniki powyższych analiz jak i wyniki przedstawione w niniejszej pracy nie dostarczają jednak informacji o strukturze przyjmowanej przez RNA w połączeniu z białkami kompleksu Mikroprocessora oraz RNazy Dicer, mogą jedynie sugerować możliwości deformacji standardowej geometrii przyjmowanych struktur.

4. Wpływ sekwencji nukleotydowej na sposób obróbki reagentów shmiR

Analiza bioinformatyczna częstości występowania nukleotydów w miejscach cięcia ludzkich prekursorów pri-miRNA przez RNazę Drosha i Dicer (Starega-Roslan i wsp. 2015) pozwoliła na wytypowanie pewnych cech sekwencji różniących pri-miRNA z których powstają homogenne miRNA od prekursorów uwalniających heterogenne miRNA (Ryc. 38). Znalezione cechy sekwencji różniące główny wariant homogennych miRNA od ich drugiego – niepreferowanego wariantu oraz określono w których miejscach sekwencja nukleotydowa ma największe znaczenie dla sposobu obróbki. Więcej charakterystycznych cech sekwencji znaleziono w grupie homogennych miRNA niż w grupie heterogennych (Ryc. 50). Wyniki analizy pokazują również, że sekwencja nukleotydowa ma największe znaczenie dla precyzji obróbki homogennych miRNA w miejscu ich cięcia przez RNazę Drosha (Ryc. 50A).



Ryc. 50. Schematyczne przedstawienie puli izomirów powstających w grupie A- homogennych oraz B- heterogennych miRNA. Miejsca cięcia przez RNazę Drosha i Dicer zaznaczono strzałkami, których wielkość oznacza częstość cięcia w danej pozycji. Kolor tła w miejscach cięcia odzwierciedla znaczenie cech sekwencji charakterystycznych dla grupy homogennych oraz heterogennych miRNA (zgodnie z legendą na rycinie).

Wyniki powyższej analizy pozwoliły na pogłębienie wiedzy dotyczącej znaczenia sekwencji nukleotydowej w procesie biogenezy ludzkich miRNA. Jak dotąd badanie biogenezy tej grupy cząsteczek od strony ich sekwencji nukleotydowej przeprowadzone było dla miRNA pochodzących z *C.elegans* oraz myszy (Warf i wsp. 2011; Humphreys i wsp.

2012), dotyczyło ono jednak węższego zakresu sekwencji (dwunukleotydowe okno) oraz cząsteczek miRNA bez podziału na grupy. Uzyskane wyniki zgodne z danymi literaturowymi są niezwykle ważne z punktu widzenia rozwoju technologii RNAi, gdyż mogą stanowić cenne wskazówki przy projektowaniu zarówno cząsteczek typu shmiR ale również shRNA oraz sztucznych miRNA.

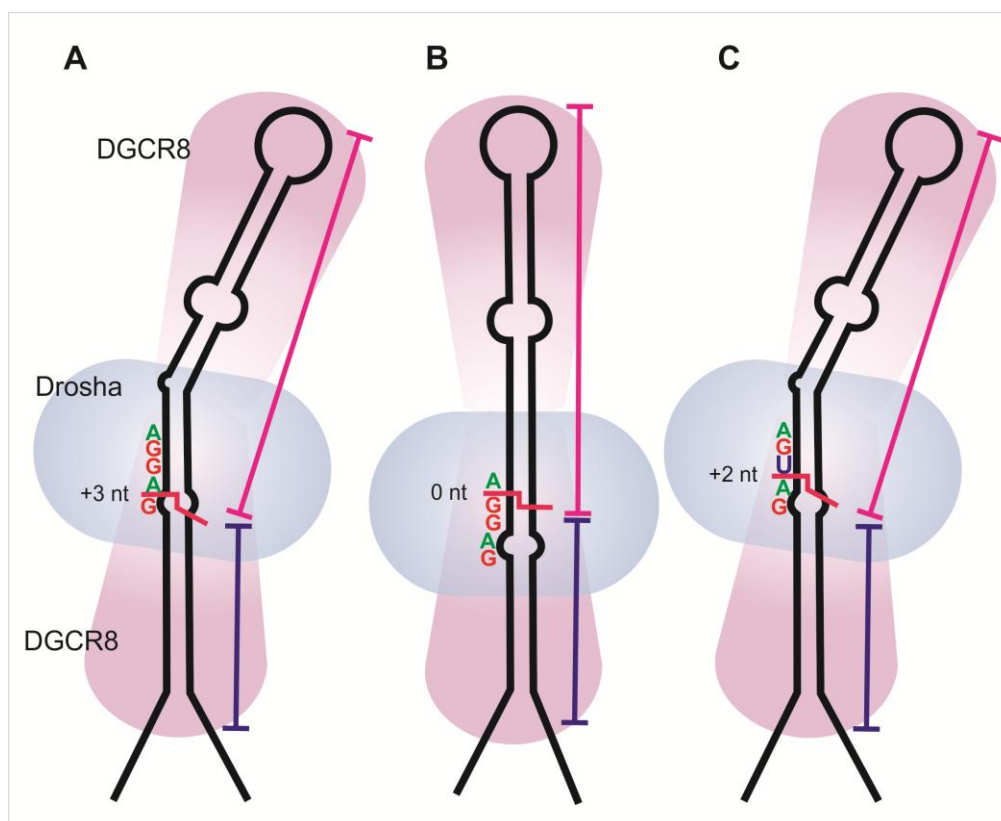
Podczas tworzenia reagentów shmiR wymianie ulega sekwencja dupleksu miRNA/miRNA* na sekwencję syntetycznej wstawki siRNA. W wyniku tego zabiegu zmianie ulega również sekwencja w obrębie miejsc cięcia reagentów przez RNazy. Podczas opracowywania systemu do ekspresji i charakterystyki reagentów shmiR w dwóch przypadkach uzyskano cząsteczki, których dojrzewanie było zahamowane na jednym z etapów obróbki przez RNazę Drosha lub Dicer.

4.1. Etap cięcia przez RNazę Drosha

W przypadku dwóch wariantów reagenta shmiR-21-HD1, różniących się nukleotydem na końcu 5' nici wiodącej (Ryc. 17B) komórkowa obróbka jednego z nich zatrzymała się już na etapie cięcia przez RNazę Drosha. W pierwszej wersji reagenta zastosowano nukleotyd A (brak docinania), który zastąpiony został nukleotydem U w drugim wariantcie reagenta, efektywnie ciętym przez RNazę Drosha. Dane literaturowe oraz wyniki analizy bioinformatycznej pokazują, że zmiana przywracająca efektywną obróbkę reagenta wywołana była przez wprowadzenie nukleotydu U, który występuje najczęściej w pierwszej pozycji miRNA (Warf i wsp. 2011; Humphreys i wsp. 2012; Starega-Roslan i wsp. 2015). Wprowadzane w shmiR-21-HD1 zmiany sekwencji nukleotydowej powodowały również zmiany struktury w tym rejonie. W pierwszym wariantcie obserwowano występowanie niekanonicznej pary A:G, a w drugim pary zasad U:G typu „wobble”. Takie zmiany struktury nie powinny jednak znacząco wpłynąć na efektywność docinania reagenta, gdyż jak pokazano w pracy Humphreys i wsp. 2012 w 60% przypadków pri-miRNA występuje rozluźniona struktura w miejscu cięcia przez RNazę Drosha.

Powyższe obserwacje oraz zidentyfikowanie pewnych cech sekwencji w obrębie miejsc cięcia przez RNazy sprawiło, że postanowiono sprawdzić, czy sekwencja nukleotydowa w tych miejscach może mieć również wpływ na precyzję procesu obróbki reagentów shmiR, a w konsekwencji na uwalnianie homogennych lub heterogennych siRNA. Co ciekawe analiza sposobu obróbki zestawu reagentów z mutacjami strukturalnymi (shmiR-136-hd1, M1-3) pokazała, iż powstające dwa główne warianty prekursora shRNA posiadają zawsze tę samą

sekwencję końca 5'. Oddalone od siebie o trzy nukleotydy cięcia RNazy Drosha w ramieniu 5' w obrębie sekwencji: 5'..GG↓AGG↓A..3' (strzałkami oznaczono cięcie) występują tak, aby zawsze pierwszym nukleotydem shRNA był A (a nie niepreferowany nukleotyd G) (Ryc. 51A i B). W celu weryfikacji wyników analizy bioinformatycznej, oraz sprawdzenia ich użyteczności w ulepszaniu narzędzi RNAi wykonano analizy eksperymentalne zmutowanych reagentów shmiR, posiadających substytucje nukleotydowe w miejscach cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer.



Ryc. 51. Sekwencja w obrębie miejsca cięcia przez RNazę Drosha w różnych wariantach prekursorów shRNA. Kolorem niebieskim oznaczono RNazę Drosha natomiast kolorem fioletowym białko DGCR8 działające w postaci dimeru. Linia zaznacza dystans do miejsca cięcia przez RNazę Drosha od pętli terminalnej oraz złączenia ss/dsRNA. **A**-Długi wariant – cięcie w pozycji +3 nt, **B**- krótki wariant - cięcie w pozycji +0 nt, **C**- wariant shRNA powstający z Ms8 – cięcie w pozycji +2 nt.

W przypadku badania wpływu sekwencji w miejscu cięcia przez RNazę Drosha analiza dwóch serii reagentów shmiR (Drosha 1 oraz Drosha 2) wykazała, że rodzaj nukleotydu w pierwszej pozycji siRNA wpływa na sposób obróbki reagenta przez RNazy, a w konsekwencji na powstające w komórce shRNA. Na podstawie obserwacji prekursorów shRNA wykrywanych metodą *northern* (Ryc. 41A i B) można stwierdzić, że zoptymalizowanie sekwencji nukleotydowej w miejscu cięcia (Drosha 1) na podstawie

analizy bioinformatycznej poprawia efektywność powstawania krótszych wariantów shRNA (Ms5). Natomiast wprowadzenie w tym miejscu sekwencji niepreferowanej (na podstawie analizy bioinformatycznej *Ryc. 38*) doprowadza do zminimalizowania sygnałów od prekursora krótkiego oraz zwiększonych intensywności sygnałów od dłuższego prekursora (Ms8) (*Ryc. 41B*). W wyniku zmiany sekwencji w reagentie Ms8, cięcie przez RNazę Drosha występuje w pozycji przesuniętej o 2, a nie jak wyjściowo o 3 nukleotydy (5' GGA↓UGA), jednak tym razem nie występuje w tej pozycji niepreferowany nukleotyd G (*Ryc. 51C*). Jest wysoce prawdopodobne, że w przypadku reagentów Ms6 i Ms7 większość uwalnianych siRNA powstaje z długiego prekursora shRNA. Wówczas utrata efektywności działania związana jest z obecnością substytucji G/C w cząsteczce siRNA związanej z powstawaniem niesparowań z sekwencją docelową w czwartej, a nie pierwszej pozycji siRNA. Zmiany w puli uwalnianych wariantów shRNA zaobserwowano również w przypadku serii mutantów Drosha 2, gdzie substytucje wprowadzono w pierwszej pozycji długiego wariantu shRNA. Najbardziej widoczna zmiana jakościowa związana była z wprowadzeniem w analizowanej pozycji nukleotydu G (Mq6), który nie występuje w tej pozycji w głównym wariantcie homogennych miRNA podczas gdy jego zwiększoną częstość obserwowano w drugim (niepreferowanym, <10%) wariantcie homogennych miRNA. W wyniku tej substytucji zaobserwowano znaczny spadek sygnału pochodzącego od długich wariantów prekursorów shRNA (*Ryc. 43B*).

4.2. Etap cięcia przez RNazę Dicer

Reagentem, którego obróbka była zahamowana na etapie cięcia przez RNazę Dicer był shmiR-hsa-155-luc (*Ryc. 16*). W przypadku jego pierwszej wersji cięcie przez RNazę Dicer zachodziło nieefektywnie w obecności pary C:G w jego obrębie. Natomiast wprowadzenie w tym miejscu pary U:A, występującej w endogennym hsa-pri-miR-155 umożliwiło obróbkę reagenta przez RNazę Dicer. Uwalniane siRNA obserwowane były na stosunkowo niskim poziomie, jednak zmiana sekwencji pojedynczej pary nukleotydowej umożliwiła cięcie reagenta przez RNazę Dicer. Zastosowana w pierwszej wersji reagenta para C:G związana jest z pojawieniem się niepreferowanego nukleotydu G w bezpośrednim sąsiedztwie cięcia przez RNazę Dicer w ramieniu 3' prekursora (Warf i wsp. 2011; Humphreys i wsp. 2012; Starega-Roslan i wsp. 2015). Największą częstość występowania w tej pozycji obserwuje się dla nukleotydów U oraz A, co tłumaczy poprawę obróbki cząsteczek po wprowadzeniu pary U:A w wersji B reagenta.

Analiza serii reagentów shmiR (Ms1-4), posiadających substytucje nukleotydowe w miejscu cięcia przez RNazę Dicer wykazała mniejszy, niż w przypadku Drosha wpływ zmian sekwencji nukleotydowej na docinanie reagentów. Pomimo wprowadzania w tym miejscu zarówno preferowanych jak i niepreferowanych nukleotydów w żadnym przypadku nie doszło do całkowitego zahamowania docinania reagenta. Wszystkie reagenty z testowanego zestawu posiadają ciąg 5-6 par G:C w obrębie miejsca cięcia przez RNazę Dicer. Wprowadzenie w tym ciągu słabszej pary U:A poniżej miejsca cięcia (reagent Ms4) spowodowało wystąpienie dodatkowych cięć w tej pozycji, skutkujących uwalnianiem dodatkowego, krótszego wariantu siRNA. Ze względu na utrudnioną analizę siRNA uwalnianych z reagentów shmiR-136 związaną z obecnością niejednorodnych prekursorów shRNA, zaprojektowano dodatkowe cząsteczki zmutowane, posiadające tylko jeden wariant prekursora shRNA. Analiza skonstruowanych w oparciu o shmiR-155-luc cząsteczek zmutowanych wykazała, że wprowadzenie niepreferowanego nukleotydu G w miejscu cięcia przez RNazę Dicer wpływa na zwiększenie intensywności cięć w pozycjach satelitarnych, a w konsekwencji zwiększenie heterogenności uwalnianych cząsteczek siRNA.

Przeprowadzone analizy pozwalają sądzić, że sekwencja nukleotydowa uczestniczy w wyborze optymalnego miejsca cięcia przez RNazę Drosha jak i Dicer. Wydaje się jednak, iż w przypadku RNazy Drosha wpływ sekwencji na wybór miejsca cięcia może być silniejszy. W przypadku RNazy Dicer głównym czynnikiem określającym wybór miejsca cięcia jest dystans pomiędzy domeną PAZ z domenami RNazowymi (~ 22 nt), jednak wydaje się, że „napotkanie„ niepreferowanej sekwencji nukleotydowej może modulować precyzję cięcia w danej pozycji i wpływać na generowanie heterogennych produktów lub zmieniać proporcje powstawania poszczególnych wariantów siRNA/miRNA. Dane literaturowe dostarczają coraz bardziej szczegółowych informacji o wyznaczaniu miejsca cięcia przez współpracujące elementy kompleksu Mikroprocesora (Ha i Kim 2014; Quick-Cleveland i wsp. 2014; Seong i wsp. 2014). Uzupełnienie tej wiedzy wynikami dotyczącymi znaczenia sekwencji nukleotydowej w różnych regionach pri-miRNA (Auyeung i wsp. 2013), w tym również przedstawionymi w niniejszej pracy wynikami dotyczącymi sekwencji w miejscach cięcia przez RNazy, pozwoli na bardziej kompleksowe spojrzenie na tematykę biogenezy cząsteczek miRNA oraz wpłynie na rozwój technologii RNAi.

5. Znaczenie uzyskanych wyników oraz ocena możliwości adaptacji prekursorów uwalniających homogenne miRNA w technologii RNAi

Rozwój technologii RNAi, a zwłaszcza najbardziej zbliżonych do miRNA reagentów typu shmiR, czerpie inspirację z szybko rozwijającej się wiedzy dotyczącej biogenezy miRNA. Cząsteczki shmiR wykorzystują do swojej obróbki endogenną ścieżkę biogenezy miRNA, dlatego charakterystyka procesów, którym podlegają dostarcza cennych informacji pogłębiających wiedzę również o mechanizmach rządzących powstawaniem miRNA. Przedstawione wyniki pokazują, że najczęściej wykorzystywane w reagentach shmiR pri-miRNA nośnikowe (pri-miR-30a oraz pri-miR155), co prawda zapewniają ich efektywne działanie ale uwalniają w komórkach heterogenne produkty siRNA. Mogą być one źródłem osłabienia działania reagenta (przez osłabienie wiązania z sekwencją docelową oraz konkurencję między nimi siRNA o kompleks RISC) jak i zwiększenia spektrum wywoływanych efektów ubocznych. W szczególnych zastosowaniach reagentów shmiR, a zwłaszcza jako potencjalnych terapeutyków, znaczenie homogenności uwalnianych siRNA jest dużo większe i bezpośrednio związane z powodzeniem stosowanej strategii. W sytuacji optymalnej uwalniana powinna być tylko jedna, ściśle określona sekwencja siRNA, bez dodatkowych wariantów, mogących wpływać na regulację ekspresji wielu innych genów.

Przedstawione wyniki pokazują jak ważne jest kontrolowanie jakości cząsteczek siRNA uwalnianych z wektorów genetycznych. Często dopiero zastosowanie technologii NGS umożliwia poznanie sekwencji oraz ilości ulegających ekspresji wariantów siRNA. Na przykładzie pri-miR-136 pokazano, że nie zawsze można przewidzieć odpowiednie miejsce umieszczenia sekwencji siRNA w reagencie shmiR, gdyż może on stanowić zupełnie nowy układ docinany przez RNazy inaczej, niż wykorzystany przy jego konstrukcji wyjściowy pri-miRNA. Zaobserwowana możliwość poprawy efektywności obróbki reagentów shmiR przez zmiany pojedynczych par nukleotydów oraz wyniki częstości występowania nukleotydów w pobliżu miejsc cięcia przez RNazy pokazują, że optymalizacja sekwencji na styku siRNA-pri-miRNA może być kluczowa przy konstrukcji niektórych reagentów shmiR.

W niniejszej pracy potwierdzono znaczenie rozluźnionej struktury poniżej miejsca cięcia RNazy Drosha na efektywność tego procesu także dla reagentów shmiR. Wykazano również, że elementy strukturalne obecne w trzonach reagentów shmiR mogą wpływać na sposób ich komórkowej obróbki, a w konsekwencji na jakościowy oraz ilościowy skład powstających siRNA. Analiza ekspresji siRNA z trzech różnych pri-miRNA pokazała, iż w zależności od wybranego pri-miRNA nośnikowego pula uwalnianych siRNA może być inna,

tak samo jak różna może być proporcja wykrywania nici wiodącej oraz pasażerskiej. Konsekwencją takich zmian może być zarówno zmieniona efektywność działania na sekwencję docelową jak i również stopień wywoływania efektów typu *off-target*.

W prowadzonych badaniach postanowiono sprawdzić, czy wykorzystanie pri-miRNA, które naturalnie uwalniają w komórkach homogenne miRNA może przynieść oczekiwane korzyści dla technologii RNAi w zakresie stosowania reagentów shmiR. Na przykładzie pri-miR-136 przeprowadzono badania, mające na celu identyfikację cech jego struktury i sekwencji, warunkujących precyzję jego cięcia przez RNazy szlaku biogenezy miRNA. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że specyficzne cechy „homogennych” pri-miRNA, zapewniające ich precyzyjne docinanie powodują, iż cząsteczki te są trudniejsze w stosowaniu i wymagają bardziej złożonej optymalizacji niż standardowo wykorzystywane pri-miRNA, uwalniające heterogenne produkty. Przedstawione wyniki pozwoliły na głębsze poznanie procesów, którym podlegają reagenty shmiR w komórkach. Wykorzystanie wyciągniętych wniosków na etapie projektowania tego typu cząsteczek pozwoli na poprawę możliwości kontrolowania uwalnianych w komórkach cząsteczek siRNA.

V. WNIOSKI

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej umożliwiły pogłębienie wiedzy z zakresu funkcjonowania szlaku biogenezy miRNA w ludzkich komórkach oraz dostarczyły cennych wskazówek dotyczących projektowania reagentów technologii RNAi typu shmiR. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

- Wzór cząsteczek siRNA uwalnianych z reagentów shmiR nie jest zależny jedynie od zastosowanego pri-miRNA nośnikowego ani od wstawki siRNA, a stanowi wypadkową połączenia tych dwóch istotnych elementów.
- Stosowane obecnie do konstrukcji reagentów shmiR pri-mir-30a oraz pri-miR155 są dobrymi pri-miRNA nośnikowymi, zapewniającymi efektywność uwalnianych siRNA w standardowych zastosowaniach technologii RNAi.
- Zastosowanie mmu-pri-miR-155 w ludzkich komórkach daje większe szanse na uzyskanie reagentów shmiR efektywnie uwalniających cząsteczki siRNA niż zastosowanie jego ludzkiego wariantu.
- W zastosowaniach RNAi, w których homogenność uwalnianych siRNA nie jest wymagana można usuwać elementy rozluźniające strukturę trzonu cząsteczek w celu zwiększenia efektywności uwalniania cząsteczek siRNA.
- Wykorzystanie pri-miRNA, uwalniającego homogenne miRNA w komórkach nie zapewnia utrzymania precyzji cięcia tworzonych reagentów shmiR ale może ułatwiać uzyskiwanie homogennych siRNA.
- W zastosowaniach RNAi, w których homogenność uwalnianych siRNA jest kluczowa wskazane jest zachowanie naturalnych motywów rozluźniających strukturę trzonu cząsteczek shmiR.
- Zachowanie optymalnej sekwencji nukleotydowej w miejscach cięcia reagentów shmiR przez RNazy pozytywnie wpływa na efektywność i precyzję ich obróbki.

VI. STRESZCZENIE

Naturalna zdolność regulacji ekspresji genów przez endogenne miRNA znajduje swoje odzwierciedlenie w technologii RNAi powszechnie wykorzystywanej do wyciszania ekspresji genów. Reagenty shmiR należą do narzędzi technologii RNAi, które włączają się w naturalną ścieżkę biogenezy miRNA na jej wczesnym etapie. Częsteczki te zbudowane są na podstawie pierwotnych transkryptów miRNA. Posiadają one sekwencje otaczające oraz pętlę terminalną pri-miRNA, podczas gdy fragment zawierający sekwencję dupleksu miRNA/miRNA* ulega wymianie na sekwencję wstawki siRNA. Ze względu na wysoką efektywność działania oraz niski poziom wzbudzania efektów ubocznych, reagenty shmiR są szeroko stosowane w wyciszaniu ekspresji genów *in vivo*. Jednak wewnątrzkomórkowa ekspresja reagentów shmiR oraz dwuetapowy proces ich obróbki powoduje trudności w kontrolowaniu precyzji uwalniania z nich cząsteczek siRNA.

Przedstawiona w niniejszej pracy charakterystyka wewnątrzkomórkowej obróbki reagentów shmiR prowadzona była z wykorzystaniem uzupełniających się metod: wysokorozdzielczej hybrydyzacji typu *northern* oraz sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Natomiast do analizy efektywności działania uwalnianych cząsteczek siRNA zastosowano ekspresję sekwencji docelowej w systemie lucyferazowym.

Do konstrukcji reagentów shmiR wykorzystano dotychczas kilka prekursorów miRNA, dlatego pierwszym etapem prowadzonych badań była szczegółowa charakterystyka reagentów shmiR, wykorzystujących najczęściej stosowane prekursory nośnikowe pri-miR-30a oraz pri-miR-155 oraz rzadziej stosowany pri-miR-21. Uzyskane wyniki potwierdziły, iż zarówno wyjściowe prekursory jak i stworzone na ich podstawie reagenty shmiR uwalniają w komórkach niejednorodne cząsteczki miRNA lub siRNA. Wykazano, że wzór heterogenności uwalnianych cząsteczek nie jest stały dla danej sekwencji siRNA ani dla zastosowanego prekursora nośnikowego, a stanowi wypadkową połączenia tych dwóch elementów.

Ze względu na zagrożenia związane z heterogennością uwalnianych w komórkach cząsteczek siRNA sprawdzono czy zastosowanie pri-miRNA nośnikowych naturalnie uwalniających homogenne miRNA może przynieść korzyści w niektórych zastosowaniach technologii RNAi. W tym celu wytypowano nowego kandydata spośród znanych prekursorów miRNA, który charakteryzował się wysokim stopniem homogenności uwalnianych cząsteczek. Wykazano, że konstruowane w oparciu o pri-miR-136 reagenty shmiR uwalniają

w komórkach siRNA o znacznie wyższej homogenności w stosunku do opisywanych w literaturze nośników pri-miRNA. Zastosowanie pri-miR-136 nie gwarantuje zachowania niezmiennych miejsc cięcia w stworzonych na jego podstawie reagentach shmiR, ułatwia jednak powstawanie homogennych siRNA w komórkach. W celu określenia szczegółowych uwarunkowań tego zjawiska sprawdzono jakie cechy pri-miR-136 oraz wykorzystujących go reagentów shmiR wpływają na precyzję oraz efektywność komórkowej obróbki tych cząsteczek.

W pierwszej kolejności analizie poddano strukturę drugorzędową reagentów shmiR oraz ich przewidywaną strukturę przestrzenną. Sprawdzono wpływ elementów rozluźniających strukturę trzonu cząsteczek shmiR na sposób ich obróbki oraz efektywność działania uwalnianych siRNA. Przeprowadzona analiza wykazała, znaczenie symetrycznych motywów strukturalnych (pętli wewnętrznych) w obrębie trzonu struktury spinki zarówno dla efektywności jak i precyzji uwalniania cząsteczek siRNA. Na analizowanym przykładzie wykazano, że obecność takich motywów w reagentach shmiR związana jest ze spadkiem efektywności oraz wzrostem precyzji ich obróbki. Uzyskane wyniki wskazują również na uczestnictwo asymetrycznego wybrzuszenia w obrębie trzonu reagentów shmiR w procesie wyboru substratów dla RNazy Dicer.

W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ sekwencji nukleotydowej w miejscach cięcia przez RNazy Drosha oraz Dicer. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna na podstawie danych NGS umożliwiła określenie różnic w sekwencji nukleotydowej w obrębie miejsc cięcia pomiędzy grupą homogennych oraz heterogennych miRNA. Wykonano również analizy szeregu zmutowanych cząsteczek shmiR, posiadających substytucje nukleotydowe w miejscach cięcia przez RNazy. Uzyskane wyniki wykazały, że sekwencja nukleotydowa uczestniczy w wyborze optymalnego miejsca cięcia przez analizowane RNazy oraz wpływa na jego precyzję.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań umożliwiły wykazanie złożoności elementów, wpływających na funkcjonowanie reagentów shmiR w komórkach oraz pozwoliły na sformułowanie wskazówek pomocnych przy projektowaniu tego typu reagentów.

VII. Abstract

“Design and characteristics of shmiR reagents employing the RNA interference process in human gene expression silencing.”

RNAi technology benefits from the endogenous pathway of miRNA biogenesis and function to knockdown the expression of any gene of interest by its transcript degradation. The pri-miRNA-based reagents termed shmiRs or artificial miRNAs enter the miRNA biogenesis pathway at a very early stage and undergo processing by the endogenous miRNA biogenesis machinery. shmiRs take advantage of a natural miRNA primary transcript with its miRNA/miRNA* sequence replaced with a highly efficient siRNA sequence. Mature siRNAs released from the shmiR precursors emerge in cells with a relatively low rate which is characteristic of endogenous miRNAs. The siRNA dosage can strongly reduce saturation of proteins involved in miRNA biogenesis and thereby do not significantly alter functioning of endogenous miRNAs. shmiRs are commonly used *in vivo* due to their high efficiency of gene expression silencing combined with a relatively low level of released siRNAs.

Presented characteristics of shmiRs cellular processing was performed with the use of complementary methods such as high resolution northern blotting and next-generation sequencing. The analysis of gene expression silencing induced by released siRNAs was performed using dual-luciferase system.

To date, only a few pri-miRNAs have been used as siRNA shuttles. The first part of presented study was focused on the comprehensive characteristics of shmiR reagents based on most commonly explored pri-miRNA backbones such as pri-miR-30a and pri-miR-155 as well as less frequently used pri-miR-21. The obtained results have revealed that these pri-miRNA scaffolds enable a highly efficient release of siRNAs; however, due to imprecise processing a heterogeneous pool of siRNAs is formed. These data show that the characteristic pattern of expressed siRNAs results from a specific combination of both siRNA sequence and pri-miRNA scaffold rather than an intrinsic feature of one of them.

The release of heterogeneous siRNAs in cells results in the increased risk of inducing off-target effects. Therefore, an attempt to verify whether the use of homogeneously processed pri-miRNA precursors will provide increased homogeneity of released siRNAs has been taken. The obtained results demonstrated that shmiR reagents based on the pri-miR-136 backbone release more homogeneous siRNAs in cells than those produced from commonly

used scaffolds. The use of pri-miR-136 backbone does not ensure cleavage of reagents at the same sites by the cellular RNases but helps to produce homogeneous siRNAs. The aim of the analysis was to determine which specific features of pri-miR-136 and its derivative shmiR reagents play a role in the process of cellular siRNA maturation in terms of efficiency and precision of their production.

secondary structure elements as well as predicted spatial structures of shmiR reagents have been analyzed in order to find out how Drosha and Dicer cleavage patterns depend on structure adopted by shmiR reagent. The obtained results indicate that the presence of symmetric structural motifs (internal loops) that cause a local relaxation of a dsRNA helix in a shmiR stem increases efficiency and decrease precision of siRNA release by the processing enzymes. Furthermore, the analyzed asymmetric bulge has been identified as a factor that may affect substrate's selection by Dicer.

In the final part of this thesis the question to what extent the processing of shmiR reagents is sensitive to nucleotide changes at the Drosha and Dicer cleavage sites has been asked. The analysis of NGS data for small RNAs have demonstrated that the generation of homogeneous miRNAs requires more sequence constraints at the cleavage sites than the formation of heterogeneous miRNAs. Additionally, specific Drosha cleavage sites appear to have more sequence determinants in miRNA precursors than specific cleavage sites for Dicer. The significant influence of the nucleotide sequence on processing precision was shown by the analysis of cellular processing of shmiRs with nucleotide substitutions introduced in positions close to the Drosha and Dicer cleavage sites.

Together, the presented results demonstrate the complexity of factors which affect both shmiR processing and functioning as well as the role of structural and sequence features of shmiR reagents that influence the heterogeneity of the released siRNAs. The lessons learned from this study allowed setting guidelines to the rational design of this type of RNAi reagents.

VIII. MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.1. Enzymy

Kinaza polinukleotydowa faga T4 OptiKinase 10 U/μl (USB)
Polimeraza DNA GoTaq Flexi 5 U/μl (Promega)
Trypsyna-EDTA 10 x (Sigma-Aldrich)
Ligaza DNA faga T4 (Promega)
DNaza I (Ambion)
Dra I (Pharmacia)
Xba I (Thermo Scientific)
Not I (Thermo Scientific)
EcoR I (Thermo Scientific)

1.2. Ważniejsze odczynniki chemiczne i biochemiczne

Agaroza (BioShop)
Akryloamid (BioShop)
Antybiotyk/antymykotyk 10 x (Sigma)
Bisakryloamid (BioShop)
Błękit bromofenolowy – BB (Fluka)
Bromek etydyny (Merck)
Bydłęca surowica płodowa FBS (PAA)
Cytrynian sodu (POCh)
Chlorek sodu (Chempur)
Chloroform cz.d.a. (POCh)
dNTP 100 mM (Promega)
EDTA- wersenian disodowy- (POCh)
Ekstrakt drożdżowy (Difco)
Etanol (Millipore)
Fenol:chloroform pH 4.5 (BioShop)
Fenol pH 7 (BioShop)
Fiolet ksylenowy - XC (Fluka)
Formamid (Fluka)
Glikogen 20 mg/ml (USB)
Izopropanol cz.d.a. (POCh)
Kwas borowy cz.d.a. (Chempur)
Kwas octowy (Chempur)
Lipofektamina 2000 (Invitrogen)
Mocznik cz.d.a. (Chempur)
Octan sodu (POCh)
PBS (BioShop)
Pożywka DMEM (Sigma-Aldrich)
Roztwór Denhardt'a 50 x (USB)
SDS- dodecylosiarczan sodu - (BioShop)
Tris (Sigma-Aldrich)
TEMED (BioShop)
TRI Reagent (Sigma Aldrich)
Wodorotlenek sodu (POCh)

1.3. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji plazmidów - Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega)
- Zestaw do izolacji plazmidów - GenElute HP Endotoxin-Free-Plasmid DNA Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich)
- Kolumnienki do oczyszczania sond radioaktywnych - illustra MicroSpin G25 (GE Healthcare)
- Zestaw do testów w systemie lucyferazowym - Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)
- Zestaw do analizy jakości RNA Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies)

1.4. Roztwory i bufony

APS 10%

EDTA 0.5 M, pH 8.0

Octan sodu 3 M, pH 5.2

SDS 20%

SSC 20 x stężony

| | |
|---------------------|--------|
| chlorek sodu | 3 M |
| cytrynian trisodowy | 300 mM |

TBE 10 x stężony, pH 8.3

| | |
|--------------|--------|
| Tris-HCl | 890 mM |
| kwask borowy | 890 mM |
| EDTA | 20 mM |

TAE 50 x stężony, pH 8.0 skład

| | |
|------|-------|
| Tris | 2 M |
| EDTA | 50 mM |

Roztwór obciążający do nakładania próbek na żele agarozowe 6 x stężony

| | |
|---------------------------|-------------|
| glicerol | 30% (w/o) |
| EDTA | 10 mM |
| błękit bromofenolowy (BB) | 0.04% (w/o) |
| fiolet ksylenowy (XC) | 0.04% (w/o) |

Roztwór obciążający formamidowy do nakładania próbek na denaturujące żele poliakrylamidowe (hybrydyzacja typu *northern*) 2 x stężony

| | |
|---------------------------|-------------|
| formamid | 95% (o/o) |
| EDTA | 10 mM |
| błękit bromofenolowy (BB) | 0.04% (w/o) |
| fiolet ksylenowy (XC) | 0.04% (w/o) |

Bufor hybrydyzacyjny do analiz typu *northern*

| | |
|--------------------|-----|
| SDS | 1% |
| roztwór Denhardt'a | 1 x |
| SSC | 5 x |

Bufor płuczący do analiz typu *northern*

| | |
|-----|------|
| SSC | 2 x |
| SDS | 0.1% |

Bufor odplukujący do analiz typu *northern*

| | |
|-----|-------|
| SSC | 0.1 x |
| SDS | 0.5% |

Bufory dostępne komercyjnie

- Bufor do annealingu oligonukleotydów (Metabion)
- Bufor do DNazy I 10x (Ambion)
- Bufor do ligazy T4 DNA 10x (Promega)
- Bufor do Opti-kinazy 10x (USB)
- Bufor do polimerazy GoTaq Flexi 5 × stężony (Promega)
- PerfectHyb Plus Hybridization Buffer 1 x stężony (Sigma)
- Bufor Tango (Fermentas)
- Bufor O (Fermentas)

1.5. Związki promieniotwórcze

ATP [γ -³²P] 5000 Ci/mmol (Hartmann Analytics)

1.6. Żele**Żele agarozowe do analizy produktów PCR, kontroli tworzenia dupleksów siRNA oraz oczyszczania plazmidów po cięciu restrykcyjnym**

- 1.3% agaroz w buforze 1 x TBE z bromkiem etydyny (0.5 µg/ml)
- 2.5% agaroz w buforze 1 x TBE z bromkiem etydyny (0.5 µg/ml)
- 0.8% agaroz Low Melting Point w buforze 1 x TAE z bromkiem etydyny (0.5 µg/ml)

Denaturujący żel poliakryloamidowy do analizy typu *northern*

- 12% akryloamid/bisakryloamid w stosunku 19:1
- 7.5 M mocznik
- Bufor: 0,5 x TBE

Katalizatory polimeryzacji:

| | |
|-------------------|------|
| Nadsiarczan amonu | 0.1% |
| TEMED | 0.1% |

1.7. Konstrukty genetyczne

Wektor do ekspresji reagentów shmiR (pCDH-CMV-MCS-EF1) zakupiono w firmie System Biosciences. Plazmid wyjściowo kodował naturalną sekwencję pri-miRNA-182, która została z niego usunięta (jak opisano w metodach konstrukcji reagentów shmiR). Sekwencje docelowe dla testowanych reagentów shmiR wklonowano do komercyjnego wektora pmiR-Glo (Promega).

Wszystkie stosowane w pracy wektory plazmidowe po etapie namnażania w komórkach bakteryjnych izolowane były zestawem usuwającym endotoksyny pochodzenia bakteryjnego.

1.8. Materiał biologiczny

Komórki bakteryjne

Do namnażania plazmidów kodujących pri-miRNA, reagenty shmiR oraz sekwencje docelowe użyto szczepów bakterii *E. coli GT116* (InvivoGen) przeznaczonych do klonowania i propagowania plazmidów, które kodują transkrypty posiadające struktury typu spinki.

Eukariotyczne linie komórkowe

W badaniach wykorzystano: linie komórkowe HeLa, oraz HEK293T (ATCC).

Hodowle prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Materiałem do badań był całkowity RNA izolowany z linii komórkowych z użyciem odczynnika TRI Reagent (Sigma -Aldrich) lub całkowity lizat komórkowy (w przypadku testów w systemie lucyferazowym)

1.9. Standardy do oznaczania wielkości fragmentów kwasów nukleinowych

- stosowany do analiz produktów PCR w żelach agarozowych

1kB DNA Ladder (Invitrogen)

- stosowany do analiz krótkich RNA w żelach poliakryloamidowych (w analizie typu *northern*)

L1. - Wzorzec długości RNA 10-100 nt (USB)

L2. -Wzorzec długości 17-25 nt - Mieszanina syntetycznych oligonukleotydów RNA różniących się sekwencją końca 3':

RNA-17 nt – 5'-GCU UAU AAA UAC UGC GG-3'

RNA-19 nt – 5'-GCU UAU AAA UAC UGC GGU C-3'

RNA-21 nt – 5'-GCU UAU AAA UAC UGC GGU CAA-3'

RNA-23 nt – 5'-GCU UAU AAA UAC UGC GGU CAA UU-3'

RNA-25 nt – 5'-GCU UAU AAA UAC UGC GGU CAA UUA A-3'

Różnice w migracji cząsteczek RNA w obydwu (L1 oraz L2) wzorcach długości RNA mogą wynikać z różnic w sekwencji nukleotydowej rozdzielanych w żelu cząsteczek.

1.10. Oligonukleotydy

Oligodeoksynukleotydy były syntetyzowane w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, oraz w firmie Sigma-Aldrich, oligorybonukleotydy pochodziły z firmy Metabion.

Tabela 6. Startery, sondy oraz siRNA

| Oligonukleotyd DNA | Sekwencja 5'→3' |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Startery | |
| Ex1-HTT-F | TCCACTACGTTTAAAAGGCTAGGGCTGTCAATCAT |
| Ex1-HTT-F | TCCACTACGTCTAGACAGGCTGCAGGGTTACCG |
| miR-Glo F | TAAAGGACTGACCGGCAAGTTGGA |
| EF1_R | GCACCCGTTCAATTGCCG |
| Sondy | |
| luc | GCGCTATGGGCTGAATACAAA |
| HD1 | AGGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| HD1_pełna_136 | GAAGGCCTGAGCATAAGAATC |
| HD1 sens | AGACTTAGGGAAGAGAAGGCC |
| HD2 | CCGCCTCCTCAGCTTCCTCA |
| miR-30a | CTTCCAGTCGAGGATGTTTACA |
| miR-155 | ACCCCTATCACGATTAGCATTA |
| miR-21 | TCAACATCAGTCTGATAAGCTA |
| miR-136 | TCCATCATCAAAACAAATGGAGT |
| miR-139 | CTGGAGACACGTGCACTGTAGA |
| miR-20a | CTACCTGCACTATAAGCACTTA |
| Oligorybonukleotydy | |
| siRNA | |
| siLuc-as | UUUGUAUUCAGCCCAUAGCGC |
| siLuc-ss | GCUAUGGGCUGAAUACAAAU |
| siHD1-as | ACUUGAGGGACUCGAAGGCCU |
| siHD1-ss | GCCUUCGAGUCCCUCAAGUCC |
| siHD2-as | UGAGGAAGCUGAGGAGGCGUU |
| siHD2-ss | CGCCUCCUCAGCUUCCUCAUU |

Tabela 7. Sekwencje syntetycznych DNA (Sigma Aldrich), które użyto do konstrukcji kaset ekspresyjnych analizowanych pri-miRNA oraz reagentów shmiR.

| Reagent | Oligonukleotyd DNA | Sekwencja 5'→3' |
|--------------------|--------------------|--|
| miR-30a flanki | 30 5'A | AATTCCTAAAGAAGGTATATTGCTGTTGA |
| | 30 5'B | TCGCTCACTGTCAACAGCAATATACCTTCTTTAGG |
| | 30 3'A | TGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTACTTTAGGAG CAGC |
| | 30 3'B | GGCCGCTGCTCCTAAAGTAGCCCCTTGAAGTCCGAG |
| miR-30a | 30 miR 1 | CAGTGAGCGACTGTAAACATCCTCGACTGGAAGCTGT GAAGCCACAGATGGGCTTTCAGTCGGATGTTTGCAGC |
| | 30 miR 2 | GCAGTAGGCAGCTGCAAACATCCGACTGAAAGCCCAT CTGTGGCTTCACAGCTTCCAGTCGAGGATGTTTACAG |
| shmiR-30a-luc | 30 Luc 1 | CAGTGAGCGACTTTGTATTAGCCCATAGCGCCTGTGA AGCCACAGATGGGGCGCTATGCTGAATACAAAGC |
| | 30 Luc 2 | GCAGTAGGCAGCTTTGTATTAGCATAGCGCCCCATCT GTGGCTTCACAGGCGCTATGGGCTGAATACAAAG |
| shmiR-30a-HD1 | 30 HD1 1 | CAGTGAGCGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTCTGTG AAGCCACAGATGGGAGGCCTTCGTCCCTCAAGTGC |
| | 30 HD1 2 | GCAGTAGGCAGCACTTGAGGGACGAAGGCCTCCCATC TGTGGCTTCACAGAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTG |
| shmiR-30a-HD2 | 30 HD2 1 | CAGTGAGCGACTGAGGAAGCTGAGGAGGCGGAGCTGT GAAGCCACAGATGGGCTCCGCCTCCAGCTTCTCAGC |
| | 30 HD2 2 | GCAGTAGGCAGCTGAGGAAGCTGGAGGCGGAGCCCAT CTGTGGCTTCACAGCTCCGCCTCCTCAGCTTCTCAG |
| hsa-miR-155 flanki | h155 5'A | AATTCAGGCTTGCTGTAGG |
| | h155 5'B | CAGCATAACAGCCTACAGCAAGCCTG |
| | h155 3'A | TGTATGATGCCTGTTACTAGCATTACATGGAACAAAT TGCTGCCGTGGGAGGATGACAAAGAGC |
| | h155 3'B | GGCCGCTCTTTGTCATCCTCCCACGGCAGCAATTTGTT CCATGTGAATGCTAGTAACAG |
| hsa-miR-155 | hmiR-155 1 | CTGTATGCTGTTTAATGCTAATCGTGATAGGGGTTTTT GCCTCCAAGTACTCCTACATATTAGCATTAAACAG |
| | hmiR-155 2 | GCATCATACTGTTAATGCTAATATGTAGGAGTCAGT TGGAGGCAAAAACCCCTATCACGATTAGCATTAAA |
| hsa-miR-155-luc | h155 luc 1 | CTGTATGCTGTTTGTATTAGCCCATAGCGCTTTTGCCT CCAAGTGGCGCTATGGCGAATACAAACAG |
| | h155 luc 2 | GCATCATACTGTTTGTATTAGCCCATAGCGCCAGTTG GAGGCAAAAAGCGCTATGGGCTGAATACAAA |
| hsa-miR-155-lucB | h155 lucB 1 | CTGTATGCTGTTTGTATTAGCCCATAGCGTTTTTGCCT CCAAGTACGCTATGGCGAATACAAACAG |
| | h155 lucB 2 | GCATCATACTGTTTGTATTAGCCCATAGCGTCAGTTG GAGGCAAAAACGCTATGGGCTGAATACAAA |
| hsa-miR-155-HD1 | h155 HD1 1 | CTGTATGCTGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTTTTTGCC TCCAAGTGGCCTTGAGCCCTCAAGTCAG |
| | h155 HD1 2 | GCATCATACTGACTTGAGGGCTCAAGGCCTCAGTTG GAGGCAAAAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |

Tabela 7. cd.

| Reagent | Oligonukleotyd DNA | Sekwencja 5'→3' |
|--------------------|--------------------|---|
| mmu-miR-155 flanki | m155 5'A | AATTCAGGCTTGCTGAAGG |
| | m155 5'B | CAGCATAACAGCCTTCAGCAAGCCTG |
| | m155 3'A | GACACAAGGCTGTACTAGCACTCACATGGAACAAATGG CCACCGTGGGAGGATGACAAGTCGC |
| | m155 3'B | GGCCGCGACTTGTCATCCTCCCACGGTGGCCATTTGTTCCA TGTGAGTGCTAGTAACAG |
| mmu-miR-155 | mmu155 miR 1 | CTGTATGCTGTTAATGCTAATTGTGATAGGGGTTTTGGCCT CTGACTGACTCCTACCTGTTAGCATTAAACAG |
| | mmu155 miR 2 | GCCTTGTGTCCTGTAAATGCTAACAGGTAGGAGTCAGTCA GAGGCCAAAACCCCTATCACAAATTAGCATTAA |
| shmiR-m155-luc | mmu155 Luc 1 | CTGTATGCTGTTTGTATTTCAGCCCATAGCGCGTTTTGGCCT CTGACTGACGCGCTCCTCTGAATACAAACAG |
| | mmu155 Luc 2 | GCCTTGTGTCCTGTTTGTATTTCAGAGGAGCGCGTCAGTCA AGGCCAAAACGCGCTATGGGCTGAATACAAA |
| shmiR-m155-HD1 | mmu155 HD1 1 | CTGTATGCTGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGTTTTGGCCT CTGACTGACAGGCCCTGTCCCTCAAGTCAG |
| | mmu155 HD1 2 | GCCTTGTGTCCTGACTTGAGGGACAGGGGCCTGTCAGTCA GAGGCCAAAACAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| shmiR-m155-HD2 | mmu155HD2 1 | CTGTATGCTGTGAGGAAGCTGAGGAGGCGCGTTTTGGCC TCTGACTGACGCCGCGAACAGCTTCCTCACAG |
| | mmu155 HD2 2 | GCCTTGTGTCCTGTGAGGAAGCTGTTTCGCGCGTCAGTCA GAGGCCAAAACGCGCCTCCTCAGCTTCCTCA |
| shmiR-m155-luc-1G | 155-1G 1 | CTGTATGCTGTTTGTATTTCAGCCCATAGCGCGTGTGGCCT CTGACTCACGCGCTCCTCTGAATACAAACAG |
| | 155-1G 2 | GCCTTGTGTCCTGTTTGTATTTCAGAGGAGCGCGTGAGTCA GAGGCCAACACGCGCTATGGGCTGAATACAAA |
| shmiR-m155-luc-2G | 155-2G 1 | CTGTATGCTGTTTGTATTTCAGCCCATAGCGCGTGTGGCCT CTGAAAGACGCGCTCCTCTGAATACAAACAG |
| | 155-2G 2 | GCCTTGTGTCCTGTTTGTATTTCAGAGGAGCGCGCTTTTCAG AGGCCACAACGCGCTATGGGCTGAATACAAA |
| miR-21 flanki | 21 5'A | AATTCTACCATCGTGACATCTCCATGGCTGTACC |
| | 21 5'B | CCGACAAGGTGGTACAGCCATGGAGATGTCACGATGGTAG |
| | 21 3'A | TGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCATCCATATCCAATG TTCTCATGC |
| | 21 3'B | GGCCGCATGAGAACATTGGATATGGATGGTCAGATGAAA GATAC |
| miR-21 | miR-21 1 | ACCTTGTGCGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAA TCTCATGGCAACACCAGTCGATGGGCTGTC |
| | miR-21 2 | CAAAATGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGTGGCCATGAGA TTCAACAGTCAACATCAGTCTGATAAGCTAC |
| miR-21-luc | 21 luc 1 | ACCTTGTGCGGTTTTGTATTTCAGCCCATAGCGCTCGTTGAAT CTCATGACGCTACGGGCGAATACAAGTC |
| | 21 luc 2 | CAAAATGTCAGACTTGTATTTCGCCCCTAGCGTCATGAGAT TCAACGAGCGCTATGGGCTGAATACAAAAC |
| miR-21-HD1 | 21 HD1 1 | ACCTTGTGCGGTCTTGAGGGACTCGAAGGCCTACTGTTGA ATCTCATGGAGGCCTCCGAGCCCTCAAGGTC |
| | 21 HD1 2 | CAAAATGTCAGACCTTGAGGGCTCGGAGGCCTCCATGAGA TTCAACAGTAGCCCTTCGAGTCCCTCAAGAC |
| miR-21-HD2 | 21 HD2 1 | ACCTTGTGCGGTGAGGAAGCTGAGGAGGCGGGACTGTTGA ATCTCATGGCCCGCCTCCTCGTTTCCTCGTC |
| | 21 HD2 2 | CAAAATGTCAGACGAGGAAGCGAGGAGGCGGGCCATGAG ATTCAACAGTCCCGCCTCCTCAGCTTCCTCAC |

Tabela 7. cd.

| Reagent | Oligonukleotyd DNA | Sekwencja 5'→3' |
|------------------|--------------------|--|
| miR-139 flanki | 139 5'A | AATTCGGTCAGGCTCCTGTGGATGGGGACACCCTTGGGAGG CACTGGGACTGG |
| | 139 5'B | TACACCTGAGCCAGTCCCAGTGCCTCCCAAGGGTGTCCCCA TCCACAGGAGCCTGACCG |
| | 139 3'A | ACAACTGAAGCCGGAGTCTGCGAAGGGTGGGCAGGAGGGT GGAGGGATGGC |
| | 139 3'B | GGCCGCCATCCCTCCACCCTCCTGCCACCCTTCGCAGACT CCGG |
| miR-139 | 139 miR 1 | CTCAGGTGTATTCTACAGTGCACGTGTCTCCAGTGTGGCTC GGAGGCTGGAGACGCGGCCCTGTTGGAGTA |
| | 139 miR 2 | CTTCAGTTGTTACTCCAACAGGGCCCGTCTCCAGCCTCCG AGCCACACTGGAGACACGTGCACTGTAGAA |
| miR-20a flanki | 20a 5'A | AATTCCTTTTATTGTGTCGATGTAGAATCTGCCTGGTCTATC TGATGTGACAGC |
| | 20a 5'B | TGCTACAGAAGCTGTCACATCAGATAGACCAGGCAGATTCT ACATCGACACAATAAAAGG |
| | 20a 3'A | ACTGCTAGCTGTAGAACTCCAGCTTCGGCCTGTCGCCAAT CAAACTGTGC |
| | 20a 3'B | GGCCGCACAGTTTGATTGGGCGACAGGCCGAAGCTGGAGT TCTAC |
| miR-20a | 20a miR 1 | TTCTGTAGCACTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGTGTTTAG TTATCTACTGCATTATGAGCACTTAAAGT |
| | 20a miR 2 | AGCTAGCAGTACTTTAAGTGCTCATAATGCAGTAGATAACT AAACACTACCTGCATAAAGCACTTTAG |
| shmiR-136 flanki | 136 5'A | AATTCCTACTCCACTGCCCGACGTGCGCTCGGTGGTGTGGA TGAG |
| | 136 5'B | CCTCCGAGGGCTCATCCAACACCACCGAGGCGACGTCGGG CAGTGGAGTGG |
| | 136 3'A | CAGAGGGTTCTATCATTTTCGTCGGATGGAAAGGAGTGTATT CTGAAGATGC |
| | 136 3'B | GGCCGCATCTTCAGAATACTCCTTTCCATCCGACGAAAT GATA |
| miR-136 | 136 miR 1 | CCCTCGGAGGACTCCATTTGTTTTGATGATGGATTCTTATGC TCCATCATCGTCTCAAATGAGTCTT |
| | 136 miR 2 | GAACCCTCTGAAGACTCATTGAGACGATGATGGAGCATAA GAATCCATCATCAAACAAATGGAGT |
| shmiR-136-HD1 | 136 HD1 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATG CTCAGGCCTTCTTCCCTAAGTCTT |
| | 136 HD1 2 | GAACCCTCTGAAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATA AGAATCAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| M1 | M1 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGC TCAGCCTTCTTCCCTCAAGTCTT |
| | M1 2 | GAACCCTCTGAAGACTTGAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATA AGAATCAGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| M2 | M2 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATG CTCAGGCCTTCGAGTCCCTAAGTCTT |
| | M2 2 | GAACCCTCTGAAGACTTAGGGACTCGAAGGCCTGAGCATA AGAATCAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| M3 | M3 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGC TCAGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCTT |
| | M3 2 | GAACCCTCTGAAGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGAGCATA AGAATCAGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |

Tabela 7. cd.

| Reagent | Oligonukleotyd DNA | Sekwencja 5'→3' |
|---------|--------------------|--|
| Ms1 | Ms1 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCAGATTCTTATGCTCTGGC CTTCTCTCCCTAAGTCTT |
| | Ms1 2 | GAACCCTCTGAAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCAGAGCATAAGAATCT GGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| Ms2 | Ms2 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCGATTCTTATGCTCCGGC CTTCTCTCCCTAAGTCTT |
| | Ms2 2 | GAACCCTCTGAAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCGAGCATAAGAATCC GGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| Ms3 | Ms3 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCGATTCTTATGCTCGGGC CTTCTCTCCCTAAGTCTT |
| | Ms3 2 | GAACCCTCTGAAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCGAGCATAAGAATCG GGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| Ms4 | Ms4 1 | CCCTCGGAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCTGGATTCTTATGCTCCAGC CTTCTCTCCCTAAGTCTT |
| | Ms4 2 | GAACCCTCTGAAGACTTAGGGAAGAGAAGGCTGGAGCATAAGAATCC AGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| Ms5 | Ms5 1 | CCCTCGGAGGTCTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGACTT |
| | Ms5 2 | GAACCCTCTGAAGTCTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGA |
| Ms6 | Ms6 1 | CCCTCGGAGGGCTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGCCTT |
| | Ms6 2 | GAACCCTCTGAAGGCTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGC |
| Ms7 | Ms7 1 | CCCTCGGAGGCCTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGGCTT |
| | Ms7 2 | GAACCCTCTGAAGCCTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGG |
| Ms8 | Ms8. 5'B | CATCCGAGGGCTCATCCAACACCACCGAGGCGACGTCGGGCAGTGGA GTGG |
| | Ms8 1 | CCCTCGGATGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGTTGT |
| | Ms8 2 | GAACCCTCTGACAACCTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |
| Mq5 | Mq5 5'B sh | CCGAGGGCTCATCCAACACCACCGAGGCGACGTCGGGCAGTGAGTG G |
| | Mq5 1 | CCCTCGGTGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGTCTA |
| | Mq5 2 | GAACCCTCTGTAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCA |
| Mq6 | Mq6 1 | CCCTCGGGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGTCTC |
| | Mq6 2 | GAACCCTCTGGAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCC |
| Mq7 | Mq7 1 | CCCTCGGCGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGTCTG |
| | Mq7 2 | GAACCCTCTGCAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCG |
| Mq8 | Mq8 5_B | CCTTTAAGGGCTCATCCAACACCACCGAGGCGACGTCGGGCAGTGGA GTGG |
| | Mq8 3_A | TGAAGGGTTCTATCATTTTCGTCGGATGGAAAGGAGTGTATTCTGAAGA TGC |
| | Mq8 1 | CCCTTAAAGGACTTGAGGGACTCGAAGGCCTGATTCTTATGCTCAGGC CTTCTCTCCCTAAGTCTT |
| | Mq8 2 | GAACCCTTCAAAGACTTAGGGAAGAGAAGGCCTGAGCATAAGAATCA GGCCTTCGAGTCCCTCAAGT |

1.11. Sprzęt laboratoryjny oraz materiały trwałe

- Aparat do elektroforezy pionowej 20x20cm (BIORAD, PROTEAN II xi Cell)
- Aparat do elektroforezy pionowej 30x40cm (Gibco BRL, S2)
- Aparat do elektrotransferu (Sigma)
- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
- Cieplarka do hodowli bakteryjnych (Mettler)
- Cieplarko-wytrząsarka Max Q Mini 4000 (Barnstead)
- Inkubator bakteryjny (Mettler)
- Inkubator do komórek eukariotycznych (Heraeus, HERACell)
- Piecyk hybrydacyjny ProBlot (Labnet)
- Kasetka oraz ekran do autoradiografii (Amersham Biosciences)
- Komora laminarna do pracy z bakteriami (Aura vertical S.D.4.)
- Komora laminarna do pracy z komórkami eukariotycznymi (Heraeus, HERASafe KS 15)
- Licznik scyntylicyjny (HIDEX, Triathler)
- Luminometr Centro LB 960 (Berthold Technologies)
- Mikroskop optyczno-fluorescencyjny IX-70 (Olympus)
- pH - metr Seven Easy Mettler (Toledo)
- Skaner laserowy FLA 5100 (Fujifilm)
- Spektrofotometr NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Techn.)
- System dokumentacji żeli G:box (Syngene)
- Termocykler - 96-Well GeneAmp® PCR System 9700 (Perkin Elmer)
- Termomikser TS-100 (Biosan)
- UV crosslinker CL-1000 (UVP)
- Wirówka (Eppendorf mini spin)
- Wirówka (Eppendorf 5810R)
- Zasilacz do elektroforezy model 200 (Gibco BRL)
- Zasilacz do elektroforezy wysokonapięciowy model E833 (Consort)
- Membrana nylonowa do analizy tyo *northern* GeneScreen Plus (Perkin Elmer)

1.12. Programy komputerowe i bazy danych

GeneTools (Syngene) oraz GelPro (Media Cybernetics)– analiza żeli agarozowych

MultiGauge – analiza żeli poliakryloamidowych (FujiFilm)

PyMOL– analiza struktur przestrzennych RNA (Schrödinger, LLC)

Ensemble – baza danych sekwencji genomowych

<http://www.ensembl.org/index.html>

miRBase, deepbase, YM-500 – bazy danych miRNA

www.mirbase.org,

<http://deepbase.sysu.edu.cn/>

<http://ngs.ym.edu.tw/ym500v2/index.php>

RNAimmuno- baza danych efektów niespecyficznego reagentów RNAi

<http://rnaimmuno.ibch.poznan.pl>

MFold, RNAfold – przewidywanie struktur RNA

<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>

Primer3 – projektowanie starterów do PCR

<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

RNAComposer – przewidywanie struktur przestrzennych RNA

<http://rnacomposer.ibch.poznan.pl/>

UCSC-Genome Browser – baza danych sekwencji genomowych

<http://genome.ucsc.edu/>

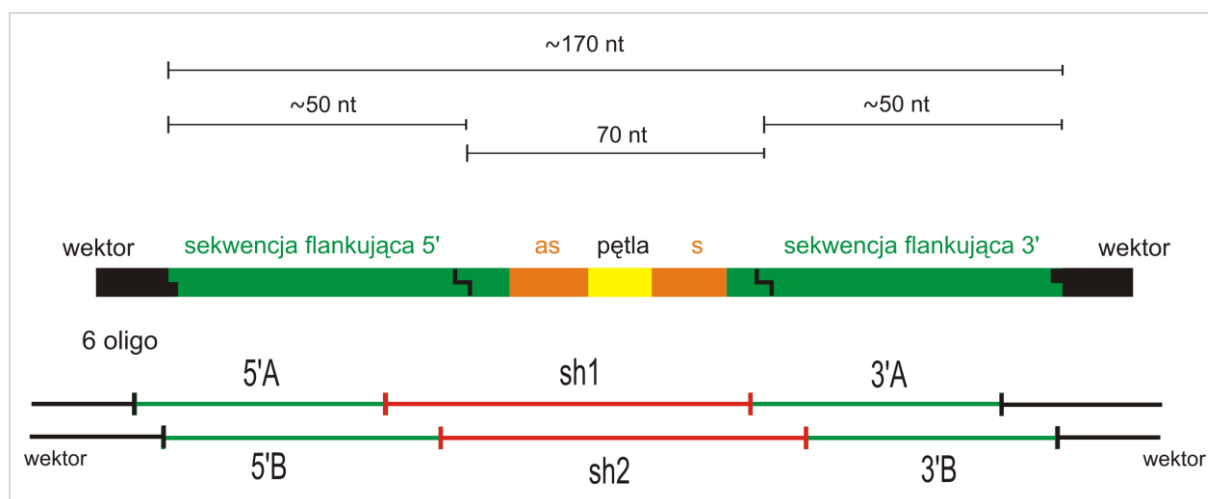
A Mammalian microRNA Expression Atlas-Atlas ekspresji miRNA

<http://www.mirz.unibas.ch/>

2. Metody

2.1. Konstrukcja plazmidów z kasetami ekspresyjnymi dla reagentów shmiR

Kasety ekspresyjne dla reagentów shmiR tworzone były poprzez ligację trzech par komplementarnych oligonukleotydów DNA (Tabela 6) pomiędzy którymi zachowano ~10 nukleotydowe komplementarne końce (Ryc. 52).



Ryc. 52. Sposób składania kaset ekspresyjnych dla wektorów shmiR

Środkowa para nukleotydów podlegała fosforylacji przed ligacją wstawki (Ligacja 1). Następnie zligowaną wstawkę wklonowywano do wektora pCDH-CMV-MCS-EF1 (SBI). Wektor ten oryginalnie zawierał sekwencje pri-miR-182, która została wycięta z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych EcoRI i NotI w buforze O (Fermentas) umożliwiając uzyskanie liniowego wektora z końcami komplementarnymi do wstawki shmiR. Całą objętość reakcji cięcia enzymami restrykcyjnymi rozdzielano w 0,8% niskotopliwym żelu agarozowym (ang. - *low melting point*). Fragment odpowiadający liniowej cząsteczce wektora zostały wycięte z żelu, zawieszony w buforze LMP, oraz oczyszczony na drodze ekstrakcji z zastosowaniem mieszaniny Fenol:Chloroform. Ligację wektora z kasetą ekspresyjną shmiR (Ligacja 2) prowadzono przy trójrotnym nadmiarze molarnym wstawki.

Fosforylacja

Fosforylacja tylko środkowej pary oligonukleotydów

| | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|--|--------------------------------|
| 17 μ l | H ₂ O | | 37°C – 50 min 65°C – 10 min |
| 1 μ l | sh1 | | |
| 1 μ l | sh2 | | |
| 2,5 μ l | Bufor 10x | | |
| 2,5 μ l | ATP 10 mM (końcowo 1mM) | | |
| 1 μ l | OptiKinase 10u/ μ l (USB) | | |
| <u>25 μl</u> | | | |

Annealing

Oligonukleotydy dupleksowano parami w buforze do annealingu (Ambion)

| | | | | | |
|------------|-------|------------|--|--|--------------------------|
| 1 μ l | 5'A | 1 μ l | 3'A | | 90°C – 5 min RT – 1 h |
| 1 μ l | 5'B | 1 μ l | 3'B | | |
| 48 μ l | bufor | 48 μ l | bufor | | |
| 50 μ l | | 50 μ l | | | |
| | | | Oligo sh1 + sh2 po fosforylacji +25 μ l bufor 50 μ l | | |

Ligacja 1

| | | | |
|-----------------------------|--|--|-------------------|
| 7,8 μ l | dupleksów (2,6 μ l z annealingu x 3 pary oligonukleotydów) | | 21°C – 1 h 15 min |
| 1 μ l | buforu do ligazy 10x | | |
| 1 μ l | T4 DNA Ligazy (Promega) | | |
| 0,2 μ l | H ₂ O | | |
| <u>10 μl</u> | | | |

Ligacja 2

Reakcję ligacji 1 rozcieńczono 10x

| | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|--|----------|
| 2 μ l | ligacji 1 rozcieńczonej 10x (~6 ng) | | 4°C - ON |
| 1 μ l | wektor pCDH-CMV (100 ng) | | |
| 1 μ l | buforu do ligazy 10x | | |
| 1 μ l | T4 DNA ligaza (Promega) | | |
| 5 μ l | H ₂ O | | |
| <u>10 μl</u> | | | |

Tak przygotowanymi wektorami transformowano komórki bakteryjne w celu propagacji plazmidów. Na jedną transformację używano 5 μ l reakcji ligacji 2 oraz 30 μ l bakterii kompetentnych *E.coli* GT 116 (Invivogen) zgodnie z zaleceniami producenta.

2.2. Konstrukcja plazmidu z sekwencją docelową testowanych reagentów shmiR

Aby prowadzić analizę efektywności działania reagentów shmiR w systemie lucyferazowym, przygotowano plazmid pmiR-Glo zawierający sekwencję eksonu 1 ludzkiego genu huntingtyny. Klonowany fragment został namnożony w reakcji PCR ze specyficznymi starterami a następnie oczyszczony po rozdziale w żelu agarozowym. W pierwszej kolejności produkt PCR wklonowany został do wektora pGemT-easy. Następnie zarówno wektor pmiR-Glo jak i pGemT-easy-HTT poddane były trawieniu enzymami restrykcyjnymi Dra I oraz Xba I w buforze Tango. W ostatnim etapie fragment wektora pGemT-easy zawierający sekwencję eksonu 1 HTT został przeklonowany do wektora pmiR-Glo bezpośrednio za genem lucyferazy firefly.

2.3. Propagacja plazmidów w komórkach bakteryjnych

Plazmidy kodujące reagenty shmiR, pri-miRNA oraz sekwencje docelowe były namnażane w bakteriach *E.coli* szczep GT 116, po wcześniejszej ich transformacji. Po całonocnej hodowli na pożywce stałej LB z agarem oraz antybiotykiem (ampicylina 100 µg/ml) pojedyncze kolonie bakteryjne przenoszono do 4ml pożywki płynnej LB z ampicyliną i prowadzono hodowlę przez noc. Następnie z nocnej hodowli izolowano plazmidy z użyciem zestawu Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega). Uzyskane plazmidy poddano sekwencjonowaniu w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu lub w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w celu wykluczenia obecności wprowadzonych przez bakterie mutacji oraz sprawdzenia wprowadzonej sekwencji insertu. Po potwierdzeniu poprawności sekwencji otrzymanych konstruktów zwiększano skalę hodowli do 200 ml pożywki LB z ampicyliną, z której to po nocnej hodowli izolowano plazmidy z wykorzystaniem zestawu GenElute HP Endotoxin-Free-Plasmid DNA Maxiprep Kit (Sigma Aldrich). Przygotowane plazmidy przechowywano w -20°C.

2.4. Przygotowanie dupleksów siRNA

W przypadku przygotowywania dupleksów siRNA, dwie komplementarne nici mieszano wg następującego przepisu:

| | | |
|---|--|-----------------------------|
| 15 μ l z 100 μ M nici antysensowej | | 90°C – 1 min RT – 40 min |
| 15 μ l z 100 μ M nici sensowej | | |
| <u>45 μl buforu do hybrydyzacji siRNA (Metabion)</u> | | |
| otrzymywano 75 μ l 20 μ M dupleksu siRNA | | |

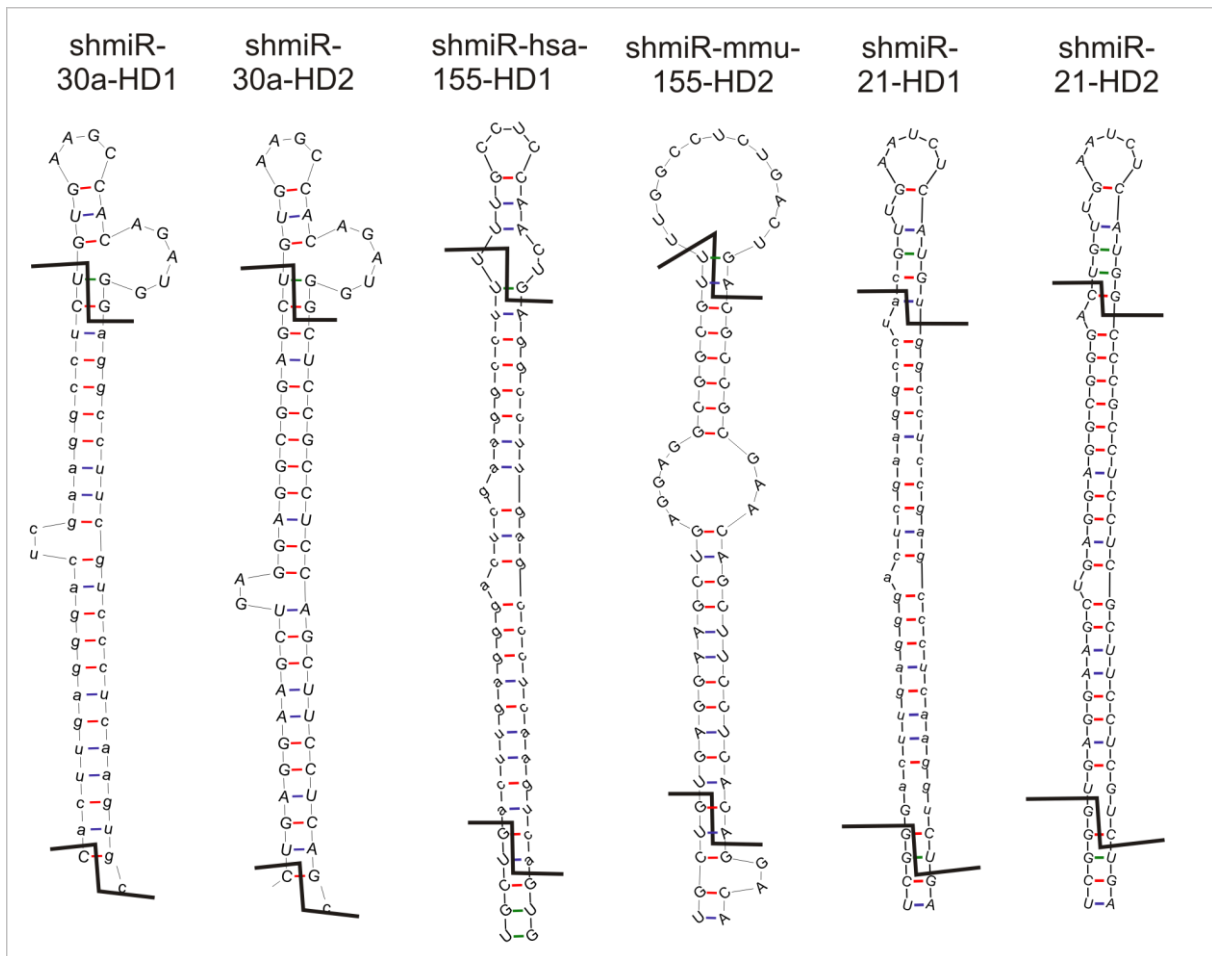
Tworzenie dupleksu było potwierdzane przez analizę migracji w 2,5% żelu agarozowym.

2.5. Analiza struktury RNA z wykorzystaniem programów komputerowych

Analizę struktur drugorzędowych RNA prowadzono za pomocą programów: MFold oraz RNAfold (struktury przedstawione m. in. na Ryc. 53). Programy te zostały zaprojektowane do przewidywania optymalnych i suboptymalnych struktur drugorzędowych przyjmowanych przez RNA w warunkach 1 M NaCl i temp. 37°C. Struktury o najniższej energii swobodnej były poddawane dalszej analizie bioinformatycznej.

Dla analizowanych pri-miRNA zostały wygenerowane struktury z wykorzystaniem programu MFold, w trzech wariantach długości sekwencji otaczających (50 nt, 100 nt, 200 nt) wg UCSC-Genome Browser.

Struktury drugorzędowe reagentów shmiR określone przy pomocy programów RNAfold zostały wykorzystane do przewidywania struktur przestrzennych z użyciem oprogramowania RNAComposer. Analizy uzyskanych struktur trójwymiarowych prowadzono w programie PyMOL (Schrödinger, LLC) umożliwiającym określenie rozbieżności struktur przestrzennych poprzez wyznaczenie współczynnika RMSD (ang. Root-mean-square deviation) dla regionów zawierających motywy rozluźniające strukturę helisy. Analizowano podobieństwo struktur (za pomocą komend align oraz pair-fit) dla całości (~150 nt) struktur cząsteczek shmiR dla których błąd przewidywania wynosi ~6Å. Z tego względu wyznaczano również lokalne współczynniki RMSD dla poszczególnych fragmentów struktur m.in. trzonu cząsteczek shRNA (~50 nt – błąd zmniejszony do ~4 Å) (Popena i wsp. 2012).



Ryc. 53. Struktury reagentów shmiR przewidywane przez program MFold nie uwzględnione na rycinach w rozdziale wyniki. Czarną linią zaznaczono przewidywane miejsca cięcia czasteczek przez RNazy Drosha oraz Dicer.

2.6. Hodowle komórkowe

Komórki eukariotyczne hodowane były w inkubatorach utrzymujących temperaturę 37°C oraz atmosferę 5% CO₂.

Komórki linii HeLa hodowano w pożywce RPMI1640 z dodatkiem 10% surowicy płodowej FBS, witamin i antybiotyków. Hodowla komórek linii HEK293T była prowadzona w pożywce DMEM suplementowanej 8% surowicą (FBS) oraz preparatem zawierającym antybiotyk/antymykotyk. Wszystkie komórki były hodowane do osiągnięcia konfluencji ~90%, a następnie pasażowane przy pomocy 1 x trypsyny, do nowych naczyń hodowlanych w celu zwiększenia skali hodowli.

2.7. Badanie poziomu RNA metodą hybrydyzacji typu *northern*

Transfekcja ludzkich komórek plazmidami DNA do analiz typu *northern*

Komórki HEK293T hodowano w butelkach T25 natomiast komórki HeLa w butelkach T75 do uzyskania ~80% konfluencji. Na każdą transfekcję przygotowano mieszaninę transfekcyjną zawierającą 4 µg plazmidu DNA (6µg w przypadku komórek HeLa) (System Biosciences) kodującego odpowiedni prekursor miRNA lub reagent shmiR i 12µl odczynnika Lipofectamine 2000 (20 ul w przypadku komórek HeLa) w pożywce DMEM (w przypadku HeLa - RPMI) bez suplementów. Jako kontrolę wydajności transfekcji komórki transfekowano tzw. „pustym” wektorem nie kodującym pri-miRNA ani cząsteczek shmiR. Komórki inkubowano z mieszaniną transfekcyjną 4 godz. w 37°C w obecności 5% CO₂. Efektywność transfekcji była monitorowana poprzez śledzenie fluorescencyjnych produktów genów reporterowych (eGFP). Całkowity RNA ze stransfekowanych komórek izolowano 24 godz. po transfekcji oraz poddawano analizie typu *northern*.

Izolacja całkowitego RNA z ludzkich linii komórkowych

Ludzkie linie komórkowe HeLa oraz HEK293T hodowano jak opisano wyżej. Po usunięciu medium hodowlanego komórki przepłukano roztworem PBS oraz zawieszano w 1ml odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Następnie prowadzono izolację według zaleceń producenta. Pomiar RNA prowadzono z użyciem spektrofotometru NanoDrop. RNA przechowywano w – 20°C.

Hybrydyzacja typu *northern* dla miRNA oraz siRNA

Przygotowanie prób oraz elektroforeza

Do 30µg wyizolowanego RNA dodano dwie objętości formamidowego roztworu obciążającego - i inkubowano 3 min. w 95°C. Po denaturacji niezwłocznie umieszczano próbki na poddanym preelektroforezie 12% żelu poliakryloamidowym (akryloamid:bisakryloamid 19:1; 0.5x TBE) o wymiarach 420/340/1mm. Wraz z próbkami całkowitego RNA, elektroforezie poddano znakowane radioaktywnie wzorce długości RNA L1 oraz L2. Elektroforezę prowadzono w buforze 0,5x TBE w warunkach 90W/80mA, tak długo, aż barwnik BB obecny w buforze obciążającym osiągnął dystans 22cm od kieszonek. Po elektroforezie żel barwiono w 0.1% roztworze bromku etydyny (EtBr) dla sprawdzenia jakości oraz ilości analizowanego RNA.

Elektrotransfer

RNA z żelu transferowano na membranę nylonową GeneScreen Plus przez 1 godzinę przy napięciu 20V (3mA/cm² żelu) w 0.5 x TBE podczas półsuchego transferu (Sigma-Aldrich).

Immobilizacja RNA na membranie

W celu immobilizacji RNA, membranę poddano naświetleniu światłem UV (120mJ/cm²) oraz zapiekaniu w 80°C.

Prehybrydyzacja

Membranę poddano prehybrydyzacji w buforze do hybrydyzacji z rotacją przez 0,5h w 37°C.

Hybrydyzacja

Jako sondy stosowano wyznakowane z użyciem [γ -ATP] syntetyczne oligonukleotydy DNA komplementarne do sekwencji miRNA lub siRNA.

Znakowanie sondy (25 μ l):

| | | |
|---------------|--|---------------|
| 15 pmol | oligonukleotyd DNA | 37°C – 45 min |
| 1 μ l | OptiKinaza (USB) | |
| 2,5 μ l | 10 \times bufor do OptiKinazy | |
| 5 μ l | ATP [γ - ³² P] (5000 Ci/mmol) | |
| do 25 μ l | (+H ₂ O) | |

Po wyznakowaniu sondy dodawano do niej 25 μ l wody i oczyszczano na kolumnkach Illustra MicroSpin G-25. Do buforu hybrydyzacyjnego dawano wyznakowaną sondę (~1 mln cpm/1ml buforu), uprzednio zdenaturowaną w 90°C przez 5 min. Membranę z sondą inkubowano z rotacją w 37°C przez noc w buforze do hybrydyzacji.

Płukanie i wizualizacja

Membranę płukano dwukrotnie buforem płuczącym w 37°C przez 40 min. Następnie membranę zawijano w folię, przykładano do kasety z ekranem wzmacniającym sygnał na 24 h. Radioaktywne sygnały były analizowane przy użyciu skanera laserowego FLA 5100 (Fujifilm) oraz programu MultiGauge (Fujifilm).

Hybrydyzacja typu *northern* dla pre-miRNA oraz shRNA

Analizę przeprowadzono, tak jak w przypadku czasetczek miRNA oraz siRNA z kilkoma różnicami. Stosowano 35 μ g całkowitego RNA a elektroforezę prowadzono tak długo, aż barwnik XC obecny w buforze obciążającym osiągnął dystans 30cm od kieszonek. Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym z żelu wycięto fragment wielkości 200x200mm

(zawierający analizowane cząsteczki) umożliwiający transfer w warunkach półsuchych (Sigma).

2.8. Analizy NGS

Do analiz NGS krótkich RNA komórki HEK 293T transfekowane były tak samo jak do analiz typu *northern*. W skrócie komórki w butelkach T25 transfekowano 4µg plazmidu (z wykorzystaniem odczynnika Lipofectamine 2000) i izolowano z nich materiał RNA po 24h, przy użyciu odczynnika TRI-reagent (sigma Aldrich). Następnie materiał RNA trawiony był DNazą (Ambion) w celu pozbycia się zanieczyszczeń DNA i oczyszczany był przez ekstrakcję mieszaniną Fenol:Chloroform o pH 4,5.

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|
| <u>Trawienie DNazą I (100µl):</u> | | 37°C – 30 min |
| 20 µg | RNA (~6 µl) | |
| 2 µl | DNaza I (2U) (Ambion) | |
| 10 µl | Bufor 10x | |
| do 100 µl | (+H ₂ O) | |

Oczyszczanie mieszaniną fenol:chloroform w objętości próbki 400 µl (+300 µl H₂O)

+ 2 obj. Mieszaniny fenol:chloroform pH~4,5 → wortexowano
wirowano 3 min 15 tys. x g, 4°C Zebrano fazę wodną

+ 1 obj. chloroformu → wortexowano
wirowano 3 min 15 tys. x g, 4°C Zebrano fazę wodną

+ 1/10 obj. Octanu sodu (3M, pH=5,2)
+ 2,5 obj. EtOH 99 %
+ 1 µl glikogenu (5mg/ml Ambion)

| |
|------------|
| -20°C – ON |
|------------|

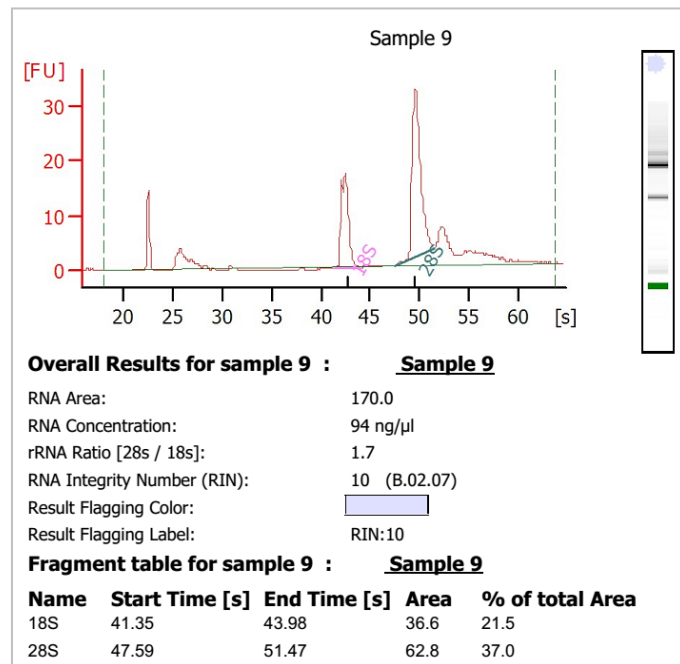
wirowano 20 tys. x g, 4°C 20 min, Zlano supernatant

Do osadu

+ 750 µl EtOH 75 % wirowano 20 tys. x g, 4°C 10 min
Osad suszono i zawieszano wodzie.

Oczyszczone próbki RNA poddawane były analizie jakości materiału na Agilent Bioanalyser (Ryc. 54) z wykorzystaniem zestawu chipów Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies).

Ryc. 54. Przykładowy wynik analizy jakości RNA z wykorzystaniem aparatury Bioanalyzer. Wynik analizy zawiera informację o ilości analizowanego RNA, stosunku 28s/18s rRNA, oraz współczynnik integralności RNA (RIN – ang. RNA Integrity Number).



Do dalszych etapów analiz wybierano próbki, których współczynnik RIN wynosił powyżej 9. Analizy NGS prowadzone były z wykorzystaniem platformy Illumina/Solexa. Próbkę całkowitego RNA wysyłane były na suchym lodzie do firmy BGI oraz Fasteris w celu stworzenia biblioteki a następnie wykonania sekwencjonowania wg standardowych protokołów platformy. W skrócie frakcja krótkich RNA (18-30 nt) poddawana była reakcji przyłączenia adaptorów do końca 3' oraz 5' cząsteczek RNA a następnie odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacji PCR. Stworzone biblioteki po przejściu testu jakości poddawane były sekwencjonowaniu nowej generacji na Illumina HiSeq 2000 (BGI) oraz HiSeq 2500 (Fasteris) (z zastosowaniem protokołu TruSeq v4, single-read 50 cycles). Analizy odczytów prowadzone były z zastosowaniem oprogramowania CASAVA v.1.8.2 (Illumina). Dane do dalszych analiz otrzymywano: w przypadku firmy BGI w postaci odczytów krótkich RNA pozbawionych sekwencji adaptorów (ang. clean reads) oraz w przypadku Fasteris w postaci surowych danych. Analizy bioinformatyczne uzyskanych odczytów prowadzone były we współpracy z dr Michałem Szcześniakiem (UAM) z wykorzystaniem opracowanego przez niego skryptu do usuwania sekwencji adaptorów (tylko w przypadku sekwencjonowania w firmie Fasteris) jak i przypisania poszczególnych odczytów do spinek shmiR oraz prekursorów znanych miRNA. W obrębie uzyskanych danych poszukiwano odczytów sekwencji pochodzących od siRNA uwalnianych z reagentów shmiR. W analizach brano pod uwagę tylko odczyty w pełni zgodne z sekwencjami reagentów shmiR (odrzucono odczyty posiadające nukleotydy „nie-matrycowe” (ang. untemplated nucleotides)). W analizach

statystycznych brano pod uwagę tylko odczyty, które uzyskały powyżej 5 RPM (ang. Read Per Milion). Sekwencjonowanie dla próbek shmiR-136-HD1 oraz M1 wykonano trzykrotnie.

Analizy poziomów znanych miRNA przeprowadzono z uwzględnieniem sekwencji miRNA zdeponowanych w bazie miRBase v.20. Porównano ekspresję wykrytych 987 miRNA pomiędzy komórkami kontrolnymi (nie traktowanymi) HEK 293T oraz tymi samymi komórkami transfekowanymi reagentami shmiR (5 próbek). Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu Bioconductor - DESeq oraz testu t-Studenta dla jednej próby. Wytypowano grupę miRNA, których poziom wykazywał istotne statystycznie zmiany w komórkach traktowanych reagentami shmiR. Ze względu na małą liczebność badanych grup analizę tę traktowano jako wstępną i analizowano tylko te miRNA (10 przedstawionych na Ryc. 20), których poziom został zmieniony minimum dwukrotnie. Krotność zmiany została przedstawiona w skali log2.

2.9. Bioinformatyczna analiza częstości nukleotydów w miejscach cięcia przez RNazy

Analiza bioinformatyczna częstości występowania nukleotydów w miejscach cięcia pri-miRNA przez RNazy Drosha oraz Dicer przeprowadzona była na danych NGS udostępnionych przez dr Davida Galasa (Lee i wsp. 2010). Dane pochodziły z komórek linii HEK293T wygenerowanych na platformie Illumina/Solexa. Analizę prowadzono z wykorzystaniem bazy miRBase v.14 wykluczono z niej jednak wszystkie cząsteczki negatywnie zwalidowane w bazie miRBase v.20 oraz te które osiągały poniżej pięciu odczytów. Analizy sekwencji izomirów prowadzone były z zastosowaniem zestawu skryptów napisanych w języku Python oraz Perl przez Tomasza Witkosia. Na podstawie udziału głównego wariantu miRNA analizowane cząsteczki zostały podzielone na grupę homogennych (>90%) oraz heterogennych (<70%). Istotność statystyczna obserwowanych zmian liczona z wykorzystaniem dwustronnego dokładnego testu Fishera z poprawką Bonferroni przyjmowana była przy wartości $p\text{-value} < 0,00078$ (0,05/64) (Tabela 8).

Tabela 8. Wartości statystyki testowej (p-value) dla nukleotydów o istotnie zmienionej częstości w poszczególnych pozycjach przedstawionych na rycinie 28.

Główny wariant homogennych miRNA vs. główny wariant heterogennych miRNA

| | | | | |
|----------|---------------|----|---|-----------------------|
| Ramię 5' | Cięcie Drosha | Nd | G | $2,22 \times 10^{-4}$ |
| | Cięcie Dicer | Nf | U | $2,7 \times 10^{-6}$ |
| Ramię 3' | Cięcie Drosha | N6 | U | $2,51 \times 10^{-4}$ |
| | | N7 | C | $7,07 \times 10^{-4}$ |
| | | N7 | A | $3,07 \times 10^{-4}$ |

Główny wariant homogennych miRNA vs. drugi wariant homogennych miRNA

| | | | | |
|----------|---------------|----|---|-----------------------|
| Ramię 3' | Cięcie Drosha | N5 | U | $1,76 \times 10^{-5}$ |
| | | N6 | G | $2,9 \times 10^{-4}$ |

Główny wariant homogennych miRNA vs. tło

| | | | | |
|----------|---------------|----|---|-----------------------|
| Ramię 5' | Cięcie Drosha | Nc | U | $4,61 \times 10^{-6}$ |
| | | Nc | G | $1,27 \times 10^{-4}$ |
| | | Nd | G | $3,44 \times 10^{-5}$ |
| | | Nd | C | $7,52 \times 10^{-4}$ |
| | Cięcie Dicer | Nf | U | $1,56 \times 10^{-9}$ |
| | | Ng | A | $4,11 \times 10^{-4}$ |
| Ramię 3' | Cięcie Dicer | N3 | G | $5,57 \times 10^{-4}$ |
| | | N4 | A | $3,47 \times 10^{-4}$ |
| | Cięcie Drosha | N6 | U | $7,76 \times 10^{-4}$ |
| | | N6 | G | $5,57 \times 10^{-4}$ |
| | | N7 | C | $4,55 \times 10^{-5}$ |

Główny wariant heterogennych miRNA vs. tło

| | | | | |
|----------|--------------|----|---|-----------------------|
| Ramię 5' | Cięcie Dicer | Nh | A | $5,33 \times 10^{-4}$ |
| Ramię 3' | Cięcie Dicer | N3 | A | $2,41 \times 10^{-4}$ |

Drugi wariant homogennych miRNA vs. tło

| | | | | |
|----------|---------------|----|---|-----------------------|
| Ramię 5' | Cięcie Drosha | Nc | U | $1,62 \times 10^{-5}$ |
| | | Nd | G | $5,73 \times 10^{-6}$ |
| | Cięcie Dicer | Ng | U | $9,94 \times 10^{-5}$ |
| | | Nh | G | $3,78 \times 10^{-5}$ |
| Ramię 3' | Cięcie Drosha | N5 | U | $5,57 \times 10^{-6}$ |
| | | N8 | C | $1,79 \times 10^{-4}$ |

2.10. Analiza efektywności działania reagentów shmiR w systemie lucyferazowym

W celu przeprowadzenia analiz aktywności badanych cząsteczek w systemie lucyferazowym komórki wysiewano na płytki 24-dołkowe po 18 tys. komórek Hela lub po 80 tys. komórek HEK na dołek. Kontransfekcję plazmidów pmiRGLO (plazmid lucyferazowy z sekwencją docelową dla reagentów shmiR) oraz plazmidów pCDH-CMV niosących sekwencje shmiR optymalizowano w zakresie ilości i proporcji podawanych plazmidów na dołek (300ng:100ng, 200ng:100ng, 100ng:50ng), finalnie stosowano 200ng plazmidu pmiRGLO oraz 100 ng plazmidu pCDH-CMV. Przy opracowywaniu warunków do testowania reagentów shmiR wybrano takie, w których cząsteczki nie osiągają maksymalnej efektywności wyciszania sekwencji docelowej. Dzięki temu, system umożliwia obserwację większego zakresu zmian w efektywności działania reagentów shmiR (nie tylko pogorszenia ale również zwiększenia efektywności działania reagentów).

Na każdą transfekcję przygotowywano mieszaninę transfekcyjną zawierającą odpowiednie ilości plazmidów shmiR oraz plazmidu pmiR-GLO z odczynnikiem Lipofectamine 2000 w pożywce DMEM bez suplementów. Jako kontrole stosowano również jednoczesną transfekcję komórek plazmidem pmiR-GLO oraz syntetycznymi siRNA w stężeniach 20 oraz 50 nM. Komórki inkubowano z mieszaniną transfekcyjną 4 godz. w 37°C w obecności 5% CO₂ po czym zmieniano medium hodowlane na kompletne. Po 24 godz. komórki zawieszano w buforze do lizy pasywnej (Promega), inkubowano przez 15 min z rotacją a następnie mrożono w -20 °C.

Zebrany materiał analizowano pod kątem ubytku luminescencji oznaczającym wyciszenie ekspresji transkryptu luc-HTT. W tym celu stosowano zestaw Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta do analizy na luminometrze płytkowym Centro LB 960 (Berthold Technologies).

2.11. Obliczenia statystyczne

Przedstawiane na rycinach wyniki efektywności działania reagentów shmiR zawierają dane z co najmniej 3 niezależnych powtórzeń biologicznych, dla których wykonano po trzy powtórzenia techniczne. Poziom ekspresji genu docelowego dla reagentów shmiR odnoszono do kontroli nietraktowanej RNAi (NC). Istotność statystyczną różnicy wyników dla poszczególnych reagentów shmiR, siRNA oraz kontroli określano używając testu one-way ANOVA z post-testem Bonferroni. Dla każdego testu statystycznego wyliczano wartość p value (two-tailed), przyjmując wynik za istotny statystycznie przy $p < 0,05$ (GraphPad). Na

słupkach wykresów zaznaczono odchylenie standardowe. We większości przypadków przedstawianych w pracy wykresów prezentujących wyniki analiz w systemie lucyferazowym zarówno siRNA jak i badane reagenty shmiR wykazują istotne statystycznie obniżenie ekspresji genu docelowego w stosunku do kontroli (NC) dlatego oznaczenia (*) wprowadzono tylko w przypadkach gdy obserwowano różnice w wyciszaniu pomiędzy reagentami (jak w przypadku Ms6, Ms7 oraz M3).

IX. BIBLIOGRAFIA

- Aagaard, L. A., J. Zhang, K. J. von Eije, H. Li, P. Saetrom, M. Amarzguioui i J. J. Rossi (2008). "Engineering and optimization of the miR-106b cluster for ectopic expression of multiplexed anti-HIV RNAs." *Gene Ther* **15**(23): 1536-49.
- Acevedo, R., N. Orench-Rivera, K. A. Quarles i S. A. Showalter (2015). "Helical Defects in MicroRNA Influence Protein Binding by TAR RNA Binding Protein." *PLoS One* **10**(1): e0116749.
- Addepalli, H., Meena, i wsp. (2010). "Modulation of thermal stability can enhance the potency of siRNA." *Nucleic Acids Res* **38**(20): 7320-31.
- Amarzguioui, M., J. J. Rossi i D. Kim (2005). "Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi." *FEBS Lett* **579**(26): 5974-81.
- Ameres, S. L., M. D. Horwich, J. H. Hung, J. Xu, M. Ghildiyal, Z. Weng i P. D. Zamore (2010). "Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs." *Science* **328**(5985): 1534-9.
- Ameres, S. L. i P. D. Zamore (2013). "Diversifying microRNA sequence and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(8): 475-88.
- Arroyo, J. D., E. N. Gallichotte i M. Tewari (2014). "Systematic design and functional analysis of artificial microRNAs." *Nucleic Acids Res* **42**(9): 6064-77.
- Auyeung, V. C., I. Ulitsky, S. E. McGeary i D. P. Bartel (2013). "Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing." *Cell* **152**(4): 844-58.
- Bartlett, D. W. i M. E. Davis (2006). "Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging." *Nucleic Acids Res* **34**(1): 322-33.
- Bauer, M., N. Kinkl, A. Meixner, E. Kremmer, M. Riemenschneider, H. Forstl, T. Gasser i M. Ueffing (2009). "Prevention of interferon-stimulated gene expression using microRNA-designed hairpins." *Gene Ther* **16**(1): 142-7.
- Beer, S., D. I. Bellovin, J. S. Lee, K. Komatsubara, L. S. Wang, H. Koh, K. Borner, T. A. Storm, C. R. Davis, M. A. Kay, D. W. Felsher i D. Grimm (2010). "Low-level shRNA cytotoxicity can contribute to MYC-induced hepatocellular carcinoma in adult mice." *Mol Ther* **18**(1): 161-70.
- Behlke, M. A. (2008). "Chemical modification of siRNAs for in vivo use." *Oligonucleotides* **18**(4): 305-19.
- Beisel, C. L., Y. Y. Chen, S. J. Culler, K. G. Hoff i C. D. Smolke (2010). "Design of small molecule-responsive microRNAs based on structural requirements for Drosha processing." *Nucleic Acids Res* **39**(7): 2981-94.
- Bellemer, C., M. L. Bortolin-Cavaille, U. Schmidt, S. M. Jensen, J. Kjems, E. Bertrand i J. Cavaille (2012). "Microprocessor dynamics and interactions at endogenous imprinted C19MC microRNA genes." *J Cell Sci* **125**(Pt 11): 2709-20.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond i G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**(6818): 363-6.
- Boden, D., O. Pusch, R. Silbermann, F. Lee, L. Tucker i B. Ramratnam (2004). "Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins." *Nucleic Acids Res* **32**(3): 1154-8.
- Boele, J., H. Persson, i wsp. (2014). "PAPD5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(31): 11467-72.

- Borchert, G. M., W. Lanier i B. L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* **13**(12): 1097-101.
- Borel, F., R. van Logtenstein, A. Koornneef, P. Maczuga, T. Ritsema, H. Petry, S. J. van Deventer, P. L. Jansen i P. Konstantinova (2011). "In vivo knock-down of multidrug resistance transporters ABCC1 and ABCC2 by AAV-delivered shRNAs and by artificial miRNAs." *J RNAi Gene Silencing* **7**: 434-42.
- Boudreau, R. L., I. Martins i B. L. Davidson (2009a). "Artificial microRNAs as siRNA shuttles: improved safety as compared to shRNAs in vitro and in vivo." *Mol Ther* **17**(1): 169-75.
- Boudreau, R. L., J. L. McBride, I. Martins, S. Shen, Y. Xing, B. J. Carter i B. L. Davidson (2009b). "Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice." *Mol Ther* **17**(6): 1053-63.
- Boudreau, R. L., A. M. Monteys i B. L. Davidson (2008). "Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs." *Rna* **14**(9): 1834-44.
- Boudreau, R. L., R. M. Spengler i B. L. Davidson (2011). "Rational design of therapeutic siRNAs: minimizing off-targeting potential to improve the safety of RNAi therapy for Huntington's disease." *Mol Ther* **19**(12): 2169-77.
- Boudreau, R. L., R. M. Spengler, R. H. Hylock, B. J. Kusenda, H. A. Davis, D. A. Eichmann i B. L. Davidson (2013). "siSPOTR: a tool for designing highly specific and potent siRNAs for human and mouse." *Nucleic Acids Res* **41**(1): e9.
- Bramsen, J. B., M. B. Laursen, i wsp. (2009). "A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity." *Nucleic Acids Res* **37**(9): 2867-81.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards i R. Agami (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* **296**(5567): 550-3.
- Buchon, N. i C. Vauray (2006). "RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements." *Heredity (Edinb)* **96**(2): 195-202.
- Burke, J. M., D. P. Kelenis, R. P. Kincaid i C. S. Sullivan (2014). "A central role for the primary microRNA stem in guiding the position and efficiency of Drosha processing of a viral pri-miRNA." *Rna* **20**(7): 1068-77.
- Burroughs, A. M., Y. Ando, M. J. de Hoon, Y. Tomaru, T. Nishibu, R. Ukekawa, T. Funakoshi, T. Kurokawa, H. Suzuki, Y. Hayashizaki i C. O. Daub (2010). "A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness." *Genome Res* **20**(10): 1398-410.
- Calabrese, J. M., A. C. Seila, G. W. Yeo i P. A. Sharp (2007). "RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18097-102.
- Castanotto, D., K. Sakurai, R. Lingeman, H. Li, L. Shively, L. Aagaard, H. Soifer, A. Gagnol, A. Riggs i J. J. Rossi (2007). "Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC." *Nucleic Acids Res* **35**(15): 5154-64.
- Chang, K., S. J. Elledge i G. J. Hannon (2006). "Lessons from Nature: microRNA-based shRNA libraries." *Nat Methods* **3**(9): 707-14.
- Cheloufi, S., C. O. Dos Santos, M. M. Chong i G. J. Hannon (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." *Nature* **465**(7298): 584-9.
- Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish i D. P. Bartel (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science* **303**(5654): 83-6.

- Chen, S. C., P. Stern, Z. Guo i J. Chen (2011). "Expression of multiple artificial microRNAs from a chicken miRNA126-based lentiviral vector." *PLoS One* **6**(7): e22437.
- Choi, J. G., P. Bharaj, S. Abraham, H. Ma, G. Yi, C. Ye, Y. Dang, N. Manjunath, H. Wu i P. Shankar (2015). "Multiplexing seven miRNA-Based shRNAs to suppress HIV replication." *Mol Ther* **23**(2): 310-20.
- Chung, K. H., C. C. Hart, S. Al-Bassam, A. Avery, J. Taylor, P. D. Patel, A. B. Vojtek i D. L. Turner (2006). "Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155." *Nucleic Acids Res* **34**(7): e53.
- Cifuentes, D., H. Xue, D. W. Taylor, H. Patnode, Y. Mishima, S. Cheloufi, E. Ma, S. Mane, G. J. Hannon, N. D. Lawson, S. A. Wolfe i A. J. Giraldez (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity." *Science* **328**(5986): 1694-8.
- de Mezer, M., M. Wojciechowska, M. Napierala, K. Sobczak i W. J. Krzyzosiak (2011). "Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference." *Nucleic Acids Res* **39**(9): 3852-63.
- Dickins, R. A., M. T. Hemann, J. T. Zilfou, D. R. Simpson, I. Ibarra, G. J. Hannon i S. W. Lowe (2005). "Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors." *Nat Genet* **37**(11): 1289-95.
- Ebhardt, H. A., H. H. Tsang, D. C. Dai, Y. Liu, B. Bostan i R. P. Fahlman (2009). "Meta-analysis of small RNA-sequencing errors reveals ubiquitous post-transcriptional RNA modifications." *Nucleic Acids Res* **37**(8): 2461-70.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel i T. Tuschl (2001a). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* **15**(2): 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel i T. Tuschl (2001b). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." *Embo J* **20**(23): 6877-88.
- Ely, A., T. Naidoo i P. Arbuthnot (2009). "Efficient silencing of gene expression with modular trimeric Pol II expression cassettes comprising microRNA shuttles." *Nucleic Acids Res* **37**(13): e91.
- Ely, A., T. Naidoo, S. Mufamadi, C. Crowther i P. Arbuthnot (2008). "Expressed anti-HBV primary microRNA shuttles inhibit viral replication efficiently in vitro and in vivo." *Mol Ther* **16**(6): 1105-12.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg i W. Filipowicz (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." *Annu Rev Biochem* **79**: 351-79.
- Fellmann, C., T. Hoffmann, V. Sridhar, B. Hopfgartner, M. Muhar, M. Roth, D. Y. Lai, I. A. Barbosa, J. S. Kwon, Y. Guan, N. Sinha i J. Zuber (2013). "An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi." *Cell Rep* **5**(6): 1704-13.
- Fellmann, C., J. Zuber, K. McJunkin, K. Chang, C. D. Malone, R. A. Dickins, Q. Xu, M. O. Hengartner, S. J. Elledge, G. J. Hannon i S. W. Lowe (2011). "Functional identification of optimized RNAi triggers using a massively parallel sensor assay." *Mol Cell* **41**(6): 733-46.
- Feng, Y., X. Zhang, Q. Song, T. Li i Y. Zeng (2011). "Drosha processing controls the specificity and efficiency of global microRNA expression." *Biochim Biophys Acta* **1809**(11-12): 700-7.
- Fernandez-Valverde, S. L., R. J. Taft i J. S. Mattick (2010). "Dynamic isomiR regulation in *Drosophila* development." *Rna* **16**(10): 1881-8.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver i C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.

- Fiszer, A. i W. J. Krzyzosiak (2014). "Oligonucleotide-based strategies to combat polyglutamine diseases." *Nucleic Acids Res* **42**(11): 6787-810.
- Fiszer, A., M. Olejniczak, P. Galka-Marciniak, A. Mykowska i W. J. Krzyzosiak (2013). "Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression." *Nucleic Acids Res* **41**(22): 10426-37.
- Frank, F., N. Sonenberg i B. Nagar (2010). "Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2." *Nature* **465**(7299): 818-22.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge i D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res* **19**(1): 92-105.
- Fukunaga, R., B. W. Han, J. H. Hung, J. Xu, Z. Weng i P. D. Zamore (2012). "Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals." *Cell* **151**(3): 533-46.
- Gantier, M. P. i B. R. Williams (2007). "The response of mammalian cells to double-stranded RNA." *Cytokine Growth Factor Rev* **18**(5-6): 363-71.
- Ge, Q., H. Ilves, A. Dallas, P. Kumar, J. Shorestein, S. A. Kazakov i B. H. Johnston (2010). "Minimal-length short hairpin RNAs: the relationship of structure and RNAi activity." *Rna* **16**(1): 106-17.
- Ghildiyal, M. i P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." *Nat Rev Genet* **10**(2): 94-108.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch i R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* **432**(7014): 235-40.
- Griffiths-Jones, S., J. H. Hui, A. Marco i M. Ronshaugen (2011). "MicroRNA evolution by arm switching." *EMBO Rep* **12**(2): 172-7.
- Grimm, D., K. L. Streetz, C. L. Jopling, T. A. Storm, K. Pandey, C. R. Davis, P. Marion, F. Salazar i M. A. Kay (2006). "Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways." *Nature* **441**(7092): 537-41.
- Gu, S., L. Jin, Y. Zhang, Y. Huang, F. Zhang, P. N. Valdmanis i M. A. Kay (2012). "The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo." *Cell* **151**(4): 900-11.
- Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman i D. P. Bartel (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature* **466**(7308): 835-40.
- Ha, M. i V. N. Kim (2014). "Regulation of microRNA biogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(8): 509-24.
- Hagan, J. P., E. Piskounova i R. I. Gregory (2009). "Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells." *Nat Struct Mol Biol* **16**(10): 1021-5.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi i G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." *Science* **293**(5532): 1146-50.
- Han, B. W., J. H. Hung, Z. Weng, P. D. Zamore i S. L. Ameres (2011). "The 3'-to-5' exoribonuclease Nibbler shapes the 3' ends of microRNAs bound to Drosophila Argonaute1." *Curr Biol* **21**(22): 1878-87.
- Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, J. W. Nam, I. Heo, J. K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B. T. Zhang i V. N. Kim (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." *Cell* **125**(5): 887-901.
- Han, J., J. S. Pedersen, S. C. Kwon, C. D. Belair, Y. K. Kim, K. H. Yeom, W. Y. Yang, D. Haussler, R. Billewicz i V. N. Kim (2009). "Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8." *Cell* **136**(1): 75-84.

- Heo, I., C. Joo, Y. K. Kim, M. Ha, M. J. Yoon, J. Cho, K. H. Yeom, J. Han i V. N. Kim (2009). "TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation." *Cell* **138**(4): 696-708.
- Huang, X. i Z. Jia (2013). "Construction of HCC-targeting artificial miRNAs using natural miRNA precursors." *Exp Ther Med* **6**(1): 209-215.
- Humphreys, D. T., C. J. Hynes, H. R. Patel, G. H. Wei, L. Cannon, D. Fatkin, C. M. Suter, J. L. Clancy i T. Preiss (2012). "Complexity of murine cardiomyocyte miRNA biogenesis, sequence variant expression and function." *PLoS One* **7**(2): e30933.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet i P. S. Linsley (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." *Nat Biotechnol* **21**(6): 635-7.
- Jackson, A. L., J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova i P. S. Linsley (2006). "Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing." *Rna* **12**(7): 1197-205.
- Jackson, A. L. i P. S. Linsley (2010). "Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application." *Nat Rev Drug Discov* **9**(1): 57-67.
- Janas, M. M., B. Wang, A. S. Harris, M. Aguiar, J. M. Shaffer, Y. V. Subrahmanyam, M. A. Behlke, K. W. Wucherpfennig, S. P. Gygi, E. Gagnon i C. D. Novina (2012). "Alternative RISC assembly: binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins." *Rna* **18**(11): 2041-55.
- Jones-Rhoades, M. W., D. P. Bartel i B. Bartel (2006). "MicroRNAs and their regulatory roles in plants." *Annu Rev Plant Biol* **57**: 19-53.
- Kadener, S., J. Rodriguez, K. C. Abruzzi, Y. L. Khodor, K. Sugino, M. T. Marr, 2nd, S. Nelson i M. Rosbash (2009). "Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex." *Rna* **15**(4): 537-45.
- Kanasty, R., J. R. Dorkin, A. Vegas i D. Anderson (2013). "Delivery materials for siRNA therapeutics." *Nat Mater* **12**(11): 967-77.
- Kataoka, N., M. Fujita i M. Ohno (2009). "Functional association of the Microprocessor complex with the spliceosome." *Mol Cell Biol* **29**(12): 3243-54.
- Kawahara, Y., B. Zinshteyn, P. Sethupathy, H. Iizasa, A. G. Hatzigeorgiou i K. Nishikura (2007). "Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs." *Science* **315**(5815): 1137-40.
- Kawamata, T., H. Seitz i Y. Tomari (2009). "Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding." *Nat Struct Mol Biol* **16**(9): 953-60.
- Kim, V. N., J. Han i M. C. Siomi (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(2): 126-39.
- Kittler, R., V. Surendranath, i wsp. (2007). "Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies." *Nat Methods* **4**(4): 337-44.
- Kok, K. H., M. H. Ng, Y. P. Ching i D. Y. Jin (2007). "Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA." *J Biol Chem* **282**(24): 17649-57.
- Koscianska, E., J. Starega-Roslan i W. J. Krzyzosiak (2011a). "The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors." *PLoS One* **6**(12): e28548.
- Koscianska, E., J. Starega-Roslan, L. J. Sznajder, M. Olejniczak, P. Galka-Marciniak i W. J. Krzyzosiak (2011b). "Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers." *BMC Mol Biol* **12**: 14.

- Kozłowski, P., J. Starega-Roslan, M. Legacz, M. Magnus i W. Krzyżosiak (2008). "Structures of microRNA precursors." *Current Perspectives in microRNAs (miRNA)* (IN Ying S-Y (ed.) Springer, Netherlands): 1-16.
- Kozomara, A. i S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D152-7.
- Kozomara, A. i S. Griffiths-Jones (2014). "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data." *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue): D68-73.
- Krol, J., I. Loedige i W. Filipowicz (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nat Rev Genet* **11**(9): 597-610.
- Landgraf, P., M. Rusu, i wsp. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." *Cell* **129**(7): 1401-14.
- Lau, P. W., K. Z. Guiley, N. De, C. S. Potter, B. Carragher i I. J. MacRae (2012). "The molecular architecture of human Dicer." *Nat Struct Mol Biol* **19**(4): 436-40.
- Lau, P. W., C. S. Potter, B. Carragher i I. J. MacRae (2009). "Structure of the human Dicer-TRBP complex by electron microscopy." *Structure* **17**(10): 1326-32.
- Lee, H. Y., K. Zhou, A. M. Smith, C. L. Noland i J. A. Doudna (2013). "Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing." *Nucleic Acids Res* **41**(13): 6568-76.
- Lee, L. W., S. Zhang, A. Etheridge, L. Ma, D. Martin, D. Galas i K. Wang (2010). "Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing." *Rna* **16**(11): 2170-80.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim i V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh i V. N. Kim (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." *Embo J* **25**(3): 522-32.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim i V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *Embo J* **21**(17): 4663-70.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek i V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *Embo J* **23**(20): 4051-60.
- Li, L., X. Lin, A. Khvorova, S. W. Fesik i Y. Shen (2007). "Defining the optimal parameters for hairpin-based knockdown constructs." *Rna* **13**(10): 1765-74.
- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon i R. Parker (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**(7): 719-23.
- Liu, X. Y., Q. S. Tang, H. C. Chen, X. L. Jiang i H. Fang (2013). "Lentiviral miR30-based RNA interference against heparanase suppresses melanoma metastasis with lower liver and lung toxicity." *Int J Biol Sci* **9**(6): 564-77.
- Liu, Y. P., J. Haasnoot i B. Berkhout (2007). "Design of extended short hairpin RNAs for HIV-1 inhibition." *Nucleic Acids Res* **35**(17): 5683-93.
- Liu, Y. P., J. Haasnoot, O. ter Brake, B. Berkhout i P. Konstantinova (2008). "Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron." *Nucleic Acids Res* **36**(9): 2811-24.
- Lo, H. L., T. Chang, P. Yam, P. M. Marcovecchio, S. Li, J. A. Zaia i J. K. Yee (2007). "Inhibition of HIV-1 replication with designed miRNAs expressed from RNA polymerase II promoters." *Gene Ther* **14**(21): 1503-12.
- Ma, H., Y. Wu, J. G. Choi i H. Wu (2013). "Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(51): 20687-92.
- Macias, S., R. A. Cordiner i J. F. Caceres (2013). "Cellular functions of the microprocessor." *Biochem Soc Trans* **41**(4): 838-43.

- Macrae, I. J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams i J. A. Doudna (2006). "Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer." *Science* **311**(5758): 195-8.
- Maczuga, P., A. Koornneef, F. Borel, H. Petry, S. van Deventer, T. Ritsema i P. Konstantinova (2012). "Optimization and comparison of knockdown efficacy between polymerase II expressed shRNA and artificial miRNA targeting luciferase and Apolipoprotein B100." *BMC Biotechnol* **12**: 42.
- Maczuga, P., J. Lubelski, R. van Logtenstein, F. Borel, B. Blits, E. Fakkert, A. Costessi, D. Butler, S. van Deventer, H. Petry, A. Koornneef i P. Konstantinova (2013). "Embedding siRNA sequences targeting apolipoprotein B100 in shRNA and miRNA scaffolds results in differential processing and in vivo efficacy." *Mol Ther* **21**(1): 217-27.
- Maczuga, P., J. Verheij, C. van der Loos, R. van Logtenstein, G. Hooijer, R. Martier, F. Borel, J. Lubelski, A. Koornneef, B. Blits, S. van Deventer, H. Petry i P. Konstantinova (2014). "Therapeutic expression of hairpins targeting apolipoprotein B100 induces phenotypic and transcriptome changes in murine liver." *Gene Ther* **21**(1): 60-70.
- Mansur, D. S., G. L. Smith i B. J. Ferguson (2014). "Intracellular sensing of viral DNA by the innate immune system." *Microbes Infect* **16**(12): 1002-12.
- Marques, J. T., T. Devosse, D. Wang, M. Zamanian-Daryoush, P. Serbinowski, R. Hartmann, T. Fujita, M. A. Behlke i B. R. Williams (2006). "A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells." *Nat Biotechnol* **24**(5): 559-65.
- Matveeva, O. V., N. N. Nazipova, A. Y. Ogurtsov i S. A. Shabalina (2012). "Optimized models for design of efficient miR30-based shRNAs." *Front Genet* **3**: 163.
- McBride, J. L., R. L. Boudreau, S. Q. Harper, P. D. Staber, A. M. Monteys, I. Martins, B. L. Gilmore, H. Burstein, R. W. Peluso, B. Polisky, B. J. Carter i B. L. Davidson (2008). "Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(15): 5868-73.
- McManus, M. T., C. P. Petersen, B. B. Haines, J. Chen i P. A. Sharp (2002). "Gene silencing using micro-RNA designed hairpins." *Rna* **8**(6): 842-50.
- Morin, R. D., M. D. O'Connor, M. Griffith, F. Kuchenbauer, A. Delaney, A. L. Prabhu, Y. Zhao, H. McDonald, T. Zeng, M. Hirst, C. J. Eaves i M. A. Marra (2008). "Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells." *Genome Res* **18**(4): 610-21.
- Moses, J., A. Goodchild i L. P. Rivory (2010). "Intended transcriptional silencing with siRNA results in gene repression through sequence-specific off-targeting." *Rna* **16**(2): 430-41.
- Myburgh, R., O. Cherpil, E. Schlaepfer, H. Rehrauer, R. F. Speck, K. H. Krause i P. Salmon (2014). "Optimization of Critical Hairpin Features Allows miRNA-based Gene Knockdown Upon Single-copy Transduction." *Mol Ther Nucleic Acids* **3**: e207.
- Neilsen, C. T., G. J. Goodall i C. P. Bracken (2012). "IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome." *Trends Genet* **28**(11): 544-9.
- Newman, M. A., V. Mani i S. M. Hammond (2011). "Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification." *Rna* **17**(10): 1795-803.
- Okada, C., E. Yamashita, S. J. Lee, S. Shibata, J. Katahira, A. Nakagawa, Y. Yoneda i T. Tsukihara (2009). "A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery." *Science* **326**(5957): 1275-9.
- Olejniczak, M., P. Galka-Marciniak, K. Polak, A. Fligier i W. J. Krzyzosiak (2012). "RNAimmuno: a database of the nonspecific immunological effects of RNA interference and microRNA reagents." *Rna* **18**(5): 930-5.

- Olejniczak, M., P. Galka i W. J. Krzyzosiak (2010). "Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators." *Nucleic Acids Res* **38**(1): 1-16.
- Olejniczak, M., K. Polak, P. Galka-Marciniak i W. J. Krzyzosiak (2011). "Recent advances in understanding of the immunological off-target effects of siRNA." *Curr Gene Ther* **11**(6): 532-43.
- Park, J. E., I. Heo, Y. Tian, D. K. Simanshu, H. Chang, D. Jee, D. J. Patel i V. N. Kim (2011). "Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing." *Nature* **475**(7355): 201-5.
- Pei, Y. i T. Tuschl (2006). "On the art of identifying effective and specific siRNAs." *Nat Methods* **3**(9): 670-6.
- Popenda, M., M. Szachniuk, M. Antczak, K. J. Purzycka, P. Lukasiak, N. Bartol, J. Blazewicz i R. W. Adamiak (2012). "Automated 3D structure composition for large RNAs." *Nucleic Acids Res* **40**(14): e112.
- Quarles, K. A., D. Sahu, M. A. Havens, E. R. Forsyth, C. Wostenberg, M. L. Hastings i S. A. Showalter (2013). "Ensemble analysis of primary microRNA structure reveals an extensive capacity to deform near the Drosha cleavage site." *Biochemistry* **52**(5): 795-807.
- Quick-Cleveland, J., J. P. Jacob, S. H. Weitz, G. Shoffner, R. Senturia i F. Guo (2014). "The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin." *Cell Rep* **7**(6): 1994-2005.
- Reynolds, A., E. M. Anderson, A. Vermeulen, Y. Fedorov, K. Robinson, D. Leake, J. Karpilow, W. S. Marshall i A. Khvorova (2006). "Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent." *Rna* **12**(6): 988-93.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall i A. Khvorova (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." *Nat Biotechnol* **22**(3): 326-30.
- Rhee, S. W., J. R. Stimers, W. Wang i L. Pang (2009). "Vascular smooth muscle-specific knockdown of the noncardiac form of the L-type calcium channel by microRNA-based short hairpin RNA as a potential antihypertensive therapy." *J Pharmacol Exp Ther* **329**(2): 775-82.
- Robbins, M., A. Judge, E. Ambegia, C. Choi, E. Yaworski, L. Palmer, K. McClintock i I. MacLachlan (2008). "Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation." *Hum Gene Ther* **19**(10): 991-9.
- Rodriguez-Lebron, E., C. Costa Mdo, K. Luna-Cancelon, T. M. Peron, S. Fischer, R. L. Boudreau, B. L. Davidson i H. L. Paulson (2013). "Silencing mutant ATXN3 expression resolves molecular phenotypes in SCA3 transgenic mice." *Mol Ther* **21**(10): 1909-18.
- Ruggiero, T., M. Trabucchi, F. De Santa, S. Zupo, B. D. Harfe, M. T. McManus, M. G. Rosenfeld, P. Briata i R. Gherzi (2009). "LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages." *Faseb J* **23**(9): 2898-908.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones i A. J. Enright (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(45): 17719-24.
- Scholefield, J., L. J. Greenberg, M. S. Weinberg, P. B. Arbutnot, A. Abdelgany i M. J. Wood (2009). "Design of RNAi hairpins for mutation-specific silencing of ataxin-7 and correction of a SCA7 phenotype." *PLoS One* **4**(9): e7232.
- Schopman, N. C., Y. P. Liu, P. Konstantinova, O. ter Brake i B. Berkhout (2010). "Optimization of shRNA inhibitors by variation of the terminal loop sequence." *Antiviral Res* **86**(2): 204-11.

- Seong, Y., D. H. Lim, A. Kim, J. H. Seo, Y. S. Lee, H. Song i Y. S. Kwon (2014). "Global identification of target recognition and cleavage by the Microprocessor in human ES cells." *Nucleic Acids Res* **42**(20): 12806-21.
- Seow, Y., C. R. Sibley i M. J. Wood (2012). "Artificial mirtron-mediated gene knockdown: functional DMPK silencing in mammalian cells." *Rna* **18**(7): 1328-37.
- Shibata, A., A. Iwaki i Y. Fukumaki (2007). "A novel expression system for artificial miRNAs containing no endogenous miRNA precursor sequences." *J RNAi Gene Silencing* **3**(1): 237-47.
- Sibley, C. R., Y. Seow, S. Saayman, K. K. Dijkstra, S. El Andaloussi, M. S. Weinberg i M. J. Wood (2012). "The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin." *Nucleic Acids Res* **40**(1): 438-48.
- Silva, J. M., M. Z. Li, i wsp. (2005). "Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes." *Nat Genet* **37**(11): 1281-8.
- Sioud, M. (2010). "Recent advances in small interfering RNA sensing by the immune system." *N Biotechnol* **27**(3): 236-42.
- Sorefan, K., H. Pais, A. E. Hall, A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, V. Moulton i T. Dalmay (2012). "Reducing ligation bias of small RNAs in libraries for next generation sequencing." *Silence* **3**(1): 4.
- Sperber, H., A. Beem, S. Shannon, R. Jones, P. Banik, Y. Chen, S. Ku, G. Varani, S. Yao i H. Ruohola-Baker (2014). "miRNA sensitivity to Drosha levels correlates with pre-miRNA secondary structure." *Rna* **20**(5): 621-31.
- Starega-Roslan, J., E. Koscianska, P. Kozlowski i W. J. Krzyzosiak (2011a). "The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA." *Cell Mol Life Sci* **68**(17): 2859-71.
- Starega-Roslan, J., J. Krol, E. Koscianska, P. Kozlowski, W. J. Szlachcic, K. Sobczak i W. J. Krzyzosiak (2011b). "Structural basis of microRNA length variety." *Nucleic Acids Res* **39**(1): 257-68.
- Starega-Roslan, J., T. M. Witkos, P. Galka-Marciniak i W. J. Krzyzosiak (2015). "Sequence Features of Drosha and Dicer Cleavage Sites Affect the Complexity of IsomiRs." *Int J Mol Sci* **16**(4): 8110-27.
- Stegmeier, F., G. Hu, R. J. Rickles, G. J. Hannon i S. J. Elledge (2005). "A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(37): 13212-7.
- Stroynowska-Czerwinska, A., A. Fiszer i W. J. Krzyzosiak (2014). "The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells." *Cell Mol Life Sci* **71**(12): 2253-70.
- Sun, D., M. Melegari, S. Sridhar, C. E. Rogler i L. Zhu (2006). "Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown." *Biotechniques* **41**(1): 59-63.
- Tan, G. C., E. Chan, i wsp. (2014). "5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance." *Nucleic Acids Res* **42**(14): 9424-35.
- Tang, X., Y. Zhang, L. Tucker i B. Ramratnam (2010). "Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization." *Nucleic Acids Res* **38**(19): 6610-9.
- Taylor, D. W., E. Ma, H. Shigematsu, M. A. Cianfrocco, C. L. Noland, K. Nagayama, E. Nogales, J. A. Doudna i H. W. Wang (2013). "Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer." *Nat Struct Mol Biol* **20**(6): 662-70.
- Terasawa, K., K. Shimizu i G. Tsujimoto (2010). "Synthetic Pre-miRNA-Based shRNA as Potent RNAi Triggers." *J Nucleic Acids* **2011**: 131579.

- Tian, Y., D. K. Simanshu, J. B. Ma, J. E. Park, I. Heo, V. N. Kim i D. J. Patel (2014). "A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer." *Mol Cell* **53**(4): 606-16.
- Unterholzner, L. (2013). "The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors?" *Immunobiology* **218**(11): 1312-21.
- van Gestel, M. A., S. van Erp, L. E. Sanders, M. A. Brans, M. C. Luijendijk, M. Merkestein, R. J. Pasterkamp i R. A. Adan (2014). "shRNA-induced saturation of the microRNA pathway in the rat brain." *Gene Ther* **21**(2): 205-11.
- Warf, M. B., W. E. Johnson i B. L. Bass (2011). "Improved annotation of *C. elegans* microRNAs by deep sequencing reveals structures associated with processing by Droscha and Dicer." *Rna* **17**(4): 563-77.
- Warthmann, N., S. Ossowski, R. Schwab i D. Weigel (2013). "Artificial microRNAs for specific gene silencing in rice." *Methods Mol Biol* **956**: 131-49.
- Wei, J. X., J. Yang, J. F. Sun, L. T. Jia, Y. Zhang, H. Z. Zhang, X. Li, Y. L. Meng, L. B. Yao i A. G. Yang (2009). "Both strands of siRNA have potential to guide posttranscriptional gene silencing in mammalian cells." *PLoS One* **4**(4): e5382.
- Wilson, R. C. i J. A. Doudna (2013). "Molecular mechanisms of RNA interference." *Annu Rev Biophys* **42**: 217-39.
- Wilson, R. C., A. Tambe, M. A. Kidwell, C. L. Noland, C. P. Schneider i J. A. Doudna (2015). "Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis." *Mol Cell* **57**(3): 397-407.
- Wostenberg, C., J. W. Lary, D. Sahu, R. Acevedo, K. A. Quarles, J. L. Cole i S. A. Showalter (2012). "The role of human Dicer-dsRBD in processing small regulatory RNAs." *PLoS One* **7**(12): e51829.
- Wu, H., H. Ma, C. Ye, D. Ramirez, S. Chen, J. Montoya, P. Shankar, X. A. Wang i N. Manjunath (2011). "Improved siRNA/shRNA functionality by mismatched duplex." *PLoS One* **6**(12): e28580.
- Wyman, S. K., E. C. Knouf, R. K. Parkin, B. R. Fritz, D. W. Lin, L. M. Dennis, M. A. Krouse, P. J. Webster i M. Tewari (2011). "Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity." *Genome Res* **21**(9): 1450-61.
- Yang, J. H., P. Shao, H. Zhou, Y. Q. Chen i L. H. Qu (2010a). "deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D123-30.
- Yang, J. S., T. Maurin, N. Robine, K. D. Rasmussen, K. L. Jeffrey, R. Chandwani, E. P. Papapetrou, M. Sadelain, D. O'Carroll i E. C. Lai (2010b). "Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(34): 15163-8.
- Yang, X., V. Haurigot, S. Zhou, G. Luo i L. B. Couto (2010c). "Inhibition of hepatitis C virus replication using adeno-associated virus vector delivery of an exogenous anti-hepatitis C virus microRNA cluster." *Hepatology* **52**(6): 1877-87.
- Yeom, K. H., Y. Lee, J. Han, M. R. Suh i V. N. Kim (2006). "Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Droscha in primary miRNA processing." *Nucleic Acids Res* **34**(16): 4622-9.
- Yoda, M., T. Kawamata, Z. Paroo, X. Ye, S. Iwasaki, Q. Liu i Y. Tomari (2010). "ATP-dependent human RISC assembly pathways." *Nat Struct Mol Biol* **17**(1): 17-23.
- Yue, J., Y. Sheng, A. Ren i S. Penmatsa (2010). "A miR-21 hairpin structure-based gene knockdown vector." *Biochem Biophys Res Commun* **394**(3): 667-72.

- Zeng, Y. i B. R. Cullen (2005). "Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences." J Biol Chem **280**(30): 27595-603.
- Zeng, Y., E. J. Wagner i B. R. Cullen (2002). "Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells." Mol Cell **9**(6): 1327-33.
- Zhang, H., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof i W. Filipowicz (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell **118**(1): 57-68.
- Zhang, T., T. Cheng, L. Wei, Y. Cai, A. E. Yeo, J. Han, Y. A. Yuan, J. Zhang i N. Xia (2012). "Efficient inhibition of HIV-1 replication by an artificial polycistronic miRNA construct." Virology **9**: 118.
- Zhou, H., M. L. Arcila, Z. Li, E. J. Lee, C. Henzler, J. Liu, T. M. Rana i K. S. Kosik (2012). "Deep annotation of mouse iso-miR and iso-moR variation." Nucleic Acids Res **40**(13): 5864-75.
- Zhu, X., L. A. Santat, M. S. Chang, J. Liu, J. R. Zavzavadjian, E. A. Wall, C. Kivork, M. I. Simon i I. D. Fraser (2007). "A versatile approach to multiple gene RNA interference using microRNA-based short hairpin RNAs." BMC Mol Biol **8**: 98.
- Zuber, J., A. R. Rappaport, i wsp. (2011). "An integrated approach to dissecting oncogene addiction implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance." Genes Dev **25**(15): 1628-40.

X. WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW

5'UTR, 3'UTR – regiony mRNA nieulegające translacji znajdujące się po stronie 5' lub 3' sekwencji kodującej białko (ang. *Untranslated Region*)

AGO – białko z rodziny Argonaute

dsRNA – dwuniciowy RNA (ang. *double-stranded RNA*)

EtBr – bromek etydyny

miRNA – mikroRNA,

NGS- sekwencjonowanie nowej generacji (ang. Next-Generation Sequencing)

nt – nukleotyd

Pol RNA – polimeraza RNA

pre-miRNA – prekursor mikroRNA

pri-miRNA – pierwotny transkrypt mikroRNA, pierwotny prekursor mikroRNA

pz – pary zasad

RHHA, RHIB - tnące domeny RNazowe białek Drosha oraz Dicer

RISC – kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. *RNA-induced silencing complex*)

RNAi – interferencja RNA (ang. *RNA interference*)

siRNA – krótkie interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*)

shRNA – krótkie RNA tworzące strukturę typu *spinki* (ang. *small hairpin RNA*)

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

ssRNA – jednoniciowy RNA (ang. *single-stranded RNA*)

STR – ciąg krótkich tandemowych powtórzeń (ang. *short tandem repeats*)

TRBP – białko wchodzące w skład kompleksu RISC (ang. *TAR RNA Binding Protein*)

XI. WYKAZ PUBLIKACJI

Publikacje dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej:

1. Starega-Roslan J, Witkos TM, Galka-Marciniak P, Krzyzosiak WJ. „Sequence Features of Drosha and Dicer Cleavage Sites Affect the Complexity of IsomiRs.” **Int J Mol Sci.** (2015) 10;16(4):8110-27.
2. Fiszer A, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Mykowska A, Krzyzosiak WJ “Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression.” **Nucleic Acids Res.** 2013 Dec 1;41(22):10426-37
3. Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Polak K, Fligier A, Krzyzosiak WJ, „RNAimmuno: a database of the non-specific immunological effects of RNA interference and microRNA reagents”. (2012) **RNA** 18, 930-935
4. Olejniczak M, Polak K, Galka-Marciniak P, Krzyzosiak WJ. „Recent Advances in Understanding of the Immunological Off-target Effects of siRNA”. (2011) **Curr Gene Ther.** 11, 532-43.
5. Koscianska E, Starega-Roslan J, Sznajder LJ, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Krzyzosiak WJ. „Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers”. (2011) **BMC Mol Biol.** 12:14.
6. Olejniczak M, Galka P, Krzyzosiak WJ. „Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators”. (2010) **Nucleic Acids Res.** 38, 1-16.

Pozostałe publikacje autorki:

1. Urbanek MO, Galka-Marciniak P, Olejniczak M, Krzyzosiak WJ. “RNA imaging in living cells - methods and applications.” **RNA Biology** R RNA Biol. (2014) 3;11(8):1083-95.
2. Wojciechowska M, Olejniczak M, Galka-Marciniak P, Jazurek M, Krzyzosiak WJ. „RAN translation and frameshifting as translational challenges at simple repeats of human neurodegenerative disorders”. **Nucleic Acids Res.** (2014) 42(19):11849-64.
3. Galka-Marciniak P, Urbanek MO, Krzyzosiak WJ. „Triplet repeats in transcripts: structural insights into RNA toxicity” (2012) **Biol Chem.** 393, 1299-1315

Główne wyniki opisane w niniejszej pracy doktorskiej oraz ich implikacje dla technologii interferencji RNA zawarte są w obecnie przygotowywanych publikacjach.

XII. ŹRÓDŁA FINANSOWANIA BADAŃ

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu



Poznańskie Konsorcjum RNA



Narodowe Centrum Nauki

„Kluczowe elementy prekursorów miRNA warunkujące uwalnianie homogennych siRNA z wektorów shRNA-miR”

Projekt Preludium (2013/11/N/NZ1/02429)

„Testowanie efektów niespecyficzných wywoływanych przez reagenty technologii interferencji RNA i mikroRNA”

(N302 633240)

„Sekwencyjne preferencje rybonukleaz szlaku biogenezy ludzkich mikroRNA”

(2011/03/B/NZ1/03259)

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

„Genetyczne podejścia do allelo-specyficznej terapii chrób poliglutaminowych”

(N301 284837)

Finansowanie zadań badawczych służące rozwojowi młodych naukowców

„Nowe wektory genetyczne dla terapeutyków RNA”

Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w ramach programu Innowacyjna Gospodarka

„Nowe reagenty technologii interferencji RNA o dużym znaczeniu dla medycyny”

(POIG.01.03.01-30-098/08)

