

Agnieszka Belter

**Strukturalne aspekty miRNA swoistych
dla guzów mózgu**

Poznań 2015

**Praca wykonana
w Zakładzie Biologii RNA Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu**

**Promotor:
prof. dr hab. Mirosława Zofia Naskręt-Barciszewska**

**Promotor pomocniczy:
dr Katarzyna Rolle**

**Praca przedstawiona
Radzie Naukowej Instytutu Chemii
Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
w celu uzyskania stopnia
doktora nauk chemicznych
w zakresie biochemii**

*Serdecznie dziękuję **prof. dr hab. Mirosławie Z. Naskręt-Barciszewskiej** za opiekę naukową i pomoc w przygotowaniu pracy.*

*Panu **prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu** dziękuję za inspirujące dyskusje, zaangażowanie oraz atmosferę sprzyjającą pracy naukowej.*

Nauczycielom, wychowawcom, rodzinie i przyjaciołom dziękuję za wszelką okazaną pomoc i wsparcie.

Spis treści	
WPROWADZENIE I CEL PRACY	5
WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	9
STRUKTURA I FUNKCJE MAŁYCH RNA	11
1. RÓŻNORODNOŚĆ ŚWIATA RNA	11
2. STRUKTURA RNA	15
3. KORELACJA SEKWENCJI, STRUKTURY I FUNKCJI RNA	21
4. MIKORNA	26
MATERIAŁY I METODY	42
1. ODCZYNNIKI	42
2. WEKTORY EKSPRESYJNE	48
3. MATERIAŁ BIOLOGICZNY	49
4. PRZECIWCIAŁA	50
5. POŻYWKI, BUFORY I ROZTWORY	50
6. METODY IZOLACJI, ROZDZIAŁU, SYNTEZY ORAZ ANALIZY STRUKTURY I AKTYWNOŚCI KWASÓW NUKLEINOWYCH	54
7. METODY IZOLACJI, ROZDZIAŁU I ANALIZY BIAŁEK	74
8. KLONOWANIE SEKWENCJI KODUJĄCYCH PRE-MIRNA DO WEKTORA PT7T3-18U ORAZ PEGFP-N3	76
9. HODOWLE KOMÓRKOWE	82
WYNIKI BADAŃ I Dyskusja	86
1. PORÓWNANIE PROFILU MIRNA W NOWOTWORACH GLEJOWYCH, TKANKACH OBRZEŻY GUZÓW ORAZ ZDROWYCH TKANKACH POCHODZENIA MÓZGOWEGO	86
2. BADANIA STRUKTURY DOJRZAŁYCH MIRNA ORAZ ICH PREKURSORÓW	104
3. STRUKTURA MIRNA DETERMINUJE ICH WŁAŚCIWOŚCI I FUNKCJE	132
4. OPRACOWANIE KATALITYCZNYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH ANTY-MIRNA	137
PODSUMOWANIE	188
REFERENCJE	189
STRESZCZENIE	207
ABSTRACT	209

WPROWADZENIE I CEL PRACY

Glejak wielopostaciowy (ang. glioblastoma multiforme, GBM) jest najczęstszym, najbardziej złośliwym, źle rokującym pierwotnym guzem mózgu. GBM charakteryzuje się naciekającym charakterem wzrostu, obfitym unaczynieniem oraz szybkim i agresywnym przebiegiem klinicznym. Niezmiennie od wielu lat standardem w leczeniu glejaków pozostaje leczenie operacyjne wspomagane radio- i chemioterapią. Ze względu na jego lokalizację oraz znaczną oporność na konwencjonalne terapie rokowanie pacjentów z glioblastomą jest bardzo złe, a współczynnik wyleczeń niski. Poszukiwanie nowych celów terapii oraz skutecznych narzędzi terapeutycznych leczenia nowotworów stanowi aktualne wyzwanie dla medycyny oraz nauki.

MikroRNA (miRNA) odgrywają kluczową rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak: wzrost, różnicowanie, podziały komórkowe, apoptoza oraz sygnalizacja komórkowa. Ich odkrycie okazało się przełomem w diagnostyce i prognozowaniu wielu chorób. Nadal jednak jesteśmy dalecy od zrozumienia mechanizmów regulacji komórkowej z udziałem miRNA, a zatem również od ich wykorzystania jako potencjalne cele terapeutyczne.

Zgodnie z przyjętym modelem specyficzność miRNA zakodowana jest w ich sekwencji. Postuluje się, że do rozpoznania sekwencji targetowej przez miRNA wystarczy komplementarność sekwencji wynosząca zaledwie 7 nt (obejmująca rejon 'seed' miRNA) [1]. Zastanawiające jest w jaki sposób tak krótka sekwencja może zapewnić specyficzność działania miRNA. W świetle wcześniejszych badań, które wskazują, że sekwencje o długości 10 nukleotydów i krótsze nie są unikalne w genomie ludzkim, wątpliwe jest aby oddziaływania miRNA-mRNA obejmujące zaledwie parę nukleotydów mogły zagwarantować specyficzność działania miRNA.

Pierwsze przesłanki mówiące o tym, że nie tylko sekwencja miRNA determinuje ich funkcję zostały dostarczone przy okazji weryfikacji wytypowanych w analizie bioinformatycznej potencjalnych sekwencji docelowych dla miRNA. Ponad połowa sekwencji mRNA wskazanych przez algorytmy bazujące jedynie na sekwencji nie pokrywa się z danymi eksperymentalnymi. Udowodniono również, że na efektywność rozpoznawania mRNA przez miRNA oprócz sekwencji wpływa struktura mRNA. Najnowsze doniesienia wskazują, że miRNA występują w komórce w nadmiarze w stosunku białek Ago oraz, że mogą one samodzielnie rozpoznawać transkrypty. Ponadto

obecność w miRNA wewnątrzcząsteczkowych rejonów komplementarności oraz motywów GNRA lub UNCG (N = A/U/G/C, R = A/G) promujących zwijanie RNA oraz determinujących stabilność powstających spinek wskazują, że miRNA niezwiązane z kompleksem RISC mogą samoistnie przyjmować strukturę spinki do włosów [2, 3]. Motyw spinki RNA znany jest jako miejsce kontaktu RNA z innymi kwasami nukleinowymi i białkami [4]. Sugeruje to, że struktura miRNA może mieć przełożenie na ich funkcje.

Poznanie struktury miRNA może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów regulacji komórkowej zależnych od miRNA oraz patogenezы chorób u podłoża których leżą te krótkie niekodujące RNA, w tym nowotworów glejowych mózgu. Próbując zrozumieć wielofunkcyjność, a zarazem specyficzność miRNA postanowiłam sprawdzić czy miRNA tworzą strukturę i w jaki sposób przekłada się ona na ich właściwości i funkcje.

Kierując się chęcią zrozumienia molekularnych podstaw nowotworów glejowych wytypowałam miRNA swoiste dla guzów mózgu oraz zweryfikowałam ich użyteczność jako celów terapeutycznych GBM. Określiłam ich strukturę oraz właściwości i funkcje w niej zakodowane. W odpowiedzi na brak skutecznych metod leczenia nowotworów glejowych mózgu zaprojektowałam katalityczne kwasy nukleinowe skierowane na miRNA oraz ich prekursorы, oceniłam ich specyficzność, aktywność i użyteczność w terapii.

Postawione cele realizowałam w następujących etapach:

- wykonałam analizę mikromacierzową profilu miRNA w tkankach złośliwych guzów mózgu, tkankach obrzeży oraz tkankach zdrowych, a następnie wytypowałam miRNA, których poziom jest istotnie zmieniony w tkankach guza w porównaniu z tkanką zdrową,
- wykonałam metaanalizę wytypowanych miRNA, wybrałam miRNA o istotnym znaczeniu dla rozwoju GBM oraz oceniłam ich użyteczność jako celów terapii guzów mózgu,
- z użyciem specyficznych nukleaz (rybonukleazy T1, V1 oraz nukleazy S1, RNazy H w obecności oligonukleotydów DNA), jonów ołowiu, spektroskopii NMR, CD oraz UV określiłam strukturę wybranych miRNA oraz ich prekursorów,

- określiłam średnie stężenie pojedynczego miRNA w komórce, a dla wybranych miRNA stałe równowagi oraz przedstawiłam przesłanki wskazujące, że miRNA mogą występować w komórce w postaci spinki do włosów lub dupleksu,
- pokazałam zależność okresu półtrwania miRNA od ich struktury,
- określiłam zdolność miRNA do oddziaływania z białkami,
- zaprojektowałam rybozimy oraz DNAzimy skierowane na miR-21, miR-10b, miR-15b oraz ich prekursory, określiłam ich specyficzność, aktywność *in vitro* oraz *in vivo* a także ich użyteczność w terapii guzów mózgu.

Istotnym osiągnięciem pracy jest:

- wytypowanie nowych celów terapii GBM,
- określenie struktury dojrzałych miRNA oraz zaproponowanie alternatywnego do ogólnie przyjętego modelu ich działania,
- zaprojektowanie specyficznych i skutecznych narzędzi obniżających poziom miRNA w komórkach GBM.

Wyniki pracy są przedmiotem:

- publikacji:

Agnieszka Belter, Dorota Gudanis, Katarzyna Rolle, Monika Piwecka, Zofia Gdaniec, Mirosława Zofia Naskręt-Barciszewska, Jan Barciszewski (2014) *Mature miRNAs form secondary structure, which suggests their function beyond RISC*, PLOS One 9:e113848.

- trzech manuskryptów:

Monika Piwecka, Katarzyna Rolle, **Agnieszka Belter**, Marek Żywicki, Marcin Michalak, Anna Maria Barciszewska, Stanisław Nowak, Mirosława Z. Naskręt-Barciszewska, Jan Barciszewski, *Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues*.

Katarzyna Rolle, Monika Piwecka, **Agnieszka Belter**, Dariusz Wawrzyniak, Jarosław Jeleniewicz, Mirosława Zofia Barciszewska, Jan Barciszewski, *The new functions of miRNAs as the consequence of their structure.*

Agnieszka Belter, Katarzyna Rolle, Monika Piwecka, Mirosława Zofia Naskręt-Barciszewska, Jan Barciszewski *Hammerhead ribozymes and DNAzymes anti-miR-21.*

- dwóch zgłoszeń patentowych:

polskiego (P.403341) pt.: *Rybozomy typu hammerhead, kompozycja, środek terapeutyczny je obejmujące, ich zastosowania oraz sposób hydrolizy miR21 i prekursorów miR21*, twórcy: Mirosława Zofia Naskręt-Barciszewska, **Agnieszka Belter**, Katarzyna Monika Rolle, Monika Piwecka, Patrycja Sosińska, Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska.

międzynarodowego w trybie PCT (PCT/IB2014/060188) pt.: *HAMMERHEAD RIBOZYMES*, twórcy: Mirosława Zofia Naskręt-Barciszewska, **Agnieszka Belter**, Katarzyna Monika Rolle, Monika Piwecka, Patrycja Sosińska, Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska.

- posteru

Anti-miRNA ribozymes as potential tools for therapy of brain tumors zaprezentowanego podczas międzynarodowej konferencji Bioinnovation International Summit, International Conference on Molecular Biotechnology and Innovations for Healthy Life, Gdańsk 22-23 października 2012.

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AA	gwieżdziak anaplastyczny
AML	ostra białaczka limfoblastyczna
amp ^r	gen oporności na ampicylinę
APS	nadsiarczan amonu
ASD	spektrum autystyczne
ATP	adenozynotrójfosforan
cAMP	cykliczny adenzynomonofosforan
BrEt	bromek etydyny
BSA	albumina z surowicy wołowej
CD	dichroizm kołowy
cpm	liczba cząsteczek β emitowanych w ciągu minuty
CCL	przewlekła białaczka limfocytarna
DLBCL	chłoniak rozlany z dużych komórek B
DM	zapalenie skórno-mięśniowe
DMD	dystrofia mięśniowa Duchenne'a
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
DNAzym	deoksyrybozym
DTT	ditiotreitól
EDTA	kwask etylenodiaminotetraoctowy
FBS	plodowa surowica bydlęca
FL	chłoniak grudkowy
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GFP	białko zielonej fluorescencji
GTP	guanozynotrójfosforan
HC	rak wątrobowokomórkowy
HNSCC	rak płaskonabłonkowy głowy i szyi
MCS	miejsce wielokrotnego klonowania
MTT	bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yol]-2,5-difenyloctetrazolowy
NB	neuroblastoma
NM	miopatia nemalinowa
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy
NSCLC	niedrobnokomórkowy rak płuc

nt	reszty nukleotydowe
OAA	skąpogwiaździak anaplastyczny
OC	rak jajnika
OD	gęstość optyczna
OSCC	rak płaskonabłonkowy jamy ustnej
PAA	poliakryloamid
PBC	pierwotna żółciowa marskość wątroby
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PCT	brodawkowy rak tarczycy
PDAC	gruczolak przewodu trzustkowego
PEG	glikol polietylenowy
PNK	kinaza polinukleotydowa faga T4
PM	zapalenie wielomięśniowe
PMSF	fluorek fenylometrylosulfonylu
pz	para zasad
RBS	miejsce wiązania rybosomu
Real-Time PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RNA	kwasy rybonukleinowe
RNaza	rybonukleaza
rpm	obroty na minutę
rybozym HH	RNAzym typu głowy młotka
SDS	sól sodowa siarczanu dodecyłu
SOC	surowiczy rak jajnika
TEMED	tetrametylenodwuamina
TLR	receptory 'toll-like'
Tris	hydroksymetyloaminometan
u	jednostka aktywności enzymatycznej
UC	wrzodziejące zapalenie jelita grubego
ULM	mięśniak macicy
UTR	region nie podlegający translacji
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia

STRUKTURA I FUNKCJE MAŁYCH RNA

1. Różnorodność świata RNA

W 1956 roku, zaledwie trzy lata po zaproponowaniu modelu struktury DNA, Lazarus Astrachan i Ken Volkin zaobserwowali w bakteriach zainfekowanych bakteriofagami, RNA będące kopią DNA fagowego [5, 6]. W 1961 roku Francois Jacob i Jacques Monod zauważyli, że informacja genetyczna znajdująca się w jądrze w postaci DNA jest przepisywana na RNA, który następnie kierowany jest z jądra do cytoplazmy, gdzie służy jako matryca do syntezy białka [7, 8]. Nazwali go informacyjnym RNA (messenger RNA, mRNA), a za odkrycie to, w 1965 roku otrzymali Nagrodę Nobla.

Zaproponowany w 1958 roku przez Francisa Crick'a dogmat biologii molekularnej zakłada jednokierunkowy przepływ informacji genetycznej od DNA przez RNA do białek. Zgodnie z nim białka są składnikami budulcowymi komórek oraz czynnikami wykonawczymi i regulatorowymi praktycznie wszystkich procesów komórkowych, z kolei RNA przypisywano jedynie rolę pośrednika w procesie biosyntezy białka (mRNA, tRNA) oraz szkieletu scalającego multienzymatyczne kompleksy (rybosomy, spliceosomy) [7, 8].

mRNA syntetyzowane są, zgodnie z regułą komplementarności sekwencji, na matrycach kwasów deoksyrybonukleinowych w procesie transkrypcji i są matrycą do syntezy białka [9, 10]. tRNA ulegają aktywacji poprzez przyłączenie przy końcu 3' odpowiedniego aminokwasu z udziałem syntetaz aminoacylo-tRNA, a następnie migrują do rybosomów gdzie po rozpoznaniu odpowiedniego kodonu przekazują aminokwas do nowo syntetyzowanego białka [11, 12]. Tłumaczą w ten sposób informację zapisaną w postaci sekwencji nukleotydów na język białek. Rybosomalne RNA stanowią z kolei strukturalną podstawę rybosomów oraz katalizują tworzenie wiązania peptydowego [13]. snRNA występują w jądrze gdzie uczestniczą w wycinaniu intronów z prekursorów mRNA (splicing), snoRNA w jąderku zaangażowane są w obróbkę RNA, polegającą głównie na modyfikacji rRNA, rzadziej snRNA i mRNA [14, 15].

Wraz z poznaniem genomów zaobserwowano, że ponad 98 % wszystkich transkryptów występujących w komórkach ludzkich jest źródłem niekodujących RNA (ncRNA) oraz że ich udział w całkowitej puli RNA koreluje ze stopniem złożoności organizmu [16-

19]. Pojawiły się doniesienia, że RNA spełniają w komórce nie tylko rolę pośrednika w przekazywaniu informacji genetycznej pomiędzy DNA i białkami, ale że są również katalizatorami i regulatorami, co przez wiele lat uznawane było za wyłączną domenę białek [7, 8]. Okazało się, że komórkowe mechanizmy sterujące są bardziej złożone niż pierwotnie sądzono oraz, że w wielu przypadkach są zależne od miRNA (Tabela 1.1) [19].

Tabela 1.1

Podział i przykłady funkcji niekodujących RNA (na podstawie [20]).

Niekodujące RNA	
konstytutywne	regulatorowe
<ol style="list-style-type: none"> 1. Translacja <ul style="list-style-type: none"> - translacja informacji genetycznej (tRNA) - tworzenie wiązań peptydowych (rRNA) - kontrola jakości translacji (tmRNA) 2. Dojrzewanie RNA <ul style="list-style-type: none"> - wycinanie intronów z pre-mRNA (snRNA) - modyfikacje RNA (snoRNA) - dojrzewanie RNA (RNaza MRP) 3. Replikacja <ul style="list-style-type: none"> - synteza telomerowego DNA (telomerazy RNA) 4. Lokalizacja białek <ul style="list-style-type: none"> - translokacja białek przez błony u bakterii i eukariota (4.5S RNA, 7SL RNA) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Transkrypcja <ul style="list-style-type: none"> - regulacja ekspresji genów podlegających imprintingowi (H19, IPW, LIT1) - zmiana struktury chromatyny związana z inaktywacją chromosomu X i kompensacją dawki genów u eukariota (roX, Xist/Tsix) 2. Zmiany posttranskrypcyjne <ul style="list-style-type: none"> - regulacja ekspresji poprzez zmiany struktury mRNA (ryboprzełączniki) - interakcje z docelowym mRNA na zasadzie antysensu (DsrA, MicF, miRNA) 3. Aktywność białek <ul style="list-style-type: none"> - interakcje RNA-białko zmieniające zdolności katalityczne białek (6S RNA, SRA RNA) 4. Lokalizacja RNA <ul style="list-style-type: none"> - wpływ na lokalizację mRNA i pre-miRNA poprzez specyficzną lokalizację ncRNA (hsr-ω, Xlsirt, BC1, BC200)

Synteza i degradacja RNA wymaga znacznie mniej energii niż produkcja i degradacja białek. Mniejsza stabilność RNA w porównaniu ze stabilnością cząsteczki białkowej jest korzystna w sytuacji, kiedy RNA pełniący funkcję sygnału przejściowego, powinien zostać gwałtownie zniszczony. Sterowanie procesami komórkowymi z udziałem ncRNA może zatem nieść za sobą oszczędność energii na poziomie komórki.

Niekodujące regulatorowe RNA warunkują prawidłowy przebieg każdego z etapów przepływu informacji genetycznej [21]. Wśród nich znajdują się takie, które pełnią swoje funkcje poprzez oddziaływanie z komplementarną sekwencją docelową oraz takie, które do swojej aktywności wymagają udziału białek wiążących RNA [22]. Znane są długie niekodujące RNA regulujące poziom metylacji chromatyny, w efekcie wpływające na strukturę konkretnych domen chromosomalnych lub całych chromosomów. Przykładem jest *Khps1*, antysensowy transkrypt o długości 1290 nt. Pokrywa się on z regionem T-DMR (ang. tissue-dependent differentially methylated region) zlokalizowanym w obrębie wyspy CpG genu *Sphk1* kodującego kinazę sfingozyny (SPHK1), enzym katalizujący powstanie fosforanu sfingozyny, zaangażowanego m.in. w mitogenezę [23]. Stwierdzono, że *Kphs1* indukuje demetylację miejsc CG oraz metylację cytozyn, tzw. non-CG, zlokalizowanych w pobliżu T-DMR, w efekcie wpływa na ekspresję *Sphk1* [24]. Innym przykładem regulacji epigenetycznej z udziałem długich niekodujących RNA (lncRNA) jest inaktywacja chromosomu X u samic ssaków, która zapobiega kumulacji produktów kodowanych przez geny umiejscowione na tym chromosomie [25]. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa *Xist* RNA (ang. X inactive-specific transcript), transkrypt rejonu DNA zwanego XIC (ang. X-inactivation center) podlegający składaniu i poliadenylacji. *Xist* RNA wskazuje miejsce wyciszenia poprzez hybrydyzację do DNA, a następnie dochodzi do przyłączania białek odpowiedzialnych za modyfikacje i remodelowanie chromatyny [26, 27]. Ekspresja *Xist* RNA z allelu matczynego zależy od ekspresji innego niekodującego RNA – *Tsix*, który częściowo pokrywa się z *Xist* w orientacji antysensowej. *Tsix* najprawdopodobniej hamuje transkrypcję *Xist*, indukując modyfikację chromatyny [28].

Inne niekodujące regulatorowe RNA wiążą docelowe mRNA w orientacji antysensowej, powodując tym samym specyficzną i bardzo wydajną regulację ekspresji genu na poziomie translacji [21]. W zależności od lokalizacji miejsca wiązania regulatorowego RNA, efektem ich działania może być albo represja lub stymulacja translacji. Sztandarowym przykładem są krótkie (~ 20 nt) dwuniciowe RNA zwane siRNA, które wpływają na poziom ekspresji genów, tzw. interferencję RNA (RNAi). Proces ten polega na hydrolizie bądź blokadzie sterycznej docelowego RNA, a jego wysoką specyficzność zapewnia komplementarność sekwencji siRNA i docelowego RNA [29]. Podobnie, miRNA wiążą na zasadzie komplementarności sekwencji

docelowe mRNA, w efekcie blokują ich translację [30]. miRNA stanowią dużą grupę antysensowych RNA podlegających regulacji w zależności od stopnia rozwoju i zróżnicowania komórek, działających w układzie trans i pełniących kluczową rolę w kontroli ekspresji genów [31].

Niekodujące regiony UTR mRNA tworzą motywy strukturalne zdolne do wiązania niskocząsteczkowych metabolitów regulujące ekspresję genów w układzie *cis*. Nazwano je ryboprzełącznikami (przełącznikami RNA, ang. riboswitches) [32, 33]. W obrębie struktury drugorzędowej wszystkich poznanych do tej pory ryboprzełączników można wyróżnić trzon, centralną multipętlę oraz dodatkowe elementy strukturalne o charakterze spinki do włosów. W wiązanie ligandu zaangażowane są rejony jednoniciowe [34]. Oprócz nich ryboprzełączniki posiadają również platformę ekspresyjną. Przyłączenie ligandu do ryboprzełącznika indukuje zmiany konformacyjne, które przenoszone są na platformę ekspresyjną, co prowadzi do modulacji poziomu ekspresji określonego genu [35].

Zmiana struktury mRNA indukowana wiązaniem niskocząsteczkowego metabolitu może wywołać dwojakie konsekwencje w regulacji ekspresji genu. Pierwsze polegają na inhibicji translacji, gdzie modulacji podlega dostępność sekwencji Shine-Dalgarno oraz kodonu AUG. Jeśli region ten uwikłany jest w strukturę drugorzędową jest on niedostępny dla rybosomu, co prowadzi do zahamowania translacji. Jego uwolnienie indukuje ekspresję białka. Wiązanie metabolitu umożliwia przejście z jednego stanu konformacyjnego w drugi – uwolnienie lub związanie miejsca wiązania rybosomu (RBS). Podobnie terminator przyjmuje strukturę spinki do włosów, po której występuje charakterystyczna sekwencja poli U. Struktura spinki atenuacyjnej powstaje w wyniku niedoboru ligandu, natomiast związanie metabolitu powoduje jej rozplecenie i umożliwia transkrypcję pełnej długości mRNA [36].

Komplementarność sekwencji gwarantuje wysoką precyzję regulacji opartej na tworzeniu dupleksów RNA-RNA. Regulacyjna rola ncRNA nie jest jednak ograniczona wyłącznie do oddziaływań z innymi kwasami nukleinowymi. Mogą one również bezpośrednio wiązać białka, zmieniać ich strukturę, a w efekcie modulować ich aktywność enzymatyczną lub zdolność wiązania ligandów [37]. Przykładem modulatorów aktywności białek tego typu są między innymi: 6S RNA z *E. coli* oraz SRA RNA ssaków [37, 38]. Struktura drugo- i trzeciorzędowa tych ncRNA determinuje ich swoistość wiązania białek.

2. Struktura RNA

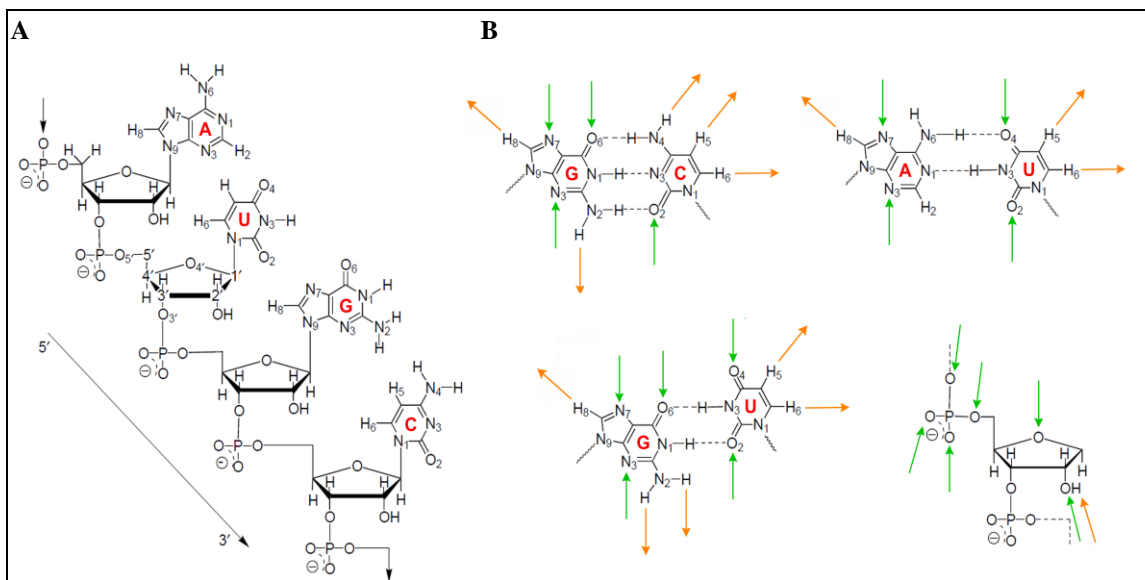
Kwas rybonukleinowy (RNA) jest polimerem zbudowanym z rybonukleotydów. Każdy z nich składa się z zasady azotowej (guaniny, cytozyny, adeniny lub uracylu) połączonej wiązaniem N-glikozydowym z D-rybofuranozą oraz grupy fosforanowej łączącej wiązaniem 5',3'-fosfodiesterowymi poszczególne rybonukleozydy (Rysunek 2.1). Stabilność estrów fosforanowych połączona z ich znaczną elastycznością oraz skomplikowana sieć oddziaływań między poszczególnymi rybonukleotydami sprawiają, że RNA mogą przyjmować skomplikowane struktury przestrzenne [39].

RNA wykazuje hierarchiczność budowy (Rysunek 2.2). Pierwszy poziom organizacji RNA to sekwencja zasad przyłączonych do szkieletu cukrowo-fosforanowego. W tworzenie struktury wyższego rzędu (drugo- i trzeciorzędowej) zaangażowane są oddziaływania warstwowe oraz wiązania wodorowe. Oddziaływania warstwowe powstają w wyniku działania sił dyspersyjnych Londona, oddziaływania między ładunkami cząstkowymi pierścieni zasad oraz sił hydrofobowych w rozpuszczalniku [40]. Wiązania wodorowe tworzone są przez donory i akceptory protonu zasad azotowych oraz rybozy. W każdej zasadzie występują trzy krawędzie, które odzwierciedlają występowanie potencjalnych donorów i akceptorów wiązań wodorowych, przez które może zostać utworzone oddziaływanie z inną zasadą [41]. W tworzeniu podwójnej helisy uczestniczą pary zasad AU oraz GC, a także tzw. chwiejna para (*wobble pair*) GU oddziałujące krawędziami Watsona-Cricka. W oddziaływaniach RNA-RNA dalekiego zasięgu, oraz w wiązaniu białek i ligandów z reguły zaangażowane są inne krawędzie [42]. Akceptorami wiązań wodorowych mogą być również atomy OP1, OP2, O2', O3', O4' lub O5' szkieletu cukrowo-fosforanowego cząsteczki, donorami np. ugrupowanie 2'OH, co daje jeszcze większą różnorodność oddziaływań, a w efekcie również form strukturalnych RNA [43] (Rysunek 2.1).

Oddziałujące ze sobą zasady mogą różnić się orientacją wiązania glikozydowego w stosunku do oddziaływania wodorowego. Wyróżniamy konformację *cis* (wiązania glikozydowe są zorientowane po tej samej stronie wiązania wodorowego) i *trans* (wiązania glikozydowe znajdują się po przeciwnej stronie wiązania wodorowego). Rodzaje krawędzi oraz położenie wiązania glikozydowego stały się podstawą klasyfikacji par zasad, która opisuje dwanaście możliwych typów oddziaływań [42].

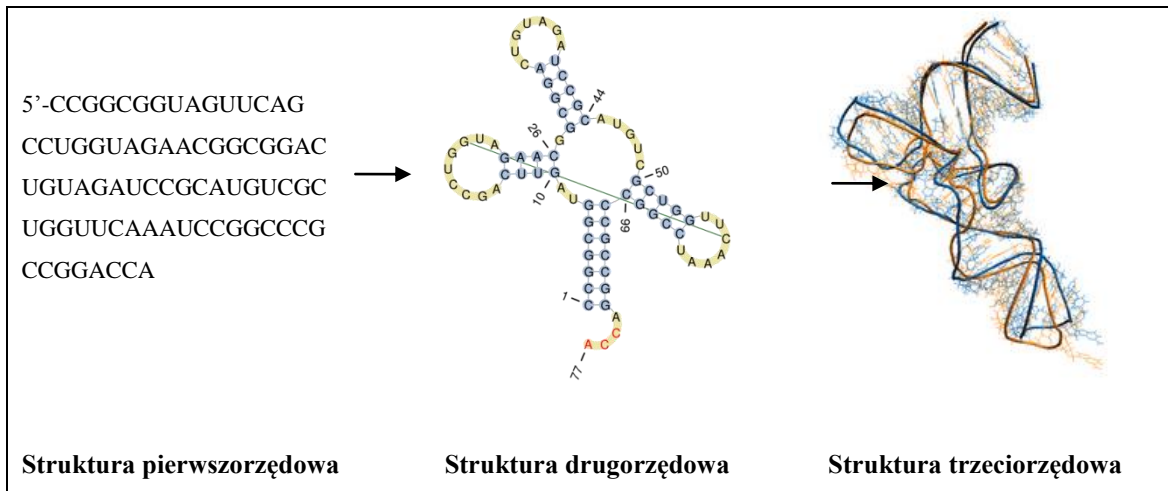
Konformacja nukleotydu w obrębie RNA lub DNA jest zdefiniowana przez sześć kątów torsyjnych rdzenia fosforanowo-cukrowego α , β , γ , δ , ϵ oraz ζ , glikozydowy kąt torsyjny χ , orientację pseudorotacji cukru furanozowego P (0-360°) oraz amplitudę Φ [44]. Pseudorotacja furanozy ogranicza się do dwóch konformerów C3'-endo (0-36°, A-helisa) oraz C2'-endo (144-180°, B-helisa) [44]. Większość nukleotydów w cząsteczce RNA występuje w konformacji C3'-endo. Konformacja C2'-endo rybozy występuje rzadziej, a jej obecność może spowalniać zwijanie cząsteczki [45]. Zwykle występuje ona w obrębie miejsc katalitycznych, m.in. ryboprzełączników, katalitycznych RNA, samowycinających się intronów oraz dużych rybosomalnych RNA [44-46]. Zidentyfikowano 46 odrębnych konformerów opisujących rozkład kątów torsyjnych i geometrię jednostki fosforanowo-cukrowej [46]. Zmiana choćby jednego kąta torsyjnego prowadzi do lokalnych zmian, dając cząsteczki różniące się właściwościami [46].

Specyficzna konformacja rdzenia fosforanowo-cukrowego determinuje właściwości katalitycznych RNA, ich zdolność wiązania kwasów nukleinowych oraz oddziaływania z białkami [46]. Regulowana jest ona w komórce w sposób zależny od gradientu jonów magnezu. Rezultatem różnorodności warunków wewnątrzkomórkowych są olbrzymie możliwości wpływania na strukturę cząsteczki, co daje przewagę adaptacyjną wielu funkcjonalnym RNA [47].



Rysunek 2.1

A. Wzór strukturalny tetranukleotydu r(AUGC), **B.** Schemat wiązań wodorowych typu Watsona-Cricka w parach zasad A:U i G:C oraz chwiejnej parze G:U. Strzałkami zaznaczono dodatkowe możliwe miejsca oddziaływań, akceptory protonów (zielone strzałki), donory protonów (pomarańczowe strzałki).

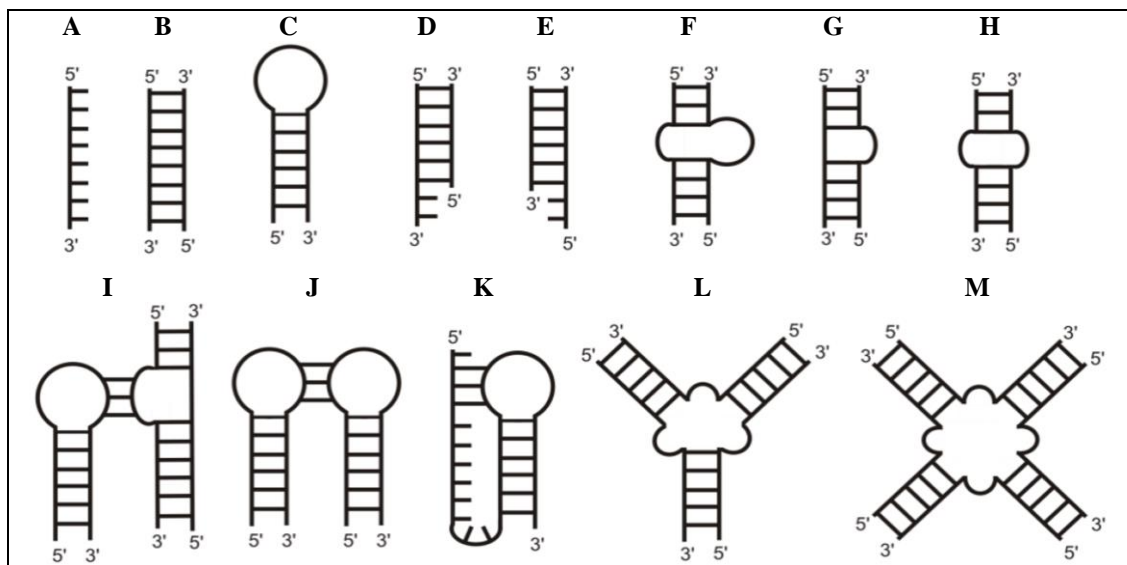

Rysunek 2.2

Schemat przedstawiający hierarchiczność budowy tRNA^{Tyr} (1J1U) [48].

Oddziaływania warstwowe i wiązania wodorowe ograniczają ekspozycję hydrofobowych powierzchni zasad do polarnego rozpuszczalnika, w efekcie determinują strukturę drugo- i trzeciorzędową cząsteczki RNA [35]. Strukturę drugorzędową definiujemy jako regiony podwójnej helisy utworzone przez pary zasad typu Watsona-Cricka, połączone przez regiony niesparowane [40]. Element łączący końce helisy - koniec 3' jednej nici z końcem 5' drugiej nici, to pętla terminalna spinki do włosów. Dwa regiony jednoniciowe, łączące dwa segmenty podwójnej helisy, tworzą pętlę wewnętrzną, a w przypadku gdy region niesparowany występuje tylko po jednej stronie określa się go jako wybrzuszenie. Połączone trzy lub więcej segmenty dwuniciowe tworzą złącze [40]. Przykłady elementów struktury drugorzędowej przedstawiono na Rysunku 2.3.

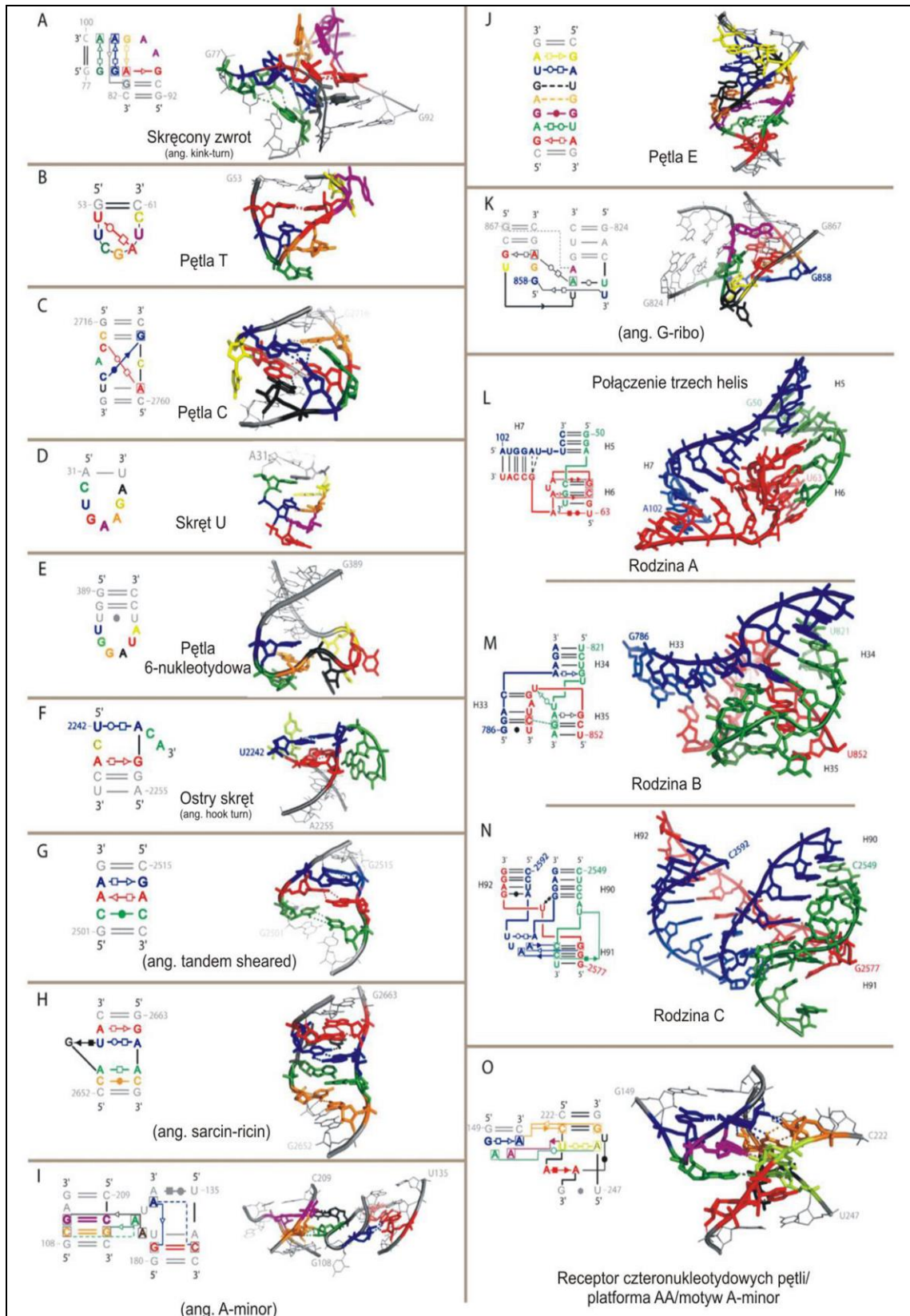
Nukleotydy w odcinkach jednoniciowych i niesparowanych elementach struktury drugorzędowej mają duże możliwości aranżacji w przestrzeni. Ich konformacja zależy od strukturalnego kontekstu, wzajemnego wpływu reszt niesparowanych i par zasad w helisie oraz oddziaływań warstwowych nukleotydów zamykających helisy [35]. Elementy struktury drugorzędowej, segmenty helikalne i niehelikalne oddziałują ze sobą tworząc układ przestrzenny, strukturę trzeciorzędową RNA (Rysunek 2.4) [49]. Niesparowane nukleotydy mogą uczestniczyć w oddziaływaniu warstwowym z helisą lub zostać wypchnięte w kierunku roztworu. Zginanie łańcucha fosforanowo-cukrowego związane z obecnością fragmentów niesparowanych, takich jak wybrzuszenia, może prowadzić do zbliżenia ujemnie naładowanych reszt

fosforanowych, w efekcie powstania miejsc wiązania jonów metali oraz ligandów [50]. Zwijanie RNA (ang. RNA folding) kierowane jest przez maksymalizację oddziaływań warstwowych zasad, zapewniających odseparowanie większości pierścieni hydrofobowych od roztworu oraz stabilizację elektrostatyczną łańcucha fosforanowo-cukrowego [51]. Efektem zwijania RNA w roztworze jest zbiór cząsteczek przyjmujących różne możliwe stany konformacyjne, znajdujące się w stanie równowagi dynamicznej. Podążają one różnymi ścieżkami do przyjęcia struktury optymalnej (Rysunek 2.5) [52].



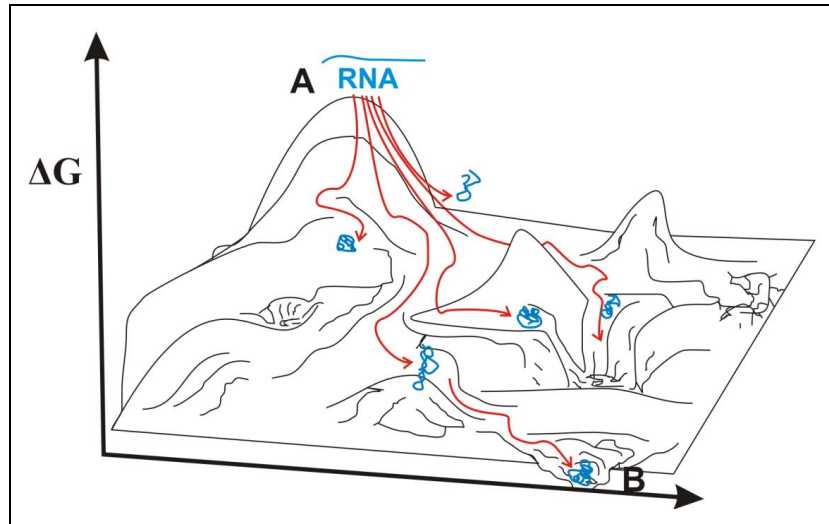
Rysunek 2.3

Niektóre elementy struktury drugorzędowej RNA. **A.** odcinek jednoniciowy, **B.** helisa, **C.** struktura typu spinka do włosów, **D.** jednoniciowe końce 3', **E.** jednoniciowe końce 5', **F.** niesymetryczne wybrzuszenie obustronne, **G.** wybrzuszenie jednostronne, **H.** symetryczne wybrzuszenie obustronne, **I.** kontakt pętli z wybrzuszeniem (ang. hairpin loop-bulge contact), **J.** kontakt dwóch struktur typu spinka do włosów (ang. kissing hairpins), **K.** pseudowęzeł (ang. pseudoknot), **L.** połączenie trzech helis (ang. three-way junction), **M.** połączenie czterech helis (ang. four-way junction) [40].



Rysunek 2.4

Struktura drugorzędowa (po lewej) oraz trzeciorzędowa (po prawej) motywów występujących powszechnie w RNA. **A.** Skrecony zwrot (ang. kink turn), **B.** pętla T, **C.** pętla C, **D.** skręt U, **E.** pętla 6-nukleotydomowa, **F.** ostry skręt (ang. hook turn), **G.** ang. tandem sheared, **H.** ang. sarcin-ricin, **I.** ang. A-minor, **J.** pętla E, **K.** ang. G-ribo, **L.** połączenie trzech helis: rodzina A, **M.** rodzina B, **N.** rodzina C, **O.** receptor czteronukleotydowych pętli/platforma AA/motyw A-minor [53].



Rysunek 2.5

Krajobraz energii swobodnej dla cząsteczki RNA podczas procesu zwijania. **A.** RNA po transkrypcji. **B.** RNA w konformacji natywnej. Strzałki obrazują różne możliwości, jakimi może przebiegać proces zwijania RNA. Kształt krajobrazu zależy od względnych wartości energii specyficznych konformacji oraz kinetycznych barier między nimi, obrazowanymi w postaci wzniesień i zagłębień [52].

3. Korelacja sekwencji, struktury i funkcji RNA

Proces zwijania RNA jest ściśle uporządkowany, dzięki czemu na podstawie sekwencji RNA, z dużym prawdopodobieństwem, możemy przewidzieć jego strukturę drugorzędową [54]. Przykładowo obecność wewnątrzcząsteczkowych rejonów komplementarności wskazuje, że mogą być one zaangażowane w tworzenie rejonów helikalnych. Dodatkowo, jeśli oddzielone są one pętlą możemy spodziewać się, że utworzą strukturę spinki do włosów.

Innym determinantem struktury RNA są sekwencje UNCG oraz GNRA (N = dowolny nukleotyd, R = puryna) [55]. Ich obecność w DNA/RNA wskazuje, że z dużym prawdopodobieństwem przyjmuje on stabilną strukturę spinki do włosów [3, 56]. Energia spinek do włosów warunkowana jest głównie oddziaływaniami niekanonicznymi występującymi w pętli, a jedynie w nieznacznym stopniu zależy od sekwencji fragmentu helikalnego i mieści się w przedziale 1.2 do 4.5 kcal/mol [55]. Spinki, w szczególności te posiadające czteronukleotydowe pętle, są powszechnie występującym motywem struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych [57]. Ich obecność stwierdzono m.in. w katalitycznych RNA, mRNA oraz ryboprzelącznikach. Ponadto, strukturę spinki do włosów mogą przyjmować znacznie krótsze RNA, przykładowo zaledwie 12-, a nawet 8-nukleotydowe RNA [55, 56].

Spinki do włosów są ważnym motywem funkcjonalnym kwasów nukleinowych. Zaangażowane są one w oddziaływania z innymi RNA (przykładowo oddziaływania pętli tymidynowej i pseudourydynowej tRNA [58]), a także białkami (np. pętla B U1 snRNA) [59].

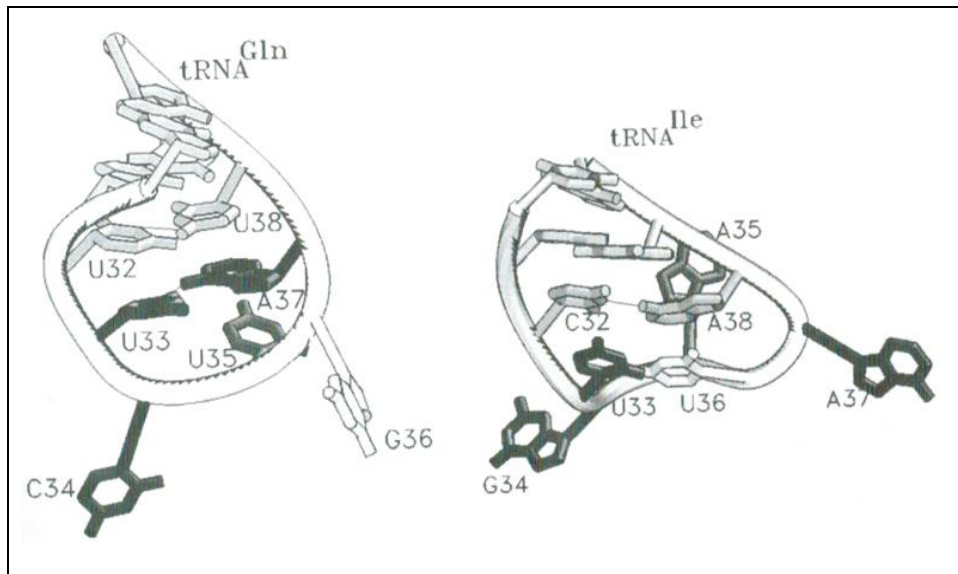
Sekwencje GNRA oddziałują najczęściej z wąskim rowkiem helisy [60], GAAA z kolei rozpoznają niesparowania w obrębie rejonów helikalnych [61]. Pokazano, że nawet bardzo krótkie (~20 nt) spinki RNA, mini- i mikrohelisy tRNA, są cząsteczkami funkcjonalnymi, w tym przypadku podlegają aminoacylacji z udziałem syntetaz aminoacylo-tRNA [62].

Zależność struktury od sekwencji obserwujemy również na przykładzie RNA bogatych w puryny. Tworzą one stabilne struktury, które determinują ich funkcje. Często są to tetrazy guanozynowe lub adenozyne zlokalizowane w rejonach promotorowych [63]. Przykładem jest sekwencja promotora genu *c-myc* zawierająca sześć traktów guanozyny [64]. Przyjmuje on alternatywne struktury zależnie od tego, które trakty guanozynowe

uczestniczą w formowaniu szkieletu kwadrupleksu. W zależności od typu utworzonego kwadrupleksu dochodzi do ekspresji *c-myc* bądź jej zahamowania [65]. Obecność tej struktury stwierdzono również w promotorach innych protoonkogenów, co budzi zainteresowanie z punktu widzenia możliwości regulacji ich ekspresji [66].

Sekwencje bogate w reszty guanozyny przyjmujące struktury kwadrupleksu występują również w telomerach [67]. Nie kodują one żadnych genów ale są elementem strukturalnym chromosomu zapewniającym jego stabilność. Inny przykład to tetrazy RNA HIV1, które wpływają na efektywność składania cząstek wirusowych [68]. Z kolei sekwencja Shine-Dalgarno, GGAGGA, przyjmuje postać wyeksponowanej platformy oddziałującej z 16S rRNA, a jej prawidłowe ukształtowanie warunkuje inicjację translacji [69].

Kolejnym przykładem ilustrującym zależność struktury i funkcji RNA są transferowe RNA. Struktury wszystkich znanych tRNA można przedstawić w formie "liścia koniczyny" [11]. Wyróżniamy cztery ramiona tRNA: ramię DHU (D) przyjmujące strukturę spinki z dihydroksyuracylem, warunkujące specyficzność wiązania aminokwasu do danego tRNA, ramię akceptorowe tworzone przez sparowane zasady końców 3' i 5', oprócz niesparowanego końca CCA-3', do którego przyłączane są aktywowane chemicznie aminokwasy, ramię pseudourydynowe (T), które rozpoznaje rybosom i umocowuje tRNA na matrycy, pętla antykodonowa odpowiedzialna za rozpoznanie i związanie z kodonem w mRNA oraz ramię zmienne. Tworzenie komplementarnych par między nukleotydami pętli DHU i pętli TΨC umożliwia cząsteczce tRNA przybranie konformacji przestrzennej (struktury III-rzędowej), przypominającej odwróconą literę L, zawierającą na jednym końcu antykodon, a na drugim miejsce akceptorowe dla aminokwasu. Wiązanie odpowiednich tRNA przez aaRS w istotnym stopniu zależy od struktury pętli antykodonu tych tRNA. Przykładowo, pętla antykodonu tRNA^{Gln} dzięki dwóm niekanonicznym parom zasad utworzonym przez cztery nukleotydy pętli antykodonu przyjmuje charakterystyczną strukturę rozpoznawaną jedynie przez GlnRS (Rysunek 3.1) [70]. Pętla antykodonu innego tRNA, tRNA^{Ile}, przyjmuje znacząco odmienną strukturę. U36, trzecia zasada antykodonu tRNA^{Ile} oddziałuje z U33 pętli antykodonu. Dodatkowo tworzy się niekanoniczna para A38-C32. Towarzyszy temu wypętlenie A37 i G34, co z kolei gwarantuje specyficzność oddziaływania z IleRS (Rysunek 3.1) [70].



Rysunek 3.1

Schemat obrazujący oddziaływania w obrębie pętli antykodonu tRNA^{Gln} (po lewej) oraz tRNA^{Ile} (po prawej) w kompleksie z syntetazami aminoacylo-tRNA, odpowiednio GlnRS i IleRS [70].

Istotnym elementem modulującym strukturę, a w efekcie również specyficzność poszczególnych tRNA są modyfikacje potranskrypcyjne [71, 72]. Mogą one zmieniać strukturę tRNA w takim stopniu, że przestaje być ona rozpoznawana przez czynnik EF-Tu niezbędny podczas wydłużania nowosyntetyzowanego łańcucha białkowego. Przykładem takiej modyfikacji jest 2'rybozylowana adenozyzna w pozycji 64 tRNA inicjatorowego drożdży, która działa jak negatywny efektor elongacji translacji zawężający funkcję tego modyfikowanego tRNA do inicjacji translacji [73]. Modyfikowany tRNA_i^{Met}, w przeciwieństwie do jego niemodyfikowanego odpowiednika, nie wiąże się z EF-Tu i nie może być włączony podczas elongacji łańcucha białka [73].

Podczas wiązania tRNA z rybosomem struktura pętli antykodonu poszczególnych tRNA jest zbliżona. Pokazano, że modyfikacje w obrębie tRNA porządkują strukturę tych cząsteczek, usztywniają ją, a także że zmniejszenie dynamiki ramienia akceptorowego tRNA ułatwia wiązanie tRNA do rybosomalnego RNA. W efekcie czyni proces translacji bardziej wydajnym energetycznie. Przykładowo 2-tiourydyna (s²U) silniej niż urydyna wiąże adenozyne, zatem jej obecność w rejonie dwuniciowym pętli antykodonu z reguły zwiększa trwałość termiczną tRNA [74]. Znane są również modyfikacje zarówno w obrębie pętli jak i trzonu ramienia antykodonu, które nie wpływają znacząco na entalpię tRNA, jednak mimo tego zmniejszają dynamikę

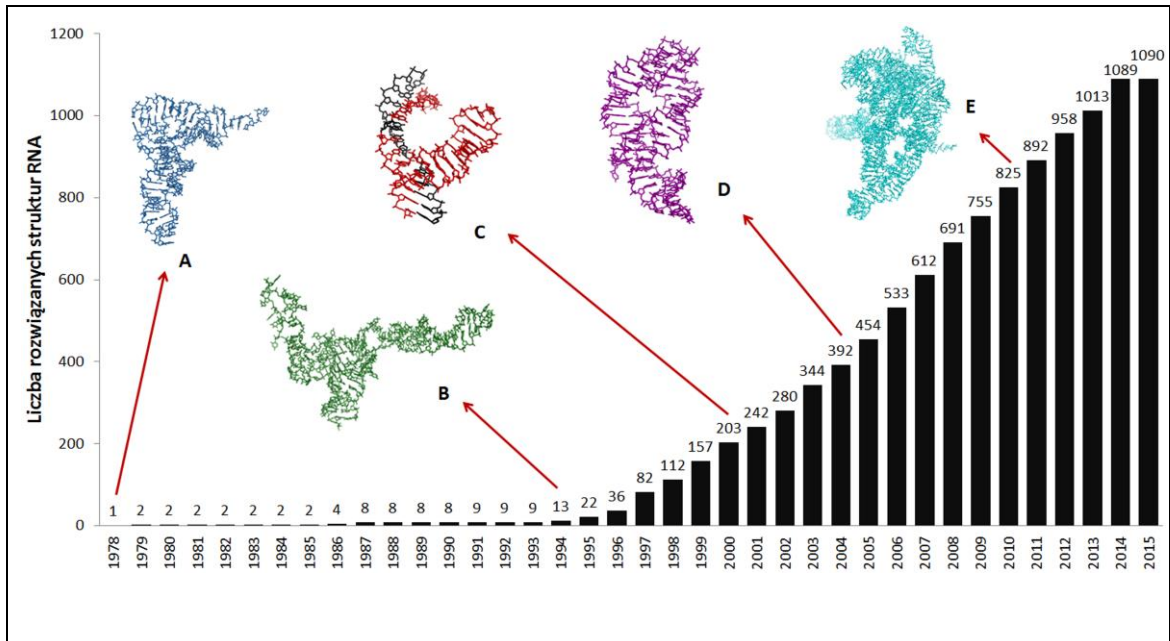
konformacyjną pętli i ułatwiają wiązanie kodonu [75-77]. Przykładem jest tiourydyna w pozycji 34 (s^2U_{34}) w pętli antykodonu tRNA^{Lys} [77]. Podobny wpływ na strukturę tRNA wywiera inny modyfikowany nukleotyd, pseudourydyna (ψ). Z reguły obecność ψ w trzonie ramienia antykodonu zwiększa jego stabilność termiczną, ułatwia wiązanie rybosomu i antykodonu. Nie jest to jednak regułą. W niektórych przypadkach, wpływ modyfikowanych nukleotydów na strukturę tRNA zależy od ich lokalizacji oraz kontekstu sekwencyjnego. Przykładowo, jeśli Ψ_{55} sąsiaduje z T_{54} nie obserwujemy wzrostu trwałości tRNA [78].

Ciekawe przypadki regulacji sekwencji, struktury, a przez to również funkcji tRNA zaobserwowano u organizmów żyjących w wysokich i umiarkowanie niskich temperaturach. Organizmy termofilne posiadają s^2T_{54} , która usztywnia strukturę ramienia antykodonu i zwiększa trwałość termiczną cząsteczki tRNA [79], z kolei organizmy mezofilne dihydrourydynę (D) zwiększającą motorykę tRNA. Modyfikacje te umożliwiają prawidłowy przebieg translacji nawet w warunkach termicznych odbiegających od optimum [80].

Przytoczone przykłady dowodzą istnienia ścisłej korelacji między strukturą oraz funkcją RNA oraz złożonych mechanizmów regulacji opartych na dynamice struktury RNA. W badaniach nad funkcjonalnymi RNA istotną rolę odgrywa znajomość ich struktury przestrzennej. To ona stanowi szkielet dla ich biologicznej funkcji. Najdokładniejszymi metodami poznania struktury trzeciorzędowej RNA są krystalografia rentgenowska i NMR [81, 82]

Pierwsza poznana na poziomie atomowym struktura RNA – drożdżowe tRNA^{Phe}, została rozwiązana w 1974 roku [83]. Obecnie znanych jest ponad 600 sekwencji i struktur tRNA pochodzących z ponad 100 gatunków (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de/>). Taka ilość danych strukturalnych stwarza możliwość analizy zależności między sekwencją, strukturą i właściwościami biologicznymi tych RNA. Podobnie, poznanie w 1994 roku struktury rybozemu typu „głowa młotka”, pozwoliło zaproponować mechanizm reakcji którą on katalizuje [84]. Przykłady te oraz wiele innych dowodzą, że podobnie jak w przypadku białek, funkcja RNA zależy od przyjmowanej przez nie struktury. Ponadto struktura RNA jest dynamiczna, podlega zmianom w odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce komórkowe, a bogactwo ich form strukturalnych determinuje wielofunkcyjność tych cząsteczek oraz ukazuje ogrom możliwości regulacji ich funkcji [85-87]. Liczba poznanych struktur RNA,

zdeponowanych w bazie PDB rośnie wykładniczo w czasie, co koreluje ze stopniem zrozumienia funkcji tych RNA (Rysunek 3.2).



Rysunek 3.2

Wykres obrazujący wykładniczy przyrost liczby poznanych, zdeponowanych w bazie PDB struktur RNA w czasie wraz z przykładami struktur trzeciorzędowych niekodujących RNA: **A.** tRNA^{Phe} z drożdży (kod PDB: 5TNA) [83], **B.** 5S RNA z *E. coli* (kod PDB: 1C2X) [88], **C.** rybozym typu „głowa młotka” (zaznaczony na czerwono) w kompleksie z substratem (zaznaczony na czarno) (kod PDB: 2OEU) [84], **D.** ryboprzełącznik adeninowy (kod PDB: 1Y26) [89], **E.** bakteryjna rybonukleaza P (kod PDB: 3Q1Q) [90]. Stan na 2015-01-23.

4. mikroRNA

4.1. Biogeneza

Geny dla miRNA są częścią sekwencji kodujących białka (intronów lub egzonów) lub funkcjonują jako samodzielne jednostki transkrypcyjne [91-93]. Ulegają one transkrypcji z udziałem polimerazy RNA II lub III do pri-miRNA o długości sięgającej kilku tysięcy nukleotydów (Rysunek 4.1) [94, 95]. Posiadają one wewnętrzcząsteczkowe regiony komplementarności, w efekcie tworzą połączone ze sobą struktury spinek do włosów. Przy końcu 5' pri-miRNA przyłączana jest 7-metyloguanozyna, koniec 3' podlega poliadenylacji [96]. W dojrzewanie pri-miRNA zaangażowane są dwa enzymy z rodziny rybonukleaz typu III: Drosha i Dicer. Drosha oraz białko DGCR8 (ang. Di George syndrome critical region gene 8) tworzą funkcjonalny enzymatyczny kompleks jądrowy nazywany mikroprocesorem [97]. Postuluje się, że białko DGCR8 uczestniczy w rozpoznaniu pri-miRNA jeszcze przed jego związaniem z Drosha. Wiąże ono jednoniciowe końce pri-miRNA i ukierunkowuje katalityczną domenę rybonukleazy Drosha na hydrolizę transkryptów do fragmentów o długości ~60-100 nukleotydów, tzw. pre-miRNA [98]. pre-miRNA również przyjmują strukturę spinek do włosów i w takiej postaci, z udziałem transportera eksportyny 5 współdziałającej z białkiem Ran, przenoszone są do cytoplazmy [99].

W cytoplazmie, pre-miRNA ulega dalszemu dojrzewaniu z udziałem enzymu Dicer powiązanego z białkami Argonaut (Ago) i TRBP (ang. transactivating response RNA-binding protein) [100]. Dicer posiada sześć domen: domenę odpowiedzialną za wiązanie dsRNA, dwie domeny katalityczne o aktywności RNazy III, domenę PAZ wiążącą m.in. białka z rodziny Argonaut, domenę o aktywności helikazy oraz DUF283 [97]. Dicer rozpoznaje zarówno rejony dwuniciowe jak i jednoniciowe niesparowane końce pre-miRNA, a następnie hydrolizuje cząsteczkę u podstawy jej pętli [97, 100]. W efekcie powstają dwuniciowe RNA o długości ~20 nukleotydów (dupleks miRNA-miRNA*). Jedna z nici dupleksu, pasażerka ulega degradacji, druga, wiodąca jest cząsteczką funkcjonalną. W niektórych przypadkach obie nici włączane są do kompleksu RISC (ang. microRNA induced silencing complex) [101, 102].

Znane są również miRNA, zwane niekanonicznymi, które powstają z pominięciem niektórych elementów opisanego powyżej szlaku biogenezy miRNA, zwykle rybonukleazy Drosha oraz białka DGCR8, rzadziej rybonukleazy Dicer [103].

Przykładowo, u *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, później również u kręgowców zaobserwowano, że źródłem miRNA mogą być introny [104, 105]. Powstają one z udziałem spliceosomów, które w tym przypadku zastępują aktywność Drosha i DGCR8. Ich produkty przypominają spinki pre-miRNA, transportowane są one do cytoplazmy z udziałem eksortyny 5, gdzie dojrzewają z udziałem rybonukleazy Dicer (Rysunek 4.1) [104].

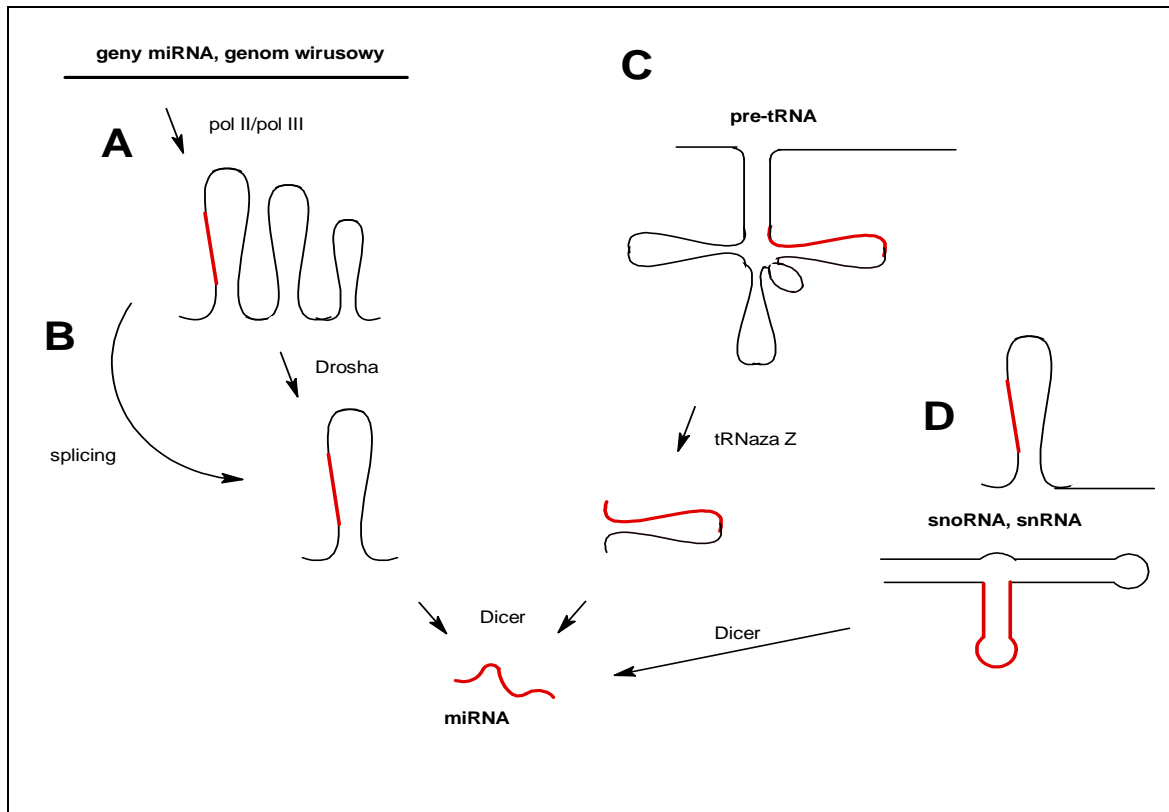
Źródłem miRNA mogą być także małe jąderkowe RNA (snoRNA). snoRNA uczestniczą w obróbce RNA polegającej głównie na modyfikacjach rRNA, rzadziej snRNA i mRNA [14, 15] oraz zaangażowane są w dojrzewanie pre-rRNA i pre-mRNA [106]. Stosunkowo niedawno zaobserwowano, że mogą również tworzyć kompleksy z białkami Ago. Przykładem jest ludzki snoRNA, ACA45, przypominający dwie związane ze sobą spinki pre-miRNA. Rozpoznawane są one przez Dicer, a jego produkt uczestniczy w wyciszaniu ekspresji genów poprzez destabilizację mRNA oraz regulację inicjacji jego translacji [107, 108]. Później odkryto, że również inne endogenne RNA przypominające spinki pre-miRNA mogą ulegać obróbce z udziałem Dicer i być źródłem funkcjonalnych miRNA, przykładowo miR-320 oraz miR-484 (Rysunek 4.1) [109].

miRNA mogą być także produktem ubocznym dojrzewania lub degradacji tRNA [110]. Powstają one z udziałem tRNazy Z lub Dicer, niezależnie od Drosha i DGCR8. Po raz pierwszy zaobserwowano je w komórkach zarażonych wirusem HIV. Był to fragment tRNA^{Lys}, rozpoznający genomowe RNA wirusa, działający jako starter dla odwrotnej transkryptazy [110]. Później zidentyfikowano 17 kolejnych 18-22 nt RNA o sekwencji identycznej do końców 3' i 5' dojrzałych tRNA (Rysunek 4.1) [110].

Innego typu przykładem niekanonicznego szlaku biogenezy miRNA jest dojrzewanie miR-451, który powstaje niezależnie od rybonukleazy Dicer [111]. Pri-miR-451 ulega obróbce z udziałem Drosha/DGCR8 do pre-miRNA o długości zaledwie 18 nt, który nie jest substratem dla rybonukleazy Dicer ale jest bezpośrednio włączany do kompleksu RISC [112].

Źródłem miRNA mogą być również transkrypty wirusowe. Do tej pory poznano ponad 300 miRNA pochodzenia wirusowego [113]. Zdarza się, że dojrzewają one niezależnie od Drosha, zawsze jednak z udziałem rybonukleazy Dicer [114, 115]. Zauważono znaczne podobieństwo sekwencji, w szczególności w rejonie 'seed', miRNA

pochodzenia wirusowego i miRNA gospodarza, przykładowo SFVagm-miR-S4 i hsa-miR-155 oraz SFVagm-miR-S6 i hsa-miR-132 [116, 117]. Wirusowe miRNA hamują odpowiedź immunologiczną komórki umożliwiając tym samym ich dłuższe przetrwanie w organizmie gospodarza [118].



Rysunek 4.1

Schemat biogenezy miRNA.

Kanoniczny szlak biogenezy miRNA zakłada, że produkty transkrypcji genów miRNA ulegają obróbce z udziałem rybonukleazy Drosha, a następnie Dicer (A). Źródłem miRNA mogą być również introny, które wycinane są z udziałem spliceosomu, a następnie dojrzewają z udziałem rybonukleazy Dicer (B), tRNA procedowane do miRNA z udziałem tRNazy Z i/lub Dicer (C) oraz inne niekodujące RNA (snRNA, snoRNA) będące substratem dla Dicer (D).

4.2. Funkcja

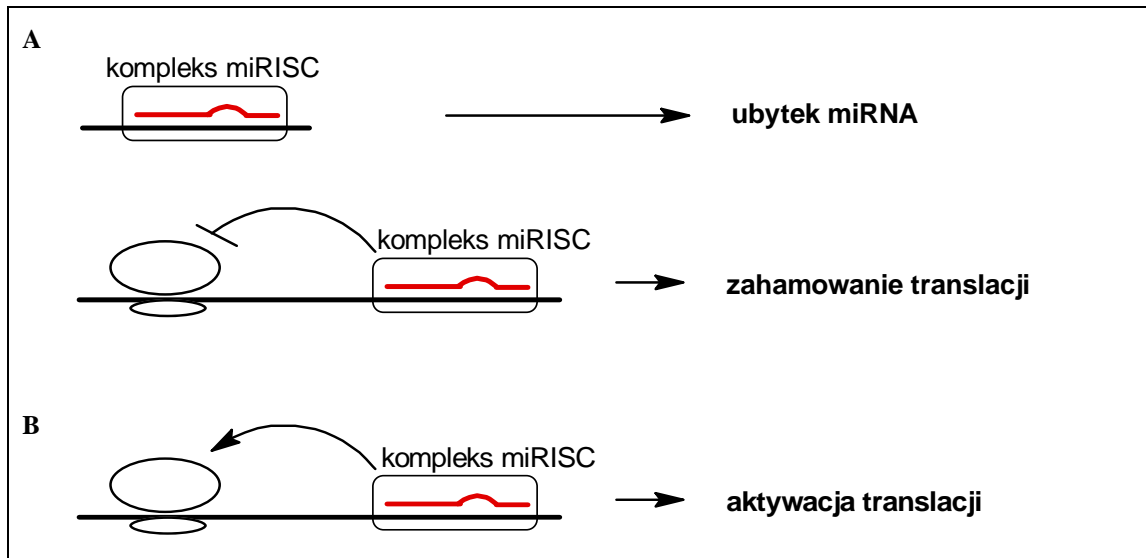
Dojrzałe miRNA włączane są do kompleksu RISC, którego głównym elementem są białka dwóch rodzin, Argonaute oraz GW182. Koniec aminowy białek GW182 zawiera miejsca wiązania Ago, koniec karboksylowy z kolei stanowi platformę wiązania kompleksu deadenylującego, białek NOT1 oraz PAN3 [119]. miRISC wiąże docelowe transkrypty [120], do czego zgodnie z kanonicznym modelem działania, wymagana jest

pełna komplementarność rejonu 'seed' miRNA (2-7 nukleotydy) i targetowego mRNA w obrębie jego 3'UTR [1]. Późniejsze badania pokazały, że między rejonem 'seed' miRNA i mRNA dopuszczalne są oddziaływania niekanoniczne, a nawet niesparowania [121]. Co więcej, dowiedziono, że w wiązaniu mRNA mogą być również zaangażowane nukleotydy spoza rejonu 'seed', w szczególności nukleotydy 9-12 miRNA [1]. Ponadto, miejsca wiązania miRNA nie znajdują się, jak sądzono pierwotnie, jedynie w 3'UTR mRNA, ale również w 5'UTR [122], a nawet jego rejonach kodujących [123].

Związanie miRISC z docelowym mRNA powoduje zahamowanie translacji [124]. Szacuje się, że w 84 % jest ono efektem degradacji mRNA poprzedzonej deadenylacją mRNA [125]. Kompleks miRISC może oddziaływać z czynnikami uczestniczącymi w usuwaniu czapeczki (ang. cap) z końca 5' mRNA, co sugeruje, że zahamowanie translacji może być również efektem degradacji mRNA będącej następstwem odcięcia m^7G znajdującego się przy końcu 5' mRNA (Rysunek 4.2) [125].

Inhibicja translacji nie musi być skutkiem obniżenia poziomu mRNA [126]. Związanie miRISC do mRNA może ograniczać rozpoznawanie czapeczki przez czynniki inicjujące translację [127] oraz przyłączanie podjednostki rybosomalnej 60S [128], a w efekcie zahamowanie inicjacji translacji. Z kolei, obecność miRNA w frakcji polisomalnej oraz bezpośrednie oddziaływanie miRNA z cytoplazmatycznymi rRNA, jak w przypadku miR-206 z 18S oraz 28S rRNA, wskazują, że inhibicja translacji może odbywać się na późniejszych etapach syntezy białka [129]. miRNA mogą również oddziaływać bezpośrednio z wolnymi rybosomami w cytoplazmie [121]. Przykładowo, obserwowano kompleksy miR-206 z 18S oraz 28S rRNA [130].

Funkcja miRNA nie ogranicza się jedynie do hamowania biosyntezy białka. Mogą one indukować translację wybranych mRNA. Przykładowo, podczas aresztu cyklu komórkowego w fazie G0/G1 czy stresu komórkowego, miR-10b oddziałuje z 5'UTR mRNA kodującym jedno z białek rybosomalnych, a w efekcie zwiększa wydajność jego translacji [122]. Znane są również przypadki, w których związanie miRNA do mRNA stymuluje przyłączenie podjednostek rybosomalnych i aktywację translacji (Rysunek 4.2) [131].



Rysunek 4.2

Kanoniczne model działania miRNA: **A.** inhibicja i **B.** aktywacja translacji.

4.3. miRNA w nowotworach glejowych mózgu u ludzi

Glejaki są najczęstszymi pierwotnymi nowotworami centralnego układu nerwowego. W zależności od typu komórki gleju z której biorą początek klasyfikujemy je jako: gwiaździaki (rozwijające się z astrocytów), skąpodrzewiaki (z oligodendrocytów) lub wyściółczaki (z epenymocytów). Ze względu na stopień złośliwości biologicznej dzielone są na glejaki niskozłośliwe o niskim potencjale proliferacyjnym, wolno rosnące, mało inwazyjne, o stosunkowo dobrych rokowaniach (I i II stopień złośliwości biologicznej wg WHO) oraz glejaki wysokozłośliwe charakteryzujące się obfitym unaczynieniem, intensywną proliferacją, naciekaniem sąsiadujących tkanek, bardzo źle rokujące (III i IV stopień wg WHO) [132].

Glejak wielopostaciowy (ang. glioblastoma multiforme, GBM) jest najczęściej występującym pierwotnym guzem mózgu, stanowi ponad 50 % wszystkich glejaków i cechuje się najwyższym stopniem złośliwości biologicznej (IV stopień wg WHO) [132]. GBM ma naciekający charakter wzrostu, obfite unaczynienie oraz szybki i agresywny przebieg kliniczny. GBM charakteryzuje się występowaniem słabo zróżnicowanych neoplastycznych komórek astrocytarnych, komórkowej i jądrowej atypii, intensywnej aktywności mitotycznej, neoangiogenezy, zakrzepicy naczyniowej, ograniczonej apoptozy oraz ognisk martwicy. Hiperproliferyacja naczyniowa oraz nekroza stanowią podstawowe kryteria diagnostyczne pozwalające na odróżnienie GBM od glejaków

niższego stopnia złośliwości [133]. GBM najczęściej występują w części nadnamiotowej jamy czaszki – w okolicy czołowej, ciemieniowej, skroniowej i potylicznej, rzadko w mózdzku [134]. Ze względu na jego lokalizację oraz znaczną oporność na konwencjonalne terapie rokowanie pacjentów z glioblastomą jest bardzo złe, a współczynnik wyleczeń niski [135].

GBM dzielimy na pierwotne i wtórne. Pierwsze z nich dotyczą głównie pacjentów w podeszłym wieku, podczas gdy znacznie rzadsze wtórne dotyczą zwykle pacjentów przed 45 rokiem życia. Pierwotne rozwijają się *de novo* z komórek glejowych, charakteryzują się agresywnym przebiegiem z krótką historią kliniczną wynoszącą zwykle poniżej sześciu miesięcy. Glejaki wielopostaciowe wtórne pochodzą z guzów szeregu astrocytarnego (gwiaździaków) niższego stopnia złośliwości WHO na skutek ich transformacji i zezłośliwienia. Pomimo różnic w patogenezie, GBM pierwotne i wtórne są zbliżone pod względem morfologicznym i klinicznym [136].

Objawy neurologiczne w przebiegu guzów mózgu stanowią następstwa wzmożonego ciśnienia śródczaszkowego, będącego wynikiem ograniczonych możliwości wzrostu nieprawidłowej masy w obrębie czaszki, oraz tworzą zespół objawów wynikających bezpośrednio z uszkodzenia określonych struktur w mózgu. Są to bóle głowy, wymioty, zaburzenia świadomości, orientacji, niedowład, zmiany osobowości, nastroju oraz spowolnienie psycho-ruchowe. Częściej zależą od lokalizacji guza niż od jego specyfiki histologicznej. Brak specyficznych objawów sprawia, że nowotwór jest trudny w diagnozie, zwykle wykrywany dopiero w zaawansowanym stadium choroby, w większości przypadków z użyciem rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, RMI). Nowe narzędzia oraz metody diagnozy, m. in. spektroskopia rezonansu magnetycznego, obrazowanie perfuzji i dyfuzji mózgowej metodą rezonansu magnetycznego, zastosowanie F18-fluorodeoksyglukozy w pozytonowej tomografii emisyjnej, pozwalają na diagnozę nowotworu już na wczesnym etapie jego rozwoju [133]. Problemem pozostaje jednak niska świadomość oraz niechęć społeczeństwa do wykonywania badań profilaktycznych, jak również brak adekwatnego finansowania leczenia.

Niezmiennie od wielu lat standardem w leczeniu glejaków pozostaje leczenie operacyjne wspomagane radio- i chemioterapią. Maksymalna cytoredukcja guza (> 98 % guza) przedłuża życie, nawet do 9-12 miesięcy. Poprawia również odpowiedź pacjenta na radio- i chemioterapię. Jednakże często ze względu na umiejscowienie guza

oraz jego naciekowy charakter interwencja chirurgiczna nie jest możliwa. W przypadku glejaków wysokozłośliwych (WHO III i IV) radioterapia (RT) stosowana jest jako pierwsze leczenie uzupełniające po zabiegu chirurgicznym. Z kolei standardem w chemioterapii jest temozolomid (TMZ) oraz karmustyna (gliadel) [137, 138]. W przypadku nawrotów choroby, w grupie pacjentów leczonych TMZ oraz RT obserwuje się szybszy i bardziej agresywny wzrost nowotworu, który dodatkowo wykazuje znaczną oporność na leczenie [139].

W ostatnich latach zidentyfikowano wiele nowych obiecujących celów terapeutycznych oraz potencjalnych terapeutyków. Nowe podejścia oparte są o takie narzędzia jak inhibitory małowzrostkowe, przeciwciała monoklonalne oraz szczepionki peptydowe stosowane w celu regulacji szlaków komórkowych kluczowych dla rozwoju nowotworu, angiogenezy, a także zniesienia lekooporności komórek nowotworowych. Badania kliniczne nie przyniosły jednak oczekiwanych rezultatów w postaci efektywnego zahamowania proliferacji komórek glejaków [140]. Powodów niepowodzenia upatruje się w aktywacji alternatywnych szlaków przekazywania sygnałów z ominięciem wyłączanego przez inhibitor czynnika [136]. Pomimo, że nowe podejścia początkowo rokowały bardzo dobrze, większość z nich została odrzucona już na etapie badań klinicznych. Dlatego glejaki niezmiennie pozostają jednymi z najtrudniejszych w leczeniu, najgorzej rokującymi nowotworami, ze średnim czasem przeżycia wynoszącym mniej niż rok [141].

Wobec braku skutecznych metod leczenia glejaków, ich oporności na leczenie, wyzwaniem są badania nad nowymi celami terapii oraz podejściami w leczeniu GBM. Pierwszym etapem projektowania terapii jest identyfikacja celów terapeutycznych, których „wyłączenie” daje szansę na zatrzymanie patologicznych procesów, w tym ograniczenie proliferacji komórek i uruchomienie procesów apoptozy. Zastosowanie wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania DNA, mikromacierzy cDNA oraz metod proteomicznych dostarczyło nowej wiedzy na temat patogenezy glejaków oraz pozwoliło na identyfikację potencjalnych celów terapeutycznych [142]. Obecnie, sporo uwagi koncentruje się na czynnikach transkrypcyjnych, białkach macierzy zewnątrzkomórkowej, białkach opiekuńczych oraz miRNA, jako nowych obiecujących celach terapii GBM. Przewagą tych ostatnich nad pozostałymi jest ich zdolność regulacji ekspresji niemal na każdym jej etapie. miRNA mogą regulować ekspresję nawet 90 % genów, a w konsekwencji wpływać na szereg procesów komórkowy, takich

jak: wzrost, różnicowanie komórek, apoptoza, czy sygnalizacja komórkowa [1]. Zaburzenie poziomu miRNA zmienia ekspresję docelowych mRNA. Szacuje się, że jest ono podłożem ponad 390 chorób (<http://cmbi.bjmu.edu.cn/hmdd>). Największą grupę spośród nich stanowią choroby nowotworowe, w tym guzy mózgu.

miRNA wskazywane najczęściej w literaturze jako występujące na podwyższonym poziomie w GBM w porównaniu z próbą kontrolną to miR-21, miR-10b oraz miR-25, na niższym poziomie miR-139 oraz miR-218 (Tabela 4.1). Stwierdzono, że podobnie jak w zdrowym mózgu podczas jego rozwoju, tak w guzie w różnych stadiach jego zaawansowania poziom poszczególnych miRNA ulega dynamicznym zmianom. Profil miRNA w GBM wskazuje stopień zaawansowania choroby, a także może ułatwić prognozowanie oraz dobór odpowiedniej terapii. W oparciu o poziom poszczególnych miRNA podzielono GBM na pięć klas [143]. Wytypowano również miRNA o najwyższej wartości prognostycznej dla GBM [144]. Wskazano, że diagnoza GBM jest również możliwa na podstawie analizy miRNA z krwi oraz płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów [145].

Analiza funkcjonalna poszczególnych miRNA swoistych dla GBM wskazuje, że mogą one pełnić rolę zarówno onkogenów jak i supresorów nowotworzenia, odpowiadają za wykształcenie oporności na chemio- i radioterapię, stymulują neoangiogenezę oraz proliferację komórek, a także regulują cykl komórkowy i apoptozę (Tabela 4.1 i 4.2) [141, 144-158].

Tabela 4.1

Wybrane miRNA, których poziom jest zmieniony w GBM w porównaniu z kontrolną [141, 144-158].

miRNA, których stężenie w GBM jest wyższe niż w próbie kontrolnej	miRNA, których stężenie w GBM jest niższe niż w próbie kontrolnej
miR-9, miR-10a, miR-10b, miR-15b, miR-16, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-25, miR-92b, miR-93, miR106a, miR-106b, miR-130a, miR-130b, miR-155, miR-182, miR-196b, miR-210, miR-451, miR-7, miR-124, miR-124a	miR-128a (miR-128-1), miR-129-5p, miR-132, miR-136, miR-137, miR-138, miR-139-5p, miR-153, miR-154*, miR-181a, miR-203, miR-218, miR-323 (miR-323a), miR-328

Tabela 4.2

Rola wybranych miRNA w GBM [141, 144-158].

Proces/szlak regulowany przez miRNA	Przykłady miRNA
Wzrost i różnicowanie CSCs (ang. cancer stem cells)	miR-7, miR-9/miR-9*, miR10a/miR-10a*/miR-10b, miR-17-92, miR-124a/miR-137, miR-125a/miR-125b, miR-302-367, miR-326
Cykl komórkowy	miR-21, miR-15b, miR-34a, miR-221/miR-222
Proliferacja oraz apoptoza	miR-21, miR-26a, miR-101, miR-128, miR-156b-5p, miR-153, miR-181a/miR-181b, miR-196a/miR-196b, miR-218, miR-381, miR-451, let-7a
Neoangiogeneza	miR-93, miR-296
Oporność komórek na radio- i chemioterapię	miR-21, miR-125b-2, miR-195, miR-455-3p, miR-10a

Poznanie swoistego dla GBM profilu ekspresji miRNA dostarcza przesłanki świadczące o zaangażowaniu poszczególnych miRNA w patogenezie GBM. Znacząco zwiększa to możliwości diagnozy i prognozowania tych nowotworów. Nadal jednak jesteśmy dalecy od zrozumienia mechanizmów regulacji komórkowej z udziałem miRNA, a zatem również od wykorzystania miRNA jako potencjalne cele terapeutyczne.

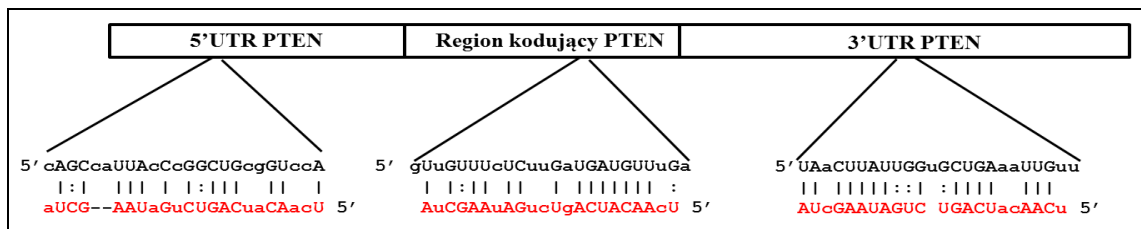
Zgodnie z przyjętym modelem funkcjonowania miRNA specyficzność ich działania zakodowana jest w ich sekwencji. Postuluje się, że do rozpoznania sekwencji targetowej przez miRNA wystarczy komplementarność sekwencji wynosząca zaledwie 7 nt (obejmująca rejon 'seed' miRNA) [1]. W świetle wcześniejszych badań, które wskazują, że sekwencje o długości 10 nukleotydów i krótsze nie są unikalne w genomie ludzkim, wątpliwe jest, aby oddziaływania miRNA-mRNA obejmujące zaledwie parę nukleotydów mogły zagwarantować specyficzność działania miRNA. Zrozumienie funkcji miRNA utrudnia dodatkowo fakt, że przeciętny ludzki miRNA może rozpoznawać i regulować ekspresję nawet 100-1000 różnych targetów (Tabela 4.3). Potencjalne miejsca rozpoznawania targetu znajdują się zarówno w rejonach, które nie ulegają translacji (5' oraz 3'UTR), jak również w tych kodujących białko (Rysunek

4.3). Ponadto, ekspresja jednego mRNA może podlegać regulacji nawet przez 1000 różnych miRNA (Rysunek 4.4).

Tabela 4.3

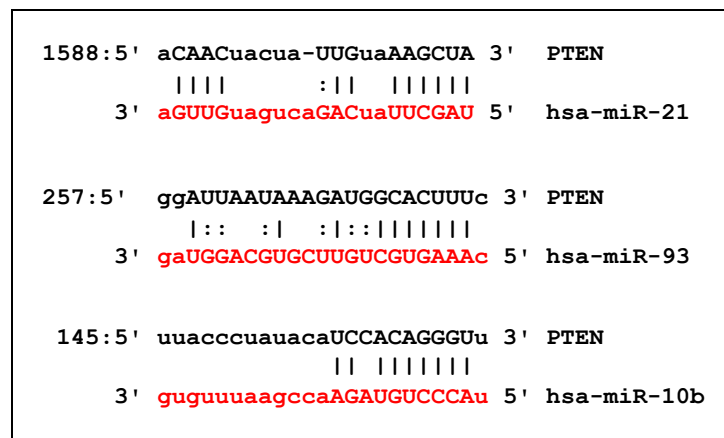
Przykłady miRNA oraz liczba sekwencji mRNA, które potencjalnie regulują, wg TargetScan [159].

miRNA	Ilość potencjalnych sekwencji mRNA regulowanych przez miRNA
miR-21	5 203
miR-93	9 156
miR-296	6 180
miR-10b	7 048
miR-15b	7 048



Rysunek 4.3

Schemat przedstawiający przykładowe miejsca oddziaływania miR-21 oraz mRNA białka PTEN w obrębie 5' oraz 3'UTR oraz regionu kodującego. Sekwencję miR-21 zaznaczono na czerwono, | - oddziaływania Watsona-Cricka, : - oddziaływania niekanoniczne.



Rysunek 4.4

Potencjalne miejsca docelowe dla miR-21, miR-93 oraz miR-10b w obrębie mRNA białka PTEN. Sekwencje miRNA zaznaczono na czerwono, | - oddziaływania Watsona-Cricka, : - oddziaływania niekanoniczne.

Pewnego rodzaju potwierdzeniem, że nasza wiedza na temat funkcji miRNA nie jest kompletna są rozbieżności wyników otrzymanych z użyciem narzędzi bioinformatycznych bazujących jedynie na sekwencji RNA (TargetScan) oraz wysokoprzepustowego profilowania mRNA oraz białek [23]. Zaledwie 50 % przewidzianych dupleksów miRNA-mRNA zostało potwierdzonych z użyciem co najmniej jednej innej metody eksperymentalnej [24-26]. Algorytmy uwzględniające energię wiązania miRNA-mRNA (RNAhybrid), motywy strukturalne oraz dostępność sekwencji docelowej w obrębie targetu (mirWIP, PITA) dają przewidywania o znacznie większym stopniu istotności [27]. Można zatem przypuszczać, że sekwencja nie jest jedynym determinantem swoistości działania miRNA [160].

Pokazano, że aktywność miRNA w znacznym stopniu zależy od dostępności sekwencji docelowej, struktury mRNA [161] oraz jego zaangażowania w oddziaływania z białkami, m.in. Dnd1 oraz Pumilio [162, 163]. Modyfikacje potranskrypcyjne występujące w sekwencjach targetowych wpływają na ich dostępność dla miRNA. Zaobserwowano, że transkrypty różniące się długością ogonów poli-A znajdujących się przy ich końcach 3' różnią się zdolnością wiązania poszczególnych miRNA [164]. Z kolei deaminacja adenzyn w obrębie mRNA może skutkować utworzeniem nowych lub eliminacją istniejących miejsc wiązania miRNA [165, 166]. Znane są również przypadki, w których miRNA współzawodniczą ze sobą o wiązanie targetu, co jest skutkiem sąsiedztwa ich miejsc docelowych w obrębie mRNA i co może ograniczać funkcjonowanie niektórych z nich [163, 167]. Aktywność niektórych miRNA jest modulowana przez cząsteczki będące antagonistami miRNA, tj. koliste RNA [168], pseudogeny [169], RNA wirusowe [170], fragmenty rRNA oraz tRNA [121, 171].

Ponadto, sekwencje niektórych miRNA wskazują, że mogą one funkcjonować poza kanonicznym szlakiem, z pominięciem kompleksu RISC. Rozkład nukleotydów w miRNA nie jest przypadkowy, a pewne motywy sekwencyjne są nadreprezentowane [172]. Znane są miRNA bogate w trakty AG oraz CU. Białka rozpoznające tego typu powtórzenia w mRNA (ang. polypyrimidine and polypurine track-binding proteins) odpowiadają za ich alternatywne składanie (ang. splicing) i edytowanie oraz regulację ich translacji [173, 174]. Związanie tych białek do miRNA bogatych w puryny bądź pirymidyny może spowodować ograniczenie dostępności tych miRNA, w efekcie wpłynąć na procesy komórkowe regulowane z ich udziałem (Rysunek 4.5).

Inną ciekawą grupą są miRNA bogate w powtórzenia CNG. Te trójnukleotydowe powtórzenia skorelowano wcześniej z chorobami neurodegeneracyjnymi, chorobą Huntingtona czy dystrofią miotoniczną typu I [175]. Trakty CNG zlokalizowane są zwykle w 3' i 5' UTR i przyjmują strukturę spinki do włosów [176], która oddziałuje z białkami MBNL-1 (ang. muscleblind-like splicing regulator 1) i CUGBP1 (ang. CUG-binding protein 1) [177]. Związanie białka zmienia strukturę RNA, a w efekcie wpływa na inicjację jego translacji [64]. Powtórzenia CNG w miRNA mogą być potencjalnie rozpoznawane przez białka MBNL-1 i CUGBP1, co wskazuje na alternatywny mechanizm patogenezy tej grupy chorób neurodegeneracyjnych (Rysunek 4.5).

Niektóre miRNA posiadają powtórzenia UGUGU, znane jako motywy stymulujące odpowiedź immunologiczną [178]. Wcześniej zauważono, że miRNA indukują rozwój i różnicowanie limfocytów B i T (miR-181a, miR-155) [179], proliferację monocytów i komórek neutrofilnych (miR-17-5p, miR-20a, miR-106a, miR-223) [180, 181] oraz uwolnienie cytokin zapalnych oraz IFN typu I (miR-146a, miR-155, miR-21) [182], jednakże mechanizm zależnej od miRNA odpowiedzi immunologicznej do tej pory pozostaje niewyjaśniony. Kwasy nukleinowe, przykładowo dsRNA oraz ssRNA mogą stymulować odpowiedź immunologiczną u ssaków [183, 184] w sposób zależny od ich sekwencji [185]. Przykładowo motyw UGUGU stymuluje wysoki poziom ekspresji IFN- α , - β , - λ oraz interleukiny 1- β [186] i aktywuje TLR (ang. Toll-like receptors). Postuluję, że miRNA posiadające powtórzenia UGUGU mogą wywołać podobny efekt (Rysunek 4.5).

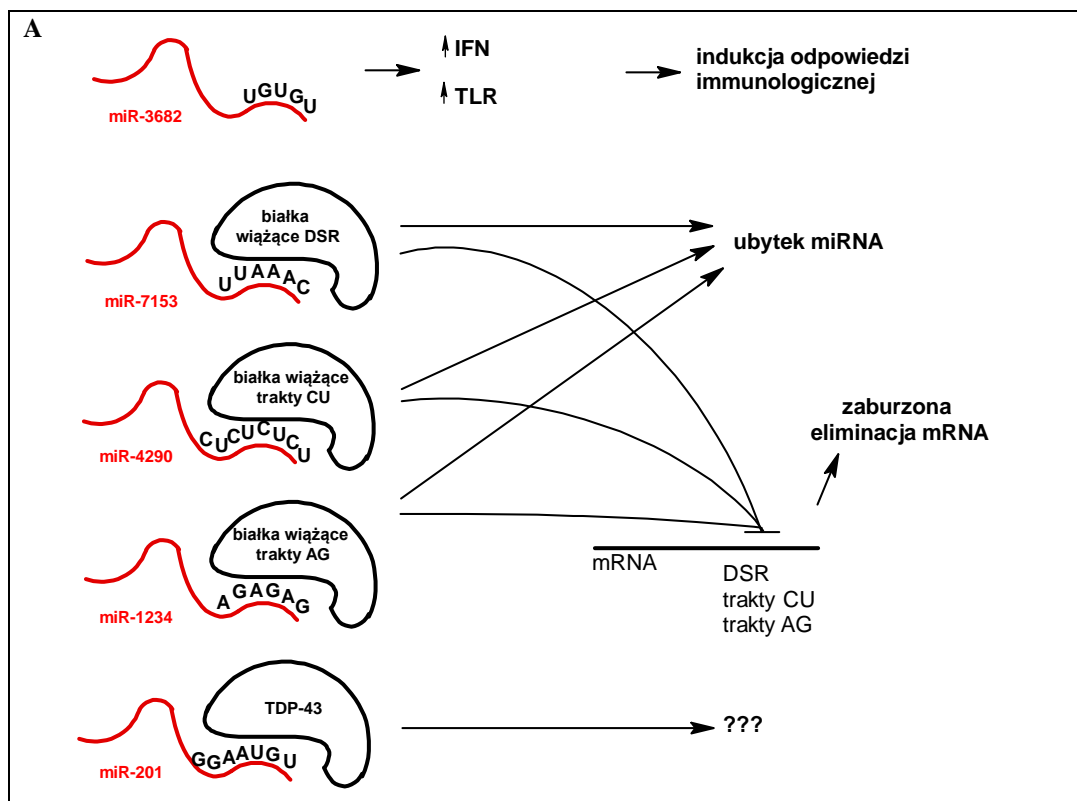
Ponadto w miRNA znajdują się tzw. motywy kierujące kwasy nukleinowe na ścieżkę degradacji (DSR, ang. determinant of selective removal). Wskazuje to, że degradacja mRNA może odbywać się niezależnie od kompleksu miRISC [187] oraz, że miRNA podobnie jak mRNA mogą być kierowane do ciałek komórkowych (ang. procesing bodies) i tam czasowo magazynowane [188] (Rysunek 4.5).

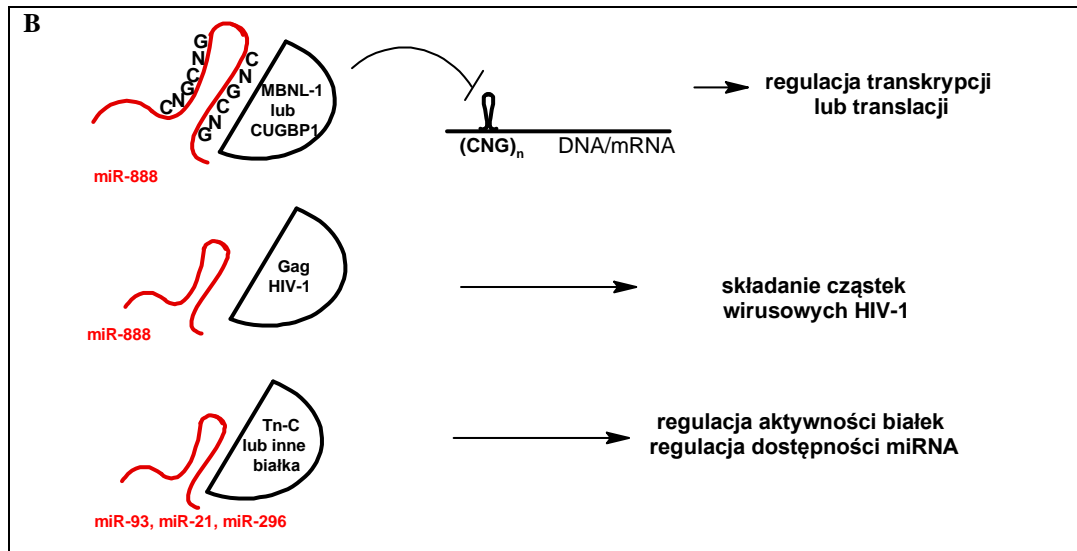
Co więcej, obecność wewnątrzcząsteczkowych rejonów komplementarności w obrębie sekwencji mRNA wskazuje, że mogą one samoistnie przyjmować strukturę. Badania *in silico* wskazują, że ponad 70 % ludzkich [189], ssaczych [190] oraz roślinnych [191] miRNA może przyjmować strukturę spinki o włosów lub dupleksu. Ponadto, w grupie wytypowanych spinek najczęściej nadreprezentowanymi w obrębie ich pętli są sekwencje UUCG, GAAA, GCAA, GAGA, GUGA, GGAA, CUUG, UUUG, znane jako motywy stabilizujące strukturę spinki do włosów [3]. Postuluję, że obecność

tych motywów w obrębie miRNA może inicjować przyjmowanie przez nie struktury spinki do włosów, co z kolei może mieć przełożenie na ich funkcje.

Spinki do włosów miRNA przypominają swoją strukturą aptamery, co wskazuje, że podobnie jak one mogą bezpośrednio, niezależnie od kompleksu RISC, oddziaływać z białkami i regulować w ten sposób ich aktywność. Przykładem są miR-888 i miR-146a, które oddziałują z jedną z domen wirusowego białka Gag będącego ważnym elementem strukturalnym wirusa HIV-1. Jego związanie z wspomnianymi miRNA zaburza składanie cząstek wirusowych [56]. Znane są aptamery anty-Gag, które wywołują dokładnie taki sam efekt jak wspomniane miRNA [57, 58] (Rysunek 4.5).

Innym dowodem na to, że miRNA mogą oddziaływać bezpośrednio z białkami spoza kompleksu RISC są miRNA rodziny miR-1/miR-206 [59]. U pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym stwierdzono kompleksy TDP-43-miR-1 oraz TDP-43-miR-201 [59]. Postuluje się, że rozwój choroby jest efektem zahamowania aktywności miRNA, będącej z kolei skutkiem uwikłania miRNA w kompleks miRNA-TDP-43. Nie ma jednak przesłanek pozwalających jednoznacznie wykluczyć, że choroba jest następstwem zahamowania aktywności białka TDP-43 przez miRNA (Rysunek 4.5).



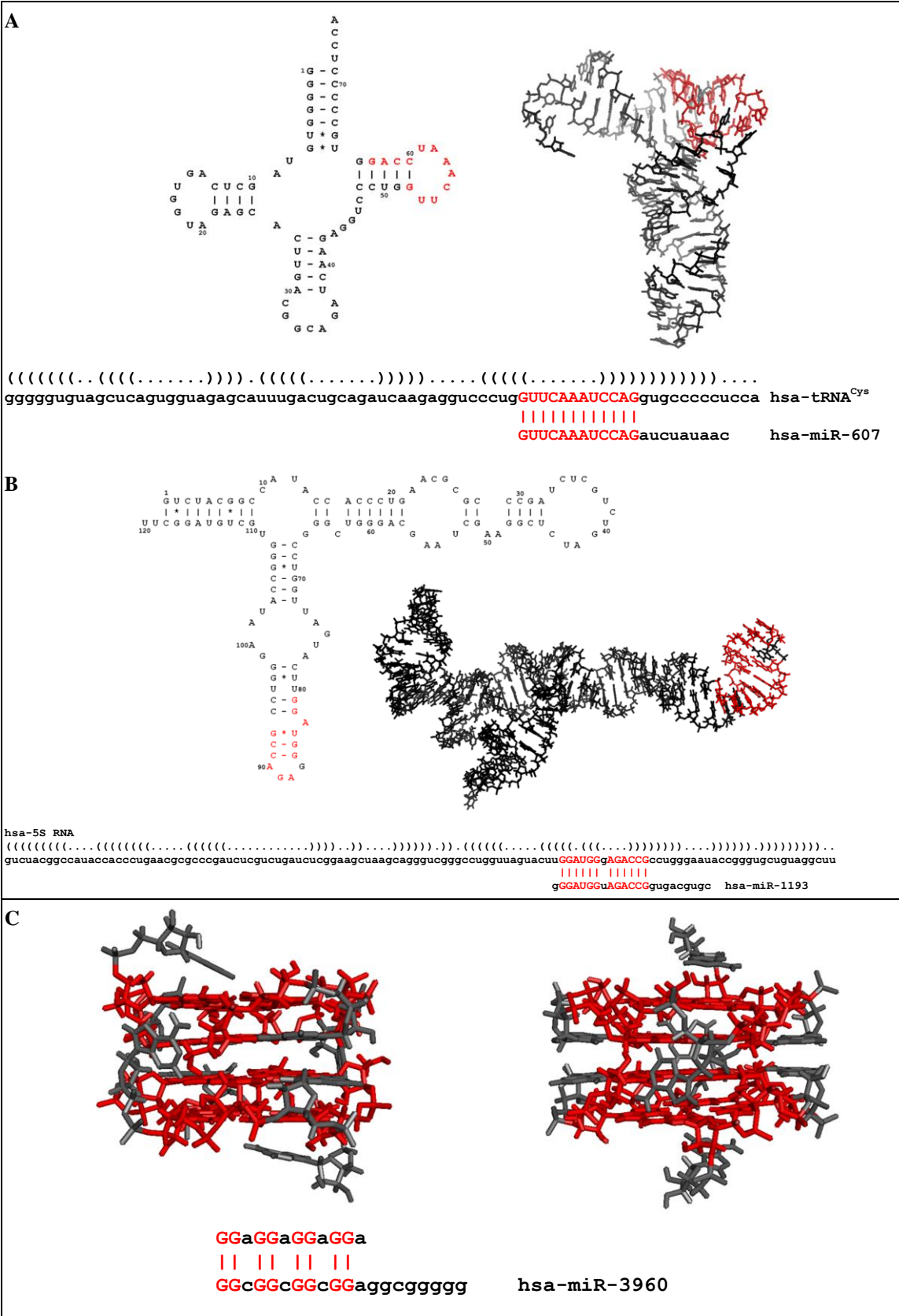


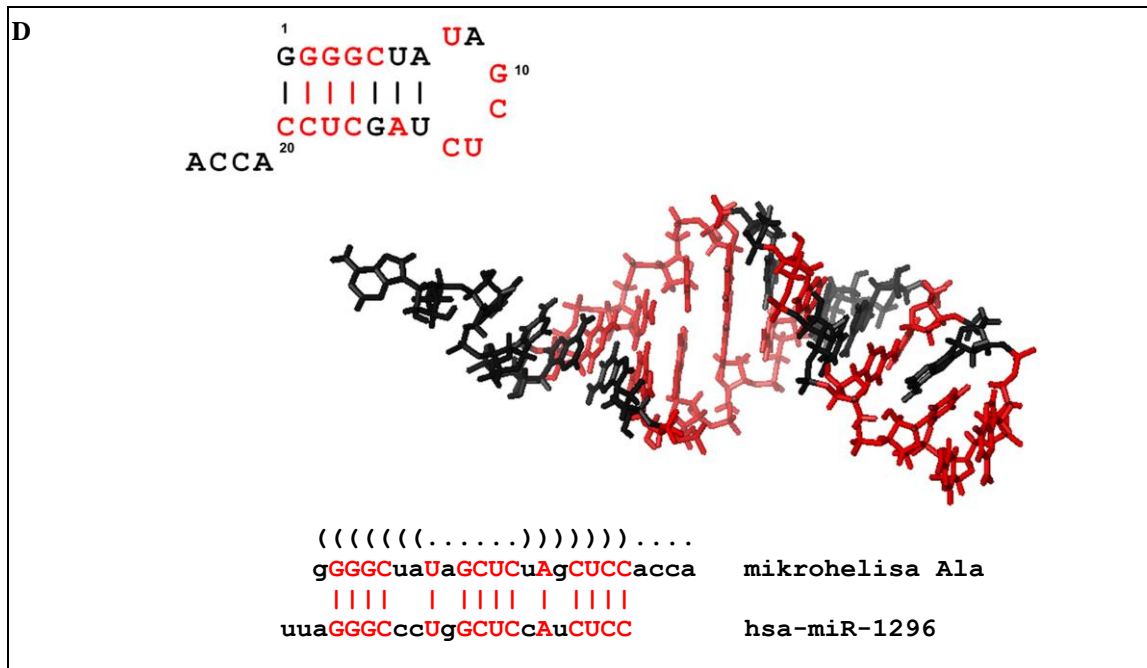
Rysunek 4.5

Potencjalne, niekanoniczne funkcje miRNA zależne od sekwencji (A) oraz struktury miRNA (B).

IFN – interferon, DSR - motywy kierujące kwasy nukleinowe na ścieżkę degradacji (ang. determinant of selective removal), MBNL-1 (ang. muscleblind-like splicing regulator 1), CUGBP1 (ang. CUG binding protein 1), Tn-C – tenascyna C (ang. tenascin C), TLR – receptor Toll podobny (ang. Toll-like receptor).

W komórce współistnieją różne mechanizmy zależnej od miRNA regulacji ekspresji genów. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w poznaniu wielu spośród nich. Pojawiły się również doniesienia świadczące o tym, że miRNA mogą funkcjonować poza kompleksem RISC. Nadal nie mamy jednak pełnego obrazu możliwych funkcji miRNA. Obserwując podobieństwo sekwencji miRNA i innych krótkich RNA (Rysunek 4.6) oraz mając na uwadze strukturę i funkcje tych drugich, można wnioskować, że miRNA przyjmują w komórce strukturę, co potencjalnie przekłada się na ich właściwości i funkcje. Poznanie struktury miRNA może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów regulacji komórkowej, w które miRNA są zaangażowane oraz patogenezy chorób u podłoża których leżą te krótkie niekodujące RNA. Próbując zrozumieć wielofunkcyjność, a zarazem specyficzność miRNA postanowiłam sprawdzić czy miRNA tworzą strukturę i w jaki sposób przekłada się ona na ich właściwości i funkcje.





Rysunek 4.6

Podobieństwo sekwencji wybranych miRNA i innych krótkich niekodujących RNA.

A. hsa-tRNA^{Cys} i hsa-miR-607, **B.** hsa-5S RNA i hsa-miR-1193, **C.** kwadrupleksu GGAGGAGGAGGA i hsa-miR-3960, **D.** mikrohelisy Ala [192] i hsa-miR-1296. Strukturę kwadrupleksu (C) określono metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (2RQJ) [193], struktury trzeciorzędowe tRNA^{Cys}, 5S rRNA oraz mikrohelisy Ala określono z użyciem RNAComposer [194] na podstawie ich struktur drugorzędowych.

MATERIAŁY I METODY

1. Odczynniki

Tabela 1.1

Zestawienie odczynników stosowanych w pracy.

Odczynnik	Producent
Zestaw do transkrypcji T7 (MEGAscript T7 transcription kit), zestaw odczynników do usuwania DNA (DNA-free™), kolumnienki z Sephadexem G-50 (NucAway Spin Columns)	Ambion
Bydłęca surowica płodowa (FBS), streptomycyna, pożywka EMEM, DMEM	ATCC
Bacto-Agar, Bacto-Trypton, ekstrakt drożdżowy	Difco
Standardy wielkości białek PageRuler, standardy wielkości DNA (1 kpz, 100 pz), zestaw do odwrotnej transkrypcji (RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit), mieszanina dNTP, PEG 200, PEG 400, PEG 3350, PEG 4000, PEG 8000	Fermentas
Błony rentgenowskie	Foton
Guanina	Fluca
[γ - ³² P]ATP (3000 Ci/mmol)	ICN
Streptawidyna skoniugowana z alkaliczną fosfatazą	GE Healthcare
Pożywka Opti-MEM, Lipofektamina 2000, TRIzol Reagent, BLOCK-iT (siRNA wyznakowany fluorescencyjnie), SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen
Chlorek magnezu, chlorek potasu, chlorek sodu, cytrynian sodu, wersenian żelaza, wodorotlenek sodu, wodorotlenek potasu, DMSO, glicerol	Merck
Kwas borowy, kwas octowy, metanol, etanol, mocznik, chloroform	Polskie Odczynniki Chemiczne
ATP, octan sodu	Promega
Zestaw do izolacji plazmidowego DNA (Plasmid Maxi Kit), zestaw do oczyszczania produktu reakcji PCR (QIAquick PCR Purification Kit)	Qiagen
PMSF (fluorek fenylometylosulfonowy)	Serva
Błona nitrocelulozowa BA 85	Schleicher & Schuell
Agaroza, kanamycyna	LabEmpire
Akryloamid, bis-akryloamid (N,N'-metylenobisakrylamid), błękit bromofenolowy (3,3',5,5'-tetrabromofenolosulfoftaleina), chlorek wapnia, DTT, EDTA, fenol, glicyna, glicerol, imidazol, N, N'-metylenobisakryloamid, APS, SDS, TEMED, Tris, Ficoll 400, izopropanol, chloroform-izoamylowy, trypsyna-EDTA, pożywka RPMI-1640, roztwór witamin do pożywki RPMI-1640, mieszanina antybiotyków do pożywki RPMI-1640 (Antibiotic-Antimycotic), PBS, Tween 20, BCIP/NBT, formaldehyd, formamid, N,N'-dimetyloformamid, ampicylina, MTT, aneksyna V – FITC do detekcji apoptozy (Annexin V_FITC Apoptosis Detection Kit)	Sigma
inhibitor hsa-miR-21 LNA	Exiqon

Tabela 1.2

Zestawienie enzymów wykorzystywanych w pracy.

Enzym	Producent
Rekombinowany ludzki Dicer	Finnzymes
Kinaza polinukleotydowa faga T4	Epicentre
Polimeraza Taq, rybonukleaza H1 (RNaza H1), ligaza faga T4, ligaza DNA faga T4, rybonukleaza T1 (RNaza T1), rybonukleaza V1 (RNaza V1), nukleaza S1	Fermentas
ligaza DNA faga T4, enzymy restrykcyjne Hind III, BamHI, EcoRI,	Promega
ligaza RNA faga T4	New England BioLabs

1.1. Oligorybonukleotydy

Pre-miR-21, miR-21, miR-10b, miR-15b, miR-93, miR-296 syntetyzowane były w firmie IBA GmbH, rybozomy skierowane na miR-21 i/lub pre-miR21 (miR21rz1-3), miR-10b i/lub pre-miR-10b (miR10brz1-3), miR-15b i/lub pre-miR-15b (miR15brz1-3), rybozomy zmutowane w obrębie rdzenia katalitycznego (miR21rz1_mut, miR10brz1_mut), krótkie substraty dla rybozymów miR21rz1-3 (pre-miR-21_S1, pre-miR-21_S2, pre-miR-21_S3) przez firmę FutureSynthesis.

Pre-miR-21, pre-miR-10b oraz pre-miR-15b uzyskano również w wyniku reakcji transkrypcji *in vitro* na matrycach DNA (sekwencje kodujące pre-miR-21, pre-miR-10b oraz pre-miR-15b wklonowana do wektora pT7T3-18U) z wykorzystaniem zestawu odczynników T7-MEGAshortscriptTM firmy Ambion.

Inhibitor hsa-miR-21 LNA oraz wyznakowaną fluorescencyjnie cząsteczkę dsRNA (BLOCK-iT Fluorescent Oligo) zakupiono, odpowiednio w firmie Exiqon oraz Invitrogen.

Tabela 1.3

Rybozomy typu hammerhead stosowane do hydrolizy miR-21 i/lub pre-miR21, miR-10b i/lub pre-miR-10b oraz miR-15b i/lub pre-miR-15b. Sekwencje rdzenia katalitycznego zaznaczono przez podkreślenie, sekwencję TLR zaznaczono przez podwójne podkreślenie.

Nazwa	Sekwencja (5' → 3')	Specyficzność	Substrat
miR21rz1	CAGUCUC <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAAU</u> AAGC	AUC↓	pre-miR-21 miR-21
miR21rz2	CCAUGAC <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAU</u> UCAA	GUC↓	pre-miR-21
miR21rz3	CCCAUCC <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA</u> ACUGGU		pre-miR-21
miR21rz1_TLR	<u>CCUAAGGCCAAAGCUAUGGCAGUCUCUGAUGAGGCCGAA</u> <u>AGGCCGAAAU</u> AAGC	AUC↓	pre-miR-21 miR-21
miR21rz1_mut	CAGUCUC <u>CAGAUGC</u> CGGCCGAAAGGCCGUA <u>UA</u> AAGC	AUC↓	pre-miR-21 miR-21
miR10brz1	CGGUUCC <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA</u> ACAGGG	GUC↓	pre-miR-10b miR-10b
miR10brz2	UAUACGC <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA</u> UACCA	AUC↓	pre-miR-10b
miR10brz3	UGCAUCC <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA</u> ACCAUA	GUC↓	pre-miR-10b
miR10brz1_mut	CGGUUCC <u>CAGAUGC</u> CGGCCGAAAGGCCGUA <u>AC</u> AGGG	GUC↓	pre-miR-10b miR-10b
miR15brz1	AACCAU <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA</u> UUGUC	AUC↓	pre-miR-15b miR-15b
miR15brz2	CAUCU <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA</u> ACUGUA	GUC↓	pre-miR-15b
miR15brz3	AAUAAU <u>CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA</u> UUCGC	AUC↓	pre-miR-15b
TARrz	GGGCUC <u>A</u> CUGAUGACUCCGGUAGGACGAA <u>AUCUGCC</u>	AUC↓	HIV TAR

Tabela 1.4

Zestawienie pozostałych oligorybonukleotydów stosowanych w pracy.

Nazwa	Charakterystyka	Sekwencja (5' → 3')
pre-miR-21	Prekursor miR-21	UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAU CUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGACA
miR-21	Dojrzały miRNA	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-10b		UACCCUGUAGAACC GAAUUGUG
miR-15b		UAGCAGCACAUCAUGGUUACA
miR-93		CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
miR-296		AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU
pre-miR-21_S1	Sekwencja komplementarna do ramion miR21rz1	GCUUAUCAGACUG
pre-miR-21_S2	Sekwencja komplementarna do ramion miR21rz2	UUGAAUCUCAUGG
pre-miR-21_S3	Sekwencja komplementarna do ramion miR21rz3	ACCAGUCGAUGGG

1.2. Oligodeoksyrybonukleotydy

Oligonukleotydy DNA do klonowania sekwencji pre-miR-21 (miR21-1, miR21-2, miR21-3, miR21-4), pre-miR-10b (miR10b-1, miR10b-2, miR10b-3, miR10b-4, miR10b-5, miR10b-6), pre-miR-15b (miR15b-1, miR15b-2, miR15b-3, miR15b-4, miR15b-5, miR15b-6) do plazmidu pT7T3 α 18, startery do reakcji PCR do syntezy sekwencji kodującej pre-miRNA wprowadzające miejsce hydrolizy dla enzymów restrykcyjnych HindIII oraz BamHI do klonowania do plazmidu pEGFP-N3, odpowiednio dla pre-miR-21 (miR21foHindIII, miR21reBamHI), pre-miR-10b (miR10bfoHindIII, miR10breEcoRI) oraz pre-miR-15b (miR15bfoHindIII, miR15breEcoRI), startery do sekwencjonowania sekwencji wklonowanych do plazmidów pT7T3-18U oraz pEGFP-N3 syntetyzowane były w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, oligodeoksyrybonukleotydy komplementarne do różnych rejonów miR-21 i/lub pre-miR-21 (O1-O12) wykorzystane w reakcji *in vitro* z RNasą H1, DNAzomy skierowane na miR-21 i/lub pre-miR-21 (miR21dz1-5), miR-10b i/lub pre-miR-10b (miR10bdz1-6), miR-15b i/lub pre-miR-15b (miR15bdz1-10, miR15brz5+, miR15brz6+), startery do reakcji PCR w czasie rzeczywistym w firmie GenoMed.

Tabela 1.5

DNAzomy stosowane do hydrolizy miR-21 i/lub pre-miR21, miR-10b i/lub pre-miR-10b oraz miR-15b i/lub pre-miR-15b. Podkreślono sekwencje rdzenia katalitycznego.

Nazwa	Sekwencja (5' → 3')	Typ	Specyficzność	Substrat
miR21dz1	CATCAGTT <u>TCCGAGCCGGACG</u> AATAAGC	DNAzym '8-17'	AG↓	pre-miR-21 miR-21
miR21dz2	CAGTCAAGGCTAGCTACAACGAATCAGTC	DNAzym '10-23'	GU↓	pre-miR-21 miR-21
miR21dz3	GATTCAAGGCTAGCTACAACGAAGTCAAC			pre-miR-21
miR21dz4	CCATCGAGGCTAGCTACAACGATGGTGT			pre-miR-21
miR21dz5	TGTCAGAGGCTAGCTACAACGAAGCCAT			pre-miR-21
miR10bdz1	GUUCUAGGCTAGCTACAACGAAGGGUA			DNAzym '10-23'
miR10bdz2	CGGTTT <u>TCCGAGCCGGACGA</u> ACAGGG	DNAzym '8-17'	AG↓	pre-miR-10b miR-10b
miR10bdz3	TGTGATCCGAGCCGGACGAATACGG			pre-miR-10b
miR10bdz4	CTGTGAGGCTAGCTACAACGATATACG	DNAzym '10-23'	GU↓	pre-miR-10b
miR10bdz5	TTCCCTCCGAGCCGGACGAAGAATC	DNAzym '8-17'	AG↓	pre-miR-10b
miR10bdz6	CATCGAGGCTAGCTACAACGACATATA	DNAzym	GU↓	pre-miR-10b

		'10-23'		
miR15bdz1	CAGTATCCGAGCCGGACGATTAAGG	DNAzym '8-17'	AG↓	pre-miR-15b
miR15bdz2	ACAGTAGGCTAGCTACAACGATTTAAG	DNAzym '10-23'	GU↓	pre-miR-15b
miR15bdz3	CTGCTAGGCTAGCTACAACGAAGTACT			pre-miR-15b
miR15bdz4	TGCTGTCCGAGCCGGACGAACAGTA	DNAzym '8-17'	AG↓	pre-miR-15b
miR15bdz5	ATGTGTCCGAGCCGGACGAGCTACA			pre-miR-15b
miR15bdz5+	CATGATGTGTCCGAGCCGGACGAGCTACA			miR-15b
miR15bdz6	TGTAAAGGCTAGCTACAACGACATGAT	DNAzym '10-23'	GU↓	pre-miR-15b
miR15bdz6+	TGTAAAGGCTAGCTACAACGACATGATGTGC			miR-15b
miR15bdz7	CTTGATCCGAGCCGGACGAGTAGCA	DNAzym '8-17'	AG↓	pre-miR-15b
miR15bdz8	TCTTGAGGCTAGCTACAACGATGTAGC	DNAzym '10-23'	GU↓	pre-miR-15b
miR15bdz9	CGCATCCGAGCCGGACGATGACTG	DNAzym '8-17'	AG↓	pre-miR-15b
miR15bdz10	AATTTTCCGAGCCGGACGAAGAGCA			pre-miR-15b

Tabela 1.6

Zestawienie pozostałych oligodeoksyrybonukleotydów stosowanych w pracy.

Nazwa	Sekwencja (5' → 3')	Charakterystyka
miR21-1	AATTCTGTGGGTAGCTTATCAGACTGATGTTG	Oligodeoksyrybonukleotydy zaprojektowane do otrzymania matrycy do syntezy pre-miR-21, do klonowania do pT7T3-18U
miR21-2	ACTGTTGAATCTCATGGCAACACCAGTCGATGGGCTGTCTGACAA	
miR21-3	AGCTTTGTGTCAGACAGCCATCGACTGGTGTTG	
miR21-4	CCATGAGATTCAACAGTCAACATCAGTCTGATAAGCTACCCGACAG	
miR10b-1	AATCCCAGAGGTTGTAACGTTGTCTATATATACCCGTAGAAC	Oligodeoksyrybonukleotydy zaprojektowane do otrzymania matrycy do syntezy pre-miR-10b, do klonowania do pT7T3-18U
miR10b-2	CGAATTTGTGTGGTATCCGTATAGTCACAGATTCGATTCTAGGGG	
miR10b-3	AATATATGGTGCATGCAAAAACCTCAA	
miR10b-4	AGCTTTGAAGTTTTTGCATCGACCATATATCCCTAGAAATCGA	
miR10b-5	ATCTGTGACTATACGGATACCACACAAATTCGGTTCTACAGGGT	
miR10b-6	ATATATAGACAACGTTACAACCTCTGGG	
miR15b-1	AATCTTGAGGCCTTAAAGTACTGTAGCAGCACATCATGGTTT	Oligodeoksyrybonukleotydy zaprojektowane do otrzymania matrycy do syntezy pre-miR-15b, do klonowania do pT7T3-18U
miR15b-2	ACATGCTACAGTCAAGATGCGAATCATTATTTGCTGCT	
miR15b-3	CTAGAAAATTTAAGGAAATTCATA	
miR15b-4	AGCTTATGAATTTCCCTTAAATTTCTAGAGCAGCAAATAATG	
miR15b-5	ATTCGCATCTTGACTGTAGCATGTAAACCATGATGTGCTG	
miR15b-6	CTACAGTACTTTAAGGCCCTCAAG	
miR21foHindIII	CGCAAGCTTATGTGTGGGTAGCT	Startery do PCR do syntezy sekwencji kodującej pre-miR-21, wprowadzające miejsce hydrolizy dla HindIII oraz BamHI
miR21reBamHI	CGAGGATCCTGTGTCAGACAGCCCAT	

miR10bfoHindIII	CACAAGCTTCCAGAGGTTGTAA	Startery do PCR do syntezy sekwencji kodującej pre-miR-10b, wprowadzające miejsce hydrolizy dla HindIII oraz BamHI
miR10breEcoRI	CGCGAATTCTGAAGTTTTTGCA	
miR15bfoHindIII	CACAAGCTTTGAGGCCTTAAAG	Startery do PCR do syntezy sekwencji kodującej pre-miR-15b, wprowadzające miejsce hydrolizy dla HindIII oraz BamHI
miR15breEcoRI	CGCGAATTCATGAATTTCTTA	
O1	GTCTGAT	Oligodeoksyrybonukleotydy komplementarne do różnych rejonów miR-21 i/lub pre-miR-21, stosowane w reakcji <i>in vitro</i> z RNazą H1
O2	CATCAG	
O3	AGTCA	
O4	TTCAAC	
O5	GAGATTC	
O6	ATGAGA	
O7	TGGTG	
O8	ATCGAC	
O9	GATAAGC	
O10	CAGTCTG	
O11	ATCATGTC	
O12	CAACATC	
T7start	TAATACGACTCACTATAGGG	Starter reakcji PCR używany do sekwencjonowania sekwencji wklonowanych do plazmidu pT7T3-18U
PrimEGFP	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	Starter do sekwencjonowania sekwencji wklonowanych do plazmidu pEGFP-N3
miR-21-fo	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	Startery do Real-Time PCR
miR-10b-fo	TACCCTGTAGAACCGAATTTGTG	
miR-15b-fo	TAGCAGCACATCATGGTTTACA	

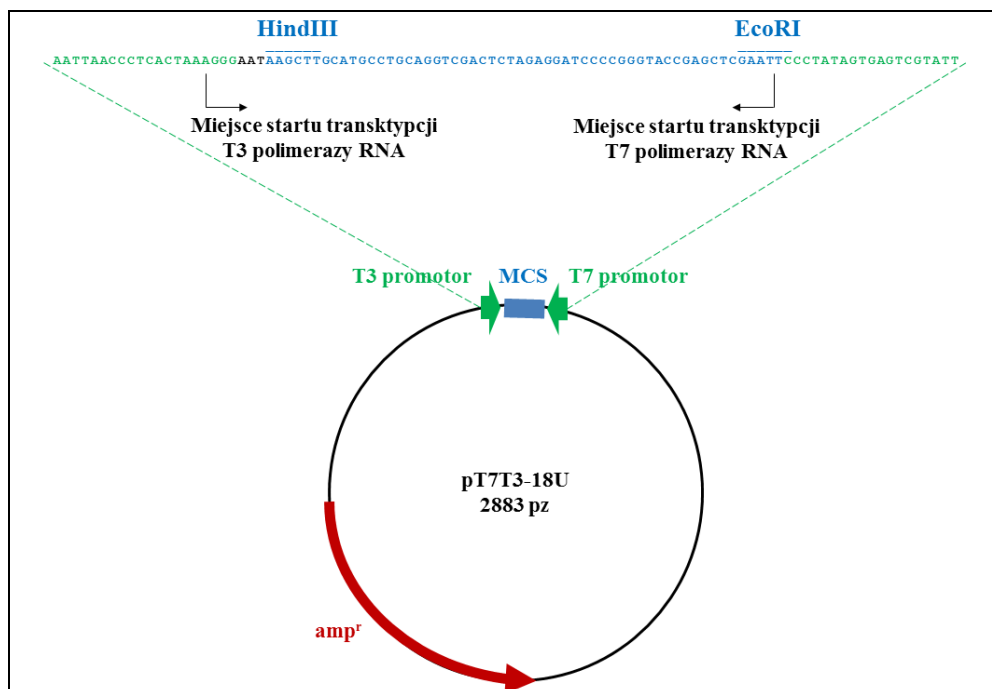
2. Wektory ekspresyjne

pT7T3-18U (Amersham Pharmacia Biotech)

Wektor plamidowy pT7T3-U18 zawiera promotory dla polimerazy T3 i T7 RNA polimerazy RNA oraz miejsce wielokrotnego klonowania (MCS, ang. Multiple Cloning Site) znajdujące się pomiędzy nimi (Rysunek 2.1). pT7T3-U18 jest wektorem wielokopijnym, powielanym w szczepach propagacyjnych, w obecności ampicyliny (50 $\mu\text{g/ml}$).

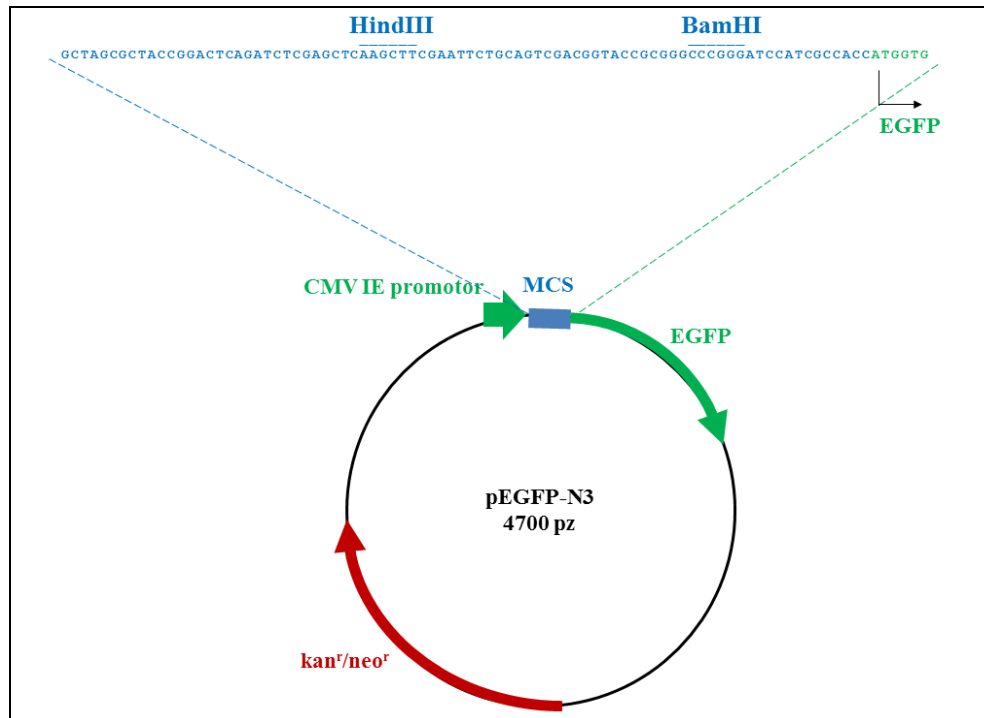
pEGFP-N3 (Clontech)

Wektor kodujący wariant białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. Green Fluorescent Protein) [195] pod kontrolą wczesnego promotora CMV (ang. Human Cytomegalovirus). Ulega wysokiej ekspresji w komórkach ssaków. Miejsce wielokrotnego klonowania (znajduje się pomiędzy promotorem CMV ($P_{CMV IE}$) a sekwencją kodującą EGFP (Rysunek 2.2). Geny wklonowane w MCS ulegają ekspresji razem z EGFP tworząc białko fuzyjne. Wektor pEGFP-N3 jest przystosowany do powielania w szczepie bakteryjnym *E. coli* DH5 α oraz T0P10 w obecności kanamycyny (30 $\mu\text{g/ml}$).



Rysunek 2.1

Mapa wektora pT7T3-18U oraz sekwencja T3 promotora, T7 promotora oraz miejsca wielokrotnego klonowania (MCS) z zaznaczonymi miejscami cięcia przez enzymy restrykcyjne, których użyto do klonowania sekwencji pre-miRNA do wektora. MCS – miejsce wielokrotnego klonowania, amp^r – gen oporności na ampicylinę.



Rysunek 2.2

Mapa wektora pEGFP-N3 oraz sekwencja MCS z zaznaczonymi miejscami cięcia przez enzymy restrykcyjne, których użyto do klonowania sekwencji pre-miRNA do wektora. MCS – miejsce wielokrotnego klonowania, EGFP – mutant GFPmut1 genu białka zielonej fluorescencji, kan^r/neo^r – gen oporności na kanamycynę i neomycynę.

3. Materiał biologiczny

3.1. Szczepy bakteryjne

Do propagacji wektorów ekspresyjnych użyto:

Escherichia coli **DH5a** (Invitrogen) – F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-

Escherichia coli **TOP10** (Invitrogen) - F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^-

3.2. Linie komórkowe

W badaniach wykorzystano linie:

- ludzkich komórek nabłonkowych z raka szyjki macicy **HeLa** (ATCC)
- ludzkich komórek wyprowadzone z glejaka wielopostaciowego: **T98G, U118** (ATCC)

3.3. Materiał ludzki

Tkanki guzów mózgu, obrzeży oraz płyn mózgowo-rdzeniowy pozyskano z Katedry i Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Fragmenty mózgu od denatów pozyskano z Zakładu Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Surowicę krwi ludzkiej zakupiono w Sigma (produkt nr H4522, human serum from human male AB plasma, sterile-filtered)

Materiał ludzki przechowywano w temperaturze -80 °C.

4. Przeciwciała

Przeciwciała I-rzędowe: monoklonalne przeciwciało anty-GFP, anty-PTEN, anty-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)

Przeciwciała II-rzędowe: anty-mysie IgG skoniugowane z biotyną (Sigma)

5. Pożywki, bufory i roztwory

Pożywka płynna LB

1 % baktotrypton

0.5 % ekstrakt drożdżowy

0.5 % NaCl

Sterylizowano przez autoklawowanie

Pożywka stała LB

1 % baktotrypton

0.5 % ekstrakt drożdżowy

0.5 % NaCl

1.5 % agar

Sterylizowano przez autoklawowanie

Pożywka SOC

2 % baktopepton

0.5 % ekstrakt drożdżowy

0.5 % NaCl

2.5 mM KCl

20 mM glukoza

SOC sterylizowano przez autoklawowanie. Glukozę dodawano po schłodzeniu roztworu do temperatury 50 °C.

Pożywki do hodowli linii komórkowych

RPMI-1640 Medium (Sigma)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma/ATCC)

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (ATCC)

OptiMEM (Invitrogen)

Pożywki uzupełnione były 10 % płodową surowicą bydlęcą (FBS), 1 % roztworem antybiotyków oraz 1 % mieszaniną witamin.

Bufor do elektroforezy kwasów nukleinowych 10x TBE pH 8.3

0.5 M Tris-HCl

0.5 M H₃BO₃

10 mM EDTA

Bufor obciążający 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA

25 mM cytrynian sodu pH 5.0

1 mM EDTA

7 M mocznik

0.1 % błękit bromofenolowy

0.1 % cyjanol ksylenowy

Bufory obciążający 6x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

30 % glicerol

0.25 % błękit bromofenolowy

0.25 % cyjanol ksylenowy

1x bufor TBE pH 8.3

Roztwór do barwienia kwasów nukleinowych w żelach PAA

40 % metanol

1 % kwas octowy

0.1 % błękit toluidynowy

Roztwór do barwienia białek w żelach PAA

50 % metanol

10 % kwas octowy

1.25 % błękit Coomassie Brilliant Blue

Roztwór odbarwiający po barwieniu białek z użyciem Coomassie Brilliant Blue w żelach PAA

10 % kwas octowy

40 % metanol

Bufor lizujący RIPA

1 % Nonidet P40
0.5 % deoksycholan sodu
50 mM Tris-HCl pH 7.5
150 mM NaCl
5 mM EDTA

Bufor obciążający do elektroforezy białek SBLU

62.5 mM Tris-HCl pH 8.3
5.9 M mocznik
2 % SDS
0.1 M DTT
0.05 % błękit bromofenolowy

Bufor obciążający do elektroforezy białek SBL

62.5 mM Tris-HCl pH 8.3
2 % SDS
0.1 M DTT
0.05 % błękit bromofenolowy

Bufor do elektrotransferu białek TOWBIM

25 mM Tris-HCl pH 8.3
192 mM glicyna
20 % metanol

Roztwór do hydrolizy alkalicznej RNA

50 mM NaOH
1 mM EDTA

Bufory do rybonukleazy T1

- I. 20 mM CH₃COONa pH 5.0
7 M mocznik
1 mM EDTA
- II. 100 mM Tris-HCl pH 7.5
10 mM EDTA
- III. 20 mM CH₃COONa pH 6.2
1 mM MgCl₂

Bufor do rybonukleazy V1

50 mM Tris-HCl pH 7.5
100 mM NaCl
10 mM MgCl₂

Bufor do nukleazy S1

50 mM CH₃COONa pH 4.5
28 mM NaCl
4.5 mM ZnSO₄

Bufor do rybonukleazy H

40 mM Tris-HCl pH 7.5
4 mM MgCl₂
0.1 mM DTT
20 mM KCl

Bufor do hybrydyzacji kwasów nukleinowych 5x stężony

20 mM Tris-HCl pH 7.5
50 mM NaCl

Bufor do ligacji 5x

250 mM Tris-HCl pH 7.5
50 mM MgCl₂
5 mM ATP
5 mM DTT
25 % PEG 8000

Bufor PBS

0.8 % NaCl
0.02 % KCl
0.144 % Na₂HPO₄
0.024 % KH₂PO₄, pH 7.4.

Bufory dostępne komercyjnie

Bufor do polimerazy Taq 10x stężony (Fermentas)
Bufor do EcoRI 10x stężony (Fermentas)
Bufor R 10x stężony (do HindIII, Fermentas)
Bufor do kinazy polinukleotydowej faga T4 10x stężony (Epicentre)
Bufor do transkrypcji T7 *in vitro* 10x stężony (Ambion)
Bufor do odwrotnej transkrypcji 5x stężony (Fermentas)
Bufor do Real-Time PCR (Agilent Technologies)
Bufor do ligazy RNA faga T4 10x stężony (New England Biolabs)
Bufor do ligazy DNA faga T4 10x stężony (Promega)

6. Metody izolacji, rozdziału, syntezy oraz analizy struktury i aktywności kwasów nukleinowych

6.1. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w denaturujących żelach poliakryloamidowych

Analizę elektroforetyczną oligonukleotydów DNA i RNA oraz transkryptów prowadzono w 10 % i 20 % żelach poliakryloamidowych z 7 M mocznikiem (Tabela 6.1) o wymiarach 20 cm x 40 cm, 30 cm x 40 cm, 38 cm x 45 cm i grubości 0.5 – 1 mm, przy napięciu 1000 V - 2000 V i natężeniu 5 – 35 mA w temperaturze pokojowej [196]. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TBE. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym do PAA w stosunku 1:1. Elektroforezę poprzedzano 30 min preelektroforezą.

Tabela 6.1
Skład denaturujących żeli poliakryloamidowych.

Składnik	10 %	20 %
40 % akryloamid/bisakryloamid (38:2)	25 ml	50 ml
mocznik	42 g	42 g
10x TBE	10 ml	10 ml
woda	do 100 ml	do 100 ml
10 % APS	700 µl	700 µl
TEMED	35 µl	35 µl

6.2. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Całkowity RNA izolowany z hodowli komórkowych lub produkty otrzymane metodą PCR analizowano w 1 %, 1.5 % lub 2 % żelach agarozowych o wymiarach 11 cm x 7 cm i grubości 0,5 cm w buforze 1x TBE [197] w obecności bromku etydyny lub barwnika SYBR[®] Safe DNA (Tabela 6.2). Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążano 1/6 objętości buforu do elektroforezy agarozowej. Rozdział prowadzono w buforze 1x TBE przy natężeniu prądu 50 – 80 mA w temperaturze pokojowej w obecności markerów wielkości DNA 1 kpz i 100 pz.

Tabela 6.2
Skład żeli agarozowych.

Składnik	1 %	2 %
Agaroza	0,5 g	1 g
1x bufor TBE	50 ml	50 ml
Bromek etydyny lub barwnik SYBR [®] Safe DNA	0.5 µg/ml	0.5 µg/ml

6.3. Identyfikacja kwasów nukleinowych w żelach i roztworach

RNA i DNA w żelach poliakryloamidowych identyfikowano w świetle UV [197] lub po barwieniu roztworem błękitu toluidyny. Znakowany radioaktywnie RNA analizowano za pomocą autoradiografii. Ekspozycję żeli prowadzono w temperaturze $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ stosując ekrany wzmacniające i błony rentgenowskie RTG-XS. Optymalny czas ekspozycji ustalano na podstawie pomiaru radioaktywności przy użyciu licznika scyntylicyjnego MicroBeta (Perkin Elmer) próbek poddawanych elektroforezie [197]. Poziom hydrolizy znakowanego materiału wyznaczano na podstawie pomiaru densytometrycznego przy użyciu urządzenia odwzorowującego FLA-5100 (FujiFilm) i oprogramowania MultiGauge v.3.0.

Kwasy nukleinowe w żelach agarazowych wybarwionych bromkiem etydydy lub SYBR[®] Safe DNA gel stain wizualizowano fluorescencyjnie przy wykorzystaniu systemu do dokumentacji żeli GelDoc-it Gel Imaging System (UVP).

Stężenie kwasów nukleinowych w próbkach oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali 260 nm z wykorzystaniem spektrofotometru Nanodrop Spectrophotometer 2000C, alternatywnie spektrofotometru BioPhotometr (Eppendorf).

Przeliczniki stosowane do obliczenia stężenia kwasów nukleinowych w roztworach:

ssRNA: 1 OD/ml = 40 $\mu\text{g/ml}$

ssDNA: 1 OD/ml = 33 $\mu\text{g/ml}$

dsDNA: 1 OD/ml = 50 $\mu\text{g/ml}$

6.4. Izolacja całkowitego RNA z hodowli komórkowych

Izolację całkowitego RNA prowadzono metodą z wykorzystaniem Trizolu zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Komórki z płytek 4- lub 24-dołkowych lizowano przy użyciu 500 μl Trizolu przez 5 min w temperaturze pokojowej. Uzyskane lizaty zbierano do 1.5 ml probówek, a następnie dodawano 100 μl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1), wytrząsano ręcznie przez 15 s i inkubowano 2 min w temperaturze pokojowej. W celu rozdzielenia faz próby wirowano 15 min w $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ przy 12 000 rpm. Fazę wodną przenoszono do nowej probówki. Zawarty w niej materiał RNA wytrącano przez dodanie 250 μl izopropanolu i 15 min inkubację w temperaturze pokojowej. Po tym czasie próby wirowano przez 10 min w $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ przy 12 000 rpm, supernatant usuwano, a uzyskany osad przemywano 500 μl 70 % etanolu

i wirowano jak poprzednio. Osad zawierający całkowity RNA suszono na powietrzu 5-10 min, a następnie rozpuszczono w 20 μ l sterylnej, dejonizowanej wody. Stężenie RNA oznaczano na podstawie pomiarów absorpcji przy długości fali 260 nm.

W przypadku hodowli na 6-dółkowych płytkach komórki lizowano stosując 1 ml Trizolu, a całkowity RNA izolowano zgodnie z procedurą opisaną powyżej zwiększając ilości stosowanych odczynników.

6.5. Izolacja całkowitego RNA z tkanek guza oraz obrzeży guza

Izolację całkowitego RNA prowadzono metodą z wykorzystaniem Trizolu zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Otrzymane RNA traktowano DNazą I (DNA-free DNase Treatment and Removal Reagent, Ambion) w celu usunięcia pozostałości DNA. Jakość otrzymanego RNA oceniano z użyciem bioanalyzera Agilent 2100 oraz zestawu RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Do dalszych analiz wykorzystano jedynie próby o współczynniku RIN (ang. RNA integrity number) >8.

6.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu odczynników RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej i poszczególne etapy reakcji przedstawiono w Tabeli 6.3. Matrycę stanowił całkowity RNA wyizolowany z hodowli komórkowych.

Tabela 6.3

Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki odwrotnej transkrypcji.

Nr etapu	Składnik	Ilość	Warunki
Etap I	Matryca (całkowity RNA)	1-2 μ g	5 min 70 °C, następnie inkubacja na lodzie 2 min
	Starter (random hexamer primer) 0.2 μ g/ μ l	1 μ l	
	Woda	do 12 μ l	
Etap II	Bufor reakcyjny 5x	4 μ l	5 min 25 °C
	Inhibitor RNaz (RNase Inhibitor RiboLock) 20 u/ μ l	1 μ l	
	dNTP mix 10 mM	2 μ l	
Etap III	Odwrotna transkryptaza (M-MuLV RT) 200 u/ μ l	1 μ l	10 min 25 °C, 1 h 42 °C
Denaturacja	-	-	10 min 70 °C
Przechowywanie	-	-	-20 °C

Uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji materiał DNA wykorzystywano jako matrycę do łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR).

6.7. Łańcuchowa reakcja polimeryzacji (PCR) w czasie rzeczywistym

Matrycę stanowił cDNA uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji. Wykonano analizę ilościową miRNA oraz ich prekursorów oraz normalizację względem 18S rRNA. Analizę ilościową przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej [198]. Każdą próbę cDNA analizowaną była trzykrotnie w termocyklerze LightCycler 480 System (Roche). Mieszaninę reakcyjną o objętości 25 μ l przygotowano z wykorzystaniem zestawu odczynników DyNAmo HS Sybr Green qPCR Kit (FINNZYMES) (Tabela 6.4). Do reakcji wykorzystano startery pozwalające na amplifikację fragmentu cDNA, w warunkach opisanych w Tabeli 6.5.

Krzywe standardowe uzyskano poprzez amplifikację serii pięciu rozcieńczeń cDNA (x1, x5, x25, x125, x625). Jakość uzyskanych produktów PCR sprawdzano poprzez analizę krzywych topnienia. W razie nieregularnego przebiegu krzywych przeprowadzano dodatkową analizę jakościową w żelu agarozowym.

Tabela 6.4

Skład mieszaniny do reakcji qPCR w objętości 25 μ l.

Składnik	Ilość
MasterMix (2x)	12.5 μ l
ROX (barwnik referencyjny)	0.25 μ l
Starter 1, starter 2	0.3 μ l (każdy)
Matryca cDNA	2 μ l
woda	Do 25 μ l

Tabela 6.5

Warunki prowadzonych reakcji qPCR.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba powtórzeń
Denaturacja wstępna	95 °C	10 min	1
Denaturacja	95 °C	15 s	40 – 50
Wiązanie starterów	57-62 °C	30 s	
Synteza	72 °C	30 s	
Oznaczanie krzywej topnienia	95 °C	1min	1
	55 °C	30 s	
	55-95 °C	0.1 °C/s	
	95 °C	30 s	

6.8. Analiza mikromacierzowa

6.8.1. Przygotowanie kolekcji tkanek oraz danych na potrzeby analizy mikromacierzowej

Tkanki złośliwych guzów mózgu oraz obrzeży guza pozyskano od 18 pacjentów Katedry i Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010-2011. Zebrano dane kliniczne dotyczące dawców oraz sklasyfikowano histopatologicznie tkanki pozyskane od pacjentów. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinowskiego w Poznaniu na wykorzystanie tkanek do badań. Tkanki były zamrażane bezpośrednio po ich resekcji.

Jako zdrową kontrolę do eksperymentów mikromacierzowych wykorzystano dostępne komercyjnie całkowite RNA ze zdrowych mózgów (FirstChoice® Human Brain Reference RNA, Ambion). Zgodnie z informacją dostawcy materiał pozyskano z tkanek pochodzących z różnych rejonów mózgu od wielu zdrowych dawców.

Dodatkowo wykorzystano profil miRNA zdrowego mózgu uzyskany z wykorzystaniem mikromacierzy, opublikowany w 2011 roku przez Hu oraz współpracowników [199], zdeponowany w bazie GEO (ang. the Gene Expression Omnibus database) pod numerem dostępu GSE26545. Wyniki własne porównywano z profilami miRNA otrzymanymi z użyciem mikromacierzy na platformie Agilent Technologies (Human miRNA Microarray 3.0) tkanek pochodzących z zakrętu czołowego górnego (ang. superior frontal gyrus) zdrowych dawców (GSM652746, GSM652747, GSM652748).

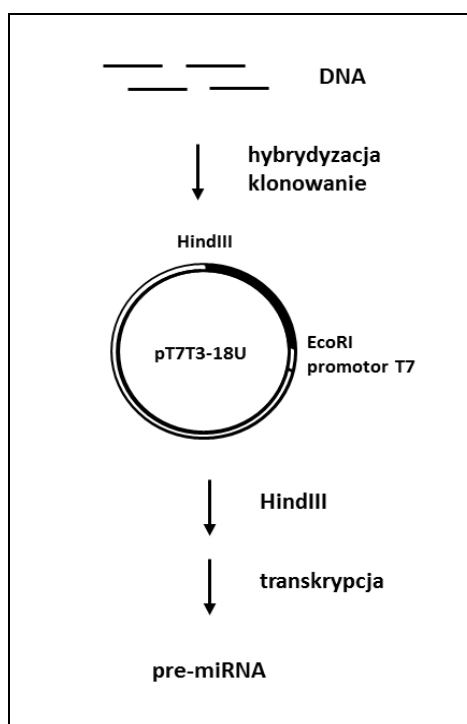
6.8.2. Analiza miRNA z użyciem mikromacierzy

Znakowanie miRNA oraz eksperyment mikromacierzowy został wykonany w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie zgodnie z procedurą rekomendowaną przez producenta mikromacierzy (Agilent Technologies). 100 ng RNA każdej z prób zostało poddane hybrydyzacji z płytką mikromacierzową (Agilent Human microRNA Microarray 14.0, 8x15K, G4471A, Agilent Technologies). Pojedyncze szkiełko zawierało 866 ludzkich oraz 89 wirusowych miRNA zdeponowanych w Sanger miRbase v14.0. Do analizy oraz wizualizacji wyników wykorzystano oprogramowanie GeneSpring GX (Agilent Technologies). Otrzymane dane pochodzące z 20 prób guzów mózgu oraz tkanek obrzeży guza analizowano łącznie z danymi zdeponowanych w bazie GEO (GEO GSM652746, GSM652747, GSM652748) pochodzącymi z eksperymentów mikromacierzowych uzyskanymi z wykorzystaniem RNA pochodzącego ze zdrowych mózgów. Każdemu punktowi przyporządkowano liczbę określającą natężenie fluorescencji. Uzyskane w ten sposób dane liczbowe poddawane zostały normalizacji lokalnej (w obrębie pojedynczej płytki), następnie globalnej (w obrębie wszystkich mikromacierzy składających się na eksperyment). Sprawdzone jakość mikromacierzy aby wykluczyć ewentualne defekty techniczne. Najpierw odrzucono miRNA niedające sygnału w co najmniej 60 % badanych prób, następnie miRNA nie dające sygnału w 50 % prób pomniejszonego zbioru elementów. Wstępna normalizacja pozwoliła zredukować liczbę miRNA do 303. Na zredukowanym zestawie miRNA przeprowadzono analizę różnicową ekspresji z wykorzystaniem pakietu R/Bioconductor limma [200], zastosowano korekcję Benjamini-Hochberg (FDR). Za punkt odcięcia (ang. p-value) przyjęto wartość 0.05. Oznacza to, że istnieje mniej niż 5 % szans, że obserwowany wynik może być przypadkowy.

Analizę funkcjonalną wykonano z użyciem IPA (ang. Ingenuity Pathway Analysis, <http://www.ingenuity.com>). Jej celem było porównanie wyników własnych z wynikami wcześniejszych eksperymentów profilowania miRNA w guzach glejowych mózgu oraz przygotowanie interpretacji biologicznej uzyskanego profilu ekspresji miRNA w guzach mózgu poprzez skorelowanie poziomu poszczególnych miRNA z ich targetami oraz patologicznymi zmianami typowymi dla tego typu nowotworów.

6.9. Synteza RNA

RNA (miRNA, pre-miRNA oraz rybozomy) zostały zsyntetyzowane zgodnie ze standardową procedurą syntezy oligonukleotydów RNA przez firmę IBA oraz FutureSynthesis. Pre-miRNA otrzymano dodatkowo w reakcji odwrotnej transkrypcji, w której jako matrycę użyto zliniowany z użyciem enzymu HindIII wektor pT7T3-18U zawierający sekwencję pre-miRNA. Wektory przygotowano przez klonowanie dsDNA poszczególnych pre-mRNA, przygotowanych przez kinazowanie a następnie hybrydyzację oligodeoksyrybonukleotydów, do zliniowanego z użyciem HindIII oraz EcoRI wektora pT7T3-18U. Schemat otrzymania pre-miRNA przedstawia Rysunek 6.1.



Rysunek 6.1

Schemat otrzymania pre-miRNA.

6.10. Znakowanie RNA oraz DNA

6.10.1. Znakowanie przy końcu 5'

Radioizotopowe znakowanie polegało na fosforylacji grupy hydroksylowej przy końcu 5' kwasów nukleinowych [196]. Mieszaninę reakcyjną (Tabela 6.6) inkubowano 45 min w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu reakcji, znakowany RNA/DNA rozdzielano w 10 % żelu poliakrylamidowym, a następnie identyfikowano przy pomocy autoradiografii. Radioaktywne pasma żelu wycinano a kwasy nukleinowe wymywano z

żelu wodą lub buforem do elucji, w 4 °C przez 16 h. Po elucji RNA/DNA strącano 2.5 objętościami 96 % etanolu i 1/10 objętości octanu sodu, pH 5.2 (dla RNA) lub pH 4.8 (dla DNA) [201]. Alternatywnie RNA/DNA po znakowaniu oczyszczano na kolumnie wypełnionej złożem Sephadex G50. Jakość otrzymanego w ten sposób RNA/DNA oceniano na 10 % PAA. Ilość radioaktywnego RNA/DNA mierzono przy wykorzystaniu licznika scyntylicyjnego MicroBeta (Perkin Elmer) i wyrażano w ilości rozpadów promieniotwórczych na minutę (ang. counts per minute, cpm).

Tabela 6.6

Skład buforu do znakowania kwasów nukleinowych przy końcu 5'.

Składnik	Ilość
RNA/DNA	1 µg
Kinaza polinukleotydowa faga T4	3 u
Bufor do kinazy 10x	1 µl
[γ - ³² P] ATP (3000 Ci/mmol)	50 µCi
H ₂ O	do 10 µl

6.10.2. Znakowanie przy końcu 3'

Znakowanie kwasów nukleinowych przy końcu 3' przeprowadzono dwuetapowo. Najpierw otrzymano znakowany izotopem [³²P] w pozycji 5' 5',3'-difosforan cytydyny ([5'-³²P]pCp). Mieszaninę reakcyjną (Tabela 6.7) inkubowano 45 min w temperaturze 37 °C. Następnie inaktywowano enzym przez ogrzanie prób przez 5 min w temperaturze 65 °C. W drugim etapie przeprowadzono znakowanie RNA/DNA z wykorzystaniem ligazy RNA faga T4. Mieszaninę reakcyjną (Tabela 6.8) inkubowano 16 h w temperaturze 4 °C.

Tabela 6.7

Skład buforu do znakowania kwasów nukleinowych przy końcu 3' – otrzymanie [5'-³²P]pCp.

Składnik	Ilość
Cp	100 pmoli
Kinaza polinukleotydowa T4	2 u
Bufor do kinazy 10x	0.6 µl
[γ - ³² P] ATP (3 000 Ci/mmol)	30 µCi
H ₂ O	do 6 µl

Tabela 6.8

Skład buforu do znakowania kwasów nukleinowych przy końcu 3' – ligacja [5'-³²P]pCp i RNA/DNA.

Składnik	Ilość
RNA	1 µg
[5'- ³² P]pCp (z etapu I)	6 µl
ATP	25 µM
ligaza RNA/DNA faga T4	2 u
Bufor do ligazy 10x	1 µl
H ₂ O	do 10 µl

Po zakończeniu reakcji, kwasy nukleinowe rozdzielano w 10 % żelu PAA, a następnie eluowano, strącano i analizowano zgodnie z procedurami opisanymi powyżej. Alternatywnie RNA/DNA po znakowaniu oczyszczano na kolumnie wypełnionej złożem Sephadex G-50.

6.11. Analiza struktury miRNA oraz ich prekursorów

6.11.1. Mapowanie enzymatyczne struktury RNA

6.11.1.1. Ograniczona hydroliza RNA z użyciem specyficznych rybonukleaz

RNA znakowany przy końcu 3' oraz 5' (30 000 cpm) poddawano kontrolowanej hydrolizie z udziałem specyficznych nukleaz: RNazy T1, RNazy V1 oraz nukleazy S1 w obecności nieznakowanego RNA (Tabela 6.9). W Tabeli 6.10 przedstawiono wykaz enzymów stosowanych w poszczególnych reakcjach, źródła ich pochodzenia, specyficzność działania oraz warunki reakcji. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 10 µl buforu obciążającego 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20 % żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Jako kontrole wykorzystywano RNA w wodzie oraz w buforach bez enzymu, a także RNA poddany hydrolizie alkalicznej.

Tabela 6.9

Skład mieszanin reakcyjnych do hydrolizy enzymatycznej RNA.

Składnik	Hydroliza z użyciem RNazy T1			Hydroliza z użyciem RNazy V1	Hydroliza z użyciem nukleazy S1
	warunki denaturujące (D)	warunki natywne (N1)	warunki natywne (N2)		
[³² P] RNA	30 000 cpm	30 000 cpm	30 000 cpm	30 000 cpm	30 000 cpm
RNA	10 nM	10 nM	10 nM	10 nM	10 nM
Enzym	RNaza T1 0.025 u/μl	RNaza T1 0.01 u/μl 0.025 u/μl 0.05 u/μl	RNaza T1 0.01 u/μl 0.025 u/μl 0.05 u/μl	RNaza V1 0.03125 u/μl 0.0625 u/μl 0.125 u/μl 0.2 u/μl	Nukleaza S1 0.0011875 u/μl 0.002375 u/μl 0.00475 u/μl 0.0095 u/μl
Bufor	Bufor T1 (D)*	Bufor T1 (N1)*	Bufor T1 (N2)*	Bufor V1*	Bufor S1*

*skład buforów:

Bufor T1 (D): 20 mM CH₃COONa pH 5.0, 7 M mocznik, 1 mM EDTA

Bufor T1 (N1): 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA

Bufor T1 (N2): 20 mM CH₃COONa pH 6.2, 1 mM MgCl₂Bufor V1: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂Bufor S1: 50 mM CH₃COONa pH 4.5, 28 mM NaCl, 4.5 mM ZnSO₄**Tabela 6.10**

Wykaz enzymów stosowanych w reakcjach hydrolizy enzymatycznej RNA.

Enzym	Pochodzenie	Specyficzność	Warunki reakcji
RNaza T1	<i>Aspergillus oryzae</i>	Gp ↓ N	55 °C, 20 min, bufor T1(D)* 25 °C, 15 min, bufor T1(N1)* 20 °C, 15 min, bufor T1(N2)*
RNaza V1	<i>Aspergillus oryzae</i>	N ↓ pN w odcinkach jednoniciowych	37 °C, 30 min, bufor V1*
Nukleaza S1	Jad kobry <i>Naja naja oziata</i>	N ↓ pN w odcinkach dwuniciowych	25 °C, 15 min, bufor S1*

*skład buforów jak w Tabeli 6.9.

6.11.1.2. Hydroliza RNA z użyciem RNazy H1 w obecności oligodeosyrybonukleotydów

RNA (10 nM) oraz 30 000 cpm [³²P]RNA znakowanego przy końcu 5' inkubowano z 1.25-, 2.5-, 5- i 10- krotnym nadmiarem odpowiednich oligodeosyrybonukleotydów komplementarnych do różnych rejonów miRNA oraz ich prekursorów. Sekwencje oligodeosyrybonukleotydów przedstawiono w Tabeli 1.6. Reakcję prowadzono w buforze: 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 40 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 1 mM DTT, w obecności 0.4 u RNazy H1 *E. coli*, w objętości 10 μl, w 37 °C, przez 10 min. W celu zahamowania

reakcji dodawano 2 μ l 0.5 M EDTA, a następnie próby denaturowano w 65 °C przez 3 min i umieszczano na lodzie [202]. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20 % żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Jako kontrole wykorzystywano RNA w wodzie oraz buforze, a także RNA poddany hydrolizie alkalicznej i enzymatycznej przy użyciu rybonukleazy T1.

6.11.2. Mapowanie chemiczne struktury RNA

6.11.2.1. Hydroliza alkaliczna RNA

RNA znakowany przy końcu 3' lub 5' (60 000 cpm) w obecności 10 nM nieznakowanego RNA poddawano hydrolizie w warunkach alkalicznych. Reakcja przebiegała w temperaturze 95 °C przez 2 minuty w 50 mM NaOH oraz 10 mM EDTA. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 10 μ l buforu obciążającego 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20 % żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Jako kontrolę wykorzystano RNA w wodzie.

6.11.2.2. Hydroliza RNA indukowana jonami ołowiu

RNA znakowany przy końcu 3' lub 5' (30 000 cpm) poddawano hydrolizie indukowanej jonami ołowiu. Reakcja przebiegała w temperaturze 25 °C przez 15 min w obecności 10 nM nieznakowanego RNA w 50 mM Tris-HCl pH 7.5 z różnym stężeniem ołowiu: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1 mM. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 10 μ l buforu obciążającego 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA. Produkty hydrolizy rozdzielano w 20 % żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Jako kontrolę wykorzystywano RNA w wodzie oraz RNA w 50 mM Tris-HCl pH 7.5, a także RNA poddany hydrolizie alkalicznej jak i enzymatycznej z użyciem rybonukleazy T1.

6.11.3. Analiza struktury RNA z wykorzystaniem metod spektroskopowych

6.11.3.1. Wyznaczanie krzywych topnienia RNA z zastosowaniem spektroskopii

UV/Vis

Pomiary trwałości termodynamicznej cząsteczek RNA prowadzono w świetle UV przy długości fali 260 nm. RNA przygotowano w 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 6.6. Zakres temperatur zawierał się w granicach od 5 °C do 85 °C, a szybkość zmian temperatury wynosiła 0.5 °C/min. Pomiar absorbancji następował co pół minuty z użyciem spektropolarymetru Jasco V-

650. Krzywe topnienia oraz parametry termodynamiczne (entalpię, entropię oraz energię swobodną) analizowano z użyciem oprogramowania MeltWin 3.5.

6.11.3.2. Widma dichroizmu kołowego

Widma dichroizmu kołowego (CD) zostały wykonane na spektropolarymetrze Jasco J-815. Widma wykonano w trzech powtórzeniach. Do pomiaru (zakres fal o długości 200-350 nm, pomiar co 0.5 nm, 4 zliczenia) stosowano próbki RNA, których absorbcja wynosiła pomiędzy 0.3-1.0. Próby były topione oraz mierzone w 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.1 mM Na₂EDTA, pH 6.6.

Widma CD zostały znormalizowane zgodnie ze wzorem:

$$\Delta\varepsilon = \theta / (32.980 \text{ CLN})$$

$$A = \varepsilon \text{CL}$$

$$\Delta\varepsilon = \theta\varepsilon / (32.980 \text{ AN})$$

$\Delta\varepsilon$ – molowa różnica absorpcji [$\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$]

θ – pierwotna amplituda CD [mdeg]

C – stężenie próbki [mol/l]

L - grubość kuwety [cm]

N - liczba nukleotydów w RNA

Krzywe zależności temperatury topnienia mierzono przy długości fali 260 nm, przy szybkości ogrzewania 0.5 ° C/min od 10 do 75 °C z użyciem spektropolarymetru Jasco V-650. Widma analizowano za pomocą oprogramowania Origin 8.

6.11.3.3. Analiza RNA z użyciem metod spektroskopii NMR

Widma NMR przedstawione w pracy zostały wykonane na spektrometrze Bruker AVANCE III 700 wyposażonym w QCI CryoProbe. Widma były procesowane za pomocą programu TOPSPIN 3.1 (Bruker Biospin) oraz analizowane z użyciem takich programów jak Cara, czy Felix. Pomiarów dokonywano w 3 mm kuwetach, w objętości próby 220 μl . RNA (0.026 – 0.75 mM) przygotowano w 150 mM NaCl, 10 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA. Przed analizą RNA denaturowano w 90 °C przez 5 min, a następnie powoli schładzano do 4 °C.

Widma ^1H NMR

Zależność jednowymiarowych widm ^1H NMR w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v/v) od temperatury badano w różnych zakresach temperatur w zależności od próbki. Najszerszy zakres obejmował temperatury od 2 °C do 45 °C.

Widma 2D NMR

Dwuwymiarowe widma 2D NOESY w $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1, v/v) wykonano w temperaturze 15 °C z czasem mieszania (ang. mixing time) 150 ms z zastosowaniem sekwencji impulsów WATERGATE do tłumienia sygnału wody. Widma 2D ^1H - ^{15}N HSQC wykonano w temperaturze 7 °C oraz 15 °C z czasem mieszania 150 ms. Widma były analizowane z użyciem oprogramowanie TopSpin 3.0 Bruker Software.

6.11.4. Przewidywanie struktury drugorzędowej oraz trzeciorzędowej RNA

Analizę struktury II-rzędowej miRNA oraz ich prekursorów przeprowadzono z użyciem narzędzia RNAMetaServer (<http://iimcb.genesilico.pl/rnametaserver>), dającego dostęp do 30 programów do przewidywania struktury RNA. Energię zwijania spinek miRNA w 37 °C oraz 1 M NaCl wyznaczono korzystając z Mfold v.3.5 (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>). Struktury III-rzędowe miRNA oraz ich prekursorów wymodelowano z użyciem RNAComposer (<http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl>) [194], zwizualizowano z Jmol v.12.2.15 (<http://www.jmol.org>).

6.11.5. Przygotowanie biblioteki sekwencji miRNA

Sekwencje miRNA pobrano z bazy miRBASE v.19 (17.10.2012), a następnie spośród nich wyselekcjonowano te, które są unikalne. Usunięto te, które figurują w bazie pod różnymi nazwami, ale mają identyczne sekwencje. W efekcie uzyskano bibliotekę składającą się z 2042 sekwencji ludzkich miRNA.

6.11.6. Wyznaczanie równowagi spinki do włosów i dupleksów poszczególnych miRNA

Struktury o najniższej energii, struktury suboptymalne, energie potencjalnych homo- i heteroduplexów RNA oraz stężenia miRNA przy których spinki do włosów oraz dupleksy miR-21, miR-93 oraz miR-296 występują w równowadze wyznaczono z użyciem RNACofold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNACofold.cgi>) [203, 204].

Udział spinek do włosów i dupleksów miRNA w całkowitej puli miRNA przy określonych stężeniach miRNA wyznaczono z krzywych zależności dimeryzacji miRNA od ich stężenia otrzymanych z wykorzystaniem RNAcofold.

6.11.7. Określenie trwałości miRNA w lizatach z GBM

miR-21, miR-93 oraz miR-296 inkubowano w lizacie otrzymanym z GBM o stężeniu białek 0.01 mg/ml, w 37 °C, przez 15, 30, 60, 120 oraz 180 min, w przypadku miR-296 dodatkowo przez 8, 15, 24 and 40 h. Reakcje zatrzymywano przez umieszczenie prób w lodzie i dodanie buforu obciążającego 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA w stosunku 1:1. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 20 % denaturującym żelu PAA w buforze 1x TBE w temperaturze pokojowej. Okresy półtrwania poszczególnych miRNA w lizacie z GBM obliczono z użyciem GraphPad Prism.

6.11.8. Analiza kompleksów miRNA-białko

Analizowano zdolność miRNA (miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b, miR-15b) oraz pre-miR-21 do tworzenia kompleksów z białkami lizatów otrzymanych z GBM oraz z komórek T98G. Reakcje prowadzono w obecności inhibitora RNaz, wg schematu przedstawionego w Tabeli 6.11, w buforach wskazanych w Tabeli 6.12.

Tabela 6.11

Skład mieszaniny reakcyjnej podczas badania kompleksów miRNA-białko.

Składnik	Ilość
[³² P] miRNA/pre-miRNA	10 000 cpm
miRNA/pre-miRNA	10 nM
tRNA	1 µg
Bufor do wiązania	Zgodnie z Tabela 6.12

Tabela 6.12

Wykaz oraz skład buforów stosowanych podczas badania kompleksów miRNA-białko.

Bufor	Skład
A	50 mM Hepes pH 7.0, 750 mM NaCl, 50 mM DTT, 50 mM EDTA, 5 % Triton X-100
B	500 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 250 mM KCl, 25 mM MgCl ₂
T1 (N1)	100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA
T1 (N2)	20 mM CH ₃ COONa pH 6.2, 1 mM MgCl ₂
V1	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂
S1	50 mM CH ₃ COONa pH 4.5, 28 mM NaCl, 4.5 mM ZnSO ₄

Inkubację prowadzono w objętości 10 µl przez 40 min w 4 °C lub alternatywnie w temperaturze pokojowej. Wyniki analizowano w 10 % natywnym żelu PAA. Żele poddawano autoradiografii.

6.12. Analiza aktywności katalitycznych kwasów nukleinowych

6.12.1. Projektowanie rybozymów typu hammerhead oraz DNAzymów anty-miRNA

W obrębie sekwencji miRNA oraz pre-miRNA wytypowano potencjalne miejsca hydrolizy z użyciem rybozymów typu hammerhead (AUC, GUC, GUA) oraz DNAzymów '8-17' (AG) i '10-23' (GU). Następnie zaprojektowano po trzy rybozomy typu hammerhead odpowiednio dla pre-miR-21 (miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3), pre-miR-10b (miR10brz1, miR10brz2, miR10brz3) oraz pre-miR-15b (miR15brz1, miR15brz2, miR15brz3). Rybozomy miR21rz1, miR10brz1 oraz miR15brz1 zaprojektowano w ten sposób aby rozpoznawały również dojrzałe miRNA, odpowiednio miR-21, miR-10b oraz miR-15b. Zaprojektowano również dodatkowy wariant rybozomu miR21rz1 mianowicie miR21rz1_TLR. Przy końcu 5' rybozomu dołączono fragment RNA zawierający motyw receptora dla czteronukleotydu pętli GAAA, która jest częścią 'standardowego' minimalnego rybozomu i stanowi wysoce specyficzny element trzeciorzędowej struktury rybozomu. Dodatkowo zaprojektowano rybozomy miR21rz1_mut, miR10brz1_mut posiadające mutacje punktowe w obrębie rdzenia katalitycznego znoszące aktywność rybozymów odpowiednio miR21rz1 oraz miR10brz1.

Dla pre-miR-21, pre-miR-10b oraz pre-miR-15b zaprojektowano również DNAzomy '8-17' oraz '10-23'. Część z nich (miR21dz1, miR21dz2, miR10bdz1, miR10bdz2, miR15bdz5, miR15bdz6) rozpoznaje zarówno pre-miRNA jak i ich formy dojrzałe.

34 nt sekwencja rybozymów obejmuje 22 nt rdzeń katalityczny o sekwencji 5'-CUGAUGAGCCGAAAGGCCGAA-3' oraz zlokalizowane po obu stronach sześcienukleotydu ramiona o sekwencjach komplementarnych do rejonu w obrębie dojrzałych miR-21, miR-10b, miR-15b i/lub ich prekursorów. 28 nt sekwencja DNAzymów '8-17' obejmuje 14 nt rdzeń katalityczny o sekwencji 5'-TCCGAGCCGGACGA-3', 29 nt sekwencja DNAzymów '10-23' obejmuje 15 nt rdzeń katalityczny o sekwencji 5'-GGCTAGCTACAACGA-3'. W obu grupach DNAzymów,

rdzeń katalityczny graniczy z siedmionukleotydowymi ramionami o sekwencjach komplementarnych do rejonu w obrębie miRNA i/lub ich prekursorów. Zaprojektowano również DNAzyny o wydłużonych ramionach (miR15bdz5+, miR15bdz6+). Sekwencję rybozymów i DNAzymów oraz ich specyficzność przedstawiono odpowiednio w Tabelach 1.4 i 1.5.

6.12.2. Analiza aktywności rybozymów oraz DNAzymów *in vitro*

Aktywność katalityczna rybozymów typu hammerhead oraz DNAzymów '8-17' i '10-23' badana była w różnych warunkach reakcji w obecności radioizotopowo znakowanego substratu miRNA lub pre-miRNA. Reakcję prowadzono w 50 mM buforze Tris-HCl pH 7.5. Pozostałe składniki i czasy reakcji dobierano w zależności od badanych czynników fizyko-chemicznych. Mieszaniny reakcyjne zawierające substrat oraz odpowiedni rybozym lub DNAzym poddawano 2 minutowej denaturacji w 85 °C a następnie schładzano do temperatury 37 °C w termomikserze z prędkością 2 °C/min lub w łaźni wodnej z prędkością 0.5 °C/min. Reakcję hydrolizy indukowano poprzez dodanie MgCl₂ w ilości zapewniającej odpowiednie stężenie końcowe. Hydrolizę zatrzymywano przez umieszczenie prób w lodzie i dodanie buforu obciążającego 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA w stosunku 1:1. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 20 % denaturującym żelu PAA w buforze 1x TBE w temperaturze pokojowej.

6.12.2.1. Wpływ stężenia jonów magnezu na aktywność rybozymów i DNAzymów

Wpływ stężenia MgCl₂ na aktywność hydrolityczną rybozymów oraz DNAzymów badano w mieszaninie reakcyjnej o objętości 10 µl zawierającej 10 nM miRNA lub pre-miRNA, 30 000 cpm odpowiedniego znakowanego przy końcu 5' substratu oraz 100 nM rybozymu lub DNAzymu, w 37 °C przez 30 min lub 16 h, odpowiednio w przypadku miRNA i pre-miRNA. Reakcję indukowano przez dodanie MgCl₂ w ilości zapewniającej stężenie końcowe 0, 0.5, 1, 5, 10 oraz 25 mM. Pozostałe warunki reakcji oraz rozdziału prób po reakcji były zgodne z opisem podanym powyżej.

6.12.2.2. Wpływ stężenia katalitycznych kwasów nukleinowych na reakcję hydrolizy miRNA i pre-miRNA

W reakcjach użyto stałe 10 nM stężenie miRNA lub pre-miRNA w obecności 30 000 cpm odpowiedniego znakowanego przy końcu 5' substratu oraz rosnące stężenia rybozymów i DNAzymów: 31.25, 62.5, 125, 250, 500 nM. Reakcje prowadzono przez

30 min lub 16 h, odpowiednio w przypadku miRNA i pre-miRNA, w temperaturze 37 °C w obecności 10 mM chlorku magnezu. Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 10 µl. Pozostałe etapy przeprowadzono zgodnie z opisem podanym powyżej

6.12.2.3. Wpływ warunków denaturacji i renaturacji na wydajność hydrolizy RNA przez rybozomy oraz DNAzomy

Reakcje prowadzono w stałym stężeniu rybozomu miR21rz1/DNAzemu miR21dz3 (250 nM), pre-miR21 (10 nM) w obecności 30 000 cpm [³²P]pre-miR-21, stałym stężeniu Mg²⁺ (10 mM), 50 mM Tris-HCl pH 7.5, w 10 µl, w 37 °C przez 15 h. Analizowano wpływ różnych warunków denaturacji, renaturacji oraz momentu zainicjowania reakcji przez dodanie jonów magnezu na wydajność hydrolizy pre-miR-21 przez kwasy nukleinowe. Zastosowane następujące warianty reakcji:

1 – pre-miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) oddzielnie, połączono po schłodzeniu do 37 °C, następnie suplementowano MgCl₂;

2 - pre-miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) łącznie, schłodzono do 37 °C, następnie suplementowano MgCl₂;

3 - pre-miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) oddzielnie w obecności Mg²⁺, po schłodzeniu do 37 °C próby połączono i inkubowano dalej w 37 °C;

4 - pre-miR-21 oraz rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) łącznie w obecności MgCl₂, następnie schłodzono do 37 °C;

5 i 6 – próby niedenaturowane, suplementowane (5) bądź niesuplementowane (6) MgCl₂;

7 - pre-miR-21 oraz rybozym/DNAzym denaturowane (85 °C, 3 min) łącznie, niesuplementowane MgCl₂;

8 - pre-miR-21 (bez dodatku rybozym/DNAzemu) denaturowany (85 °C, 3 min), po schłodzeniu do 37 °C suplementowany MgCl₂.

Hydrolizę zatrzymywano przez umieszczenie prób w lodzie i dodanie buforu obciążającego 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA w stosunku 1:1. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 20 % denaturującym żelu PAA w buforze 1x TBE w temperaturze pokojowej.

6.12.2.4. Wpływ stłoczenia cząsteczkowego oraz obecność jonów

jednowartościowych na wydajność hydrolizy pre-miR-21 przez rybozomy

W celu oceny przebiegu reakcji w obecności jonów jednowartościowych lub czynników imitujących stłoczenie wewnątrzkomórkowe (ang. molecular crowding), reakcje prowadzono w stałym stężeniu pre-miR-21 (10 nM), w obecności 30 000 cpm [³²P]pre-miR-21 RNA, stałym stężeniu rybozomu miR21rz3 (250 nM), w 50 mM Tris-HCl, pH 7.5., w obecności 16 % PEG 200, 16 % PEG 400, 16 % PEG 3350, 16 % PEG 4000, 40 mM spermina, 40 mM spermidyny lub 5 % MPD. Mieszaniny reakcyjne poddawano 3 minutowej denaturacji w 85 °C a następnie schładzano do temperatury 37 °C w termomikserze z prędkością 2 °C/min. Reakcje indukowano przez suplementację mieszaniny reakcyjnej MgCl₂ do stężenia 10 mM, zamiennie 10 mM NaCl, 10 mM NH₄Cl, 10 mM LiCl. Reakcje prowadzono przez 16 h, w temperaturze 37 °C. Stosowano również zamiennie zamiast buforu Tris-HCl 20 mM kakodylan sodu, pH 5.5, a także dodatek 10 mM heksaaminy kobaltu. Reakcje bez jonów Mg²⁺ oraz bez rybozomu traktowano jako reakcje kontrolne. Reakcje zatrzymywano przez umieszczenie prób w lodzie i dodanie buforu obciążającego 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA w stosunku 1:1. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 20 % denaturującym żelu PAA w buforze 1x TBE w temperaturze pokojowej.

6.12.3. Analiza aktywności rybozymów w środowisku komórkowym z

wykorzystaniem układu reporterowego opartego na białku EGFP

Do określenia wydajności hydrolizy pre-miR-21 z użyciem zaprojektowanych rybozymów, w liniach komórkowych, wykorzystano system reporterowy oparty na białku zielonej fluorescencji (GFP). Do wektora pEGFP-N3 (BD Biosciences Clontech), pod promotorem cytomegalowirusa (CMV), w ramce odczytu dla białka EGFP wklonowano sekwencję kodującą pre-miR-21. Hodowlę linii komórkowej HeLa lub T98G prowadzono na szalkach 24 dołkowych, w pożywce odpowiednio RPMI-1640 (Sigma) lub EMEM (ATCC) suplementowanej 10 % FBS (Gibco), 1 % mieszaniną witamin i 1 % mieszaniną antybiotyków (Sigma), w 37 °C, w 5 % CO₂. Po osiągnięciu 70 % konfluencji linię transfekowano plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję pre-miR-21 (0.8 µg/dołek) oraz katalitycznymi kwasami nukleinowymi, w ilościach pozwalających na osiągnięcie następujących stężeń końcowych w pożywce: 31.25, 62.5, 125, 250 nM. Kwasy nukleinowe wprowadzane były do komórek z

wykorzystaniem Lipofektaminy 2000 (Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Przed transfekcją komórki przemywano buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki. Wydajność hydrolizy transkryptów zawierających sekwencję pre-miR21 oraz mRNA białka EGFP z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych oceniono 24 h od transfekcji na podstawie obserwacji linii komórkowej z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Leica, pomiaru fluorescencji białka EGFP z użyciem Multi-mode Microplate Reader BioTek Synergy2 oraz poziomu białka EGFP na podstawie analizy Western blot. Hydroliza mRNA w obrębie sekwencji pre-miR-21 uniemożliwia syntezę białka EGFP. W efekcie obserwujemy obniżony poziom tego białka oraz spadek fluorescencji w komórkach traktowanych rybozymem w stosunku do kontroli bez rybozymu. Komórki transfekowane jedynie plazmidem, a także traktowane równocześnie plazmidem oraz plazmidem i rybozymem niewykazującym komplementarności do pre-miR-21 (TARrz) traktowano jako kontrole.

6.12.4. Wpływ rybozymów oraz DNazymów na endogenną pulę miRNA oraz pre-miRNA w liniach komórkowych

Hodowlę linii komórkowej T98G prowadzono na szalkach 24 dołkowych w pożywce EMEM (ATCC) suplementowanej 10 % FBS (Gibco), 1 % witaminami i 1 % antybiotykami (ATCC), w 37 °C, w 5 % CO₂. Po osiągnięciu 70 % konfluencji komórki transfekowano z użyciem rybozymów i DNazymów w ilości zapewniającej 100 nM stężenie końcowe (w 200 µl pożywki). Kwasy nukleinowe wprowadzane były do komórek z wykorzystaniem Lipofectaminy 2000 (Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Przed transfekcją komórki przemywano buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki EMEM. Po 24 h od transfekcji izolowano RNA z użyciem TRI Reagent® (Molecular Research Center). Próby traktowano DNA-free™ Kit (Applied Biosystems) w celu usunięcia DNA oraz jonów dwuwartościowych. Stężenie oraz czystość otrzymanego RNA oceniono przy pomocy NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), jakość w 10 % żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Przeprowadzono poliadenylację miRNA oraz odwrotną transkrypcję z wykorzystaniem miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Stratagene). Pomiar ilościowy miR-21, miR-10b, miR-15b, ich prekursorów oraz R18S RNA jako referencji wykonano z użyciem techniki Real-time PCR. Porównując poziom miRNA oraz pre-miRNA względem R18S RNA w próbach traktowanych rybozymami i DNazymami i

próbach kontrolnych oceniono wpływ badanych katalitycznych kwasów nukleinowych na poziom endogennej puli miRNA oraz ich prekursorów w komórkach T98G.

6.13. Trwałość rybozymów oraz DNazymów anty-miRNA w ekstrakcie z tkanki nowotworowej, płynie mózgowo-rdzeniowym oraz surowicy krwi

Ekstrakt z tkanki nowotworowej sporządzono z fragmentu glejaka wielopostaciowego izolowanego śródoperacyjnie i mrożonego w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii UM w Poznaniu). Tkanekę po rozmrożeniu sonikowano w 10 mM Tris-HCl pH 7,5 (5 x 15 s, amplituda 80 %), odwirowano (10 min, 12 000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), a następnie mierzono zawartość całkowitego białka we frakcji rozpuszczalnej tj. w supernatancie z użyciem spektrofotometru Nanodrop.

Rybozomy oraz DNazy my anty-miR-21 znakowano przy końcu 5' przy użyciu [γ - ^{32}P]ATP oraz PNK. Wyznakowany materiał oczyszczono z wykorzystaniem kolumnienek NucAway Spin Columns (Ambion). RNA oraz DNA inkubowano w ekstrakcie z GBM (stężenie białka 0.8 mg/ml) oraz kolejnych rozcieńczeniach ekstraktu, w obecności nieznakowanego materiału, w temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, w określonych odcinkach czasu (0, 30 s, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 min, 2, 5, 16 h). Reakcje zatrzymywano poprzez dodanie buforu obciążającego do analizy kwasów nukleinowych w żelu PAA zawierającego 0.1 M EDTA. Produkty reakcji analizowano w 20 % PAA z 7 M mocznikiem. Ilość niezhydrolizowanego materiału oceniono na podstawie pomiaru densytometrycznego przy użyciu urządzenia odwzorowującego FLA-5100 (FujiFilm) i oprogramowania MutiGauge.

Analogiczne eksperymenty wykonano w surowicy ludzkiej (Sigma) oraz płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w obecności Lipofektaminy 2000 (1 μl Lipofektaminy 2000/10 μl reakcji).

6.14. Trwałość rybozymów oraz DNazymów anty-miRNA w komórkach T98G

Hodowlę linii komórkowej T98G prowadzono na szalkach 24 dołkowych, w pożywce EMEM (ATCC) suplementowanej 10% FBS (Gibco), 1 % witaminami i 1 % antybiotykami (ATCC), w $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, w 5 % CO_2 . Po osiągnięciu 70 % konfluencji komórki transfekowano z użyciem 250 nM miR21rz3 w obecności 60000 cpm [^{32}P]miR21rz3 lub 250nM miR21dz2 w obecności 60 000 cpm [^{32}P]miR21dz2 (w 200 μl pożywki). Kwasy nukleinowe wprowadzane były do komórek z wykorzystaniem Lipofektaminy 2000 (Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Przed transfekcją komórki

przemywano buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki. Po 1, 5 lub 15 h od transfekcji komórki przemyto buforem PBS, a następnie izolowano z nich RNA z użyciem TRI Reagent® (Molecular Research Center). Do prób dodano mieszaninę zawierającą 7 M mocznik, 20 mM EDTA oraz barwniki (0.1 % błękit bromofenolowy oraz 0.1 % cyjanol ksylonowy), a następnie analizowano w 20 % żelu poliakrylamidowym z dodatkiem 7 M mocznika.

7. Metody izolacji, rozdziału i analizy białek

7.1. Izolacja białek z tkanek

Ekstrakty białka z tkanek nowotworowych otrzymywano poprzez sonikację tkanki w 10 mM Tris-HCl pH 7.5 (4 x 15 s, amplituda 80 %), odwirowanie 12 000 rpm przez 10 min w 4 °C. Supernatant zawierający frakcję rozpuszczalną białek oddzielono od osadów. Próby przechowywano w -80 °C.

7.2. Izolacja białek z hodowli komórkowych

W celu otrzymania ekstraktu białek, komórki poddano lizie z zastosowaniem dwóch alternatywnych metod:

- liza z zastosowaniem buforu RIPA z inhibitorami proteaz – komórki przemywano buforem PBS, aplikowano mieszaninę RIPA/inhibitory proteaz (50 µl/mln komórek), odczepiano mechanicznie od powierzchni naczynia hodowlanego, przenoszono do probówki i inkubowano 1h w lodzie. Po tym czasie lizaty komórkowe wirowano w 10 000 rpm przez 10 min w 4 °C. Supernatant przenoszono do nowej probówki i przechowywano w -80 °C.

- zamrażanie-rozmrażanie – komórki trypsynizowano, przemywano 2-krotnie schłodzonym buforem PBS, zawieszano w buforze do lizy (Cell Lysis Buffer, Promega), inkubowano przez 10 min w temperaturze -80 °C, a następnie przekładano na 10 min do temperatury 37 °C. Procedurę zamrażania-rozmrażania powtórzono 2-krotnie, po czym lizaty komórkowe schłodzono w lodzie przez 15 min, a następnie wirowano 12 000 rpm, 10 min w 4 °C. Supernatant przenoszono do nowej probówki i przechowywano w -80 °C.

7.3. Rozdział białek w żelu poliakrylamidowym z SDS

Analizę elektroforetyczną białek przeprowadzano w 15 % żelu poliakrylamidowym z SDS o wymiarach 10 cm x 10 cm grubości 0.4 mm - 0.8 mm, przy napięciu 250 V i natężeniu prądu 35 mA w temperaturze pokojowej, w buforze do rozdzielania elektroforetycznego białek (Tabela 7.1) [205]. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym SBLU lub SBL (przy przygotowaniu żelu do analizy Western blot) w stosunku 1:1, po uprzedniej denaturacji 10 min w 95 °C. Rozdział prowadzono przez około 1-2 h. Do oznaczania wielkości białek używano markerów wielkości Spectra™ Multicolor oraz PageRuler™ Plus (Fermentas).

Tabela 7.1

Skład żeli poliakrylamidowych z SDS.

Składnik	4.5 % żel zagęszczający (10 ml)	15 % żel rozdzielający (20 ml)
30 % akryloamid/bisakryloamid (30:0.8)	1.5 ml	10 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.2 ml	-
3 M Tris-HCl pH 8.8	-	7.5 ml
20 % SDS	50 µl	100 µl
woda	7.3 ml	2.3 ml
10 % APS	75 µl	150 µl
100 % TEMED	7.5 µl	15 µl

7.4. Identyfikacja białek w żelach i roztworze

Po rozdzielaniu elektroforetycznym białka uwidaczniano poprzez barwienie w roztworze Comassie Brilliant R-250 z metanolem i kwasem octowym przez 2 h w temperaturze pokojowej i odbarwienie przez 15 h [197]. Wybarwiony żel wizualizowano w świetle widzialnym z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli GelDoc (UVP).

Stężenie białek w próbkach oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali 280 nm przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Białka przechowywano krótkoterminowo w -20 °C lub długoterminowo w -80 °C.

7.5. Analiza Western blot

Ekstrakt białkowy w ilości 30 µg białka rozdzielano w 15 % żelu poliakrylamidowy z SDS obciążając próby buforem SBL w stosunku 1:1 wobec znacznika wielkości PageRuler™ Plus (Fermentas). Rozdzielone białka były przenoszone na membranę PVDF w procesie elektrotransferu z wykorzystaniem urządzenia Western Unit (BioRad) w buforze do elektrotransferu Towbin. Membranę blokowano w roztworze mleka w proszku w 1x PBS/0.05%Tween20 w 4 °C przez 15 h, a następnie odmywano trzykrotnie w 1x PBS/0.05%Tween20 przez 10 min przy 350 rpm w temperaturze pokojowej. Membranę inkubowano z mysimi pierwszorzędowymi przeciwciałami monoklonalnymi specyficznymi wobec białek GFP (1:500), PTEN (1:500) oraz GAPDH (1:500) przez 2 h w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po trzykrotnym przemyciu membrany w 1xPBS/0.05%Tween20, membranę inkubowano z biotynylowanym przeciwciałem anti-mysim w stosunku 1:2000 (Sigma) przez 2 h w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po trzykrotnym przepłukaniu inkubowano z roztworem streptawidyny skoniugowanej z alkaliczną fosfatazą przez 15 min w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po przemyciu przyłączone przeciwciała uwidaczniano z wykorzystaniem roztworu BCIP/NBT (Sigma), a uzyskane prążki oceniano densytometrycznie przy wykorzystaniu programu ImageQuant (Molecular Dynamics).

8. Klonowanie sekwencji kodujących pre-miRNA do wektora pT7T3-18U oraz pEGFP-N3

8.1. Przygotowanie dsDNA kodujących pre-miR-21, pre-miR-10b oraz pre-miR-15b

Oligodeoksyrybonukleotydy (Tabela 1.6) kinazowano (Tabela 8.1) w 37 °C przez 30 min, następnie próby denaturowano (90 °C, 3 min), po czym powolnie schładzano w termobloku do osiągnięcia temperatury 25 °C i dalej inkubowano w 25 °C przez 16 h. W efekcie otrzymano dsDNA posiadające lepkie końce komplementarne do lepkich końców powstałych po zliniowaniu wektora pT7T3-18U z użyciem enzymów restrykcyjnych HindIII oraz EcoRI. Mieszaninę reakcyjną użyto bezpośrednio do ligacji ze zliniowanym wektorem pT7T3-18U.

Tabela 8.1

Skład mieszaniny do kinazowania oraz hybrydyzacji oligodeoksyrybonukleotydów.

Składnik	Ilość
Oligodeoksyrybonukleotydy	10 pmoli (każdy)
I. miR21-1, miR21-2, miR21-3, miR21-4	
II. miR10b-1, miR10b-2, miR10b-3, miR10b-4, miR10b-5, miR10b-6	
III. miR15b-1, miR15b-2, miR15b-3, miR15b-4, miR15b-5, miR15b-6	
Bufor ligacyjny 5x	2 µl
Kinaza PNK	5 u
Woda	do 10 µl

Do wektora ekspresyjnego pEGFP-N3 wklonowano z kolei produkty reakcji PCR powstałe z użyciem odpowiednich oligodeoksyrybonukleotydów (Tabela 1.6) na matrycy wektorów pT7T3-18U z wklonowanymi sekwencjami kodującymi poszczególne pre-miRNA. Skład oraz warunki reakcji PCR przedstawiono w Tabelach 8.2 i 8.3. Produkty reakcji PCR oczyszczono (QIAquick PCR Purification Kit), a następnie poddano cięciu enzymami restrykcyjnymi (HindIII, BamHI), ponownemu oczyszczeniu, a następnie wklonowaniu do zlinowanego uprzednio wektora pEGFP-N3 w reakcji ligacji.

Tabela 8.2

Skład mieszaniny reakcji PCR.

Składnik	Ilość
pT7T3-18U-pre-miR-21, pT7T3-18U-pre-miR-10b, pT7T3-18U-pre-miR-15b	50 nmoli
10 mM mix dNTP (Fermentas)	0.2 µl
25 mM MgCl ₂	0.4 µl
Bufor reakcyjny 10x (Fermentas)*	1 µl
Starter 10 pmol/µl	0.5 µl (każdy z pary)
I. miR21foHindIII, miR21reBamHI	
II. miR10bfoHindIII, miR10breBamHI III. miR15bfoHindIII, miR15breBamHI	
Starter (nazwa) 10 pmol/µl	0.5 µl
Polimeraza Taq 5 u/µl (Fermentas)	0.15 µl
Woda	do 10 µl

* Skład buforu reakcyjnego 10x: 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl, 0.8 % Nonidet P40.

Tabela 8.3

Warunki reakcji PCR.

Etap		Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Etap I	Denaturacja	94 °C	5 min	1
	Wiązanie starterów	55 °C/60 °C	30s	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72 °C	30s	
Etap II	Denaturacja	94 °C	30s	29
	Wiązanie starterów	55 °C	30s	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72 °C	30s	
Etap III	Synteza końcowa	72 °C	5 min	1

8.2. Hydroliza DNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcję hydrolizy enzymami restrykcyjnymi prowadzono w objętości 100 µl przez 4 - 16 h zgodnie z zaleceniami producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tabeli 8.4. Enzymy restrykcyjne wykorzystane w pracy, odpowiednie dla nich bufony oraz DNA z ich użyciem hydrolizowane przedstawiono w Tabeli 8.5.

Tabela 8.4

Skład buforu do hydrolizy DNA enzymami restrykcyjnymi.

Składnik	Ilość
dsDNA	5-50 µg
Bufor do trawienia restrykcyjnego 10x	10 µl
Enzym restrykcyjny	5-50 u (1 u/1µg DNA)
Woda	do 100 µl

Tabela 8.5

Zestawienie enzymów restrykcyjnych i buforów wykorzystywanych do hydrolizy DNA.

Enzym restrykcyjny	Bufor*	Substrat poddany trawieniu
HindIII, EcoRI	H, E	pT7T3-18U, pT7T3-18U-pre-miR-21, pT7T3-18U-pre-miR-10b, pT7T3-18U-pre-miR-15b
HindIII, BamHI	E	pEGFP-N3, pEGFP-N3-pre-miR-21
HindIII, BamHI	E	dsDNA pre-miR-21, pre-miR10b, pre-miR15b, pre-miR296 uzyskane w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów wprowadzających sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne

* Oznaczenia buforów firmy Promega.

Produkty reakcji oczyszczano zgodnie z procedurą fenol-chloroform, a następnie analizowano w 1.5 – 2 % żelu agarozowym. Stężenie oczyszczonego DNA określono mierząc absorpcję promieniowania UV przy długości fali 260 nm.

8.3. Ligacja

Dwuniciowe fragmenty DNA kodujące pre-miR-21, pre-miR-10b, pre-miR-15b otrzymane w wyniku hybrydyzacji oligodeoksyrybonukleotydów oraz produkty reakcji PCR poddane cięciu z użyciem enzymów restrykcyjnych zostały zligowane ze zliniowanym wektorem, odpowiednio pT7T3-18U oraz pEGFP-N3. Stosunek molowy wektor:insert wynosił 1:10. Skład mieszaniny ligacyjnej przedstawiono w Tabeli 8.6. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 16 h w temperaturze 16 °C. Każdorazowo przygotowywano kontrolną reakcję ligacji (kontrolę negatywną) zawierającą wektor w formie liniowej bez insertu. Mieszaninę reakcyjną wykorzystano do transformacji kompetentnych bakterii *E. coli* szczep TOP10 metodą szoku cieplnego lub *E. coli* szczep DH5α metodą elektroporacji.

Tabela 8.6

Skład mieszaniny ligacyjnej.

Składnik	Ilość
pT7T3-18U/ pEGFP-N3 posiadające lepkie końce	0.2 pmol
dsDNA pre-miR-21/pre-miR10b/pre-miR-15b posiadające lepkie końce	2 pmol
Bufor ligacyjny 10x	1 µl
ligaza DNA faga T4 (1 u/µl)	1 µl
Woda	do 10 µl

8.4. Hodowle bakterii *E. coli*

Hodowle bakterii *E. coli* szczep TOP10 oraz DH5 α prowadzono w pożywce płynnej LB, opcjonalnie pożywce stałej LB. Bakterie posiadające plazmid pT7T3-18U lub pEGFP-N3 hodowano w obecności, odpowiednio 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicyliny i 60 $\mu\text{g/ml}$ kanamycyny. Bakterie wykorzystano do namnożenia wektorów plazmidowych.

8.5. Przygotowanie bakterii kompetentnych *E. coli*

Bakterie *E. coli* TOP10 oraz DH5 α przygotowano do transformacji wektorami stosując metodę z wykorzystaniem chlorku wapnia. 100 ml płynnej pożywki LB inokulowano 1 ml hodowli nocnej. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$ z wytrząsaniem 230 rpm do wczesnej fazy logarytmicznego wzrostu bakterii $\text{OD}_{600} = 0.5 - 0.6$. Kulturę wirowano 10 min w 4 $^{\circ}\text{C}$ przy 4 000 rpm, osad zawieszano w 4 ml schłodzonego w lodzie 100 mM chlorku wapnia następnie inkubowano w lodzie przez 25 min, po czym wirowano 5 min w 4 $^{\circ}\text{C}$ z prędkością 4 000 rpm. Komórki kompetentne zawieszano w 2 ml 75 mM roztworu chlorku wapnia zawierającego 25 % glicerolu, rozdzielono na 50 μl porcje i zamrożono w ciekłym azocie. Tak przygotowane bakterie przechowywano w temperaturze -70 $^{\circ}\text{C}$.

8.6. Transformacja bakterii plazmidowym DNA metodą szoku cieplnego

Do 50 μl zawiesiny bakterii kompetentnych dodawano 10-50 ng plazmidu lub 1 μl mieszaniny ligacyjnej. Bakterie inkubowano 30 min w lodzie, a następnie 90 s w 42 $^{\circ}\text{C}$ i ponownie w lodzie przez 2 min. Do transformowanych komórek dodano 800 μl pożywki SOC i inkubowano przez 1 h w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$ z wytrząsaniem 350 rpm. Bakterie wirowano 2 min przy 4 000 rpm, osad zawieszano w 50 μl pożywki LB. 10 oraz 30 μl zawiesiny bakteryjnej наносzono równomiernie na płytki Petriego z pożywką stałą LB zawierającą antybiotyk selekcyjny (kanamycynę o stężeniu końcowym 60 $\mu\text{g/ml}$ w przypadku plazmidu pEGFP-N3, ampicylinę o stężeniu końcowym 100 $\mu\text{g/ml}$ dla wektora pT7T3-18U) i inkubowano w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$ do pojawienia się na szalce pojedynczych kolonii transformowanych bakterii (zwykle 16 h).

8.7. Analiza transformantów

Identyfikację transformantów przeprowadzono z użyciem techniki PCR na koloniach (ang. colony PCR). Fragment pojedynczej kolonii bakteryjnej zawieszono w 10 μl jałowej dejonizowanej wody i denaturowano 5 min w temperaturze 95 $^{\circ}\text{C}$. Uzyskane lizaty komórkowe wirowano 5 min z prędkością 14 000 rpm. Supernatant zawierający

plazmidowy DNA przenoszono do nowej probówki i wykorzystano jako matrycę do reakcji PCR. Do reakcji stosowano 1 μ l zawiesiny bakterii. Dalsza selekcja polegała na weryfikacji poprawności sekwencji wektorów izolowanych z poszczególnych kolonii na postawie ich sekwencjonowania.

8.8. Izolacja plazmidowego DNA z hodowli bakteryjnych

8.8.1. Otrzymywanie plazmidów w małej skali

Pojedyncze kolonie bakterii transformowane plazmidem przenoszono do 10 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym (ampicyliną lub kanamycyną) i wytrząsano 14-16 h w temperaturze 37 °C z szybkością 230 rpm. 3 ml zawiesiny bakterii wirowano 1 min z prędkością 10 000 rpm. Z uzyskanego osadu izolowano plazmidowy DNA z wykorzystaniem zestawu odczynników FastPlasmidTM Mini Kit (Eppendorf) zgodnie z opisem producenta. Wydajność izolacji wynosiła około 5-10 μ g plazmidowego DNA. Stężenie otrzymanego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm.

8.8.2. Izolacja plazmidów w dużej skali

10 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem selekcyjnym zaszczerpiono bakteriami z plazmidem pT7T3-18U lub pEGFP-N3 z pojedynczych kolonii i wytrząsano 14-16 h w temperaturze 37 °C z szybkością 230 rpm. 100 ml pożywki LB z odpowiednim antybiotykiem inokulowano 1 ml nocnej hodowli bakterii i inkubowano w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem 230 rpm do osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600} = 1.5-2.0$. Następnie kulturę wirowano 15 min w 4 °C przy 4 000 rpm. Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono wykorzystując zestaw odczynników Perfectprep Plasmid Midi Kit (Eppendorf) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Wydajność izolacji wynosiła około 150-200 μ g plazmidowego DNA. Stężenie otrzymanego DNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm.

8.9. Sekwencjonowanie DNA

Automatyczne sekwencjonowanie plazmidów zawierających wklonowaną sekwencję kodującą pre-miRNA przeprowadzono wykorzystując ABI PRISM[®] Big DyeTM Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kit oraz startera uniwersalnego T7start w przypadku wektora pT7T3-18U lub startera primEGFP dla plazmidu pEGFP-N3. Warunki sekwencyjnego PCR zestawiono w Tabeli 8.7.

Reakcję prowadzono w objętości 10 μ l w następującej mieszaninie reakcyjnej:

4 μ l Terminator Ready Reaction Mix

3.2 pmol startera

200-500 ng matrycy (plazmidowy DNA)

Tabela 8.7

Warunki reakcji sekwencyjnego PCR.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja	96 °C	5 min	30
Wiązanie starterów	50 °C /60 °C	30s	
Wydłużanie łańcucha DNA	60 °C	4 min	

W celu oczyszczenia produktów do 10 μ l mieszaniny reakcyjnej dodano 2.5 μ l 125 mM EDTA i 30 μ l 96 % etanolu i inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano 30 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4 °C. Roztwór dekantowano, a osad przemywano 120 μ l 70 % etanolu i wirowano 10 min przy 14 000 rpm, w temp. 4 °C. Osad po wysuszeniu rozpuszczono w 10 μ l TSR (Template Suppressing Reagent, ABI PRISM). Sekwencjonowanie przeprowadzono przy użyciu sekwenatora ABI-PRISM.

Sekwencjonowanie DNA wykonano w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Uzyskane wyniki analizowano z użyciem BioEdit v.7.0.9.0 [206].

9. Hodowle komórkowe

9.1. Charakterystyka i warunki hodowli linii komórkowych

Wykorzystane w pracy linie komórkowe, ich krótką charakterystykę oraz warunki hodowli przedstawiono w Tabeli 9.1.

Tabela 9.1

Linie komórkowe stosowane w pracy oraz warunki ich hodowli.

Linia komórkowa	Charakterystyka	Pożywka hodowlana	Suplementy pożywki	Temperatura	CO ₂	Naczynia hodowlane
HeLa	linia ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy. Komórki transformowane nowotworowo na skutek zakażenia wirusem brodawczaka HPV 18	RPMI 1640 (Sigma)	10 % FBS, antybiotyki, witaminy	37 °C	5 %	T25*, T75**, płytki 6-, 24-, 48-, 96-dołkowe
T98G	linie ludzkich komórek glejowych pochodzących z glejaka złośliwego	EMEM (ATCC)	10 % FBS			
U118		DMEM (ATCC)	10 % FBS, streptomycyna			

*butelki hodowlane o powierzchni wzrostowej 25 cm²**butelki hodowlane o powierzchni wzrostowej 75 cm²

9.2. Przechowywanie linii komórkowych

Hodowle linii komórkowych prowadzono do osiągnięcia 80 % konfluencji. Z naczynia hodowlanego usunięto pożywkę, komórki przepłukano buforem PBS, a następnie trypsynizowano w 37 °C, 5 % CO₂. Po odzepieniu komórek od podłoża zatrzymano działanie enzymu przez dodanie 2 objętości medium hodowlanego z FBS. Zawiesinę komórek przenoszono do probówki typu Falcon i wirowano 5 min z prędkością 1 500 rpm. w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 500 µl pożywki uzupełnionej 40 % FBS i 500 µl pożywki z dodatkiem 20 % DMSO. Całość przenoszono do probówki przystosowanej do przechowywania w ciekłym azocie, a następnie poddawano powolnemu zamrażaniu w łaźni izopropanolowej do temperatury -70 °C. Po upływie 24 h probówki przenoszono do ciekłego azotu.

9.3. Transfekcja komórek linii komórkowych

Kwasy nukleinowe wprowadzane były do komórek na drodze lipofekcji z wykorzystaniem Lipofektaminy 2000 (Invitrogen). Mieszaninę transfekcyjną przygotowywano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta, optymalizując stężenie kwasu nukleinowego oraz ilość Lipofektaminy w zależności od powierzchni naczynia hodowlanego. Hodowle komórek prowadzono do osiągnięcia przez nie 80 % konfluencji. Przed transfekcją komórki przemyto buforem PBS oraz dostarczono świeżej, niesuplementowanej pożywki. Po transfekcji hodowlę prowadzono w 37 °C, 5 % CO₂, przez 24 lub 48 h. Równolegle przeprowadzano transfekcję z użyciem

kontrolnego fluorescencyjnego dsRNA (BLOCK-it Fluorescent Oligo, Invitrogen) w celu oceny wydajności transfekcji. Wydajność transfekcji wektorem pEGFP-N3-pre-miR-21 oraz stopień zahamowania ekspresji pre-miR-21 i obniżenia poziomu pre-miR-21 oraz miR-21 przy użyciu katalitycznych kwasów nukleinowych oceniano przy zastosowaniu: mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus), pomiaru fluorescencji białka EGFP z użyciem czytnika płytek (Synergy2, Biotek), analizy RealTime PCR z użyciem termocyklera (LightCycler, Roche) oraz analizy Western blot. Wpływ katalitycznych kwasów nukleinowych na przeżywalność komórek oceniono na podstawie testu MTT.

9.4. Test MTT

Do przeprowadzenia testu MTT przygotowano 10x stężony roztwór wodny MTT (5 mg/ml) oraz 1x stężony MTT rozcieńczony w pożywce OptiMEM. Analizowane komórki hodowlane na 24- lub 96-dołkowych płytkach hodowlanych poddane były transfekcji rybozymami oraz DNazymami wg opisanej wcześniej procedury, a następnie przemywane buforem PBS i zalewane 1x stężonym MTT (500 μ l/dołek w szalce 24-dołkowej oraz 100 μ l/dołek w szalce 96-dołkowej). Komórki inkubowano 3 h w atmosferze 5 % CO₂, po czym odsysano MTT, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczano poprzez dodanie DMSO (100 μ l oraz 500 μ l na pojedynczy dołek odpowiednio szalki 96- i 24-dołkowej) i wytrząsanie szalki na wytrząsarce orbitalnej przez 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie przy wykorzystaniu czytnika mikroplątek (Synergy2, Biotek) odczytywano absorbancję przy długości fali 590 nm oraz długości referencyjnej 620 nm. Każdorazowo stosowano kontrolę zawierającą sam odczynnik MTT.

9.5. Ocena proliferacji komórek z wykorzystaniem platformy Exelligence

Hodowlę linii komórkowej T98G prowadzono w pożywce EMEM (ATCC) suplementowanej 10 % FBS (Gibco), 1 % witaminami i 1 % antybiotykami (ATCC), w 37 °C, w 5 % CO₂, na płytkach 16 dołkowych pokrytych złotem (E-Plate 16, Roche). Po osiągnięciu 70 % konfluencji komórki transfekowano z użyciem 250 nM i 2.5 μ M (w 200 μ l pożywki) rybozymów lub DNazymów. Kwasy nukleinowe wprowadzane były do komórek z wykorzystaniem Lipofektaminy 2000 (Invitrogen), zgodnie z protokołem producenta. Przed transfekcją komórki przemywano buforem PBS oraz dostarczono świeżej niesuplementowanej pożywki EMEM. Wzrost komórek monitorowano w

sposób ciągły od momentu ich wysiania, a następnie przez 72 h od momentu transfekcji, z użyciem xCELLigence RTCA DP (Roche).

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

1. Porównanie profilu miRNA w nowotworach glejowych, tkankach obrzeży guzów oraz zdrowych tkankach pochodzenia mózgowego

Wobec braku skutecznych metod leczenia glejaków, ich oporności na leczenie, wyzwaniem są badania nad nowymi celami terapii oraz podejściami w leczeniu GBM. Do tej pory uwagę koncentrowano głównie na czynnikach transkrypcyjnych, białkach macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białkach opiekuńczych jako celach molekularnych w terapii GBM. Nowe podejścia oparte są o takie narzędzia jak inhibitory małowcząsteczkowe, przeciwciała monoklonalne oraz szczepionki peptydowe stosowane w celu regulacji szlaków komórkowych kluczowych dla rozwoju nowotworu, angiogenezy, a także zniesienia lekooporności komórek nowotworowych nie przyniosły jednak oczekiwanych rezultatów w postaci efektywnego zahamowania proliferacji komórek glejaków [140].

Już od połowy XX wielu cząsteczki RNA postrzegane są jako dobry cel terapeutyczny. Odkrycie pod koniec lat 90-tych ubiegłego wieku zjawiska interferencji RNA potwierdziło potencjał tkwiący w cząsteczkach RNA. Krótkie niekodujące RNA, w tym mikroRNA mają ogromny potencjał terapeutyczny. MiRNA mogą regulować ekspresję nawet 90 % genów, a w konsekwencji wpływać na szereg procesów komórkowy, takich jak: wzrost, różnicowanie komórek, apoptoza, czy sygnalizacja komórkowa [1] dzięki czemu stanowią doskonały cel molekularny.

1.1. Analiza mikromacierzowa

Określono profil miRNA w 12 tkankach guzów glejowych mózgu, w 4 tkankach obrzeży guza oraz 1 próbie pochodzącej z różnych rejonów mózgu zdrowych dawców. Charakterystykę histopatologiczną tkanek przedstawiono w Tabeli 1.1.

Tabela 1.1

Charakterystyka tkanek guzowych oraz tkanek obrzeży guzów wykorzystanych w eksperymentach profilowania miRNA.

Nr próby	Charakterystyka tkanki			Charakterystyka dawcy	
	Lokalizacja guza	Stopień złośliwości wg WHO	Klasyfikacja histologiczna	Płeć	Wiek
T1	Ciało modzielowate w płacie czołowym prawej półkuli mózgu	IV	GBM	M	53
T2	bd	IV	GBM	K	56
T3	Płat ciemieniowy prawej półkuli mózgu	IV	GBM	K	70
T4	Płat czołowy oraz ciemieniowy lewej półkuli mózgu	IV	Gliosarkoma	M	70
T5	Płat czołowy i skroniowy prawej półkuli mózgu	IV	GBM	M	60
T6	Płat skroniowy prawej półkuli mózgu	IV	GBM	M	58
T7	Płat ciemieniowy prawej półkuli mózgu	IV	GBM po wznowie	M	57
T8	Płat czołowy i skroniowy prawej półkuli mózgu	IV	GBM po wznowie	K	32
T9	Płat skroniowy i potyliczny lewej półkuli mózgu	IV	GBM po wznowie	K	54
T10	Płat skroniowy, ciemieniowy i potyliczny lewej półkuli mózgu	IV	GBM po wznowie	M	59
T11	Płat czołowy i ciemieniowy prawej półkuli mózgu	IV	GBM po wznowie	M	50
T12	Płat ciemieniowy lewej półkuli mózgu	III	AA po wznowie	M	53
B1	Płat skroniowy lewej półkuli mózgu	obrzeże guza III stopnia	AA/obrzeże	M	68
B2	Płat skroniowy, ciemieniowy i potyliczny lewej półkuli mózgu	obrzeże guza III stopnia	AA/obrzeże	K	56
B3	Płat ciemieniowy lewej półkuli mózgu	obrzeże guza III stopnia	OAA/obrzeże	M	30
B4	Płat czołowy i ciemieniowy lewej półkuli mózgu	obrzeże guza III stopnia	GBM/obrzeże	M	70

T - guz (ang. tumor), B - obrzeże guza (ang. tumor border), M - mężczyzna, K - kobieta, bd – brak danych.

W eksperymentach wykorzystano mikromacierze firmy Agilent Technologies zawierające na pojedynczym szkiełku 866 ludzkich oraz 89 wirusowych miRNA. Po korekcie tła, normalizacji globalnej i lokalnej oraz filtrowaniu danych otrzymano pulę 303 miRNA, na której przeprowadzono analizę różnicową. miRNA połączono w klastry uwzględniając profile ich ekspresji oraz rodzaj tkanki (guz, obrzeże, tkanka zdrowa) (Rysunek 1.1). Zidentyfikowałam 56 miRNA ulegających nadekspresji oraz 41 miRNA, których poziom jest niższy w tkankach guza w porównaniu z tkankami zdrowymi oraz z

użyciem bazy miR2Disease określono ich udział w patogenezie różnych chorób (Tabela 1.2 i 1.3).

W obrzeżach guza stwierdziłam 6 miRNA ulegających podwyższonej ekspresji oraz 16 obniżonej ekspresji w porównaniu z tkankami zdrowymi (Tabela 1.4 i 1.5). Poziom 21 spośród nich jest zmieniony również w tkankach GBM (Rysunek 1.2). Poziom miR-21, miR-630, miR-155, miR-1260, miR-542-5p, miR-142-5p jest znacząco wyższy, miR-137, miR-124, miR-129-3p, miR-769-5p, miR-132, miR-128, miR-7, miR-410, miR-136, miR-153, miR-323-3p, miR-330-3p, miR-598 znacząco niższy zarówno w tkankach GBM jak i ich obrzeży w porównaniu z tkankami zdrowymi. Wyniki wskazują, że różnicowanie tkanek guza oraz obrzeży na podstawie profilu miRNA nie jest możliwe. Trudność wynika z naciekowego charakteru wzrostu GBM oraz braku wyraźnej granicy między tkanką nowotworową, obrzeżem i tkanką zdrową.

Tabela 1.2

miRNA, których poziom jest wyższy w GBM niż w tkankach zdrowych pochodzenia mózgowego.

Dane dotyczące chorób związanych ze zmienionym poziomem poszczególnych miRNA pochodzą z bazy miR2Disease (z dnia 14.03.2011), bd – brak danych, strzałki skierowane w górę oznaczają podwyższony, w dół – obniżony poziom danego miRNA.

miRNA występujące w guzach na podwyższonym poziomie				
Nr	miRNA	Choroby o zmienionym poziomie miRNA*	Krotność zmiany	P value
1	miR-1290	Udar mózgu↑	5.926	0.000602
2	miR-630	bd	4.984	0.0000118
3	miR-135a*	bd	4.976	0.000448
4	miR-1246	Udar mózgu↑	5.028	0.0000142
5	miR-513a-5p	bd	3.829	0.003
6	miR-1275	Stwardnienie rozsiane↑, udar mózgu↑	3.555	0.0000258
7	miR-155	Chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL)↑, GBM↑, chłoniak Hodgkina↑, rak jelita grubego↑, przewlekła białaczka limfocytarna (CCL)↑, rak trzustki↑, nowotwór tarczycy↑, gruczolak przewodu trzustkowego (PDAC)↑, rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (OSCC)↓	3.291	0.000788
8	miR-1471	bd	3.067	0.01
9	miR-210	Rak szyjki macicy↑, rak płuc↑, ostra białaczka limfoblastyczna (AML)↑, rak piersi↑, zapalenie skórno-mięśniowe (DM)↑, DLBCL↑, czerniak złośliwy↑, rak trzustki↑, rak prostaty↑	2.893	0.000145
10	miR-886-3p	bd	2.89	0.0078
11	miR-21	Rak jelita grubego↑, rak szyjki macicy↑, rak płuc↑, rak trzustki↑, DLBCL↑, rak piersi↑, rak wątrobowokomórkowy (HCC)↑, rak żołądka↑, rak jajnika (OC)↑, rak pęcherza moczowego↑, OSCC↓, rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (HNSCC)↑, rak nerki↑	2.847	0.003267

12	miR-150*	bd	2.813	0.00235
13	miR-494	OC↑, przewlekłe zapalenie trzustki↑, siatkówczak↑, przerost serca↓	2.78	0.00059
14	miR-542-5p	bd	2.78	0.000178
15	miR-1260	bd	2.635	0.0000389
16	miR-1826	bd	2.588	0.0019
17	miR-142-5p	Rak szyjki macicy↑, ostra białaczka limfoblastyczna (AML)↑, HCC↓, OC↓	2.54	0.000137
18	miR-144*	bd	2.518	0.000175
19	miR-483-5p	Przewlekłe zapalenie trzustki↑, pierwotna żółciowa marskość wątroby (PBC)↓	2.507	0.001123
20	miR-144	bd	2.453	0.000064
21	miR-940	bd	2.438	0.00043
22	miR-486-5p	bd	2.433	0.0000356
23	miR-199b-5p	AML↑, DM↑, przewlekłe zapalenie trzustki↑, brodawkowy rak tarczycy (PTC)↓, rak prostaty↑, OC↓	2.418	0.011
24	miR-188-5p	Przewlekła białaczka limfocytarna↑, rak płuc↓	2.404	0.000208
25	miR-1274a	bd	2.403	0.000208
26	miR-575	Nefropatia toczniowa↑	2.401	0.000545
27	miR-542-3p	Makroglobulinemia Waldenstorna↑, OC↓, mięśniak macicy (ULM)↑	2.343	0.009
28	miR-1207-5p	bd	2.304	0.0017
29	miR-1225-5p	bd	2.295	0.000691
30	miR-148a	HNSCC↑, rak płuc↑, miopatia mięśniowa (MM)↑, miopatia nemalinowa (NM)↑, rak prostaty↓	2.2523	0.001289
31	miR-1915	bd	2.17335	0.001648
32	miR-720	Rak prostaty↑	2.127	0.0076
33	miR-193a-5p	bd	2.073	0.00426
34	miR-424	ALL↓, AML↑, rak nerki↑, rak trzustki↑, OC↓	2.047	0.012
35	miR-301b	bd	1.981	0.014
36	miR-502-3p	bd	1.96255	0.0057
37	miR-142-3p	OC↑, stwardnienie rozsiane↑, łuszczyca↑, HCC↓	1.934	0.000186
38	miR-130b	Rak płuc↑, ALL↑, rak jelita grubego↑, PDAC↓, białaczka T-komórkowa↑	1.925	0.0039
39	miR-1202	bd	1.8574	0.0054
40	miR-134	Przewlekła białaczka limfocytowa↑, dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD)↑, nefropatia toczniowa↑, NM↑, OC↓	1.85556	0.00337
41	miR-1308	bd	1.834	0.00319
42	miR-93	Rak szyjki macicy↑, rak płuc↑, rak jelita grubego↑, rak żołądka↑, HCC↑, neuroblastoma (NB)↑, PDAC↑, surowiczy rak jajnika (SOC)↑, białaczka T-komórkowa↑	1.811	0.000906
43	miR-202	Rak piersi↑, rak prostaty↑	1.81	0.012
44	miR-15b	Rak szyjki macicy↑, ostra białaczka promielocytowa (APL)↑, rak jelita grubego↑, niedrobnokomórkowy rak płuc (NSCLC)↑, rak trzustki↑, Schizophrenia↑	1.56	0.0024
45	miR-23a	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego (UC)↑, rak trzustki↑, SOC↑, AML↑, ALL↓, spektrum autystyczne (ASD)↑, rak pęcherza moczowego↑, HCC↑, nefropatia toczniowa↑	1.593	0.0027

46	miR-25	Rak jelita grubego↓, rak żołądka↑, HCC↑, MM↑, rak trzustki↑, rak prostaty↑	1.602	0.00279
47	mir-1224-5p	bd	1.792	0.008
48	miR-378	Rak nerki↓, przerost serca↓	1.713	0.008
49	miR-500* (miR-500a-3p)	bd	1.594	0.014
50	miR-362-5p	DM↑, MM↑, NM↑, zapalenie wielomięśniowe (PM)↑	1.4535	0.00557
51	miR-20a* (miR-20a-3p)	bd	1.434	0.00327
52	miR-320c	bd	1.413	0.008
53	miR-505	bd	1.375	0.00618
54	miR-92a	HCC↑, rdzeniak↑, choroba niedokrwienna↑, AML↓	1.334	0.009
55	miR-939	bd	1.243	0.015
56	miR-17* (miR-17-3p)	ATC↑, rak jelita grubego↑, HCC↑, rak płuc↑, chłoniak złośliwy↑, rak prostaty↓	1.251	0.01

Tabela 1.3

miRNA, których poziom jest niższy w GBM niż w tkankach zdrowych pochodzenia mózgowego.

Dane dotyczące chorób związanych ze zmienionym poziomem miRNA pochodzą z bazy miR2Disease (z dnia 14. 03.2011), bd – brak danych, strzałki skierowane w górę oznaczają podwyższony, w dół – obniżony poziom danego miRNA.

miRNA występujące w guzach na obniżonym poziomie				
Nr	miRNA	Choroby o zmienionym poziomie miRNA*	Krotność zmiany	P value
1	miR-124	HCC↓	-4.548	0.00000089
2	miR-129*	bd	-3.887	0.000027
3	miR-139-5p	czerniak↓, rak płuc↓, HCC↓, rak trzustki↓, OSCC↓	-3.702	0.0000179
4	miR-338-3p	Prionowe neurodegeneracje↓	-3.635	0.000163
5	miR-219-5p	Czerniak↓	-3.53	0.00222
6	miR-218	Rak szyjki macicy↓, rak płuc↓, przerost serca↓, rak prostaty↑	-3.3434	0.0000237
7	miR-7	Choroba Parkinsona↓, rak piersi↓	-3.38	0.0000755
8	miR-487b	OC↑, miopatie↑	-3.23	0.000369
9	miR-128	Choroba Huntington'a↓, neuroblastoma↓, Prionowe neurodegeneracje ↓	-3.21	0.0000214
10	miR-330-3p	bd	-3.182	0.0000192
11	miR-129-3p	bd	-2.819	0.000957
12	miR-137	Rak jelita grubego↓, czerniak↓, OSCC↓, HCC↑, NSCLC↑	-2.771	0.000845
13	miR-410	bd	-2.7546	0.000272
14	miR-769-5p	Nefropatia toczniowa↓	-2.672	0.0000276
15	miR-132	Choroba Huntington'a↓, HCC↓, OSCC↓, gruczolak przysadki↓, miopatie↑	-2.57	0.0000794
16	miR-495	OC↓, DM↑, miopatie↑	-2.3817	0.00158
17	miR-132*	bd	-2.356	0.000253
18	miR-381	OC↓, ASD↓, DM↑	-2.198	0.00173

19	miR-885-5p	bd	-2.1696	0.001426
20	miR-149	Rak prostaty↓, czerniak↓, DLBCL↓, chłoniak grudkowy (FL)↓, gruczolak przysadki↑,	-2.113	0.0062555
21	miR-323-3p	bd	-2.075	0.00305
22	miR-539	ASD↓	-1.968	0.00169
23	miR-33a	bd	-1.938	0.00413
24	miR-95	Rak jelita grubego↓, rak płuc↓, OSCC↓, czerniak↓,	-1.868	0.00696
25	miR-598	ASD↑	-1.845	0.0011
26	miR-584	MM↑, stwardnienie rozsiane↑	-1.84	0.00276
27	miR-136	Rak piersi↑, gruczolak przysadki↓, HCC↓	-1.8322	0.0062
28	miR-340*	MM↓	-1.827	0.00183
29	miR-574-3p	bd	-1.797	0.00927
30	miR-485-3p	bd	-1.792	0.0066
31	miR-379	PM↑, DMD↑, DM↑, inne miopatie↑	-1.759	0.00757
32	miR-197	OSCC↓, łuszczyca↓, choroba Alzheimer'a↑, rak płuc↑	-1.742	0.0027
33	miR-153	B-komórkowa przewlekła białaczka limfocytowa↑	-1.7125	0.00923
34	miR-29b	AML↓, CLL↓, rak płuc↓, czerniak↓, neuroblastoma↓, rak prostaty↓, rak nerki↑	-1.657	0.0116
35	miR-181a	AML↑, rak piersi↓, czerniak↑, rak jelita grubego↑, rak trzustki↑, PTC↑	-1.644	0.00526
36	miR-299-5p	DMD↑, DM↑, PBC↑	-1.623	0.0136
37	miR-328	Choroba Alzheimer'a↓, rak jelita grubego↓, AML↑, PBC↓	-1.5935	0.0024
38	miR-212	Rak trzustki↑, rak płuc↑, gruczolak przysadki↓, HCC↑, ASD↑	-1.584	0.00848
39	miR-342-3p	Choroba prionowa↑, rak nerki↑	-1.547	0.00779
40	miR-181b	AML↑, B-komórkowa przewlekła białaczka limfocytowa↑, MM↑, rak jelita grubego↑, rak prostaty↓	-1.38	0.0167
41	miR-1280	bd	-1.362	0.0148

Tabela 1.4

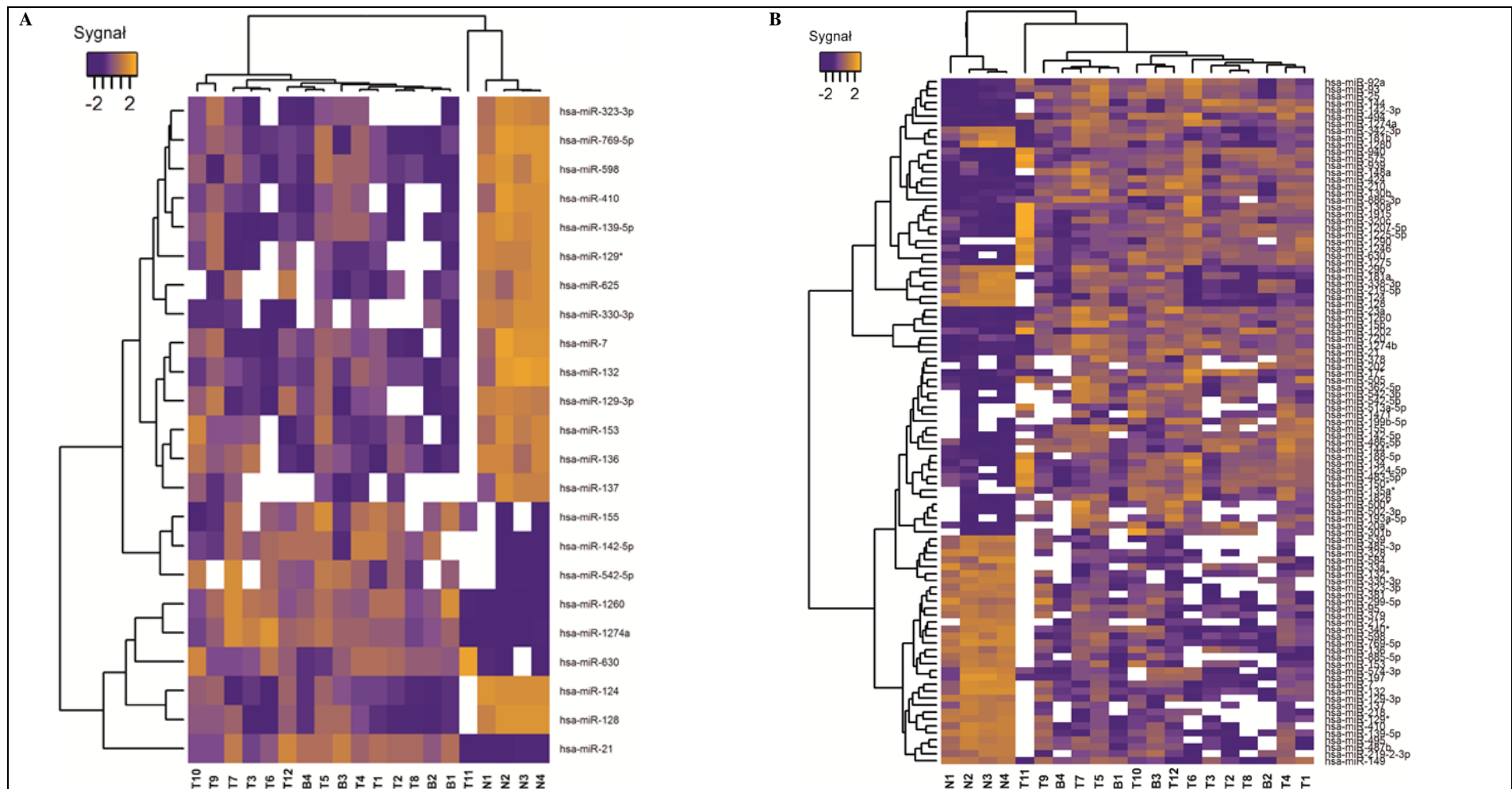
miRNA, których poziom jest wyższy w obrzeżach guza niż w tkankach zdrowych pochodzenia mózgowego.

Nr	miRNA	Krotność zmiany	Wartość P
1	mir-21	3.8234	0.00148
2	miR-630	3.7684	0.001932
3	miR-155	3.412	0.001573
4	miR-1260	2.884	0.000157
5	miR-542-5p	2.6613	0.002
6	miR-142-5p	2.292	0.00331

Tabela 1.5

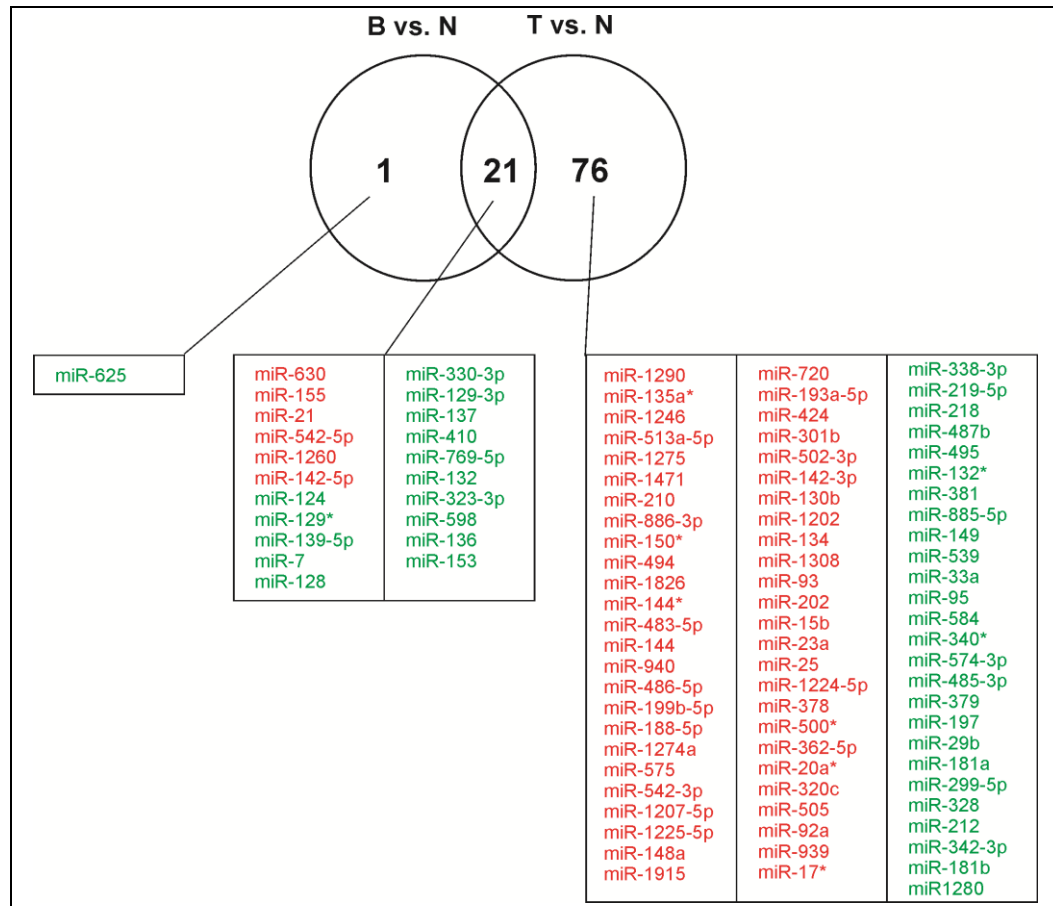
miRNA, których poziom jest niższy w obrzeżach guza niż w tkankach zdrowych pochodzenia mózgowego

Nr	miRNA	Krotność zmiany	Wartość P
1	miR-137	-6.205	0.0000646
2	miR-124	-5.175	0.0000024
3	miR-129-3p	-5.111	0.0000056
4	miR-129*	-4.905	0.000105
5	miR-139-5p	-3.8185	0.00012
6	miR-769-5p	-3.652	0.000005
7	miR-132	-3.602	0.0000115
8	miR-128	-3.558	0.000068
9	miR-7	-3.304	0.0016
10	miR-410	-3.126	0.0007
11	miR-136	-3.103	0.00027
12	miR-153	-2.9175	0.00102
13	miR-323-3p	-2.8565	0.00109
14	miR-330-3p	-2.76	0.0023
15	miR-598	-2.436	0.00047
16	miR-625	-2.331	0.0027

**Rysunek 1.1**

Porównanie ekspresji miRNA w GBM, obrzeżach guza oraz zdrowym mózgu

A. Mapa ciepła obrazująca miRNA różnicujące tkanki obrzeży guzów i normalne komórki mózgowie, **B.** Mapa ciepła obrazująca miRNA różnicujące tkanki GBM i normalne komórki mózgowie. Kolor żółty przedstawia średni poziom fluorescencji danego miRNA, zmiana barwy na ciemniejszą (aż do fioletowej) obrazuje stopień zróżnicowania sygnału fluorescencji od wartości średniej, biały - brak sygnału (brak ekspresji).



Rysunek 1.2

Diagram Venna ilustrujący relację puli miRNA zmienionych w GBM oraz obrzeżach guza w stosunku do tkanek zdrowych. Oznaczono liczbę miRNA ulegających zmienionej ekspresji oraz liczbę miRNA wspólnych dla obu porównywanych zbiorów. Poniżej wyszczególniono miRNA różnicujące analizowane zbiory, na czerwono miRNA ulegające nadekspresji, na zielono miRNA występujące na obniżonym poziomie. T - guz (ang. tumor), B - obrzeże guza (ang. tumor border), N – zdrowa kontrola.

1.2. Metaanaliza

Do 2013 roku włącznie opublikowano 15 prac dotyczących poziomu miRNA w GBM (Tabela 1.6). Różnią się one rodzajem użytych metod (Real-Time PCR, mikromacierze, głębokie sekwencjonowanie, hybrydyzacja ‘dot blot’), ilością prób pochodzących z guzów glejowych mózgu (3-354) oraz stopniem ich złośliwości (WHO I-IV), rodzajem próby kontrolnej (zdrowa tkanka mózgowa, tkanka obrzeża guza, tkanki pochodząca od pacjentów z nienowotworowymi chorobami układu nerwowego). Znaczącą trudnością w projektowaniu eksperymentu jest ograniczona dostępność do materiału biologicznego, który może stanowić próbę kontrolną dla tkanek GBM. W różnych eksperymentach, jako materiał referencyjny wykorzystano tkanki obrzeży guzów, tkanki nowotworów mózgu o niższym (I lub II) stopniu złośliwości, tkanki mózgowe od

pacjentów ze zdiagnozowanymi innymi chorobami układu nerwowego, zdrowe tkanki mózgowe oraz RNA dostępne komercyjnie wyizolowane z puli tkanek pochodzących z różnych rejonów mózgu od zdrowych dawców (Ambion, FirstChoice® Human Brain Reference RNA). Eksperymenty mikromacierzowe wykonane jako pierwsze uwzględniały znacząco mniejszą pulę miRNA, w stosunku do badań wykonanych w ostatnim roku, co wynika m.in. z szybkiego postępu w poznaniu nowych miRNA (Tabela 1.6).

Tabela 1.6

Wybrane badania, wykonane w latach 2005-2013, dotyczące profilowania miRNA w GBM, z pominięciem badań z użyciem linii wyprowadzonych z komórek glejowych [207], komórek macierzystych glioblastomy [208], płynu mózgowo-rdzeniowego [209] oraz krwi obwodowej pacjentów z nowotworami mózgu [145].

Rok	Metoda	Stopień złośliwości GBM (liczba prób)	Kontrolna (liczba prób)	Ilość miRNA o zmienionym poziomie		Referencja
				↑	↓	
2005	Mikromacierze miRNA	IV (9)	Komórki glejowe (nieguzowe) (9)	9	4	[141]
2008	Mikromacierze miRNA	IV (bd)	Komórki sąsiadujące z guzem (bd)	8	11	[148]
2008	Real-Time PCR	III (4), IV (4)	Przerośnięte komórki gleju gwiaździstego od pacjentów z padaczką (4)	4	25	[156]
2009	Mikromacierze miRNA	IV (3)	Zdrowa tkanka mózgu (2)	29	bd	[150]
2010	Real-Time PCR	III (3), IV (2)	Zdrowa tkanka mózgu (1)	43	28	[153]
2010	Real-Time PCR	IV (4)	Pierwotny nowotwór mózgu, WHO II (4)	12	2	[154]
2010	Mikromacierze miRNA	I (1), II (1), III (1), IV (1)	Zdrowa tkanka mózgu (3)	9	8	[151]
2010	Mikromacierze miRNA	IV (240)	Zdrowa tkanka mózgu (10)	30	67	[147]
2010	Mikromacierze miRNA	III (13), IV (26)	Zdrowa tkanka mózgu (7)	55	29	[155]
2010	Real-Time PCR	IV (22)	Tkanka z naczynek tętniczo-żylnych (6)	2	6	[158]
2011	Mikromacierze miRNA	IV (354)	Zdrowa tkanka mózgu (10)	7	3	[144]
2011	Głębokie sekwencjonowanie	IV (6)	Tkanka mózgowa od pacjentów z dysplazją korową (3)	18	38	[157]
2011	Dot blot, Real-Time PCR	II (11), III (2), IV (11)	Tkanka mózgowa od pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym	15	11	[152]
2012	Mikromacierze miRNA	IV (94)	Zdrowa tkanka mózgu (10)	6	6	[146]
2012	Głębokie sekwencjonowanie	IV (3)	Zdrowa tkanka mózgu (3)	33	40	[149]

bd – brak danych, strzałki skierowane w górę oznaczają podwyższony, w dół – obniżony poziom miRNA.

W literaturze wskazano 303 miRNA o zmienionym profilu ekspresji w GBM w porównaniu z kontrolą. 157 miRNA występują na podwyższonym, 146 miRNA na obniżonym poziomie (Tabela 1.7 i 1.8). Najobszerniejszą listę miRNA dostarczyły szeroko zakrojone badania profilowania miRNA wykonane w ramach projektu TCGA (The Cancer Genome Atlas). Wskazały one, że poziom aż 97 miRNA jest znacząco zmieniony w GBM [147]. Spośród miRNA typowych dla GBM aż 188 wskazano zaledwie w pojedynczym badaniu, 37 zostały potwierdzone przez cztery niezależne zespoły badawcze. miRNA wskazywane najczęściej to miR-21, miR-10b oraz miR-25 (występujące na podwyższonym poziomie) oraz miR-139-5p i miR-218 (na obniżonym poziomie) (Tabela 1.9). Dla 11 miRNA stwierdzono rozbieżności w otrzymanych wynikach (Tabela 1.10). Przykładowo, grupa badawcza pod kierownictwem Conti wskazuje, że poziom miR-221 jest podwyższony w GBM i koreluje ze stopniem złośliwości nowotworów glejowych [210], z kolei dwa inne zespoły badawcze pokazały, że miR-221 występuje w nowotworach glejowych mózgu na znacząco niższym poziomie niż w tkankach zdrowych [144, 158].

Tabela 1.7

miRNA opisane w literaturze, których poziom jest wyższy w GBM niż w zdrowych tkankach mózgowych.

Nr	miRNA	Referencje
1	let-7a	[152]
2	let-7b	[152]
3	let-7d	[152]
4	let-7f	[152]
5	let-7i	[147, 149]
6	let-7i*	[157]
7	miR-9	[146, 149, 151, 152, 154, 155]
8	miR-9*	[150, 151]
9	miR-10a	[150, 153, 155, 157]
10	miR-10b	[141, 148-151, 153, 155-157, 211, 212]
11	miR-10b*	[149, 157]
12	miR-15a	[147, 154, 155]
13	miR15b	[147, 150, 152, 155]
14	miR-16	[147, 152, 154, 155]
15	miR-17-5p	[144, 147, 152-155]
16	miR-17-3p	[147, 149, 155]
17	miR-18a	[147]
18	miR-19a	[153-155]
19	miR-19b	[149, 153, 155]
20	miR-20a (miR-20)	[144, 147, 152-154]
21	miR-20b	[155]
22	miR-20b*	[155]
23	miR-21	[141, 146-154, 156-158]
24	miR-21*	[149, 157]
25	miR-22	[155]
26	miR-23a	[147, 150, 155]
27	miR-24	[155]
28	miR-24-2*	[149]
29	miR-25	[147, 149, 150, 153-155, 157, 211]
30	miR-25*	[149]
31	miR-26a	[148, 150]
32	miR-26b	[152]
33	miR-27a	[147, 150]
34	miR-28	[149, 154]
35	miR-28-3p	[149]
36	miR-29b-1*	[151]
37	miR-30a-5p	[147]
38	miR-30b	[149]

39	miR-30e	[151]
40	miR-30e*	[151]
41	miR-32	[149, 155]
42	miR-34a	[155]
43	miR-92a (miR-92, miR-92a-3p)	[147, 149, 153, 155, 157]
44	miR-92b	[147, 149, 150, 155, 157]
45	miR-92b*	[149]
46	miR-93	[147, 149, 150, 153, 155, 157]
47	miR-96	[149, 153, 155]
48	miR-98	[151]
49	miR-99a	[149, 155]
50	miR-105	[155]
51	miR-106a	[144, 147, 153, 155]
52	miR-106b	[147, 149, 150, 153, 155]
53	miR-106b*	[149, 155]
54	miR-122*	[155]
55	miR-123	[141]
56	miR-125b	[151, 158]
57	miR-125b-1	[141]
58	miR-125b-2	[141]
59	miR-126	[152]
60	miR-130a	[102, 141, 153, 155, 211]
61	miR-130b	[147, 153-155]
62	miR-130b*	[149]
63	miR-135a* (miR-135a- 3p)	[149]
64	miR-135b	[153, 155]
65	miR-136	[151]
66	miR-138	[146]
67	miR-140	[154]
68	miR-141	[150]
69	miR-142-3p	[147, 150, 155]
70	miR-142-5p	[150, 155]
71	miR-143	[155]
72	miR-144	[150, 155]
73	miR-146a	[155]
74	miR-146b-5p	[144, 155]
75	miR-148a	[144, 149, 150]
76	miR-148a*	[157]
77	miR-152	[155]
78	miR-155	[146, 147, 152, 153, 155, 156]
79	miR-181a-2*	[151, 155]
80	miR-182	[149, 150, 153, 155, 211]

81	miR-182*	[153]
82	miR-183	[150, 153]
83	miR-188	[153, 211]
84	miR-193 (miR-193a, miR-193a-3p)	[144, 153, 155]
85	miR-195	[155]
86	miR-196b	[147, 150, 155, 157]
87	miR-199b-3p miR-199a-3p	[155]
88	miR-200b	[144]
89	miR-200c	[153]
90	miR-205	[153]
91	miR-206	[153]
92	miR-208	[153]
93	miR-210	[147, 152-154, 156]
94	miR-215	[155]
95	miR-216	[153]
96	miR-217	[153, 157]
97	miR-221	[141, 146]
98	miR-223	[150]
99	miR-296	[153]
100	miR-296-3p	[157]
101	miR-301a	[153]
102	miR-302a	[153]
103	miR-302b	[153]
104	miR-302b*	[153]
105	miR-302c	[153]
106	miR-302c*	[153]
107	miR-302d	[153]
108	miR-320 (miR-320a)	[147, 153, 155]
109	miR-320b	[149]
110	miR-320c	[157]
111	miR-320d	[157]
112	miR-335	[155]
113	miR-345	[149]
114	miR-347	[146]
115	miR-362	[150]
116	miR-362-3p	[155]
117	miR-367	[153]
118	miR-371	[153]

119	miR-372	[153]
120	miR-373	[153, 155]
121	miR-374a	[152, 155]
122	miR-374a*	[149]
123	miR-374b	[155]
124	miR-376c	[155]
125	miR-381	[155]
126	miR-383	[148]
127	miR-422a	[147]
128	miR-424	[155]
129	miR-450 (miR-450a, miR-450a-5p)	[147, 155]
130	miR-451	[148, 150, 155, 211]
131	miR-486	[148, 150, 211]
132	miR-492	[147]
133	miR-497	[155]
134	miR-503	[150]
135	miR-505	[150, 155]
136	miR-509-3-5p	[155]
137	miR-513a-5p	[155]
138	miR-519d	[148]
139	miR-532	[150, 155]
140	miR-542-5p	[150, 155]
141	miR-542-3p	[149, 150]
142	miR-546	[151]
143	miR-550	[150, 155]
144	miR-552	[155]
145	miR-590	[147]
146	miR-629	[147]
147	miR-630	[211]
148	miR-660	[155]
149	miR-671	[211]
150	miR-720	[149]
151	miR-886-5p	[155]
152	miR-886-3p	[155]
153	miR-891a	[157]
154	miR-1274b	[151]
155	miR-1280	[151]
156	miR-4286	[149]
157	miR-4448	[157]

Tabela 1.8

miRNA opisane w literaturze, których poziom jest niższy w GBM niż w zdrowych tkankach mózgowych.

Nr	miRNA	Referencje
1	miR-1	[149]
2	miR-7	[147, 149, 152, 156, 157, 211]
3	miR-7-1*	[149]
4	miR-15a	[146]
5	miR-16	[146]
6	miR-1	[146]
7	miR-22	[157]
8	miR-26b	[153]
9	miR-29b	[147, 156]
10	miR-29c	[147]
11	miR-31	[144, 149, 156]
12	miR-33	[147, 153, 211]
13	miR-95	[147, 157]
14	miR-98	[153]
15	miR-101	[156]
16	miR-103 (miR-103a, miR-103a- 3p)	[147, 157]
17	miR-103b	[157]
18	miR-107	[147, 153, 156]
19	miR-124-3p (miR-124, miR-124a)	[147-149, 152, 153, 155, 156, 211]
20	miR-124b	[156]
21	miR-124-1	[153]
22	miR-124-5p miR-124*	[157]
23	miR-126	[153]
24	miR-127 (miR-127- 3p)	[147, 152]
25	miR-128	[147, 152, 155]
26	miR-128a (miR-128-1)	[148, 153, 156, 158]
27	miR-128b (miR-128-2)	[147, 148, 153]
28	miR-129-5p	[147, 149, 153, 155, 156, 211]
29	miR-129*	[149, 155]
30	miR-132	[147, 149, 152, 153, 155- 157]
31	miR-132*	[149]

32	miR-133a	[146, 147, 149]
33	miR-133b	[146, 147, 149]
34	miR-134	[152]
35	miR-136	[147, 153, 157, 211]
36	miR-137	[147, 148, 153, 156]
37	miR-138	[147, 149, 155, 156]
38	miR-138-1*	[149, 157]
39	miR-139-5p	[147, 148, 151-153, 156, 157, 211]
40	miR-139-3p	[157]
41	miR-143	[153]
42	miR-149	[147, 152, 156]
43	miR-150	[151]
44	miR-153	[147, 153, 156, 157]
45	miR-154	[147, 153]
46	miR-154*	[146, 147, 149, 153]
47	miR-181c	[141, 146, 158]
48	miR-181a	[141, 146, 158, 213]
49	miR-181b	[141, 158, 213]
50	miR-184	[154]
51	miR-185	[156]
52	miR-187	[156]
53	miR-187*	[155]
54	miR-190	[148]
55	miR-191	[149]
56	miR-198	[155]
57	miR-203	[146, 147, 149, 153]
58	miR-211	[151]
59	miR-212	[157]
60	miR-218	[147-149, 151, 153, 156, 157, 211]
61	miR-219	[147, 211]
62	miR-219-2- 3p	[155]
63	miR-221	[144, 158]
64	miR-222	[144, 158]
65	miR-299-5p	[147, 148, 153]
66	miR-301b	[157]
67	miR-323 (miR-323-3p miR-323a- 3p)	[146-149, 153, 155, 157]
68	miR-323b-3p	[157]
69	miR-324-5p	[147]
70	miR-326	[147]
71	miR-328	[146, 151, 153, 154]
72	miR-329	[147, 155]
73	miR-330	[146, 147]

74	miR-330-3p	[152]
75	miR-331	[147]
76	miR-338	[147, 153, 155]
77	miR-338-3p	[155]
78	miR-339-5p	[152]
79	miR-340	[147]
80	miR-342	[147, 149, 157]
81	miR-369-5p	[147, 149, 153]
82	miR-370	[153]
83	miR-376a*	[147]
84	miR-377	[147]
85	miR-379	[147, 157]
86	miR-380-3p	[147]
87	miR-382	[157]
88	miR-383	[147]
89	miR-409-3p	[147]
90	miR-409-5p	[147, 152]
91	miR-410	[147, 149]
92	miR-411	[147]
93	miR-411-3p	[157]
94	miR-425	[149]
95	miR-432	[147, 149, 155]
96	miR-433	[147, 149]
97	miR-448	[147]
98	miR-483-5p	[148, 155]
99	miR-485-3p	[147, 149]
100	miR-485-5p	[147, 149]
101	miR-487a	[147]
102	miR-487b	[147, 149, 157]
103	miR-488	[147]
104	miR-490	[147]
105	miR-490-3p	[157]
106	miR-491	[147]
107	miR-495	[147, 149, 157]
108	miR-496	[147]
109	miR-498	[155]
110	miR-504	[147, 157]
111	miR-511-1	[148]
112	miR-539	[147]
113	miR-543	[157]
114	miR-548i	[157]
115	miR-575	[151]
116	miR-584	[155]
117	miR-598	[147]
118	miR-628	[147, 149]
119	miR-628-3p	[155]
120	miR-637	[155]

121	miR-638	[155]
122	miR-656	[147, 149]
123	miR-664*	[149]
124	miR-665	[155]
125	miR-668	[149]
126	miR-675b	[151]
127	miR-758	[147]
128	miR-765	[155]
129	miR-767-5p	[157]
130	miR-769-5p	[147]
131	miR-769-3p	[149]
132	miR-770-5p	[157]
133	miR-873	[157]
134	miR-876-3p	[149]
135	miR-885-5p	[157]
136	miR-885-3p	[149]
137	miR-889	[157]
138	miR-935	[149]
139	miR-940	[149]
140	miR-1185	[149]
141	miR-1224-5p	[149]
142	miR-1258	[149]
143	miR-1270	[157]
144	miR-1273d	[157]
145	miR-1827	[149]
146	miR-1908	[155]

Tabela 1.9

miRNA najczęściej wskazywane w badaniach profilowania miRNA jako typowe dla nowotworów glejowych mózgu. ↑ - podwyższony, ↓ - obniżony poziom miRNA.

N r	miRNA	Zmiana w poziomie miRNA	Referencje
1	miR-9-5p	↑	[146, 147, 149, 151, 152, 155]
2	miR-10a-5p	↑	[150, 153, 155, 157]
3	miR-10b-5p	↑	[141, 144, 148-151, 153, 155-157, 211, 212]
4	miR-15b-5p	↑	[147, 152, 154, 155]
5	miR-16-5p	↑	[147, 152, 154, 155]
6	miR-17-5p	↑	[144, 147, 152-155]
7	miR-20a-5p (miR-20)	↑	[144, 147, 152-154]
8	miR-21-5p	↑	[141, 147-152, 154-157]
9	miR-25-3p	↑	[141, 147, 149, 150, 154, 155, 157, 211]
10	miR-92a-3p (miR-92a, miR-92)	↑	[141, 147, 149, 153, 155, 157]
11	miR-92b-3p	↑	[141, 147, 149, 150, 155, 157]
12	miR-93-5p	↑	[141, 147, 149, 150, 153, 155, 157]
13	miR-106a-5p	↑	[141, 144, 147, 153, 155]
14	miR-106b-5p	↑	[141, 147, 149, 150, 153, 155]
15	miR-130a-3p	↑	[141, 147, 153, 155, 211]
16	miR-130b-3p	↑	[147, 153-155]
17	miR-155-5p	↑	[146, 147, 152, 153, 155]
18	miR-182-5p	↑	[149, 150, 153, 155, 211]
19	miR-196b-5p	↑	[147, 150, 155, 157]
20	miR-210	↑	[146, 147, 152-154]
21	miR-451 (miR-451a)	↑	[148, 150, 155, 211]
22	miR-7-5p	↓	[146, 147, 149, 152, 157, 211]
23	miR-124-3p (miR124a, miR-214)	↓	[147, 148, 152, 153, 155, 156, 211]
24	miR-128-3p (miR-128a)	↓	[148, 150, 153, 156]
25	miR-129-5p	↓	[147-149, 153, 155, 156, 211]
26	miR-132-3p	↓	[147, 152, 153, 155-157]
27	miR-136-5p	↓	[147, 153, 157, 211]
28	miR-137	↓	[146-148, 153]
29	miR-138-5p	↓	[146, 147, 149, 155]
30	miR-139-5p	↓	[147, 148, 151-153, 156, 157, 211]
31	miR-153-3p	↓	[147, 153, 156, 157]
32	miR-154-3p	↓	[147, 149, 153, 156]
33	miR-181a-5p	↓	[141, 146, 150, 213]
34	miR-203a	↓	[147, 149, 153, 156]
35	miR-218-5p	↓	[147-149, 151, 156, 157, 211]
36	miR-323a-3p (miR-323)	↓	[147-149, 153, 156]
37	miR-328-3p	↓	[151, 153, 154, 156]

Tabela 1.10

miRNA, co do których poziomu w tkankach guzów glejowych mózgu istnieją rozbieżności.

↑ - podwyższony, ↓ - obniżony poziom miRNA.

miRNA	Zmiana w poziomie miRNA	Referencje
miR-15a	↑	[147, 154, 155]
	↓	[146]
miR-16	↑	[147, 152, 154, 155]
	↓	[146]
miR-22	↑	[155]
	↓	[157]
miR-26b	↑	[5][152]
	↓	[153]
miR-98	↑	[151]
	↓	[153]
miR-126	↑	[152]
	↓	[153]
miR-136	↑	[151]
	↓	[147, 153, 157, 211]
miR-138	↑	[146]
	↓	[147, 149, 155, 156]
miR-143	↑	[155]
	↓	[153]
miR-221	↑	[141, 146]
	↓	[144, 150]
miR-383	↑	[148]
	↓	[147]

64 miRNA wytypowane przez nas w analizie mikromacierzowej, jako występujące na istotnie zmienionym poziomie w tkankach guzów glejowych mózgu w porównaniu z tkankami zdrowymi, opisano wcześniej w literaturze jako typowe dla nowotworów glejowych mózgu IV stopnia złośliwości. 29 spośród nich (m.in. miR-21, miR-155, miR-210, miR-15b, miR-93 and miR-25) występuje na podwyższonym, 35 na obniżonym poziomie (np. miR-7, miR-139-5p, miR-218, miR-137). 33 wskazane przez nas miRNA nie były wcześniej skorelowane z nowotworami mózgu.

Poznanie swoistego dla GBM profilu ekspresji miRNA znacząco zwiększa możliwości diagnozy i prognozowania tych nowotworów. Nadal jednak jesteśmy dalecy od zrozumienia mechanizmów regulacji komórkowej z udziałem miRNA, a zatem również od ich wykorzystania jako potencjalne cele terapeutyczne. Zgodnie z przyjętym modelem przeciętny ludzki miRNA może rozpoznawać i regulować ekspresję nawet

100-1000 różnych targetów, a ekspresja jednego mRNA może podlegać regulacji nawet przez 1000 różnych miRNA. Rodzi to pytanie o specyficzność działania tych krótkich RNA. Ostatnio pojawiły się doniesienia, że miRNA mogą funkcjonować poza kompleksem RISC. Obserwując podobieństwo sekwencji miRNA i innych krótkich RNA (Rysunek 4.6) oraz mając na uwadze strukturę i funkcje tych drugich, można wnioskować, że miRNA przyjmują w komórce strukturę, co potencjalnie przekłada się na ich właściwości i funkcje. Poznanie struktury miRNA może przyczynić się do zrozumienia mechanizmów zależnej od miRNA regulacji komórkowej oraz patogenezy chorób u podłoża których leżą te krótkie niekodujące RNA. Próbując zrozumieć wielofunkcyjność, a zarazem specyficzność miRNA postanowiłam sprawdzić czy miRNA tworzą strukturę i w jaki sposób przekłada się ona na ich właściwości i funkcje. Kolejne części pracy dotyczą badań mających na celu określenie struktury wybranych miRNA nadreprezentowanych w komórkach glejaka wielopostaciowego (miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b oraz miR-15b) oraz otrzymanie narzędzi pozwalających na obniżenie ich poziomu w komórkach.

2. Badania struktury dojrzałych miRNA oraz ich prekursorów

Określono struktury dojrzałych miRNA (miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b) oraz pre-miR-21 (i) metodą mapowania enzymatycznego z wykorzystaniem specyficznych nukleaz: RNazy T1, RNazy V1, nukleazy S1 oraz RNazy H1 w obecności oligodeoksyrybonukleotydów, (ii) metodą mapowania chemicznego (w obecności jonów ołowiu) oraz (iii) z użyciem metod spektroskopowych (CD, NMR, UV/Vis). Dodatkowo określono struktury drugorzędowe pozostałych dojrzałych miRNA zdeponowanych w bazie miRBASE v.19.

2.1. Analiza struktury z zastosowaniem metod biochemicznych oraz spektroskopii NMR, UV/Vis i CD

2.1.1. miR-21

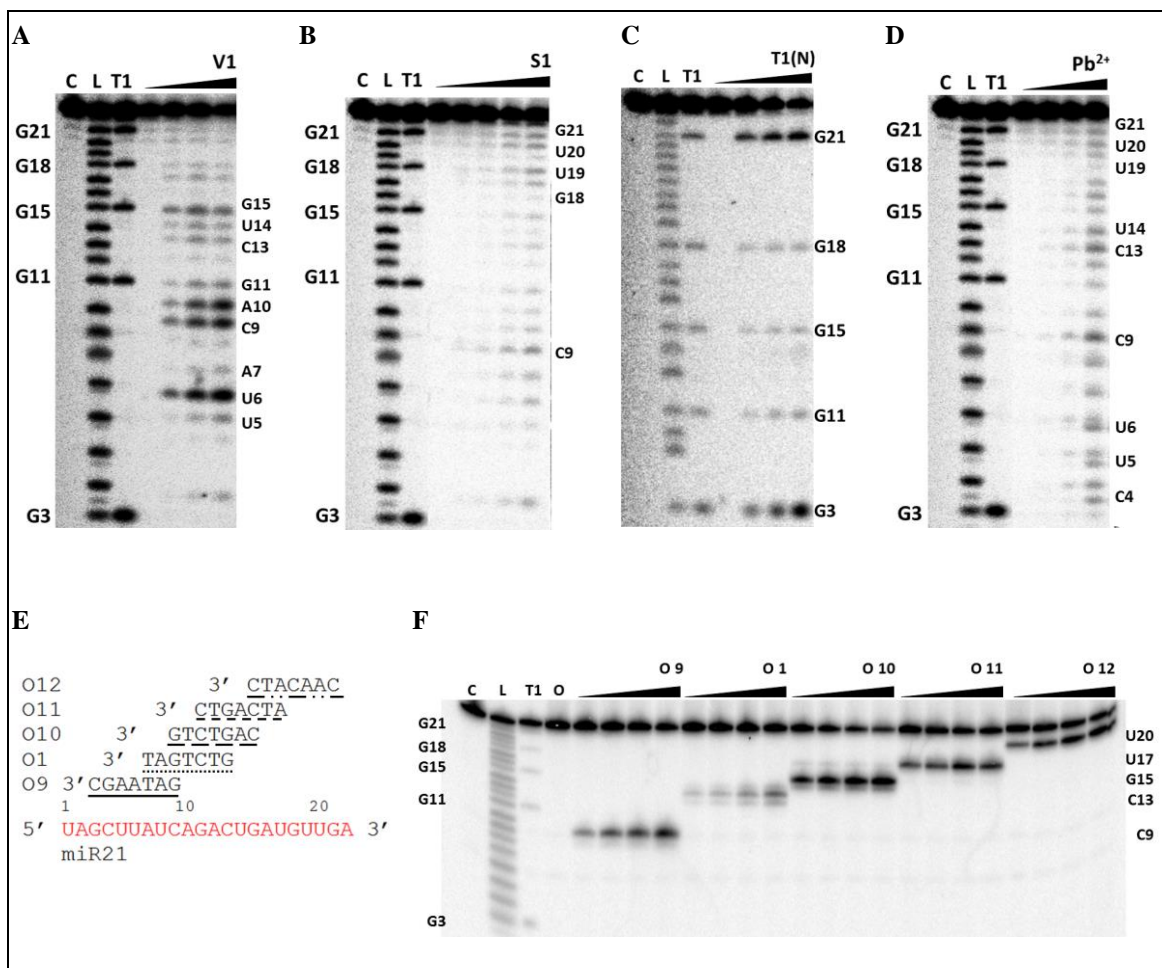
RNaza V1, enzym hydrolizujący wiązania fosfodiesterowe po dowolnych nukleotydach zaangażowanych w oddziaływania drugorzędowe lub warstwowe, najwydajniej hydrolizuje wiązania w obrębie miR-21 po A6, C9, A10 oraz G15 (Rysunek 2.1 (A)). Wnioskuję zatem, że reszty te znajdują się w rejonach zaangażowanych w tworzenie struktury drugorzędowej. Rejony te nie są hydrolizowane (bądź jedynie w nieznacznym stopniu) przez nukleazę S1 wykazującą specyficzność względem rejonów jednoniciowych. Nukleaza ta z kolei hydrolizuje RNA w rejonie G18-G21, stanowiącym niesparowany koniec 5' miR-21 (Rysunek 2.1 (B)). Analiza profilu hydrolizy RNA przez RNazy T1 w warunkach natywnych potwierdza, że miR-21 może przyjmować strukturę drugorzędową, z G11, G15 oraz G18 w obrębie trzonu spinki do włosów, alternatywnie w rejonie dwuniciowym dupletu miR-21 (obserwujemy wyraźnie słabszą hydrolizę RNA po tych nukleotydach). Obserwowano wyraźnie wydajniejszą hydrolizę po guanozynach G3 i G21, co sugeruje, że znajdują się one w obrębie wolnych końców cząsteczki miR-21 (Rysunek 2.1 (C)).

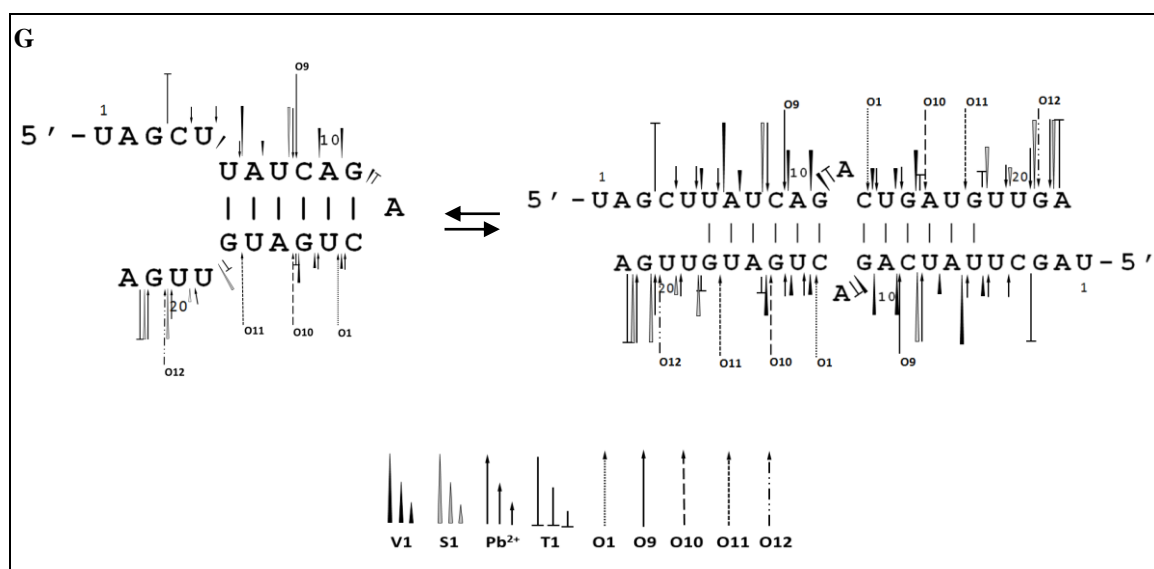
RNaza H1 hydrolizuje miR-21 z różną wydajnością w zależności od użytego w reakcji sześci nukleotydowego oligodeoksyrybonukleotydu (O1, O9-O12). Kompleksy RNA-DNA są rozpoznawane i hydrolizowane przez RNazę H1. Stopień hydrolizy odzwierciedla dostępność poszczególnych rejonów miRNA dla komplementarnych do nich oligo DNA. W reakcjach z O1 i O10 stopień hydrolizy RNA jest najniższy, co wskazuje najmniejszą dostępność komplementarnych do nich rejonów miR-21. Może to

wynikać z ich zaangażowania w tworzenie struktury drugorzędowej RNA (Rysunek 2.1 (E, F)).

Hydroliza miR-21 w obecności jonów Pb^{2+} zachodzi najwydajniej w rejonach C4G6, C13U14, U19G21 oraz U8, słabiej A7-A12 i G15-G18 (Rysunek 2.1 (D)). Dowodzi to, że miR-21 może tworzyć strukturę drugorzędową, z rejonem dwuniciowym, w rejonie A7-A12 oraz G15-G18.

Zastosowane metody analizy struktury RNA wskazują, że miR-21 tworzy strukturę drugorzędową, nie rozstrzygają jednak czy mamy do czynienia ze strukturą spinki do włosów czy z dupleksem miR-21. W tworzeniu obu tych struktur zaangażowane są wiązania wodorowe między tymi samymi parami zasad miR-21, dlatego nie jest możliwe ich rozróżnienie w oparciu o otrzymane wyniki.





Rysunek 2.1

Analiza struktury miR-21 z zastosowaniem metod mapowania enzymatycznego (A, B, C, F) oraz chemicznego (D).

A, B, C, D, F. Autoradiogramy 20 % żeli poliakrylamidowych z produktami hydrolizy miR-21 z udziałem RNazy V1, nukleazy S1, RNazy T1 w warunkach natywnych, w obecności Pb²⁺ oraz RNazy H1 w obecności oligodeoksyrybonukleotydów komplementarnych do różnych rejonów miR-21.

A. V1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy V1 (0, 0.0001, 0.0002, 0.0004 u/μl).

B. S1 - ograniczona hydroliza z udziałem nukleazy S1 (0, 0.0011875, 0.002375, 0.00475, 0.0095 u/μl).

C. T1(N) - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0, 0.04, 0.02, 0.01 u/μl) w warunkach natywnych.

D. Pb²⁺ - hydroliza z udziałem Pb²⁺ (0, 0.1, 0.5, 0.9 mM).

E. Sekwencje oligodeoksyrybonukleotydów (O1, O9-O12) komplementarnych do różnych rejonów miR-21. Na czerwono zaznaczono sekwencję miR-21.

F. O1, O9-O12 – ograniczona hydroliza z udziałem RNazy H1 (0.04 u/μl) w różnych stężeniach (0, 1.25, 2.5, 5, 10 μM) oligodeoksyrybonukleotydów (O1, O9-O12).

G. Schemat struktury drugorzędowej miR-21 (spinki do włosów oraz dupleksu) ze wskazanymi miejscami hydrolizy indukowanymi przez RNazę T1, RNazę V1, nukleazę S1, RNazę H1 w obecności O1, O9-O12 oraz Pb²⁺.

C – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w kontrolowanych warunkach, T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1(0.025u/μl) w warunkach denaturujących. Wzrost stężenia RNazy V1, nukleazy S1, RNazy S1, RNazy T1, oligodeoksyrybonukleotydów zaznaczono grotami. Produkty hydrolizy wskazano na autoradiogramach.

W zakresie przesunięć chemicznych typowych dla kanonicznych par zasad Watsona-Cricka (11.5-14.3 ppm) widma jednowymiarowego H₂O/D₂O (9:1, v/v) obserwowano pięć sygnałów pochodzących od iminowych atomów wodoru (Rysunek 2.2 (A)). Na podstawie rozkładu sygnałów iminowych widma heterojądrowego ¹H-¹⁵N HSQC rozrózniono protony iminowe pochodzące od reszt guanozyny oraz urydyny (Rysunek 2.2 (B)). Dwa pierwsze sygnały przesunięte w kierunku niższego pola pochodzą od

protonów iminowych reszt urydyny, kolejne dwa od protonów iminowych reszt guanozyny. Ich rozróżnienie jest możliwe dzięki dużej różnicy przesunięć chemicznych atomów azotu dla tych reszt nukleotydowych. Charakterystyczne wartości przesunięcia chemicznego dla atomów azotu N1 w guanozynie mieszczą się w przedziale 145-148 ppm, dla atomów azotu N3 w urydynie w przedziale 157-162 ppm (Rysunek 2.2 (B)).

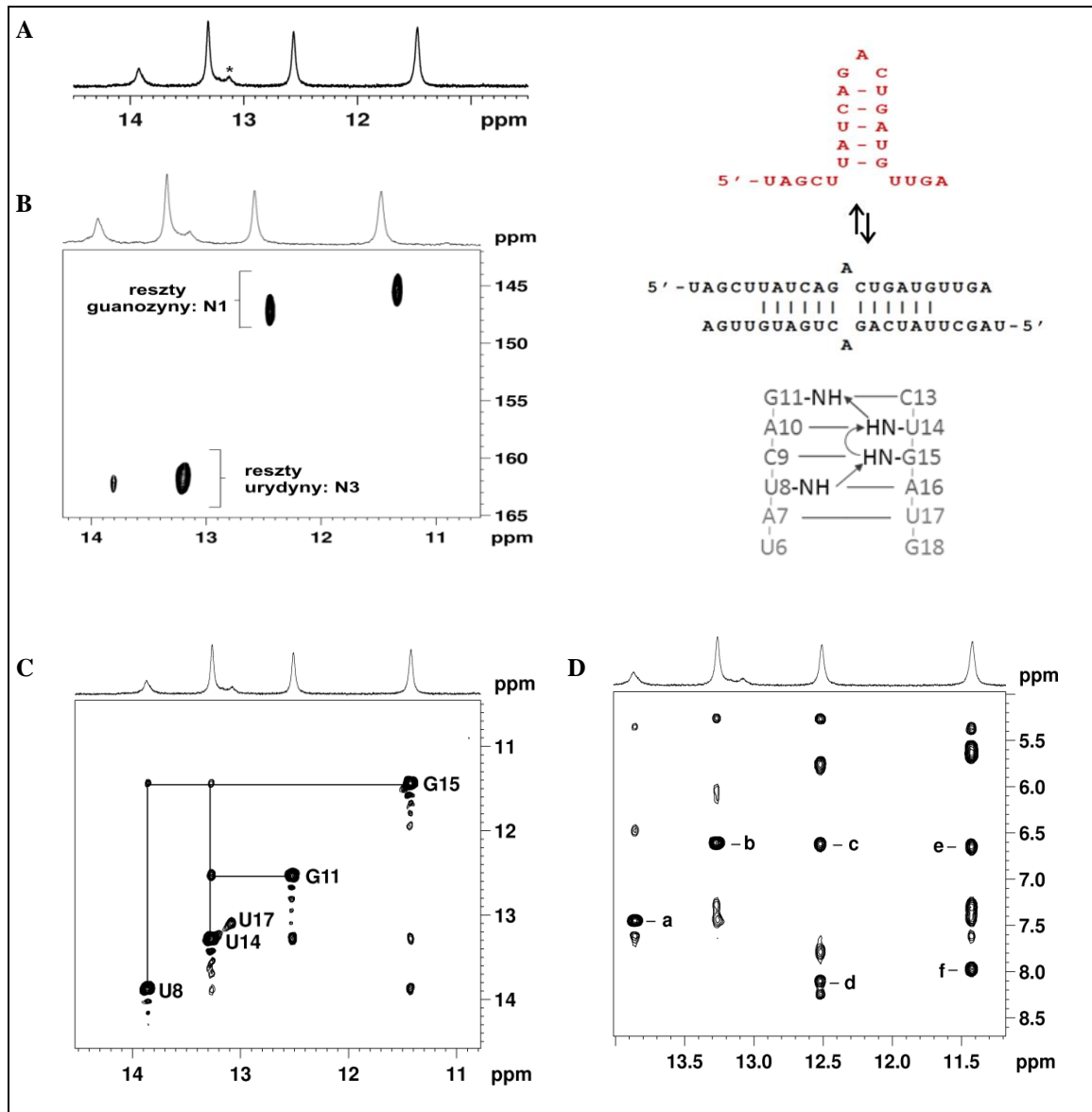
Na podstawie analizy sygnałów korelacyjnych dwuwymiarowego widma homojądrowego 2D NOESY ustalono kontakty NOE pomiędzy iminowymi atomami wodoru U14-G15, U8-G15 oraz G11-U14. Pozwoliło to wyznaczyć cztery kolejne pary zasad: G11-C13, A10-U14, C9-U15, U8-A16 (Rysunek 2.2 (C, D)). Ze względu na niską intensywność sygnału od protonu iminowego U17 nie obserwowano sygnału korelacyjnego z udziałem tego protonu. W widmach ^1H NMR nie odnotowano także sygnałów rezonansowych protonów iminowych reszt U6 oraz G18 choć teoretycznie reszty te mogą być zaangażowane w tworzenie niekanonicznej pary zasad G:U. Jest to częste dla par terminalnych i wynika z szybszej w skali czasu NMR wymiany protonów iminowych w obrębie takiej pary niż w przypadku pozostałych par zasad.

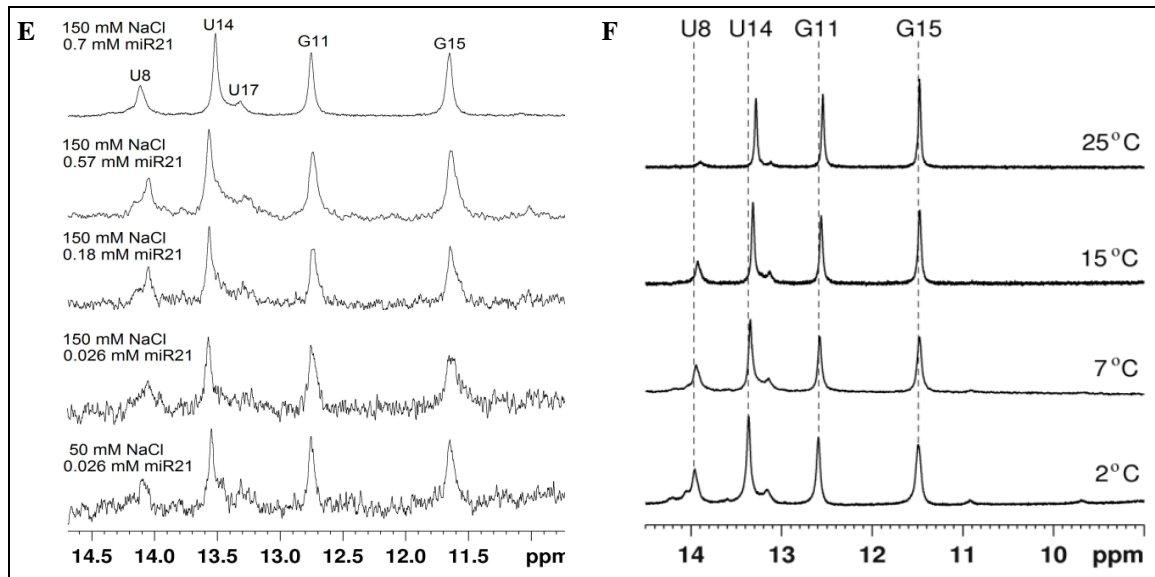
Opisane powyżej wyniki otrzymano na podstawie pomiarów z użyciem spektroskopii NMR w warunkach sprzyjających powstawaniu formy dupletu - stosunkowo wysokiego stężenia RNA (0.7 mM) oraz soli (150 mM NaCl). W warunkach sprzyjających powstawaniu spinki do włosów, w niższych stężeniach RNA oraz soli, nie obserwowano dodatkowych sygnałów mogących świadczyć o obecności dodatkowej formy miR-21. Przesunięcia chemiczne protonów iminowych są niemal identyczne w zakresie 26 μM - 0.7 mM RNA oraz w 50 – 150 mM NaCl (Rysunek 2.2 (E)).

Na widmach otrzymanych w niskich temperaturach (2 – 25 °C) również nie obserwowano dodatkowych sygnałów, które mogłyby pochodzić od formy spinki do włosów. Wraz ze wzrostem temperatury obserwowano jedynie zanik sygnałów protonów iminowych reszty U17 oraz U8 co świadczy o topieniu struktury (poczynając od najbardziej terminalnych par) (Rysunek 2.2 (F)).

Z użyciem metod spektroskopii NMR potwierdzono, że miR-21 tworzy strukturę drugorzędową oraz wyznaczono reszty nukleotydowe miR-21 zaangażowane w wiązania wodorowe. Na podstawie otrzymanych widm nie można jednoznacznie określić czy miR-21 przyjmuje formę spinki do włosów czy dupletu. Nie można

wykluczyć współistnienia obu form w roztworze. Ograniczenie to wynika z zaangażowania takich samych par zasad w wiązania wodorowe zarówno w spince do włosów jak i duplesie miR-21 oraz bardzo podobnych kontaktów NOE dla obu tych form.





Rysunek 2.2

Analiza struktury miR-21 z użyciem metod spektroskopii NMR.

A. Rejon iminowy widma ^1H NMR miR-21.

B. Widmo ^1H - ^{15}N HSQC miR-21. Sygnałom przypisano protony iminowe reszt urydyny oraz protony iminowe reszt guanozyny.

C. Rejon iminowy widma ^1H - ^1H 2D NOESY miR-21 w 15 °C. Sygnałom iminowym przypisano poszczególne reszty nukleotydowe.

D. Widmo 2D NOESY miR-21 w 15 °C. Zaznaczono kontakty NOE pomiędzy iminowymi atomami wodoru: a – U8:NH1-A16:H2, b – U14:NH1-A10:H2, c – G11:NH1-C13:NH4₂ d - G11:NH1-C13:NH4₁, e - G15:NH1-C9:NH4₂, f - G15:NH1-C9:NH4₁. Wyznaczono cztery kolejne pary zasad: G11-C13, A10-U14, C9-U15, U8-A16.

E. Rejon iminowy widm ^1H NMR otrzymanych dla miR-21 w różnych stężeniach RNA (0.026, 0.18, 0.57, 0.7 mM) w obecności 50 lub 150 mM NaCl.

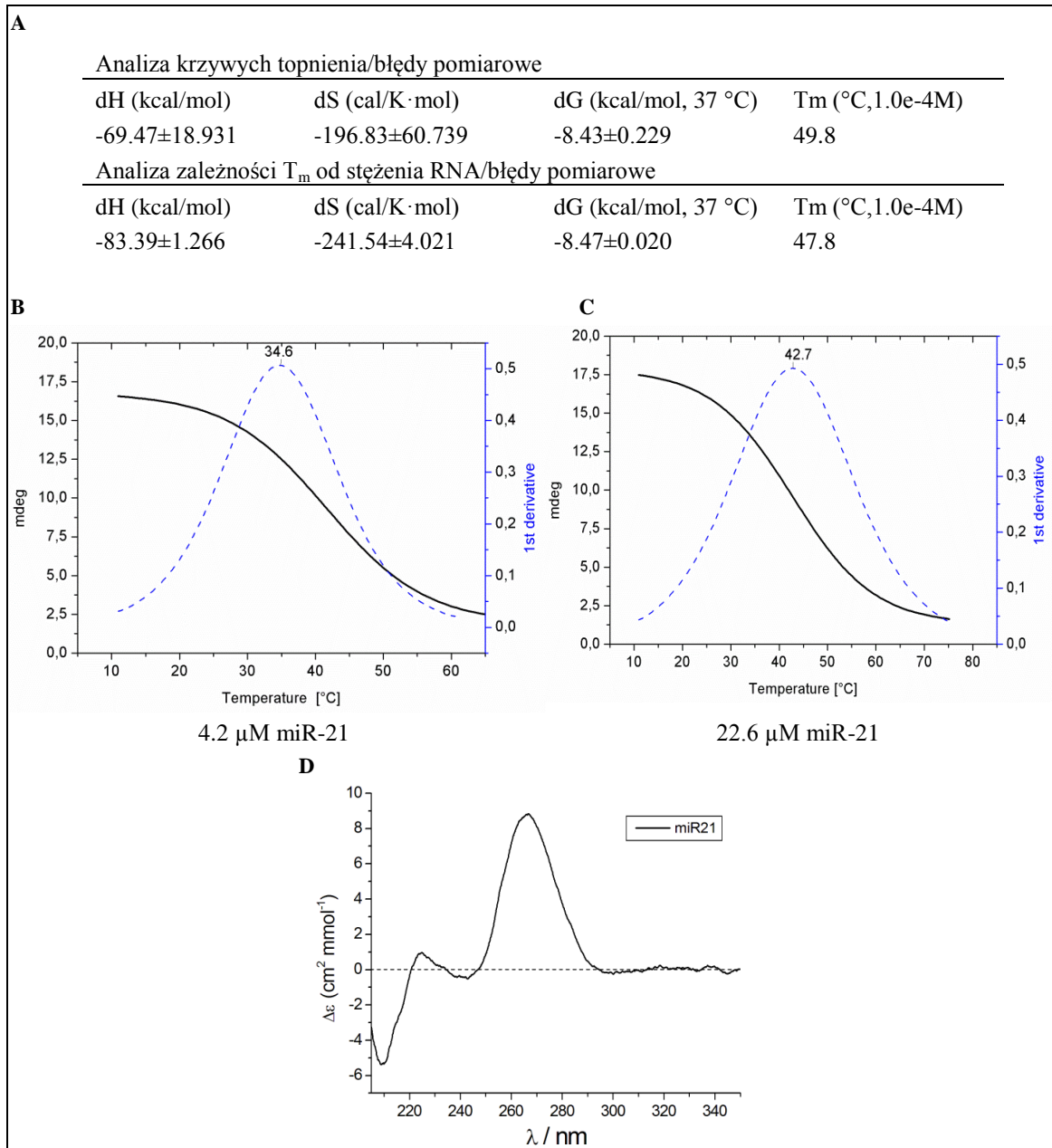
F. Rejon iminowy widm ^1H NMR otrzymanych dla miR-21 w różnych temperaturach (2, 7, 15, 25 °C).

Widma otrzymano w $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90 %:10 %), 150 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 0.7 mM miR-21, w 7 °C (chyba, że wskazano inaczej).

Temperatury topnienia miR-21 wyznaczone z użyciem metod spektroskopii UV/Vis oraz CD rosną wraz ze wzrostem stężenia miRNA w przedziale 0.8 - 73 μM . Na podstawie wykresu zależności T_m od stężenia RNA możliwe jest rozróżnienie spinki do włosów i dupleksu. Gdy RNA przyjmuje strukturę w obrębie jednej cząsteczki (przykładowo struktura spinki do włosów) temperatura topnienia RNA nie zależy od jego stężenia. W przypadku dupleksów, T_m rośnie wraz ze wzrostem stężenia RNA.

Wyniki otrzymane dla miR-21 wskazują, że w przedziale badanych stężeń, 0.8 - 73 μM , przyjmuje on formę dupleksu (Rysunek 2.3). Potwierdziły to widma CD miR-21. Są one typowe dla struktur A-RNA, a profile topnienia krzywych CD otrzymane dla dwóch

stężenia RNA (4.2 μM oraz 22.6 μM) różnią się o 7 $^{\circ}\text{C}$. Wskazuje to, że w badanych warunkach miR-21 przyjmuje formę dupleksu (Rysunek 2.3 (C, D, E)).



Rysunek 2.3

Analiza struktury miR-21 z zastosowaniem metod spektroskopii UV/Vis oraz CD.

A. Wartości parametrów termodynamicznych (T_m, entalpia, entropia oraz energia swobodna) wyznaczone z użyciem spektroskopii UV/Vis oraz oprogramowania MeltWin 3.5. Zależność T_m od stężenia miR-21 (0.8-73 μM).

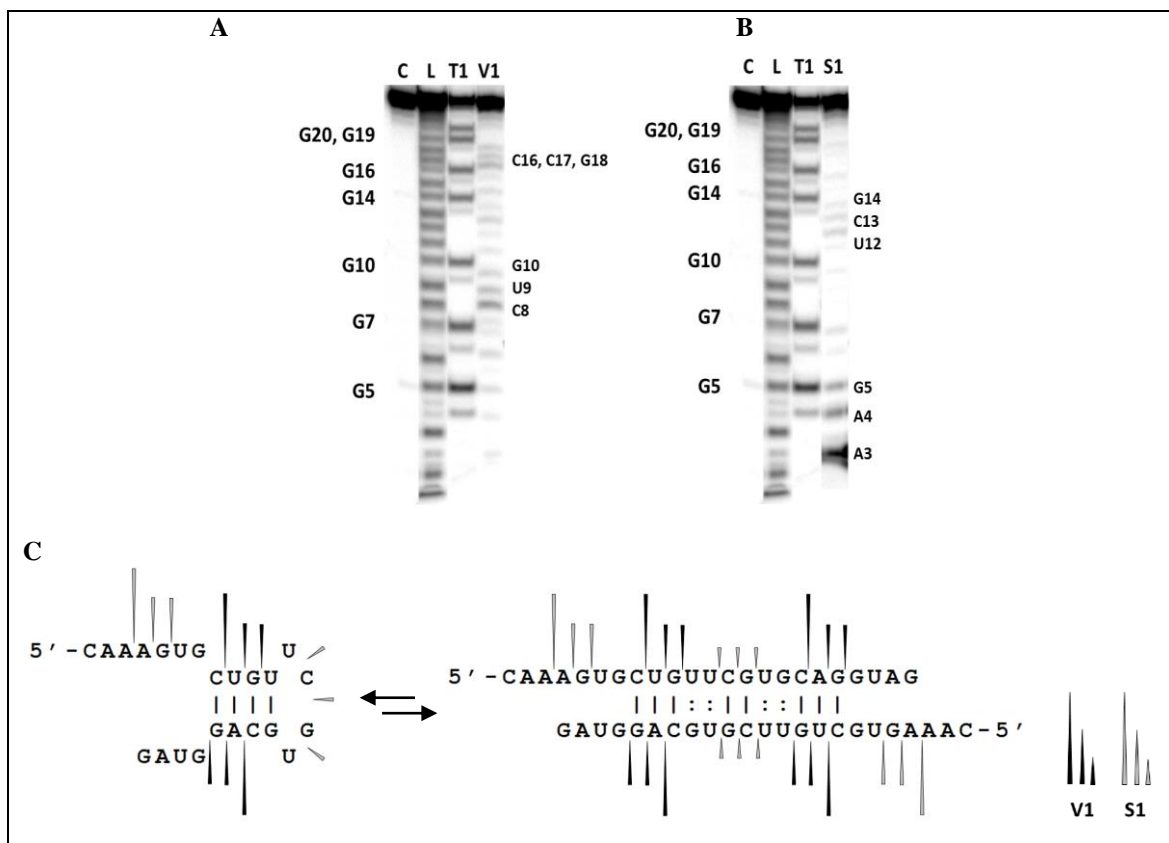
B, C. Widma CD wykonane dla dwóch różnych stężeń miR-21 (4.2 μM oraz 22.6 μM) otrzymane przy długości fali 260 nm, w zakresie temperatur od 10 do 75 $^{\circ}\text{C}$.

D. Widmo CD miR-21 (13.2 μM) w 25 $^{\circ}\text{C}$.

Widma otrzymano w 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6.6, 0.1 mM EDTA.

2.1.2. miR-93

RNaza V1 wydajnie hydrolizuje miR-93 w rejonach C8U9G10 oraz C16C17G18, nukleaza S1 - A3A4G5 oraz U12C13G14. Otrzymany profil hydrolizy RNA wskazuje, że miR-93 przyjmuje strukturę drugorzędową, spinkę do włosów bądź dupleks. Hydroliza RNA po U12, C13 oraz G14 indukowana przez nukleazę S1 sugeruje, że w badanych warunkach miR-93 tworzy strukturę spinki do włosów, z mniejszym prawdopodobieństwem dupleks (Rysunek 2.4).



Rysunek 2.4

Analiza struktury miR-93 z zastosowaniem metod mapowania enzymatycznego (A, B).

A, B. Autoradiogramy 20 % żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy miR-93 z udziałem RNazy V1 (A) oraz nukleazy S1 (B).

A. V1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy V1 (0.0002 u/μl).

B. S1 - ograniczona hydroliza z udziałem nukleazy S1 (0.00475 u/μl).

C. Schemat struktury drugorzędowej miR-93 (spinki do włosów oraz dupleksu) ze wskazanymi miejscami hydrolizy indukowanymi przez RNazę T1, RNazę V1 oraz nukleazę S1. Produkty hydrolizy wskazano na autoradiogramach.

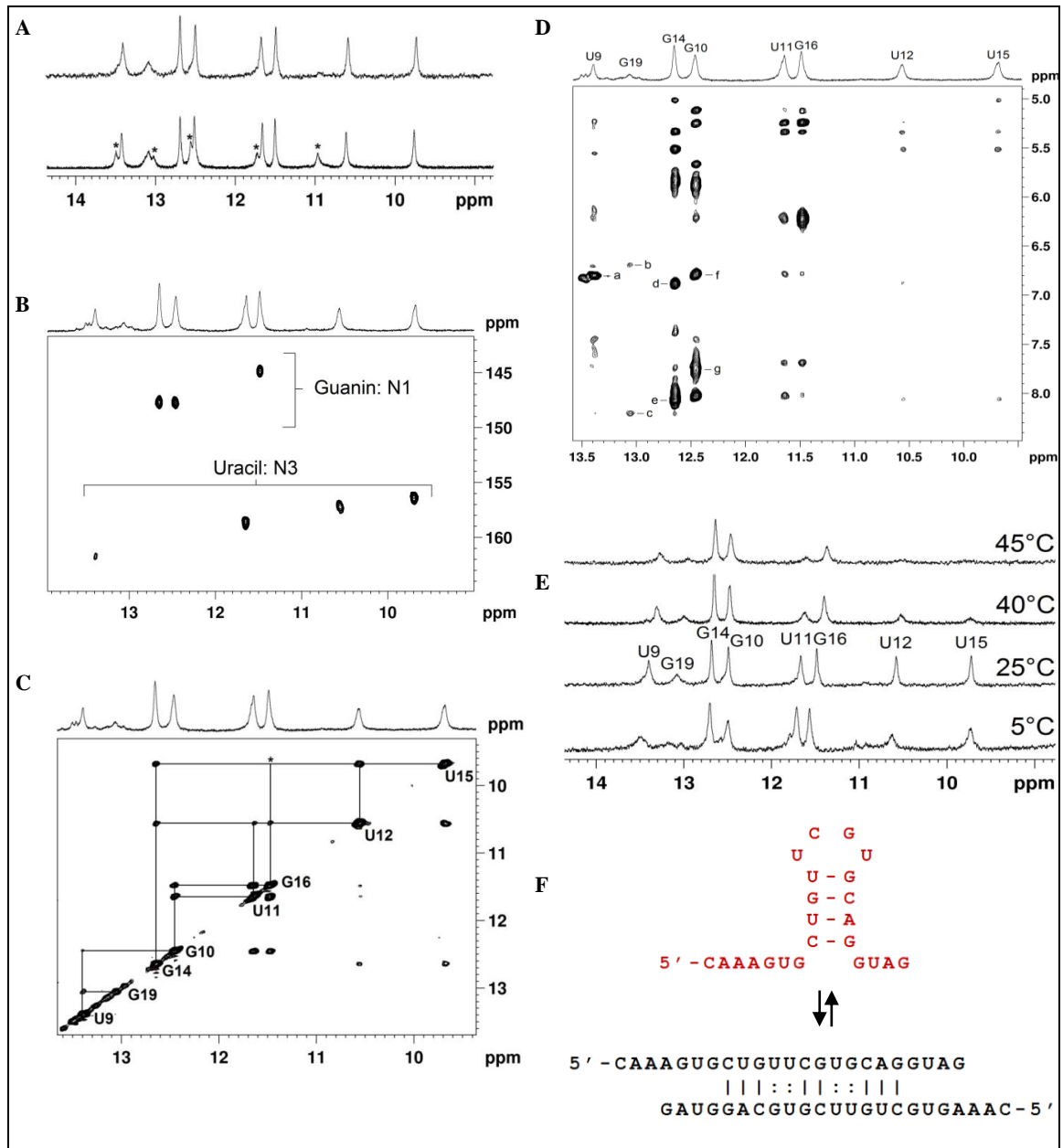
C – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych, T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0.025u/μl) w warunkach denaturujących.

Widmo protonowe NMR miR-93 otrzymane w 50 mM NaCl wskazują współistnienie dwóch struktur miR-93, spinki do włosów i dupleksu. Sygnały pochodzące od formy spinki nie występują na widmach otrzymanych w wyższym, 150 mM, stężeniu NaCl. Oznacza to, że w buforze o wyższej sile jonowej miR-93 preferencyjnie przyjmuje formę dupleksu (Rysunek 2.5 (A)).

Na podstawie widma heterojądrowego $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC miR-93 rozróżniono sygnały pochodzące od protonów iminowych reszt guanozyny oraz urydyny (Rysunek 2.5 (B)). Analiza sygnałów korelacyjnych dwuwymiarowego widma homojądrowego 2D NOESY pozwoliła przypisać sygnały iminowe poszczególnym resztom nukleotydowym (Rysunek 2.5 (C)). Określono kontakty NOE pomiędzy iminowymi atomami wodoru: U9:NH1-A18:H2, G19:NH1-C8:NH4₂, G19:NH1-C8:NH4₁, G14:NH1-C13:NH4₂, G14:NH1-C13:NH4₁, G10:NH1-C17:NH4₂, G10:NH1-C17:NH4₁ (Rysunek 2.5 (D)). Analiza sekwencyjnych oraz międzyciniowych kontaktów NOE pomiędzy iminowymi atomami wodoru reszt guanozyny oraz urydyny pozwoliła zidentyfikować rejon pomiędzy resztami C8-G19 jako dwuniciowy. Oprócz kanonicznych par zasad typu Watsona-Cricka obserwowano również powstawanie niekanonicznych par zasad U12:U15 oraz G16:U11. Świadczą o tym silne sygnały korelacyjne pomiędzy protonami iminowymi tych reszt. Obecność pary U12:U15 oraz G14:C13 jednoznacznie wskazuje, że w 150 mM NaCl miR-93 (0.75 mM) występuje w postaci homodupleksu. W przypadku spinki do włosów reszty od U12 do U15 tworzyłyby pętlę i nie byłyby zaangażowane w tworzenie par zasad.

Wraz ze wzrostem temperatury, w zakresie od 2 do 45 °C, obserwowano zanik sygnałów pochodzących od protonów iminowych terminalnych reszt nukleotydowych. Najpóźniej zanikający sygnał pochodzi od protonów iminowych reszty G14, co potwierdza, że w badanych warunkach miR-93 przyjmuje formę dupleksu (Rysunek 2.5 (E)).

miR-93 tworzy strukturę drugorzędową, preferencyjnie spinkę do włosów w nanomolarnych stężeniach miRNA oraz 50 mM NaCl, dupleks przy wyższej sile jonowej oraz milimolarnych stężeniach RNA. Mapowanie enzymatyczne oraz spektroskopia NMR dają jednoznaczną odpowiedź na temat struktury miR-93, dlatego nie wykonano dodatkowych analiz z użyciem innych metod użytych podczas analizy struktury miR-21.



Rysunek 2.5

Analiza struktury miR-93 z użyciem metod spektroskopii NMR.

A. Rejon iminowy widma ^1H NMR miR-93 otrzymanego w 25 °C w 150 mM (powyżej) oraz 50 mM NaCl (poniżej). Sygnały iminowe dla formy spinki do włosów zaznaczono *.

B. Widmo ^1H - ^{15}N HSQC miR-93. Sygnałom przypisano protony iminowe reszt urydyny oraz protony iminowe reszt guanozyny.

C. Rejon iminowy widma ^1H - ^1H 2D NOESY miR-93. Sygnałom iminowym przypisano poszczególne reszty nukleotydowe.

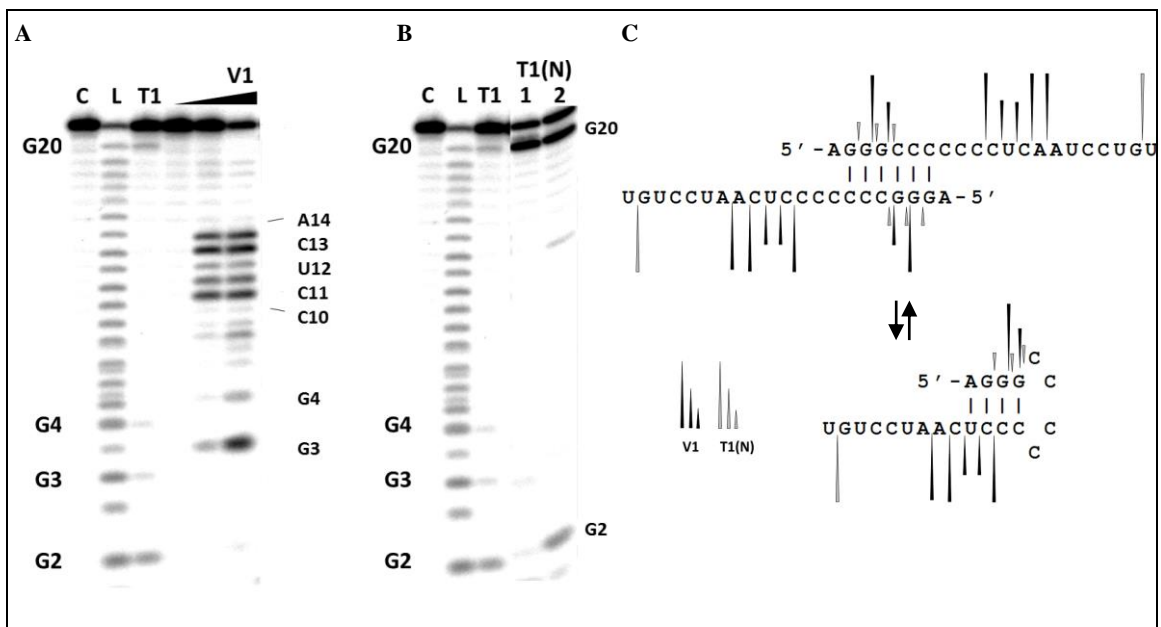
D. Widmo 2D NOESY miR-93. Zaznaczono kontakty NOE pomiędzy iminowymi atomami wodoru: a – U9:NH1-A18:H2, b – G19:NH1-C8:NH₄₂, c – G19:NH1-C8:NH₄₁, d - G14:NH1-C13:NH₄₂, e - G14:NH1-C13:NH₄₁, f - G10:NH1-C17:NH₄₂, g - G10:NH1-C17:NH₄₁.

E. Rejon iminowy widm ^1H NMR otrzymanych dla miR-93 w różnych temperaturach (5, 25, 40, 45 °C).

Widma otrzymano w H₂O:D₂O (90%:10%), 150 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 0.75 mM miR-93, w 15 °C (chyba, że wskazano inaczej).

2.1.3. miR-296

W warunkach natywnych RNaza T1 najwydajniej hydrolizuje miR-296 po G20, znacząco słabiej po G2, G3 i G4 (Rysunek 2.6 (B)). Sugeruje to, że guanozyny w pozycjach 2, 3 i 4 zaangażowane są w oddziaływania drugorzędowe. Wynik ten nie rozstrzyga jednak czy miR-296 tworzy strukturę w obrębie jednej cząsteczki czy występuje w formie dupleksu. Rozstrzygający jest z kolei profil hydrolizy tego miRNA przez RNazę V1 specyficzną względem rejonów dwuniciowych. Najwydajniej hydrolizuje ona miR-296 w rejonie C10C11U12C13A14 oraz po G3 (Rysunek 2.6 (A)). Rejon ten tworzy sparowania w spince do włosów, pozostaje z kolei jednoniciowy w dupleksie miR-296 (Rysunek 2.6 (C)), zatem otrzymany profil wyklucza dupleks miR-296.



Rysunek 2.6

Analiza struktury miR-296 z użyciem metod mapowania enzymatycznego

A, B. Autoradiogramy 20 % żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy miR-296 z udziałem RNazy V1 (**A**) oraz RNazy T1 w warunkach natywnych (**B**).

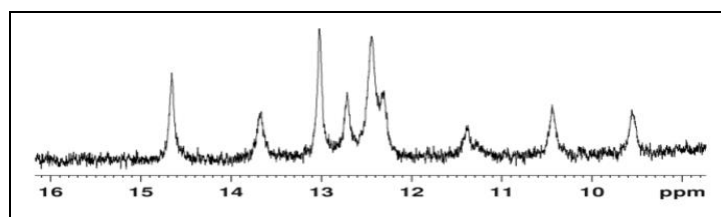
A. V1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy V1 (0, 0.00002, 0.00004 u/μl).

B. T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0.001 u/μl) w warunkach natywnych, bez (1) oraz w obecności Mg²⁺.

C. Schemat struktury drugorzędowej miR-296 (spinki do włosów oraz dupleksu) ze wskazanymi miejscami hydrolizy indukowanymi przez RNazę T1 oraz RNazę V1. Produkty hydrolizy wskazano na autoradiogramach.

C – kontrola reakcji, L - alkalizacja w kontrolowanych warunkach, T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0.025u/μl) w warunkach denaturujących.

Widmo protonowe NMR wskazuje, że w roztworze, w badanych warunkach współistnieją dwie struktury miR-296 - spinka do włosów oraz dupleks (Rysunek 2.7). Zarejestrowano osiem sygnałów pochodzących od protonów iminowych reszt nukleotydydowych. Zastosowane narzędzia oraz metody jednoznacznie wskazują, że miR-296 tworzy strukturę drugorzędową, w nanomolarnych stężeniach miRNA oraz 50 mM NaCl spinkę do włosów, w wyższej sile jonowej oraz milimolarnych stężeniach RNA dupleks. Nie było uzasadnione wykonanie dodatkowych analiz.



Rysunek 2.7

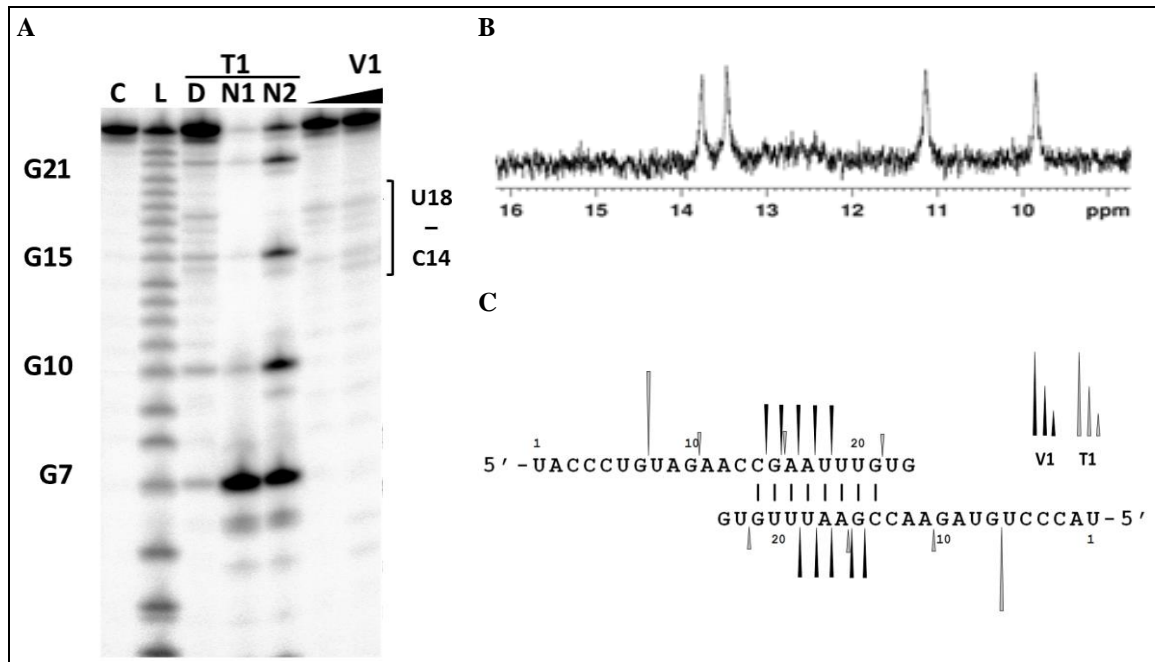
Analiza struktury miR-296 z użyciem metod spektroskopii NMR.

Rejon iminowy widma ^1H NMR miR-296 otrzymanego $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90 %:10 %), 150 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.1 mM EDTA, 0.3 mM miR-296, w 5 °C.

2.1.4. miR-10b

RNaza V1 najwydajniej hydrolizuje miR-10b w rejonie C14 - U19, RNaza T1, w warunkach natywnych, zarówno w obecności jak przy barku jonów Mg^{2+} , po G7 (Rysunek 2.8 (A)). Wyraźnie mniej wydajna hydroliza po G10, G15, G21 świadczy o zaangażowaniu tych nukleotydydów w strukturę drugorzędową (Rysunek 2.8). Otrzymane wyniki pozwoliły zidentyfikować rejon C14-G21 jako dwuniciowy, co dowodzi, że w badanych warunkach miR-10b występuje w formie dupleksu.

Potwierdzają to wyniki analizy z użyciem metod spektroskopii NMR. W rejonie iminowym widma protonowego NMR miR-296 występują cztery sygnały pochodzące od protonów iminowych reszt nukleotydydowych zaangażowanych w tworzenie struktury drugorzędowej. W przypadku miR-10b, w przeciwieństwie do opisanych wcześniej miRNA (miR-21, miR-93 oraz miR-296) nie obserwowano dodatkowych sygnałów mogących świadczyć o współistnieniu dwóch form strukturalnych miR-10b (Rysunek 2.8 (B)). Otrzymane wyniki jednoznacznie pokazują, że miR-10b przyjmuje strukturę dupleksu. Nie była konieczna ich weryfikacja z użyciem innych metod.



Rysunek 2.8

Analiza struktury miR-296 z użyciem metod mapowania enzymatycznego (A) oraz spektroskopii NMR (B).

A. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego z produktami hydrolizy miR-10b z udziałem RNazy T1 (0.001 u/μl) w warunkach natywnych przy braku (N1) oraz w obecności (N2) Mg^{2+} oraz z produktami ograniczonej hydrolizy z udziałem RNazy V1 (0.00002, 0.00004 u/μl).

B. Rejon iminowy widma 1H NMR miR-10b otrzymanego w $H_2O:D_2O$ (90%:10%), 150 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 0.1 mM EDTA, 0.083 mM miR-10b, w 5 °C.

C. Schemat struktury drugorzędowej miR-10b ze wskazanymi miejscami hydrolizy indukowanej przez RNazę T1 oraz RNazę V1.

Produkty hydrolizy wskazano na autoradiogramach. C – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych, D - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0.025 u/μl) w warunkach denaturujących.

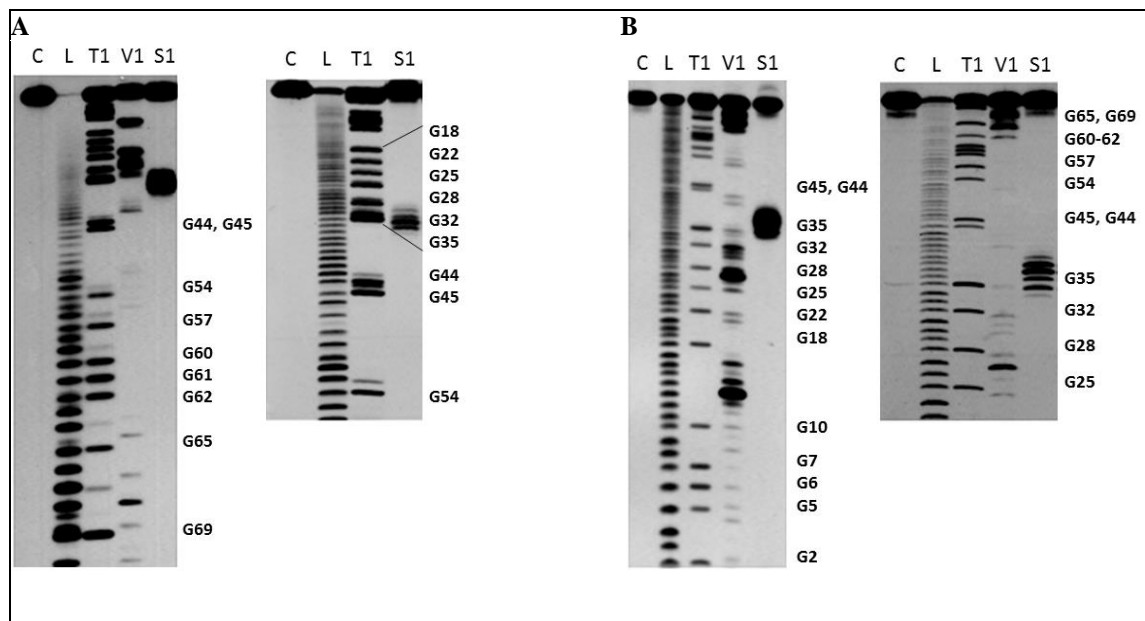
2.1.5. pre-miR-21

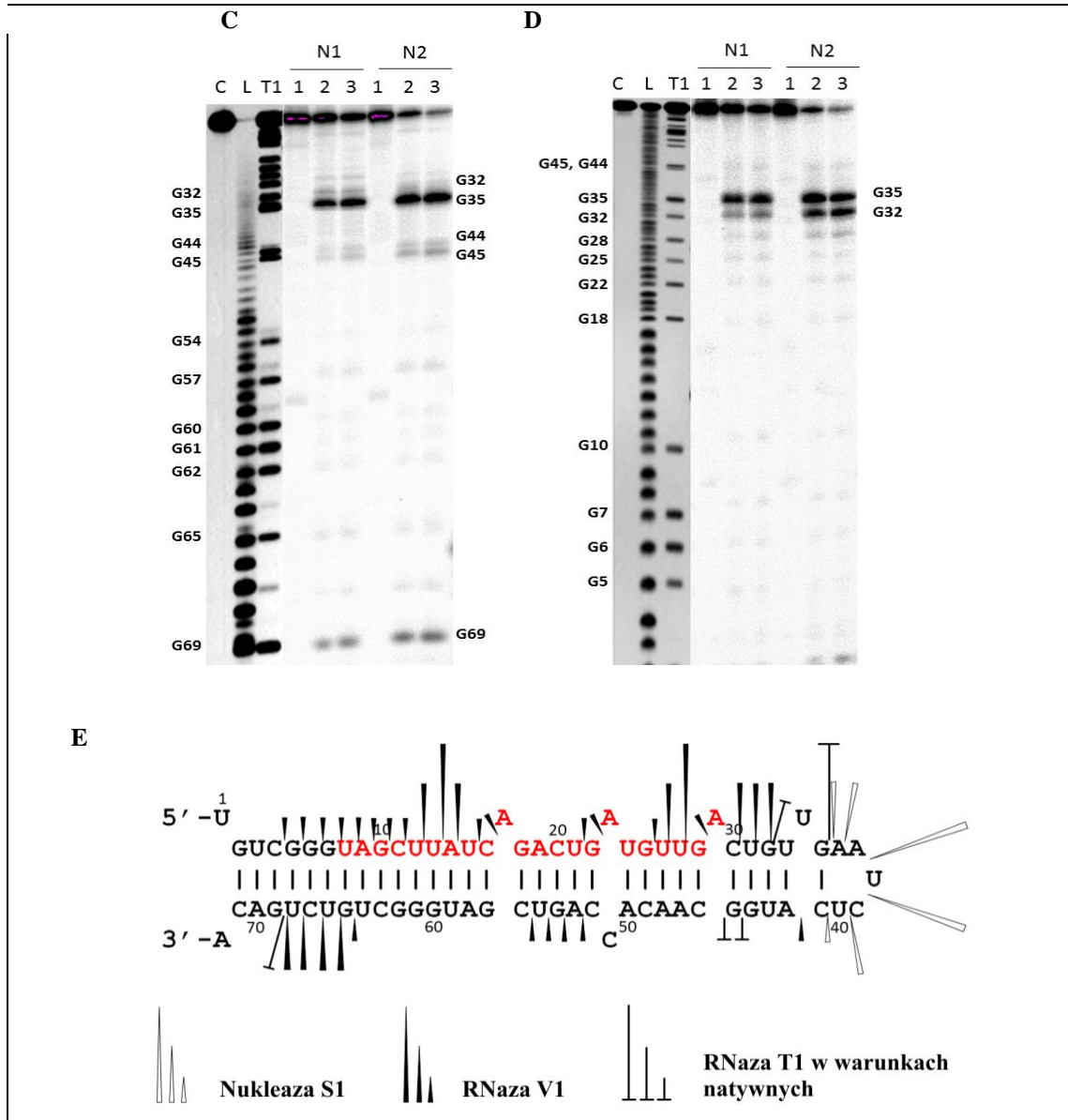
Potwierdzono użyteczność opisanych powyżej metod biochemicznych w badaniach struktury RNA. Dowiedziono na przykładzie pre-miR-21, że RNaza T1, V1 oraz nukleaza S1 wykazują znaczną czułość względem struktury RNA. Uzyskane wyniki analizy struktury pre-miR-21 są zgodne z ogólnie przyjętą wiedzą, że prekursorzy miRNA przyjmują strukturę spinki do włosów. Potwierdzają tym samym użyteczność zastosowanych narzędzi do mapowania struktury krótkich RNA. Wyniki mapowania struktury pre-miR-21 przedstawiono poniżej.

Strukturę drugorzędową pre-miR-21 określono na podstawie profilu hydrolizy RNA z użyciem (i) RNazy V1, (ii) nukleazy S1, (iii) RNazy T1 w warunkach denaturujących i

natywnych oraz (iv) RNazy H1 w obecności oligodeoksynukleotydów (O1-O8) komplementarnych do różnych rejonów pre-miR-21.

Pre-miR21 ulega hydrolizie w pozycjach C4-C16, U21-G32, C52-U55 oraz U64-U68 w obecności RNazy V1, co wskazuje, że reszty tych nukleotydów zaangażowane są w tworzenie struktury drugorzędowej tego RNA. Rejon A42-C51 i C56 –C63 oraz pozycje A17, A23 i A29 są odporne na cięcia z udziałem RNazy V1, pomimo że przewiduje się, że znajdują się one w rejonach dwuniciowych pre-miR-21 (Rysunek 2.9 (A, B)). Nukleaza S1 najwydajniej hydrolizuje pre-miR-21 w pozycjach G35-U60. RNaza T1 w warunkach denaturujących hydrolizuje pre-miR-21 po każdej guanozynie, w warunkach natywnych kilkukrotnie wydajniej w pozycji G35 niż w G32, G44 i G45 (Rysunek 2.9 (C, D)).





Rysunek 2.9

Analiza struktury pre-miR-21 z użyciem metod mapowania enzymatycznego.

A, B, C, D. Autoradiogramy 20 % żeli poliakrylamidowych z produktami hydrolizy pre-miR-21 z udziałem RNazy T1, RNazy V1 oraz nukleazy S1.

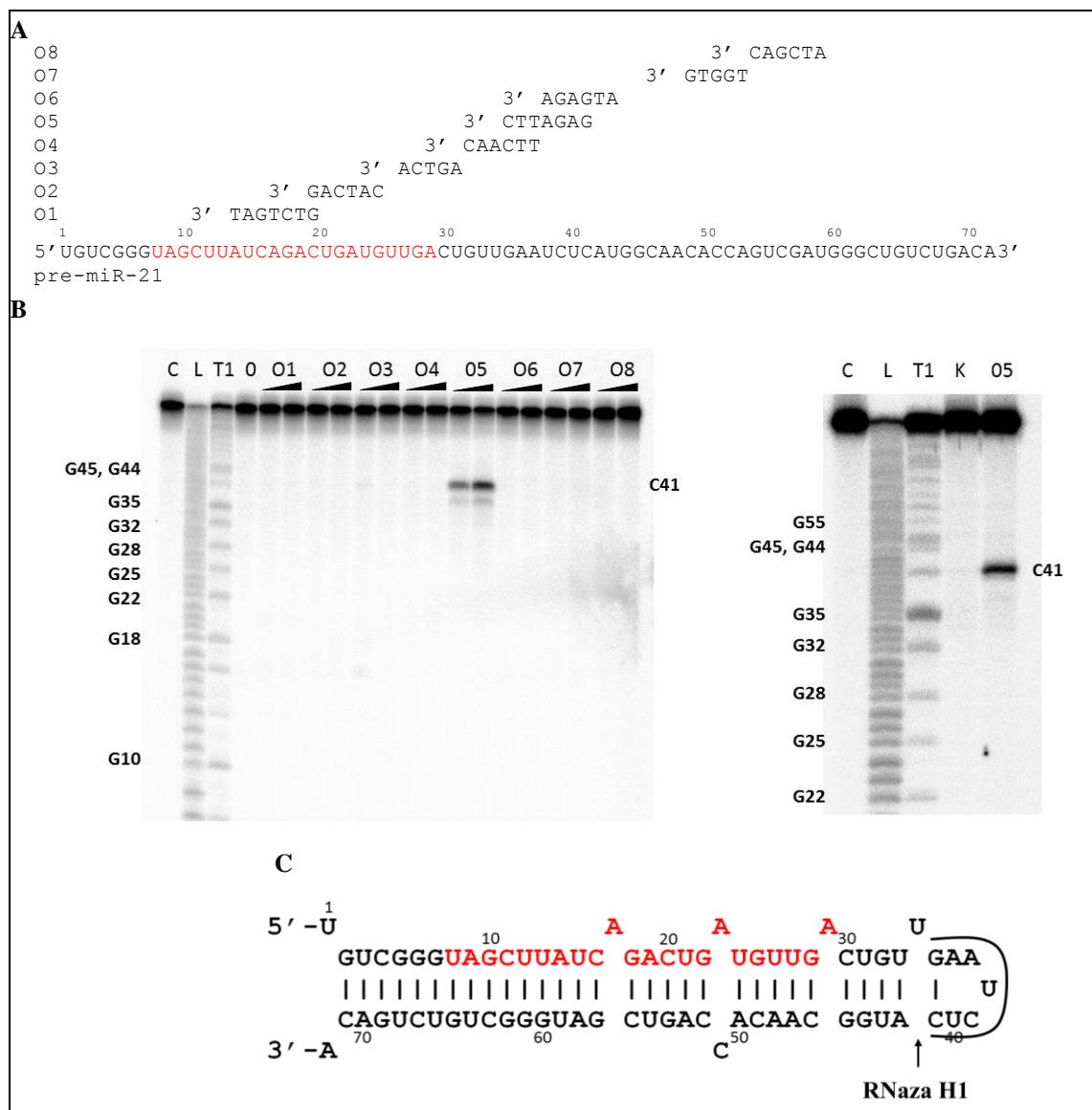
A, B. V1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy V1 (0, 0.0002 u/μl), S1 - ograniczona hydroliza z udziałem nukleazy S1 (0.0095 u/μl).

C, D. N1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0, 0.025, 0.05 u/μl) w warunkach natywnych, N2 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0, 0.025 u/μl, 0.05 u/μl) w warunkach natywnych, w obecności Mg²⁺.

C – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w kontrolowanych warunkach, T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0.025u/μl) w warunkach denaturujących. Produkty hydrolizy wskazano na autoradiogramach.

E. Schemat struktury drugorzędowej pre-miR-21 ze wskazanymi miejscami hydrolizy indukowanymi przez RNazę T1, RNazę V1 oraz nukleazę S1.

Określono dostępność poszczególnych rejonów pre-miR-21 na podstawie wyników analizy wydajności hydrolizy RNA przez rybonukleazę H1 w obecności oligodeoksyrybonukleotydów komplementarnych do różnych rejonów pre-miR-21 (O1-O8). Rybonukleaza H1 hydrolizuje pre-miR-21 jedynie w obecności O5, komplementarnego do rejonu G35-C41. Wskazuje to, że rejon ten tworzy fragment jednoniciowy tego pre-miRNA, pętlę spinki do włosów (Rysunek 2.10). Pozostałe rejonny pre-miR-21 są niedostępne dla oligomerów DNA, co wskazuje, że tworzą rejon dwuniciowy.



Rysunek 2.10

Analiza struktury pre-miR-21 z użyciem RNazy H1.

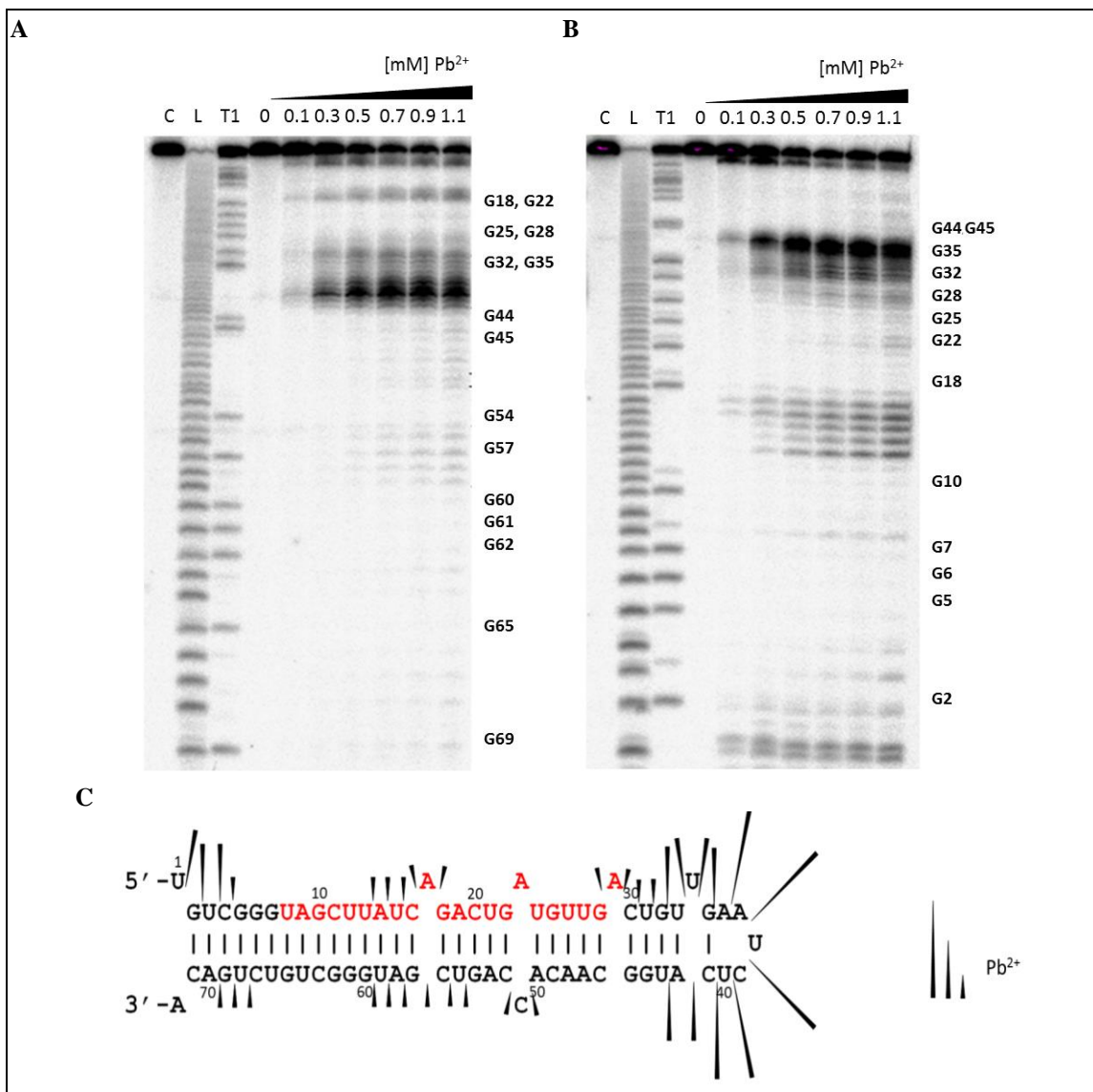
A. Sekwencje oligodeoksyrybonukleotydów (O1–O8) komplementarnych do różnych rejonów pre-miR-21. Sekwencje miR-21 zaznaczono na czerwono.

B. Autoradiogramy 20 % żeli poliakrylamidowych z produktami hydrolizy pre-miR-21 z udziałem RNazy H1 (0.04 u/μl) w obecności różnych stężeń (5 i 10 μM) oligodeoksyrybonukleotydów (O1–O8).

C – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w kontrolowanych warunkach, T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0.025 u/ μ l) w warunkach denaturujących. Produkt hydrolizy wskazano na autoradiogramach.

C. Schemat struktury drugorzędowej pre-miR-21 ze wskazanym miejscem hydrolizy indukowanej przez RNazę H1 w obecności oligodeoksyrybonukleotydu O5 (zaznaczony ciągłą, czarną linią). Sekwencję miR-21 zaznaczono na czerwono.

Profil produktów hydrolizy pre-miR-21 po traktowaniu różnymi stężeniami Pb^{2+} wskazuje, że rejon G32-A42 RNA jest szczególnie podatny na hydrolizę w obecności tych jonów. W wyższych stężeniach Pb^{2+} (0.7 - 1.1 mM) zaobserwowano również cięcia w rejonach terminalnych oraz w sąsiedztwie niesparowania A17 pre-miR-21, zarówno w nici, w której ono występuje jak i nici komplementarnej (rejon G54-U59) (Rysunek 2.11).



Rysunek 2.11

Analiza struktury pre-miR-21 z użyciem Pb^{2+} .

A, B. Autoradiogramy 20 % żeli poliakrylamidowych z produktami hydrolizy pre-miR-21 w obecności różnych stężeń Pb^{2+} . Wskazano wzrastające stężenie Pb^{2+} (grot), poszczególne stężenia Pb^{2+} oraz produkty hydrolizy indukowanej przez Pb^{2+} .

C – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w kontrolowanych warunkach, T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 (0.025 u/ μ l) w warunkach denaturujących.

C. Schemat struktury drugorzędowej pre-miR-21 ze wskazanymi miejscami hydrolizy indukowanej przez Pb^{2+} . Podatność poszczególnych miejsc w obrębie pre-miR-21 odzwierciedla wielkość grotów.

2.2. Analiza struktury miRNA z zastosowaniem metod obliczeniowych

Otrzymano osiem różnych modeli struktury miR-21, siedem miR-93 i miR-15b, sześć miR-296 i miR-10b (Tabele 2.1-2.3). Wyniki wskazują z dużym prawdopodobieństwem, że miR-21, miR-93 oraz miR-296 mogą przyjmować strukturę spinki do włosów. Modele otrzymane z wykorzystaniem narzędzia RNAfold pokrywają się z opisanymi powyżej wynikami analizy struktury z użyciem metod enzymatycznych, chemicznych oraz spektroskopii NMR, CD i UV/Vis. Energia spinek miR-21, miR-93 i miR-296 wynosi odpowiednio -1.98, -3.9, -4.14 kcal/mol (Tabela 2.4). W przypadku miR-10b i miR-15b prawdopodobieństwo utworzenia struktury spinki do włosów jest niskie. Znacząca większość użytych narzędzi obliczeniowych, w tym RNAfold, wskazuje, że tworzą one struktury dupleksów, co pozostaje w zgodzie z wynikami analizy struktury metodami enzymatycznymi i NMR. Również miR-21, miR-93, miR-296 oprócz tego że mogą przyjmować strukturę spinki, mogą również tworzyć dupleksy. Energie homodupleksów miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b, miR-15b wynosi odpowiednio -13.46, -13.54, -15.17, -5.8, -7.34 kcal/mol (Tabela 2.4).

Struktury trzeciorzędowe spinek do włosów miR-21, miR-93 i miR-296 wymodelowane z wykorzystaniem RNAComposer przedstawiono na Rysunku 2.13.

Tabela 2.1

Modele struktury drugorzędowej miR-21 oraz miR-93 otrzymane z użyciem metod obliczeniowych dostępnych za pośrednictwem RNAMetaServer. Modele zobrazowano z użyciem VARNA v.3.7., bd – brak danych.

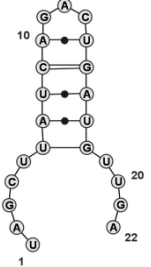
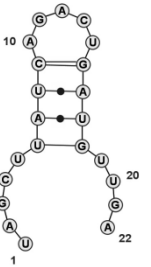
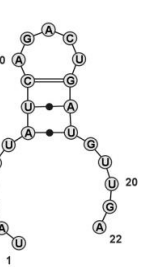
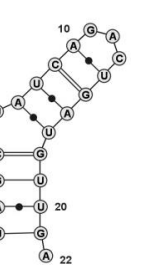
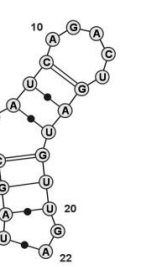

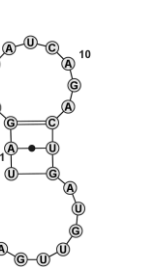

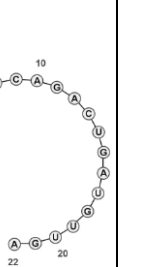
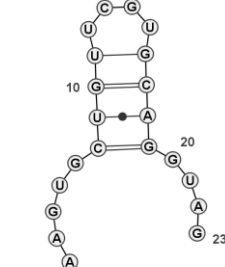
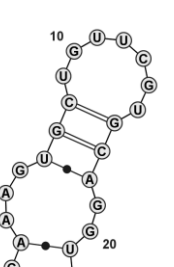
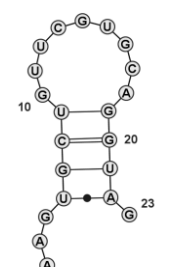
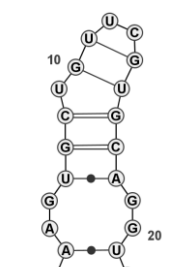
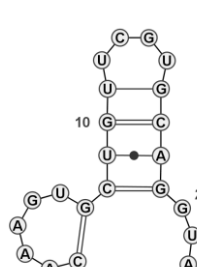
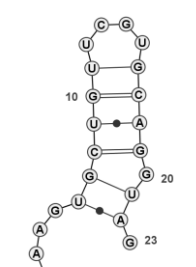
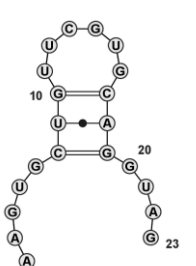
<p>Model struktury monomeru miR-21</p> <p>Program użyty do modelowania (energia/punktacja)</p>	 <p>RNAfold (-1.98 kcal/mol)</p>	 <p>HotKnots (-0.90 kcal/mol)</p>	 <p>MaxExpect (1.40 expected accuracy)</p>	 <p>MCFold (bd) Fold (-0.80 kcal/mol)</p>	 <p>Afold (-1.00 kcal/mol)</p>	 <p>ContextFold (bd)</p>	 <p>RNAwolf (bd)</p>	 <p>PknotsRG (-1.00 kcal/mol)</p>	 <p>CentroidFold, Contrafold, IPknot (bd)</p>
<p>Model struktury monomeru miR-93</p> <p>Program użyty do modelowania (energia/punktacja)</p>	 <p>RNAfold (-3.90 kcal/mol) CentroidFold, Contrafold, DotKnot, IPKnot (bd) Fold, HotKnots, PknotsRG, RNASLOpt, RNashapes, RNASubopt, Sfold, UNAFold (-3.40 kcal/mol) MaxExpect (1.90 expected accuracy)</p>	 <p>Afold (-3.40 kcal/mol)</p>	 <p>ContextFold (bd)</p>	 <p>MCFold (bd)</p>	 <p>PKnots (-3.80 kcal/mol)</p>	 <p>ProbKnot (bd)</p>	 <p>RNAwolf (bd)</p>		

Tabela 2.2

Modele struktury drugorzędowej miR-296 oraz miR-10b otrzymane z użyciem metod obliczeniowych dostępnych za pośrednictwem RNAMetaServer. Modele zobrazowano z użyciem VARNA v.3.7., bd – brak danych.

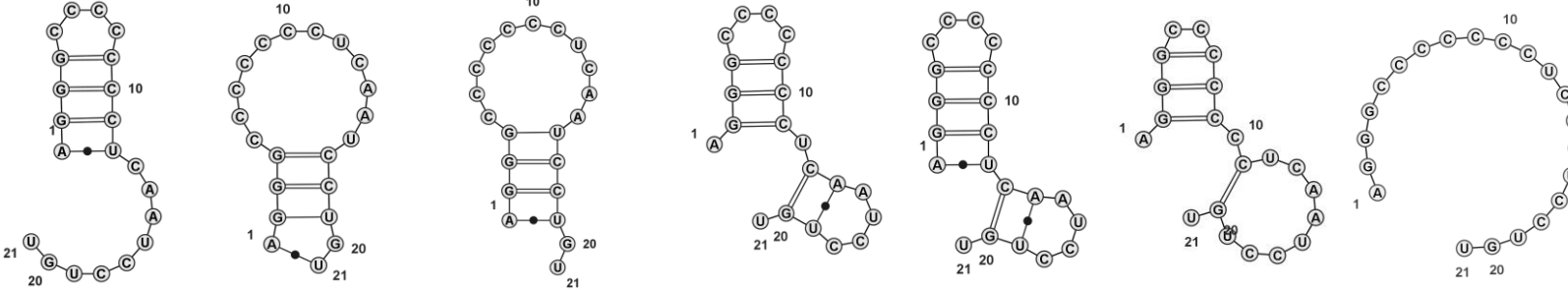
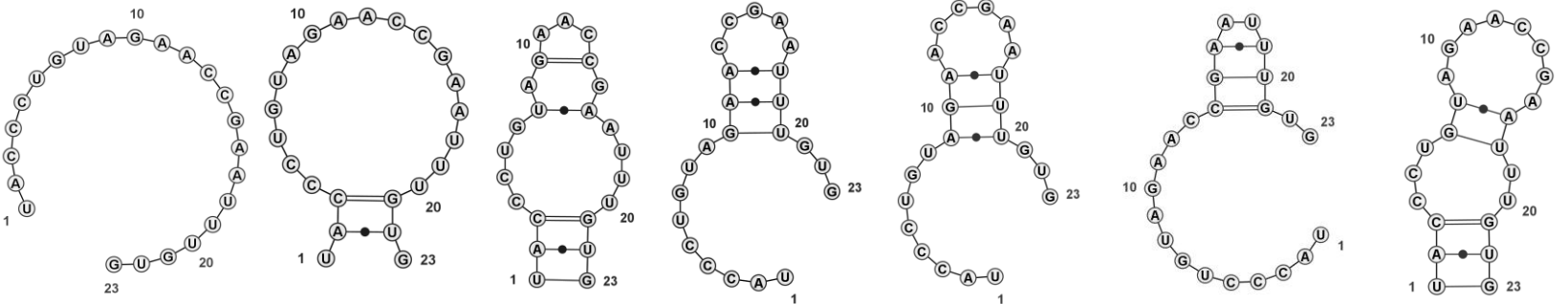
<p>Model struktury monomeru miR-296</p>  <p>Program użyty do modelowania (energia/punktacja)</p>	<p>RNAfold (-4.14 kcal/mol) CentroidFold, Contrafold, DotKnot, IPKnot (bd) McQFold (-36.19 log-likelihood) PknotsRG, RNashapes, RNASubopt(-3.40 kcal/mol)</p> <p>Afold (-3.40 kcal/mol)</p> <p>ContextFold, ProbKnot (bd) UnaFold, Fold, RNASLOpt (-2.80 kcal/mol) HotKnots (-2.79 kcal/mol) MaxExpect (1.80 expected accuracy)</p> <p>MCFold (bd)</p> <p>PKnots (-4.40 kcal/mol)</p> <p>RNA wolf (bd)</p> <p>Sfold (bd)</p>
<p>Model struktury monomeru miR-10b</p>  <p>Program użyty do modelowania (energia/punktacja)</p>	<p>CentroidFold, Contrafold, DotKnot, HotKnots, Fold, IPKnot, PknotsRG, RNASLOpt, RNAfold, RNASubopt, RNashapes (bd) McQFold (-39.99 log-likelihood)</p> <p>ContextFold (bd)</p> <p>MCFold (bd)</p> <p>PKnots (0.30 kcal/mol)</p> <p>ProbKnot (bd)</p> <p>RNA wolf (bd)</p> <p>Afold (bd)</p>

Tabela 2.3

Modele struktury drugorzędowej miR-15b otrzymane z użyciem metod obliczeniowych dostępnych za pośrednictwem RNAMetaServer. Modele zobrazowano z użyciem VARNA v.3.7., bd – brak danych.

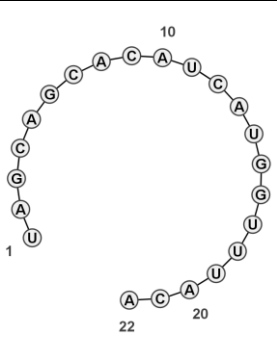
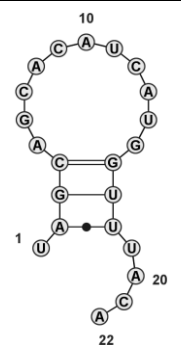
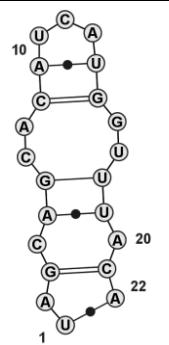
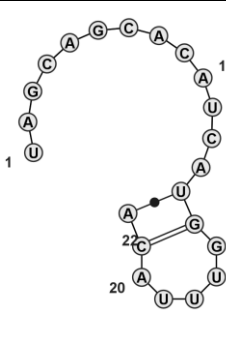
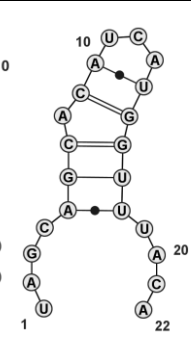
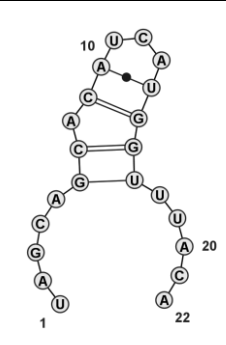
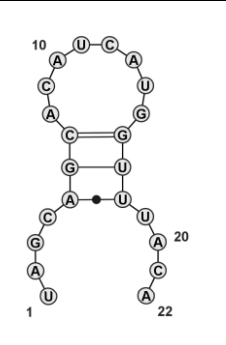
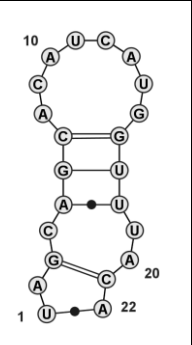
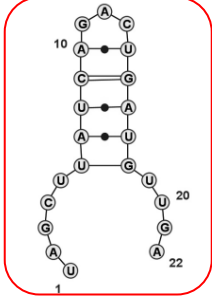
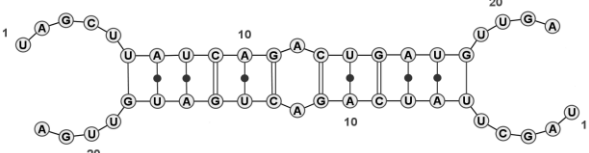
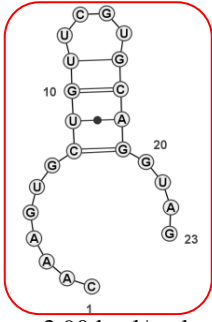
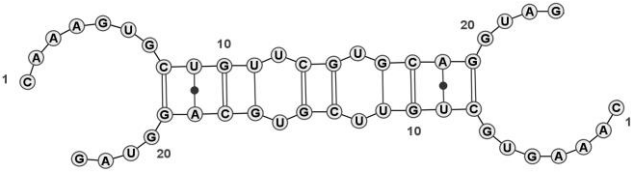
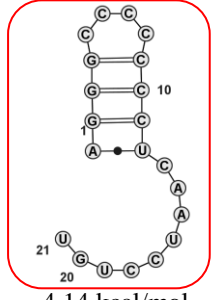
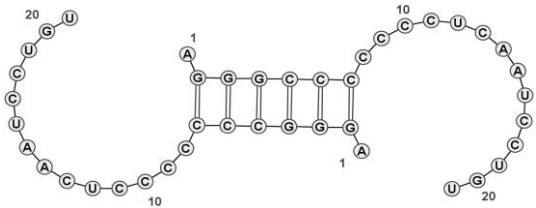
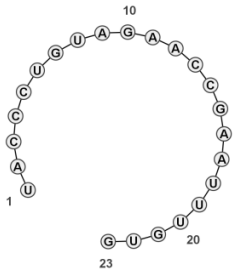
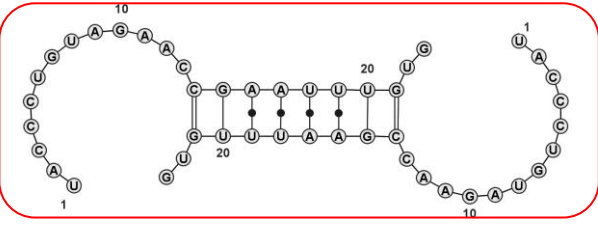
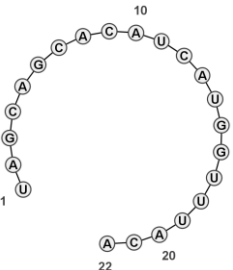
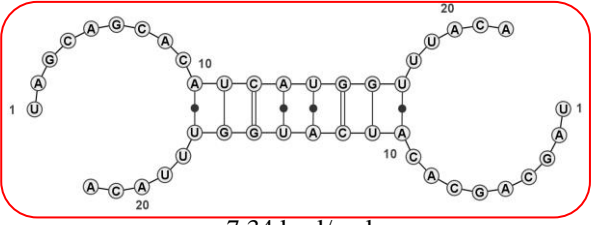
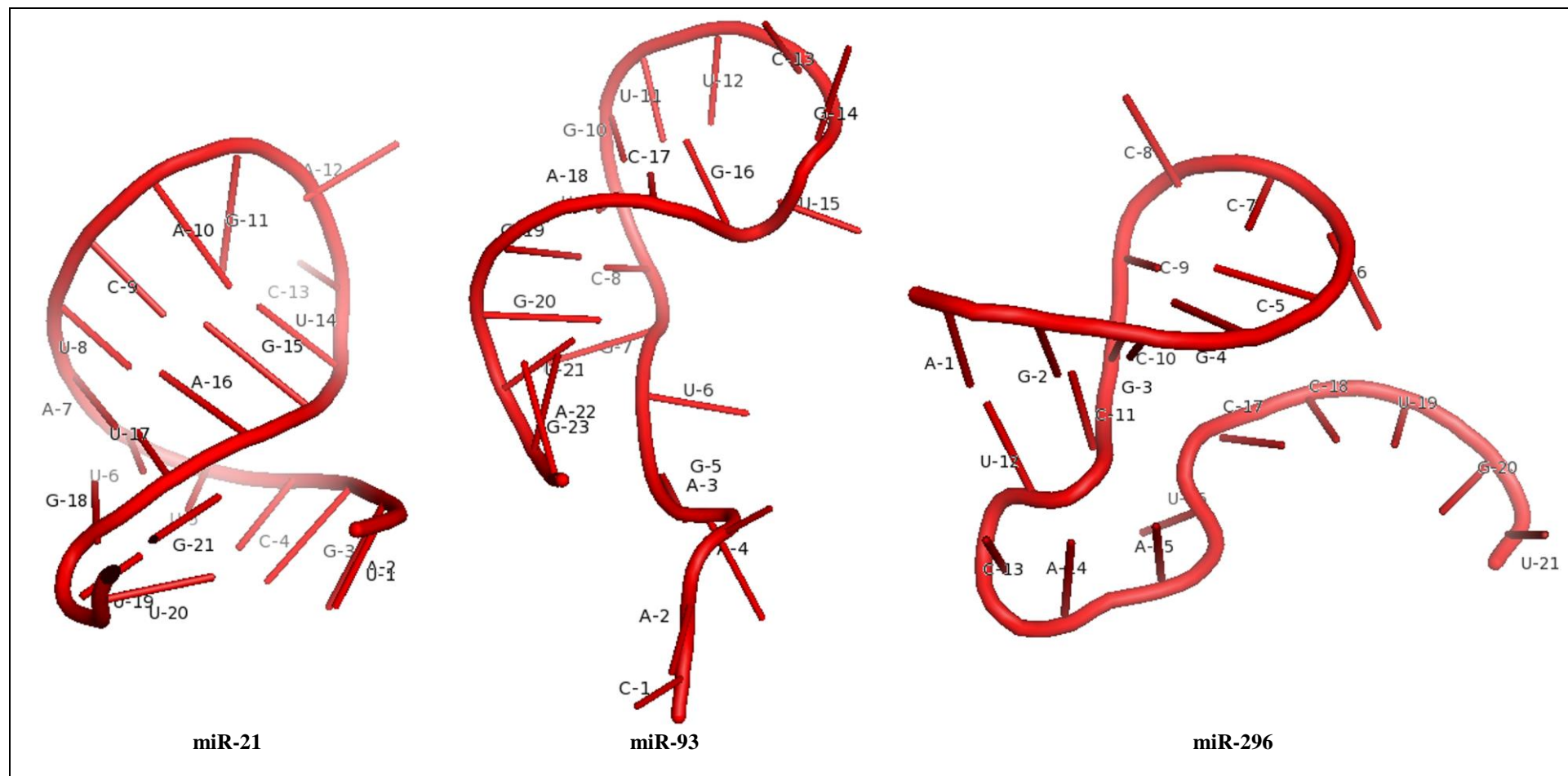
Model struktury monomeru miR-15b								
Program użyty do modelowania (energia/punktacja)	CentroidFold, Contrafold, DotKnot, HotKnots, Fold, IPKnot, McQFold, PknotsRG, RNASLOpt, RNAfold, RNAsubopt, RNASHapes, Sfold (bd)							
	ContextFold (bd)	MCFold (bd)	PKnots (bd)	ProbKnot (bd)	RNA wolf (bd) ,	UNAFold (1.00 kcal/mol)	Afold (bd)	

Tabela 2.4

Modele struktur miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b, miR-15b oraz ich energie otrzymane z wykorzystaniem RNAfold oraz RNAcifold. Czerwoną ramką oznaczono struktury, które są w zgodzie z wynikami analizy struktury z wykorzystaniem metod enzymatycznych, chemicznych oraz spektroskopii NMR, CD i UV/Vis.

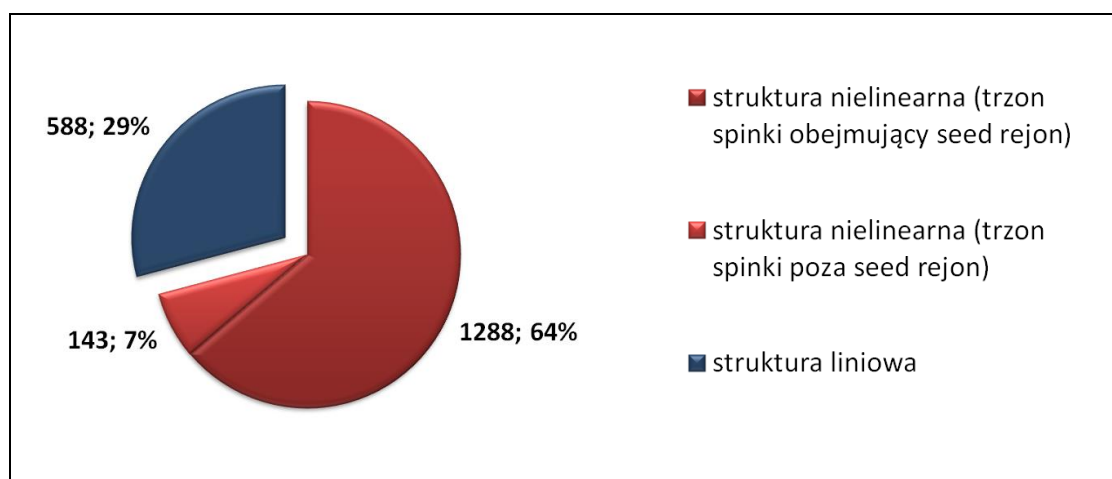
	Struktura i energia monomeru miRNA (RNAfold)	Struktura i energia homodupleksu miRNA (RNAcifold)
miR-21	 <p>-1.98 kcal/mol</p>	 <p>-13.46 kcal/mol</p>
miR-93	 <p>-3.90 kcal/mol</p>	 <p>-13.54 kcal/mol</p>
miR-296	 <p>-4.14 kcal/mol</p>	 <p>-15.17 kcal/mol</p>
miR-10b		 <p>-5.80 kcal/mol</p>
miR-15b		 <p>-7.34 kcal/mol</p>



Rysunek 2.12

Struktury trzeciorzędowe spinek do włosów miR-21, miR-93 oraz miR-296 wymodelowane z użyciem RNAComposer, zwizualizowane z wykorzystaniem PyMol Viewer.

Globalna analiza struktury ludzkich miRNA wskazuje, że ponad 70 % z nich może przyjmować strukturę drugorzędową. Spośród 2042 sekwencji ludzkich miRNA zdeponowanych w bazie miRBASE v.19 (stan na 17 października 2012) 1448 może występować w postaci spinki do włosów lub dupleksu, z czego 89 % to struktury z rejonem ‘seed’ znajdującym się w obrębie trzonu spinki do włosów lub dupleksu (Rysunek 2.13). Minimalne energie wymodelowanych spinek miRNA mieszczą się w przedziale od -0.1 do -11.1 kcal/mol, w przypadku większości z nich w przedziale od -0.1 do -3 kcal/mol. Najczęściej posiadają one 4-nt pętle (433 miRNA), rzadziej 3- i 5-nt, odpowiednio 413, 283 miRNA. GAGA, następnie GGAA, GAAA oraz UUUU występują najczęściej w obrębie 4-nt pięli spinek. Dodatkowo, często graniczą one z parą GC zamykającą pętlę.



Rysunek 2.13

Diagram obrazujący udział miRNA tworzących strukturę liniową oraz strukturę nieliniową w całkowitej puli miRNA.

2.3. Wyznaczanie równowagi spinki do włosów i dupleksów miRNA

Analizując strukturę miR-21, miR-93 oraz miR-296 metodami mapowania enzymatycznego i chemicznego oraz spektroskopii NMR, UV/Vis oraz CD pokazano, że struktura tych miRNA zależy od jego stężenia, temperatury pomiaru oraz siły jonowej roztworu. Wyznaczono stałe równowagi dla obu tych form z użyciem RNAcifold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAcifold.cgi>) [204]. Równowaga między spinką do włosów i dupleksem ustala się przy stężeniu 163 nM, 51 μ M oraz 8.1 μ M, odpowiednio dla miR-21, miR-93 oraz miR-296 (Rysunek 2.14). Otrzymane

wartości tłumaczą różnice w wynikach otrzymanych dla poszczególnych miRNA w eksperymentach mapowania enzymatycznego struktury RNA oraz z użyciem spektroskopii NMR, CD oraz UV/Vis oraz współistnienie obu form w warunkach eksperymentu NMR (0.3 – 0.75 mM). Z wykresu zależności dimeryzacji miRNA od ich stężenia wynika, że w stężeniu 0.7 mM dimery stanowią ponad 98, 93 oraz 85 % odpowiednio dla miR-21, miR-93 oraz miR-296. W 10 nM miRNA (stężenie miRNA stosowane w eksperymentach mapowania biochemicznego RNA) 88.5 % miR-21 oraz niemal 100 % miR-93 i miR-296 występuje w formie monomeru.

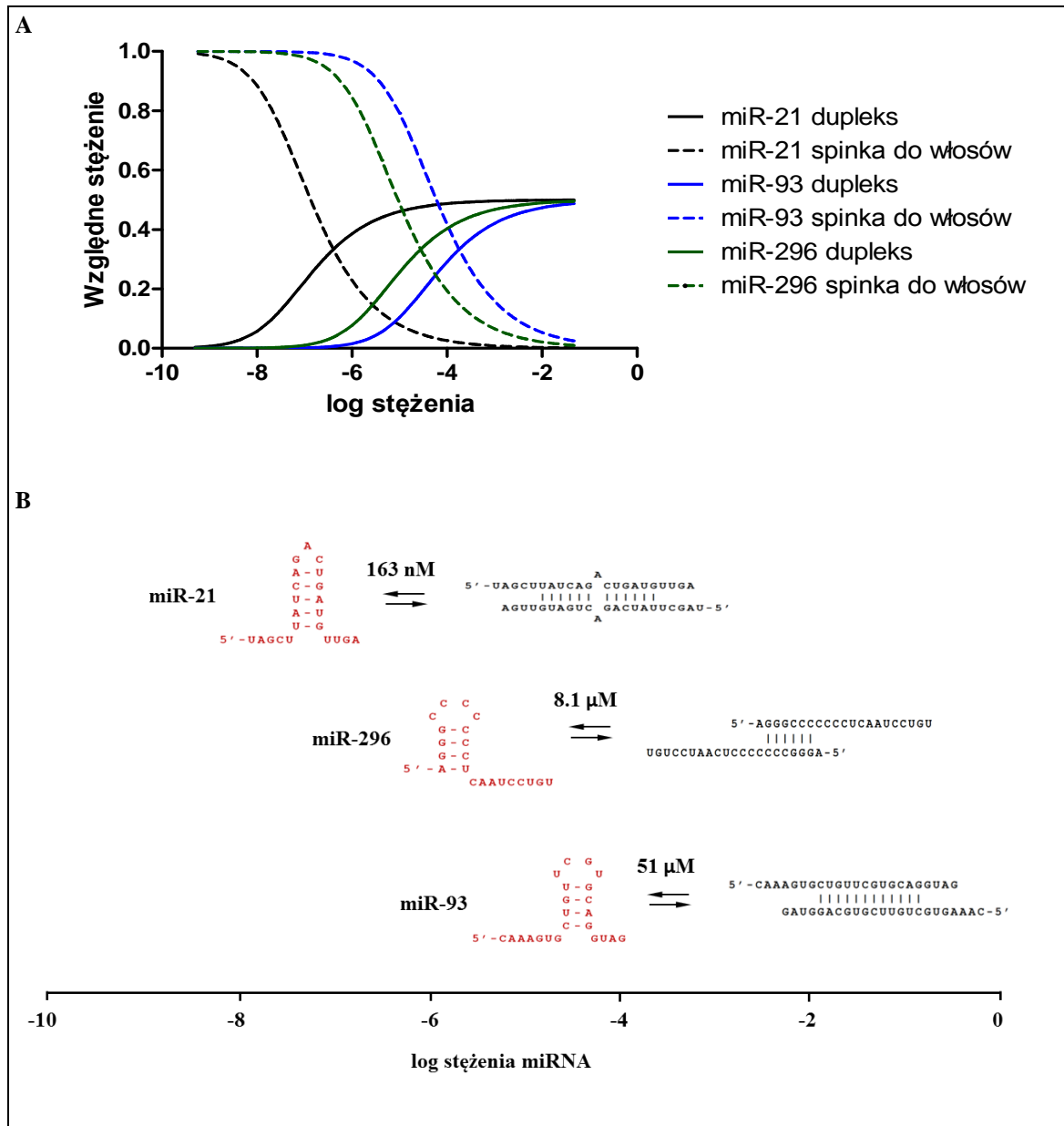
Otrzymane wyniki nasuwają pytanie o strukturę miRNA w komórce. W związku z tym, że struktura RNA jest pochodną jego stężenia, aby na nie odpowiedzieć określono średnie stężenie pojedynczego miRNA w komórce. Przyjmując, że (i) średnia liczba kopii pojedynczego miRNA w komórce wynosi 200 [214], (ii) średnia objętość komórki ludzkiej (HeLa) wynosi $2 \times 10^{-12} \text{ dm}^3$ [215] średnie stężenie pojedynczego miRNA wynosi 166 pM.

$$\begin{array}{rcl} 6.022 \times 10^{23} & - & 1 \text{ mol} \\ 200 \text{ kopii miRNA} & - & x \\ & & x = 33.21156 \times 10^{-23} \text{ moli} \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 33.21156 \times 10^{-23} \text{ moli} & - & 2 \times 10^{-12} \text{ dm}^3 \\ x & - & 1 \text{ dm}^3 \\ x = 16.60578 \times 10^{-11} \text{ mola} & = & 166 \text{ pmole} \\ 166 \text{ pmole}/1 \text{ dm}^3 & = & 166 \text{ pM} \end{array}$$

Otrzymane stężenie jest wartością przybliżoną, co wynika z różnej (i) wielkości różnego typu komórek, (ii) liczby kopii poszczególnych miRNA w komórce, jednak daje pewnego rodzaju wyobrażenie o rzędzie wielkości, w którym się poruszamy mówiąc o stężeniu miRNA w komórce.

Przyjmując wartość 166 pM jako średnie stężenie pojedynczego miRNA w komórce, z krzywych zależności dimeryzacji od ich stężenia otrzymanych dla poszczególnych miRNA określono, że badane miRNA w warunkach komórkowych z dużym prawdopodobieństwem występują w formie monomeru, nie dupleksu (Tabela 2.5). Na tej podstawie można przypuszczać, że miRNA występujące w komórce w formie niezwiązanej z białkami Ago tworzą strukturę spinki do włosów.



Rysunek 2.14

Wykresy (A) oraz schemat (B) przedstawiające zależność udziału duplexu oraz monomeru poszczególnych miRNA od ich stężenia. Na strzałkach wskazano stężenia miRNA, w których forma duplexu i monomeru miRNA występują w równowadze.

Tabela 2.5

Parametry energetyczne oraz równowagowe dupleksu oraz spinki do włosów miRNA.

	miR-21	miR-93	miR-296
Energia dupleksu [kcal/mol]	-13.45	-13.54	-15.17
Energia spinki do włosów [kcal/mol]	-1.98	-3.90	-4.14
Stężenie RNA, przy którym spinka i dupleks miRNA występują w równowadze [M]	163 nM	51 μ M	8.1 μ M
Stężenie RNA, przy którym 50 % cząsteczek występuje w formie dupleksu [M]	135 nM	60.7 μ M	9.27 μ M
Udział procentowy monomeru RNA w 10 nM miRNA	88.5 %	~100 %	~100 %
Udział procentowy monomeru RNA w 0.7 mM miRNA	1.9 %	31.5 %	14.5 %
Udział procentowy monomeru RNA w komórkowym stężeniu miRNA (166 pM)	~ 100 %	~ 100 %	~ 100 %

Z wykorzystaniem metod biochemicznych oraz spektroskopii NMR, UV oraz CD po raz pierwszy pokazano, że miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b oraz miR-15b przyjmują strukturę drugorzędową, miR-21, miR-93 oraz miR-296 zarówno strukturę spinki do włosów jak i dupleks, miR10b i miR-15b w badanych warunkach występują jedyne w formie homodupleksu. Ponadto, wykazano, że ponad 70 % ludzkich miRNA może przyjmować strukturę, spinkę i/lub dupleks. Otrzymane wyniki pozostają w zgodzie z wcześniejszymi badaniami *in silico* struktury ludzkich miRNA [189]. Modelowanie struktury z użyciem Mfold oraz UnaFold wskazują, że 73.36 % miRNA może przyjmować strukturę spinki, niemal tyle samo (57.29 %) dupleksy [189]. Podobnie, 78.34, 74.02, 70.49 oraz 68.69 % miRNA, odpowiednio wirusowych, mysich, zwierzęcych oraz roślinnych może tworzyć strukturę [189-191].

Ponadto zauważono, że ilość miRNA w komórce przewyższa kilkukrotnie ilość białek Ago 1-4 co potwierdza, że miRNA mogą występować jako wolne, niezwiązane z kompleksem RISC cząsteczki [216].

Spinki do włosów oraz duplekсы miR-21, miR-93 oraz miR-296 współistnieją w warunkach wykonanych eksperymentów. Wcześniej zaobserwowano również występowanie obu form innego miRNA, miR-520h [189]. Autorzy obserwowali agregaty miR-520h w 0.3 mM RNA, w 20 °C. Obniżenie stężenia miRNA do 0.1 mM powodowało zanik sygnałów, a równoczesne obniżenie stężenia RNA i temperatury do 4 °C pojawienie się sygnałów pochodzących od drugiej formy miR-520h – spinki do włosów. Sygnały te zanikają po podwyższeniu temperatury zaledwie do 15 °C, co świadczy o niskiej trwałości tej formy.

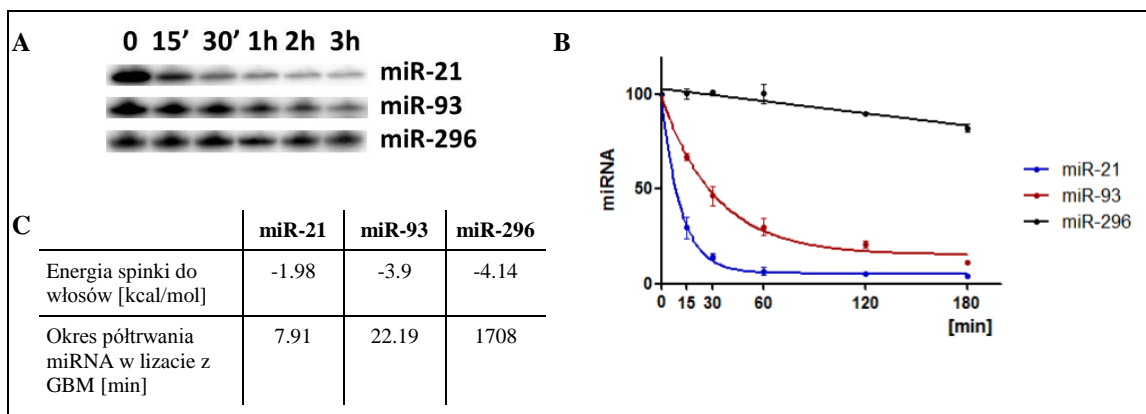
Zauważono, że równowaga między spinką do włosów i dupleksem poszczególnych miRNA zależy od stężenia RNA, temperatury oraz siły jonowej badanego roztworu RNA. Wcześniej, na przykładzie innych RNA zaobserwowano, że proces dimeryzacji spinek zależy również od wielkości jej pętli oraz sekwencji [217]. Równowaga między spinką do włosów i dupleksem ustala się przy stężeniu 163 nM, 51 μM oraz 8.1 μM, odpowiednio dla miR-21, miR-93 oraz miR-296. Biorąc pod uwagę fakt, że stężenie pojedynczego miRNA w komórce z reguły jest niższe niż 200 pM postuluję, że formą miRNA dominującą w komórce jest spinka do włosów.

Zidentyfikowane spinki miRNA najczęściej posiadają 4-nt pętle o sekwencjach GNRA lub UNCG (N = A/U/G/C, R = A/G). Ponad 50 % przewidzianych spinek w ludzkich 16S i 23S r RNA posiada 4-nt pętle, a 70 % spośród nich posiada konsensusową sekwencję pętli GNRA lub UNCG [2]. Motywy te promują zwijanie RNA oraz determinują stabilność spinki [2, 3]. Stanowią również miejsce kontaktu z innymi kwasami nukleinowymi i białkami [4]. Sugeruje to, że struktura spinki miRNA determinuje ich stabilność oraz funkcje.

3. Struktura miRNA determinuje ich właściwości i funkcje

3.1. Trwałość miRNA w lizatach z GBM

Trwałość miR-21, miR-93 oraz miR-296 w lizatach z guzów glejowych mózgu różni się między sobą. Okresy półtrwania w lizatach GBM poszczególnych miRNA przedstawiono w tabeli na Rysunek 3.1. Jest on ponad 200x i 80x dłuższy dla miR-296 niż odpowiednio dla miR-21 oraz miR-93. Dla badanych miRNA koreluje on z energią struktury spinki do włosów przyjmowanej przez dany miRNA.



Rysunek 3.1

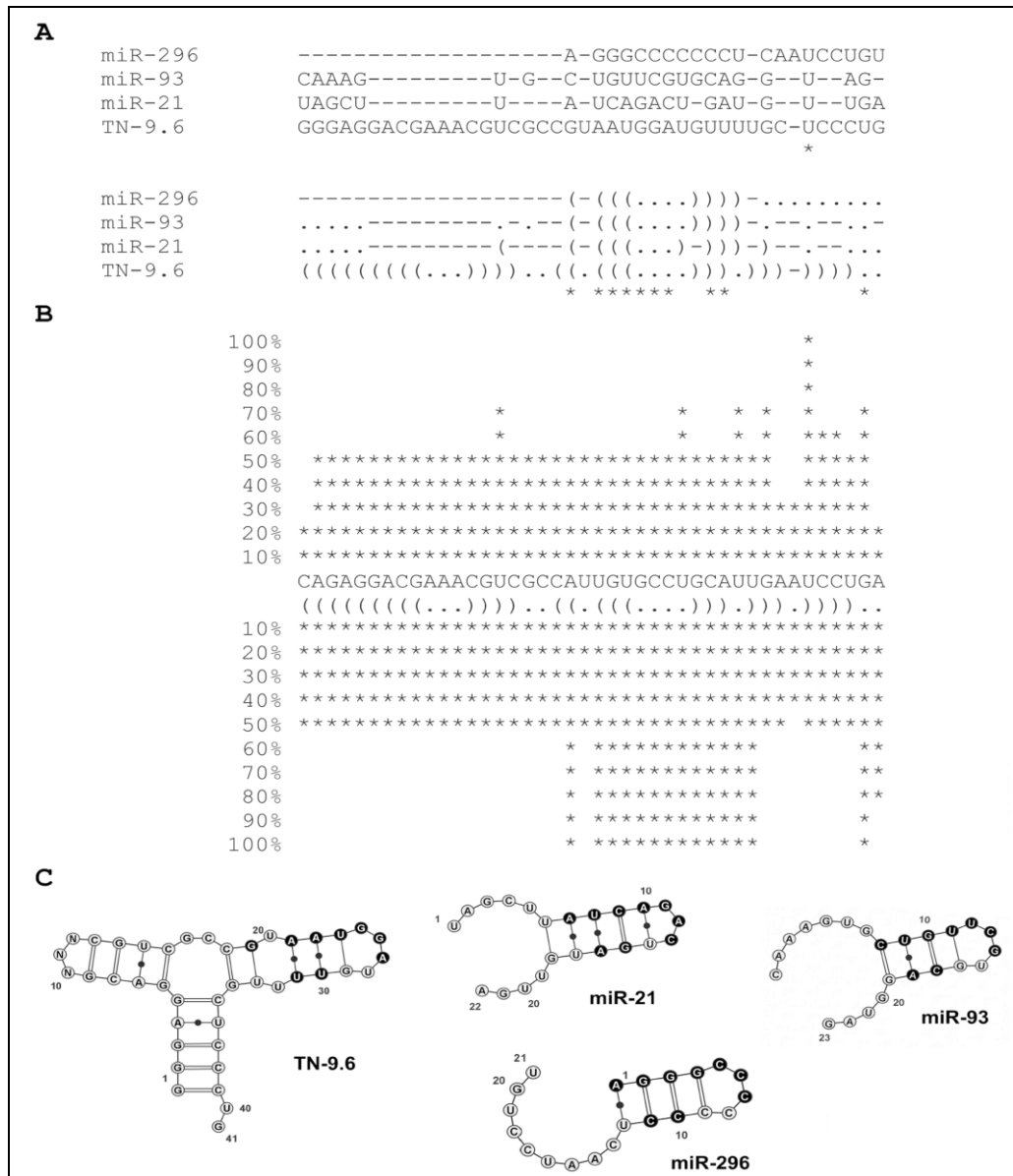
Stabilność miR-21, miR-93 oraz miR-296 w lizatach z GBM.

A, B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego obrazujący stopień hydrolyzy miR-21, miR-93 and miR-296 w lizacie z GBM (stężenie białek 0.01 mg/ml) w czasie.

C. Okresy półtrwania oraz energie struktur miR-21, miR-93 oraz miR-296.

3.2. Podobieństwo struktur miRNA oraz aptamerów RNA.

Wyniki otrzymane z użyciem algorytmu RNAforester wskazują na duże podobieństwo strukturalne miR-21, miR-93, miR-296 oraz aptameru TN-9.6 skierowanego przeciwko białku tenascyna C (Rysunek 3.2). Przykład ten oraz inne przytoczone wcześniej pokazujące podobieństwo struktury wybranych miRNA oraz tRNA, minihelis RNA i 5S RNA sugerują, że miRNA mogą funkcjonować poza kompleksem RISC, a ich struktura może determinować ich funkcje. Postuluję, że podobnie jak aptamery RNA, miRNA mogą modulować aktywność białek.



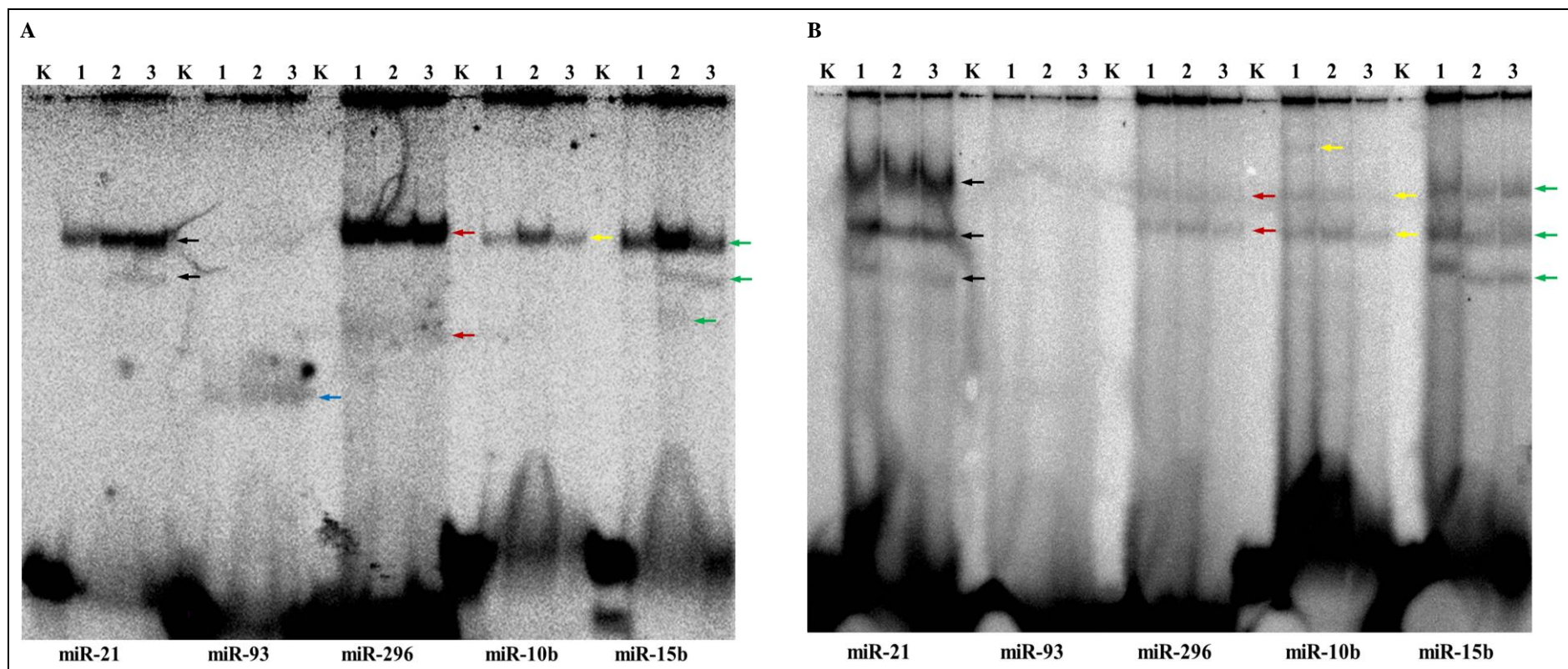
Rysunek 3.2

Podobieństwo struktury miR-21, miR-93, miR-296 oraz aptameru anty-Tn-C, TN-9.6, wg RNAforester.

A. Klaster struktury miR-21, miR-93, miR-296 oraz TN-9.6. **B.** Porównanie sekwencji i struktury aptamera TN-9.6, miR-21, miR-93 oraz miR-296. **C.** Schematy struktury drugorzędowej miR-21, miR-93, miR-296 oraz TN-9.6. Pozycje o identycznej strukturze dla wszystkich badanych RNA oznaczono na czarno.

3.3. Badanie oddziaływań białko-miRNA

miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b oraz miR-15b tworzą kompleksy z białkami lizatów otrzymanych z tkanek guza oraz komórek T98G (Rysunek 3.3). Kompleksy tworzone przez poszczególne miRNA różnią się między sobą. Dodatkowo obserwowano odmienne profile kompleksów na żelach retardacyjnych obrazujących reakcje z lizatem z GBM oraz T98G. Kompleksy powstają w pH 7.5 oraz 4.5. Dodatek Mg^{2+} (10 mM) oraz Tritonu X-100 promuje ich tworzenie.



Rysunek 3.3

Autoradiogram 10 % żelu poliakrylamidowego obrazujący kompleksy miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b oraz miR-15b z białkami lizatu GBM (**A**) oraz lizatu z T98G (**B**).

K - kontrola reakcji, 1-3 – reakcje w buforze 1 (50 mM Hepes pH 7.0, 750 mM NaCl, 50 mM DTT, 50 mM EDTA, 5 % Triton X-100), 2 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), 3 (50 mM CH₃COONa pH 4.5, 28 mM NaCl, 4.5 mM ZnSO₄).

Do niedawna uważano, że miRNA występują w komórkach jedynie w kompleksie RISC. Otrzymane przeze mnie wyniki oraz wcześniejsze badania *in silico* pokazują, że miRNA mogą występować w komórce w postaci spinki do włosów i/lub dupleksu, co może przekładać się na ich właściwości, dostępność i funkcje. Pokazałam, że istnieje zależność między trwałością miRNA przyjmujących strukturę spinki do włosów, a energią tych spinek. Wcześniej pokazano, że trwałość poszczególnych miRNA jest różna. Średni okres półtrwania miRNA wynosi 119 h (~5 dni) [189, 218, 219], w skrajnych przypadkach mierzony jest w minutach, choć może dochodzić nawet do 225 h. Wcześniejsze badania wskazują, że miRNA mogą występować w komórce w formie niezwiązanej z białkami Ago [220, 221]. Wnioskuje zatem, że przyjęcie przez miRNA struktury, przykładowo spinki do włosów, w pewnym stopniu może chronić je przed działaniem nukleaz komórkowych, w efekcie odgrywać istotną rolę w regulacji poziomu miRNA w komórce. Pokazano, że efekt komórkowy wywierany przez miRNA w dużym stopniu zależy od stosunku stężeń miRNA oraz mRNA [214].

Regulacja ekspresji genów z udziałem miRNA zależy od termodynamiki oddziaływań mRNA-miRNA, ta z kolei od dostępności sekwencji docelowej i miRNA, struktury tych RNA oraz ich zaangażowania w oddziaływania z białkami, co pokazano na przykładzie mRNA i białek Dnd1 oraz Pumilio [162, 163]. Przyjęcie przez miRNA struktury spinki do włosów, motywu często zaangażowanego w oddziaływania z białkami oraz innymi RNA, ogranicza ich dostępność do oddziaływań z mRNA targetowym. Pokazano jednak, że nie wyklucza oddziaływań miRNA z mRNA targetowym. Spinki miRNA, przykładowo miR-451 będącego produktem Drosha, nieulegającego obróbce z udziałem Dicer, ale są włączane bezpośrednio do kompleksu RISC [111].

Motyw spinki do włosów RNA znany jest jako miejsce kontaktu RNA z innymi kwasami nukleinowymi i białkami [4]. Pokazano podobieństwo struktury miR-21, miR-93, miR-296 oraz aptameru TN-9.6 skierowanego przeciwko białku tenascyna C. Sugeruje to, że spinki do włosów miRNA, podobnie jak aptamery RNA, mogą bezpośrednio, niezależnie od kompleksu RISC, oddziaływać z białkami i regulować w ten sposób ich aktywność.

Udowodniono, że wybrane miRNA, w tym miRNA przyjmujące strukturę spinki, mogą tworzyć kompleksy z białkami guza GBM oraz komórek T98G. Zauważono specyficzność oddziaływań miRNA-białko. Część białek tworzy kompleksy z

wszystkimi badanymi miRNA, inne tylko z wybranymi z nich. Innym dowodem na to, że miRNA mogą specyficznie oddziaływać bezpośrednio z białkami spoza kompleksu RISC są miRNA rodziny miR-1/miR-206 [59]. U pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym stwierdzono kompleksy TDP-43-miR-1 oraz TDP-43-miR-201 [59]. Postuluje się, że rozwój choroby jest efektem zahamowania aktywności miRNA, będącej z kolei skutkiem uwikłania miRNA w kompleks miRNA-TDP-43. Nie ma jednak przesłanek pozwalających jednoznacznie wykluczyć opcję, że choroba jest następstwem zahamowania aktywności białka TDP-43 przez miRNA. Kolejnym przykładem są miR-888 i miR-146a, które oddziałują z jedną z domen wirusowego białka Gag. Białko to jest ważnym elementem strukturalnym wirusa HIV-1, a jego związanie z wspomnianymi miRNA zaburza składanie cząstek wirusowych [56]. Znane są aptamery anty-Gag, które wywołują dokładnie taki sam efekt jak wspomniane miRNA [57, 58].

Przytoczone przykłady pokazują, że za sprawą struktury, miRNA mogą funkcjonować niezależnie od kompleksu RISC. Struktura miRNA wpływa na ich dostępność oraz aktywność, a zatem stanowi kolejny poziom regulacji epigenetycznej.

Ponadto, odkrycie to stawia miRNA jako nowe cele terapeutyczne w nowym świetle. Znane są w literaturze przykłady związków małowcząsteczkowych oraz antysensowych RNA i DNA, które zmieniając strukturę RNA znoszą ich aktywność. Postuluję, że zmiany struktury dojrzałych miRNA mają odzwierciedlenie w ich funkcji, a zastosowanie czynników modulujących ich strukturę może stanowić nowe podejście zależnej od miRNA regulacji ekspresji genów.

4. Opracowanie katalitycznych kwasów nukleinowych anty-miRNA

Zaburzenie poziomu miRNA skorelowano z ponad 390 chorobami (<http://cmbi.bjmu.edu.cn/hmdd>), w tym nowotworami glejowymi mózgu. miRNA mają dużą wartość prognostyczną oraz stanowią potencjalny cel terapii tych chorób. Wobec braku skutecznych metod leczenia glejaków, ich oporności na konwencjonalne metody leczenia, istnieje potrzeba rozwijania nowych narzędzi pozwalających regulować poziom miRNA. Jednym z celów pracy jest dostarczenie rybozymów typu hammerhead oraz DNAzymów specyficznym i wydajnie hydrolizującym miRNA i/lub ich prekursorów, obniżających komórkową pulę miRNA. Opracowałam rybozomy oraz DNAzomy skierowane na miR-21, miR-10b, miR-15b oraz ich prekursorów, których poziom jest znacząco wyższy w nowotworach glejowych mózgu niż w tkankach zdrowych.

4.1. Projektowanie rybozymów oraz DNAzymów anty-miRNA

4.1.1. Wybór miejsc docelowych dla rybozymów typu hammerhead

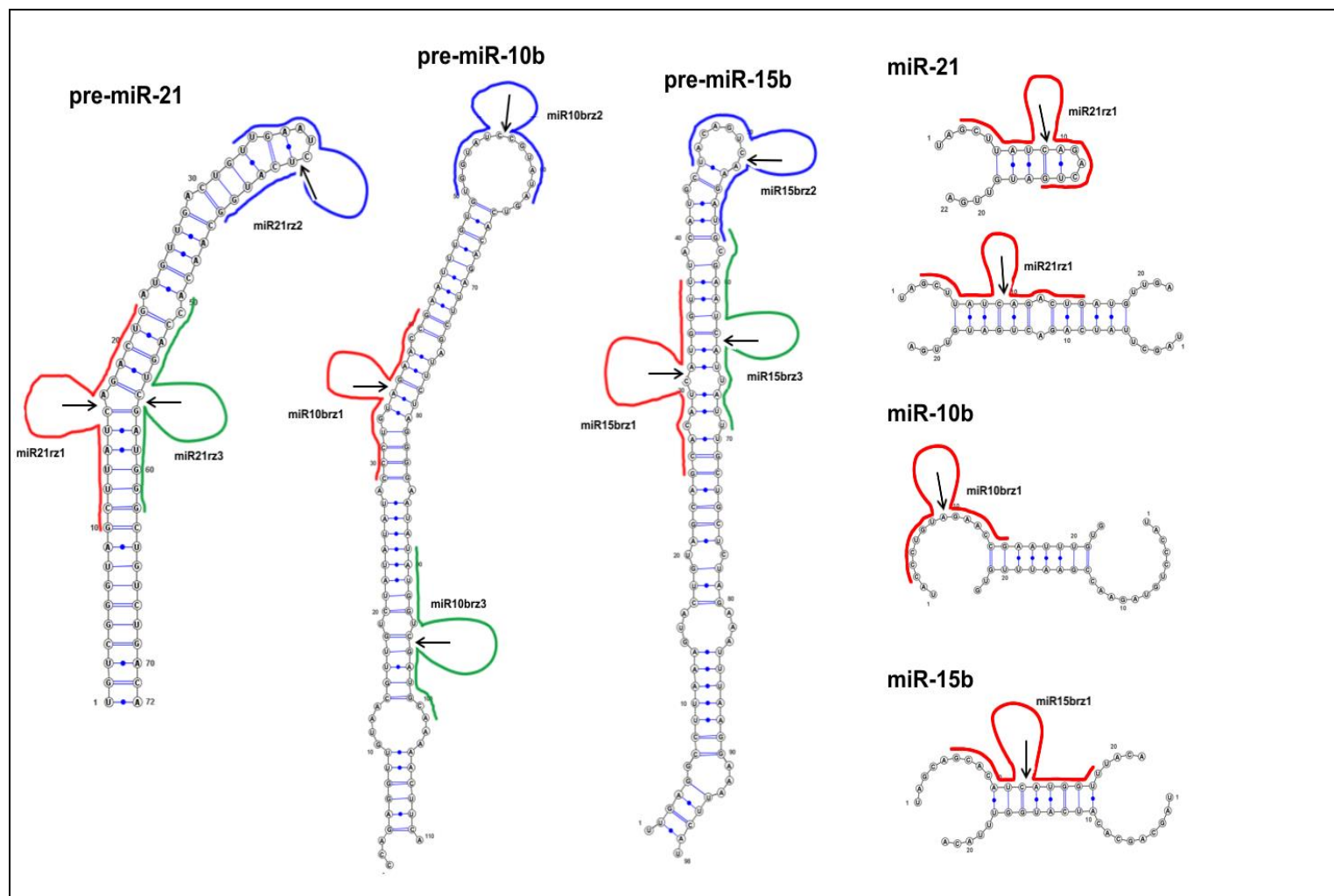
Rybozym typu hammerhead katalizuje transestryfikację substratów po sekwencji 5'-NUH-3', gdzie N oznacza dowolny nukleotyd, U urydynę natomiast H adenozyne, cytozynie lub urydynę niezwiązaną wiązaniami wodorowymi. Stała szybkości reakcji katalizowanej przez rybozym hammerhead zależy od sekwencji docelowego RNA i maleje w następującym porządku: AUC, GUC > GUA, AUA, CUC > AUU, UUC, UUA > GUU, CUA > UUU, CUU [222]. Z tego względu jako miejsca docelowe działania rybozymów wybrałam trinukleotydy AUC, GUC oraz w jednym przypadku GUA. Wybierając miejsca docelowe dla rybozymów wzięłam pod uwagę ich odległość od końca 3' oraz 5' cząsteczki RNA tak aby zapewnić efektywne związanie 6-nt ramion rybozomu z substratem oraz dostępność wytypowanych miejsc w obrębie struktury drugorzędowej miRNA oraz ich prekursorów (Rysunek 4.1 i 4.2).

Zidentyfikowałam dwie sekwencje AUC oraz trzy GUC w obrębie pre-miR-21. Jedna z sekwencji AUC znajduje się również w dojrzałym miR-21. Odrzucono dwie skrajne sekwencje GUC, gdyż ich bliskie (< 6nt) sąsiedztwo z końcami RNA nie pozwala na pełne parowanie z ramionami rybozymów. Dla trzech pozostałych miejsc zaprojektowano rybozomy typu hammerhead. W obrębie pre-miR-10b występuje jedno miejsce AUC oraz trzy GUC. Żadne z nich nie występuje w dojrzałym miRNA. Zaprojektowano rybozomy dla sekwencji AUC oraz GUC znajdującej się najbliżej końca 3'. Dodatkowo, jako potencjalne miejsca działania rybozomu wytypowano

sekwencję GUA, która znajduje się zarówno w pre-miR-10b jak i miR-10b. W pre-miR-15b zidentyfikowano dwie sekwencje AUC oraz jedną GUC, a następnie dla każdej z nich zaprojektowano rybozomy.

Analiza struktury miRNA z użyciem metod mapowania chemicznego oraz enzymatycznego, metod spektroskopii NMR, CD, UV/Vis oraz modelowania *in silico* wskazują, że badane prekursor miRNA tworzą struktury spinki do włosów, dojrzałe miR-21, miR-93, miR-296 mogą przyjmować zarówno strukturę spinki do włosów, alternatywnie tworzą dupleks, miR-10b oraz miR-15b nie tworzą struktury w obrębie jednej cząsteczki ale mogą występować w formie dupleksu. Wybrane sekwencje (AUC oraz GUC) dla rybozymów anty-pre-miR-21 znajdują się w trzonie spinki pre-miR-21, alternatywnie w jej pętli (sekwencja AUC). Sekwencja AUC dojrzałego miR-21 zlokalizowana jest w rejonie dwuniciowym trzonu spinki alternatywnie dupleksu. GUA oraz GUC pre-miR-10b znajdują się w obrębie trzonu spinki do włosów tego pre-miRNA, AUC w obrębie jej pętli terminalnej. W przypadku pre-miR-15b obie sekwencje AUC znajdują się w trzonie spinki, GUC w pętli terminalnej. Sekwencja GUC miR-10b znajduje się w rejonie niesparowanym dupleksu, AUC miR-15b z kolei w rejonie dwuniciowym (Rysunek 4.1 i 4.2).

Dane strukturalne wskazują, że niektóre z wytypowanych trójek nukleotydowych znajdują się w rejonach dwuniciowych RNA dlatego ich dostępność dla rybozymów może być ograniczona. Projektując rybozomy wzięto jednak pod uwagę fakt, że może dojść do wymuszenia dostępności sekwencji RNA [87]. Z tego względu nie odrzucano miejsc docelowych o cechach sugerujących brak dostępności ze względu na charakter dwuniciowy.



Rysunek 4.2

Schemat przedstawiający strukturę miR-21, miR-10b, miR-15b, ich prekursorów oraz rybozymów. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy RNA z udziałem rybozymów.

4.1.2. Porównanie miejsc docelowych dla rybozymów w obrębie substratów

Wszystkie wybrane miejsca docelowe rybozymów posiadają sekwencję 5'-AUC-3', 5'-GUC-3' lub 5'-GUA-3' (Rysunek 4.3). Podobieństwo sekwencji 13-nukleotydocowych fragmentów substratów (Rysunek 4.3) wynoszą odpowiednio dla: (i) pre-miR-21/miR-21: T1 i T2 38 %, T1 i T3 31 %, T2 i T3 38 %, (ii) pre-miR-10b/miR-10b: T4 i T5 15 %, T4 i T6 38 %, T5 i T6 38 %, (iii) pre-miR-15b/miR-15b: T7 i T8 38 %, T7 i T9 69 %, T8 i T9 46 %. Ilość par GC w obrębie ramion wynosi 42, 33, 50, 42, 33, 58, 67, 33 oraz 42 % odpowiednio dla kolejnych sekwencji T1-T9.

Sekwencja substratu oraz zawartość nukleotydów G/C ma wpływ na aktywność *in vitro* rybozymów typu hammerhead [223]. Jest wielce prawdopodobne, że również *in vivo* mają one istotne znaczenie nie tylko w aspekcie dostępności substratu ale również aktywności rybozymu. Wpływ reszt w określonych pozycjach ramion rybozymu nadal nie jest poznany.

pre-miR-21/miR-21	pre-miR-10b/miR-10b	pre-miR-15b/miR-15b
T1 GCUUA <u>AUC</u> AGACUG	T4 CCCUGU <u>AGA</u> ACCG	T7 GCACA <u>UCA</u> UGGUU
T2 UUGAA <u>AUC</u> UCAUGG	T5 UGGUA <u>UCG</u> UAUA	T8 UACA <u>GUC</u> AAGAUG
T3 ACCAG <u>UCG</u> AUGGG	T6 UAUGG <u>UCG</u> AUGCA	T9 GCGAA <u>UCA</u> UUAUU

Rysunek 4.3

Porównanie sekwencji 13-nukleotydocowych substratów rybozymów w obrębie pre-miRNA oraz miRNA. Sekwencje AUC, GUC, GUA podkreślono. Kolorem ciemnoszarym zaznaczono nukleotydy identyczne we wszystkich sekwencjach, jasnoszarym identyczne w dwóch sekwencjach w obrębie porównywanej grupy.

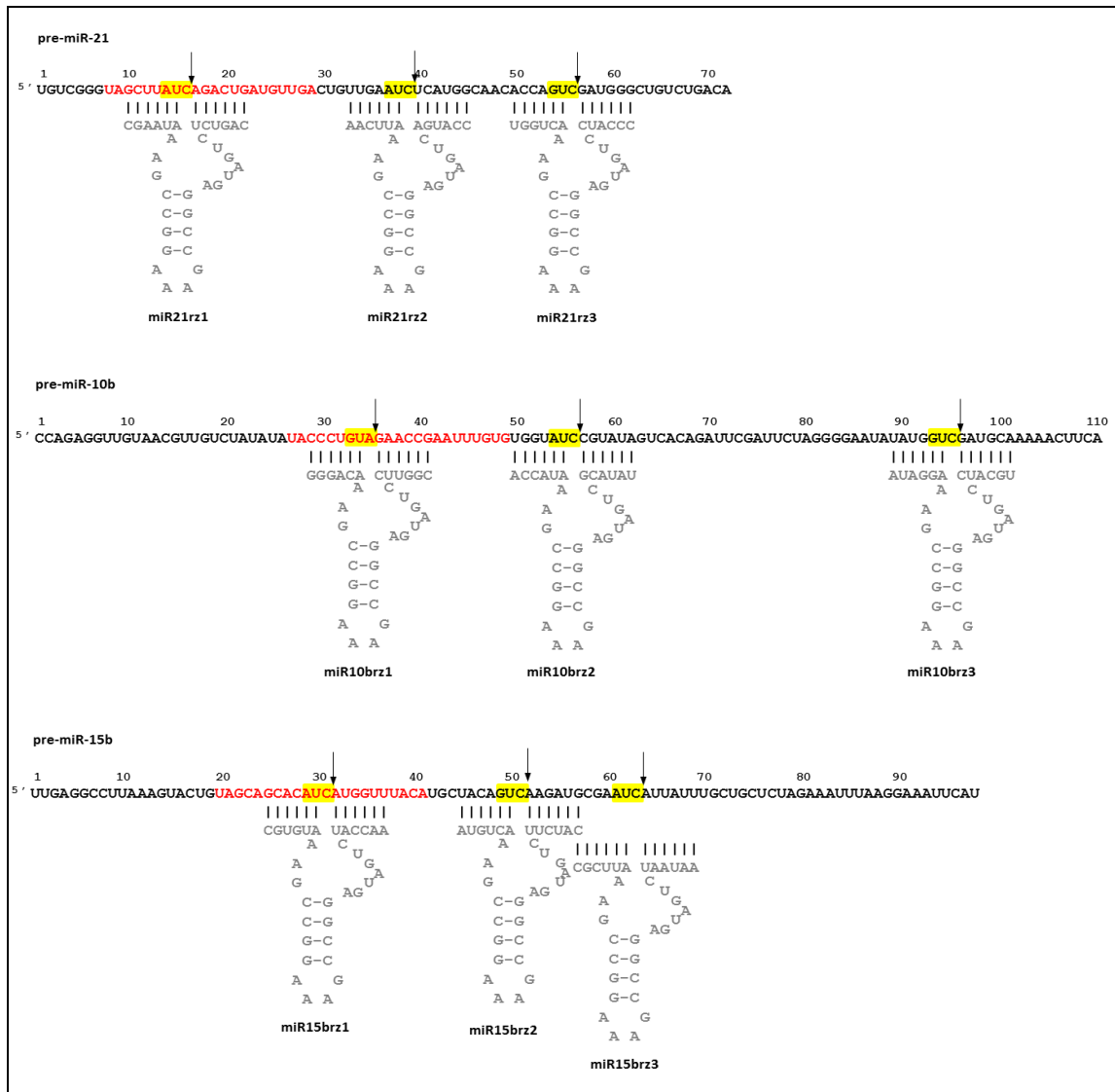
4.1.3. Projektowanie rybozymów typu hammerhead

Zaprojektowałam łącznie po trzy rybozimy typu hammerhead anty-miR-21 (miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3), anty-miR-10b (miR10brz1, miR10brz2, miR10brz3) oraz anty-miR-15b (miR15brz1, miR15brz2, miR15brz3). Trzy z nich rozpoznają zarówno prekursorzy jak i dojrzałe miRNA (miR21rz1, miR10brz1, miR15brz1) (Tabela 1.3, Rysunek 4.4). 34 nt sekwencja rybozymów obejmuje 22 nt rdzeń katalityczny o sekwencji 5'- CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA-3' oraz zlokalizowane po obu stronach sześciokleotydocowe ramiona, o sekwencjach komplementarnych do miRNA i/lub pre-miRNA. Długość ramion rybozymu jest kompromisem między jego aktywnością, a specyficnością [224]. Ramiona mają zapewnić silne związanie

rybozemu z substratem, równocześnie umożliwić jego łatwe uwolnienie od produktów hydrolizy, dzięki czemu rybozym staje się aktywny dla kolejnych cząsteczek substratu. Wydłużenie ramion rybozemu może się wiązać ze spadkiem wydajności hydrolizy, z kolei ich skrócenie ze spadkiem specyficzności rybozemu [224, 225]. Optymalna długość ramion hybrydujących to 6-10 reszt nukleotydowych [226]. Sekwencję rdzenia katalitycznego rybozymów wybrano w oparciu o wyniki wcześniejszych badań realizowanych w Zespole Biologii RNA [227, 228]. Strukturę drugorzędową rybozemu typu hammerhead oraz miejsca hydrolizy miR-21, miR-10b, miR-15b oraz ich prekursorów z udziałem zaprojektowanych rybozymów przedstawiono na Rysunek 4.4.

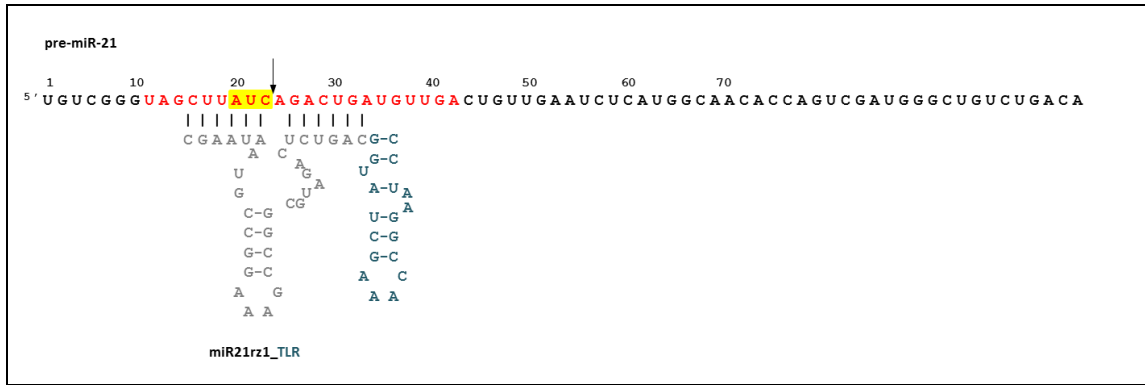
Zaprojektowałam również dodatkowy wariant rybozemu miR21rz1 mianowicie miR21rz1_TLR (Rysunek 4.5). Przy końcu 5' rybozemu dołączono fragment RNA zawierający motyw receptora dla czteronukleotydowej pętli GAAA, która jest częścią 'standardowego' minimalnego rybozemu i stanowi wysoce specyficzny element struktury trzeciorzędowej rybozemu. Ma on zapewnić rybozymowi wysoką aktywność katalityczną w niskich stężeniach jonów Mg^{2+} .

Zaprojektowano także rybozemy posiadające mutacje w obrębie centrum katalitycznego (miR21rz1_mut, miR10b_mut). Rybozemy zmutowane zostały wykorzystane w charakterze kontroli reakcji z właściwymi rybozymami (Tabela 1.3, Rysunek 4.6).



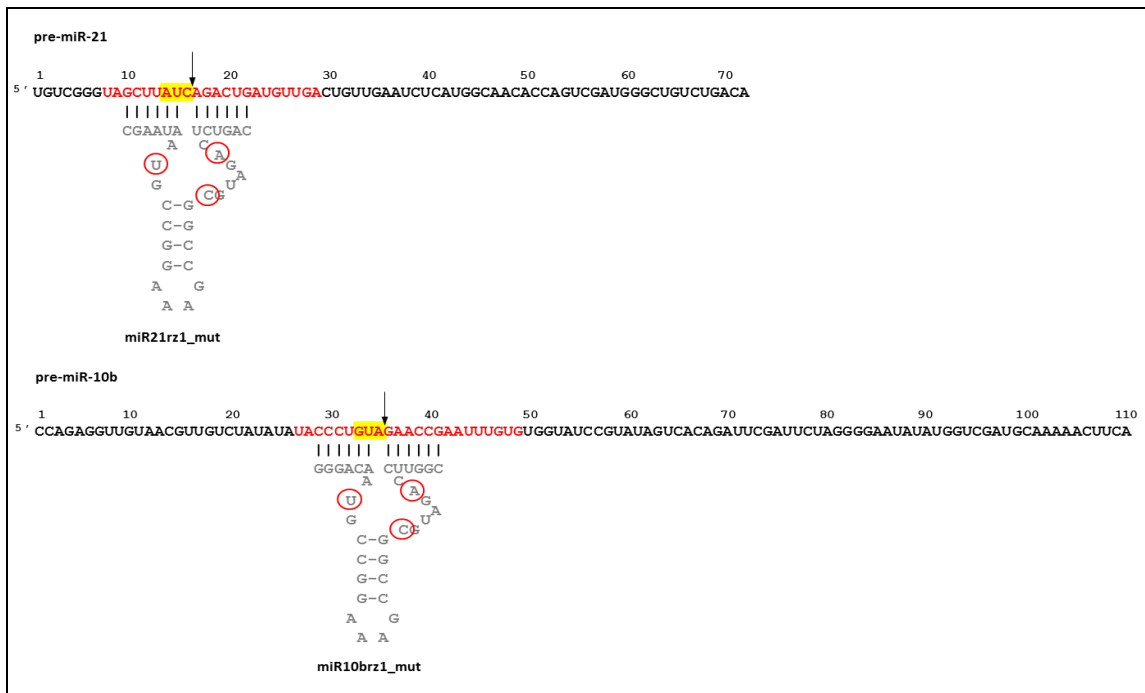
Rysunek 4.4

Struktura drugorzędowa rybozymów anti-miR-21 (miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3), anti-miR-10b (miR10brz1, miR10brz2, miR10brz3) oraz anti-miR-15b (miR15brz1, miR15brz2, miR15brz3) (szary) w kompleksie z pre-miRNA/miRNA. Na czerwono zaznaczono sekwencję dojrzałych miRNA, na żółto sekwencje AUC, GUC i GUA rozpoznawane przez rybozymy. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy pre-miRNA oraz miRNA z udziałem tych rybozymów.



Rysunek 4.5

Struktura drugorzędowa rybozemu anty-miR-21 z motywem receptora dla czteronukleotydu GAAA (miR21rz1_TLR) w kompleksie z pre-miRNA/miRNA. Podstawowy wariant rybozemu miR21rz1 zaznaczono na szaro, motyw TLR na turkusowo, sekwencję dojrzałego miR-21 na czerwono, sekwencję AUC rozpoznawaną przez rybozym na żółto. Strzałka wskazuje miejsce hydrolizy pre-miR-21 oraz miR-21 z udziałem rybozemu.



Rysunek 4.6

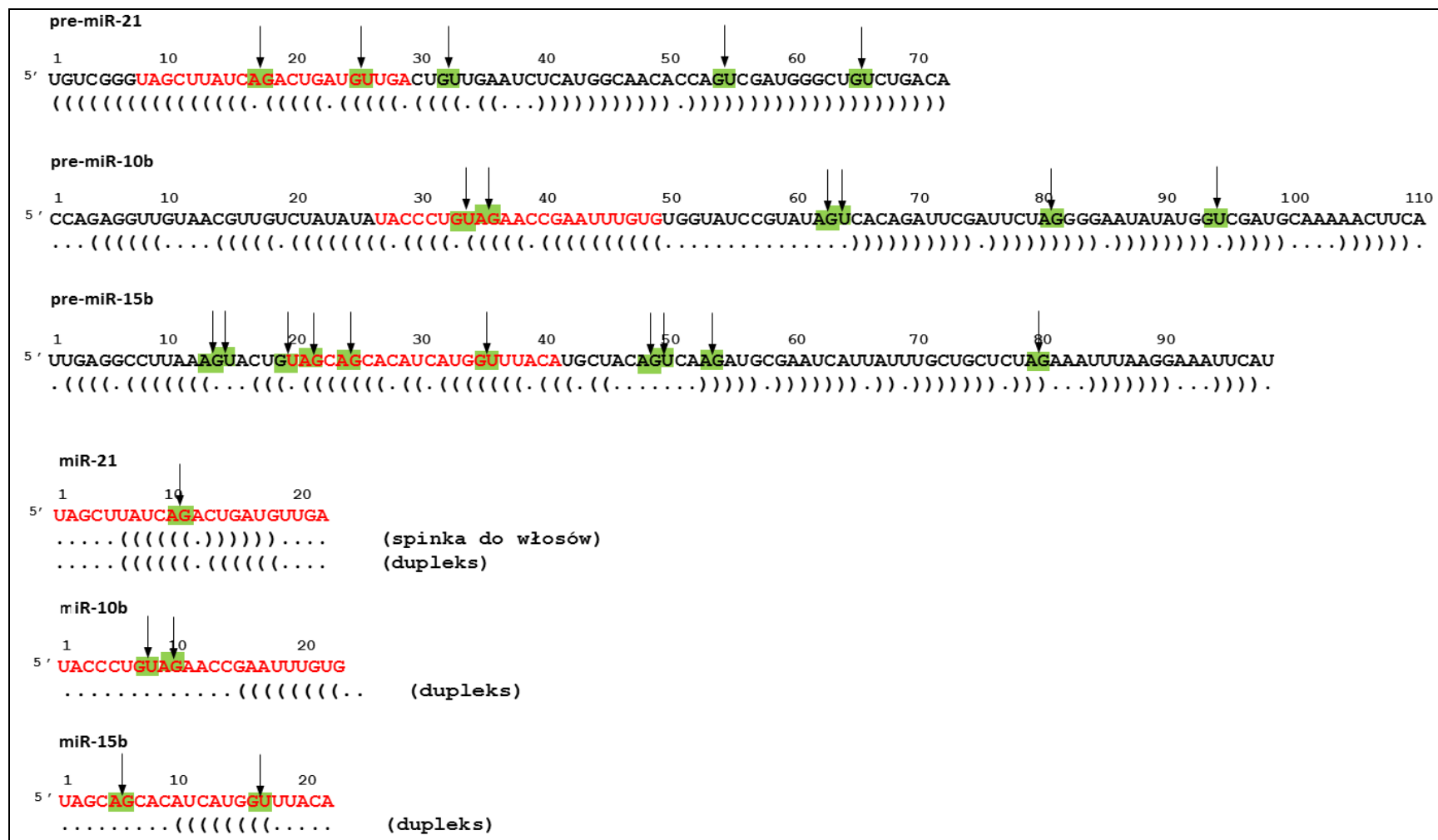
Struktura drugorzędowa rybozemu zmutowanych w obrębie rdzenia katalitycznego miR21rz1_mut oraz miR10brz1_mut (szary) w kompleksie z substratem pre-miRNA/miRNA. Na czerwono zaznaczono sekwencję dojrzałych miRNA, na żółto sekwencje AUC oraz GUA rozpoznawane przez rybozemy. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy pre-miRNA oraz miRNA z udziałem odpowiadających im niezmutowanych odpowiedników tych rybozemu, odpowiednio miR21rz1 oraz miR10brz1. Czerwonymi kółkami zaznaczono zmienione nukleotydy.

4.1.4. Wybór miejsc docelowych dla DNAzymów

DNAzym '8-17' hydrolizuje wiązanie internukleotydomy pomiędzy AG lub GG, natomiast '10-23' wiązanie pomiędzy dowolnym nukleotydem purynowym i pirymidynowym [229]. Podobnie jak w przypadku rybozymów, wydajność hydrolizy RNA zależy do sekwencji DNAzymu. Stała szybkości reakcji hydrolizy z udziałem DNAzymów '10-23' maleje według następującej kolejności: $GU \geq AU > GC > AC$ [230, 231]. Z tego względu, jako miejsca docelowe działania tego typu DNAzymów wybrano sekwencje GU. Zaprojektowano również DNAzimy '8-17' rozpoznający sekwencję AG. Projektując DNAzimy, podobnie jak w przypadku rybozymów, analizowano dostępność wytypowanych sekwencji w obrębie struktury drugorzędowej pre-miRNA oraz miRNA a także ich odległość od końców RNA, tak by zagwarantować możliwość utworzenia parowań RNA-DNAzym.

W obrębie pre-miR-21 zidentyfikowałam trzy sekwencje AG oraz sześć GU, z czego jako miejsca docelowe dla DNAzymów wybrano jedną sekwencję AG oraz cztery GU. Odrzucono jedną z sekwencji AG oraz dwie GU znajdujące się najbliżej końca 5' RNA. W obrębie miR-21 zidentyfikowano jedną sekwencję GU oraz dwie AG, z czego jedną z nich odrzucono ze względu na jej umiejscowienie w sąsiedztwie (w odległości zaledwie 1 nt) końca 5' miRNA, co uniemożliwia wiązanie DNAzymu do substratu. W pre-miR-10b występuje aż jedenaście sekwencji GU, z czego jako miejsca docelowe dla DNAzymów wybrano trzy oraz sześć sekwencji AG, przy czym dla połowy z nich zaprojektowano DNAzimy. Dwa z DNAzymów skierowanych na pre-miR-10b rozpoznaje również dojrzały miR-10b. W pre-miR-15b znajduje się sześć sekwencji AG oraz cztery GU. Dwie z AG odrzucono. Dla pozostałych zaprojektowano DNAzimy. Ramiona dwóch spośród nich, miR15bdz5 oraz miR15bdz6 są komplementarne do miR-15b (Rysunek 4.7). Dodatkowo zaprojektowano ich warianty o wydłużonych o 4 nt ramionach (miR15bdz5+ oraz miR15bdz6+) (Rysunek 4.12).

Dane strukturalne dotyczące miRNA i ich prekursorów wskazują, że znacząca część z wytypowanych miejsc docelowych dla DNAzymów znajduje się w obrębie rejonów dwuniciowych RNA. Dopuszczono jednak możliwość wymuszenia dostępności sekwencji RNA przez DNAzimy [87]. Dlatego nie odrzucano miejsc docelowych o cechach sugerujących brak dostępności ze względu na charakter dwuniciowy.



Rysunek 4.7

Sekwencje oraz struktury drugorzędowe miR-21, miR-10b, miR-15b oraz ich prekursorów. Na zielono zaznaczono sekwencje AG oraz GU do których zaprojektowano DNazyimy. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy RNA z udziałem DNazyimów. Sekwencję dojrzałych miRNA zaznaczono na czerwono.

4.1.5. Porównanie miejsc docelowych dla DNAzymów w obrębie substratów

Wszystkie wybrane miejsca docelowe DNAzymów '8-17' posiadają sekwencję 5'-GU-3', DNAzymów '10-23' sekwencję 5'-AG-3'. Podobieństwo fragmentów pre-miRNA komplementarnych do poszczególnych DNAzymów (T1-T21) (Rysunek 4.8) dla (i) pre-miR-21/miR-21 jest największe między T2 i T3 (53 %), najmniejsze między T1 i T2 (20 %), (ii) pre-miR-10b/miR-10b największe między T8 i T9 (92 %), najmniejsze między T6 i T7 (20 %), (iii) pre-miR-15b/miR-15b największe między T12 i T13 oraz T18 i T19 (92 %), najmniejsze między T17 i T18 oraz T16 i T20 (15 %). Ilość par GC w obrębie ramion mieści się w przedziale 25 – 58 % i jest największa dla T7, najmniejsza na T13, T16, T18, T21. Podobnie jak w przypadku rybozymów, sekwencja substratu oraz zawartość nukleotydów G/C ma wpływ na aktywność *in vitro* oraz *in vivo* DNAzymów [223] (Rysunek 4.8).

Pre-miR-21/miR-21	Pre-miR-10b/miR-10b	Pre-miR-15b/miR-15b
T1 GCUUAUC <u>AG</u> ACUGAUG	T6 UACCCUG <u>U</u> AGAAC	T12 CCUUA <u>AG</u> GUACUG
T2 GACUGAUG <u>U</u> UGACUG	T7 CCCUG <u>U</u> AGAACCG	T13 CUUA <u>AG</u> GUACUGU
T3 GUUGACUG <u>U</u> UGAAUC	T8 CCGUA <u>U</u> AGUCACA	T14 AGUACUG <u>U</u> AGCAG
T4 AACACCAG <u>U</u> CGAUGG	T9 CGUA <u>U</u> AGUCACAG	T15 UACUG <u>U</u> AGCAGCA
T5 AUGGGC <u>U</u> GUCUGACA	T10 GAUUC <u>U</u> AGGGGAA	T16 UGUAGCAGCACAU
	T11 UAU <u>A</u> UGGUCGAUG	T17 AUC <u>A</u> UGGUUUACA
		T18 UGC <u>U</u> ACAGUCAAG
		T19 GCU <u>A</u> CAGUCAAGA
		T20 CAG <u>U</u> CAAGAUGCG
		T21 UGC <u>U</u> AGAAAAU

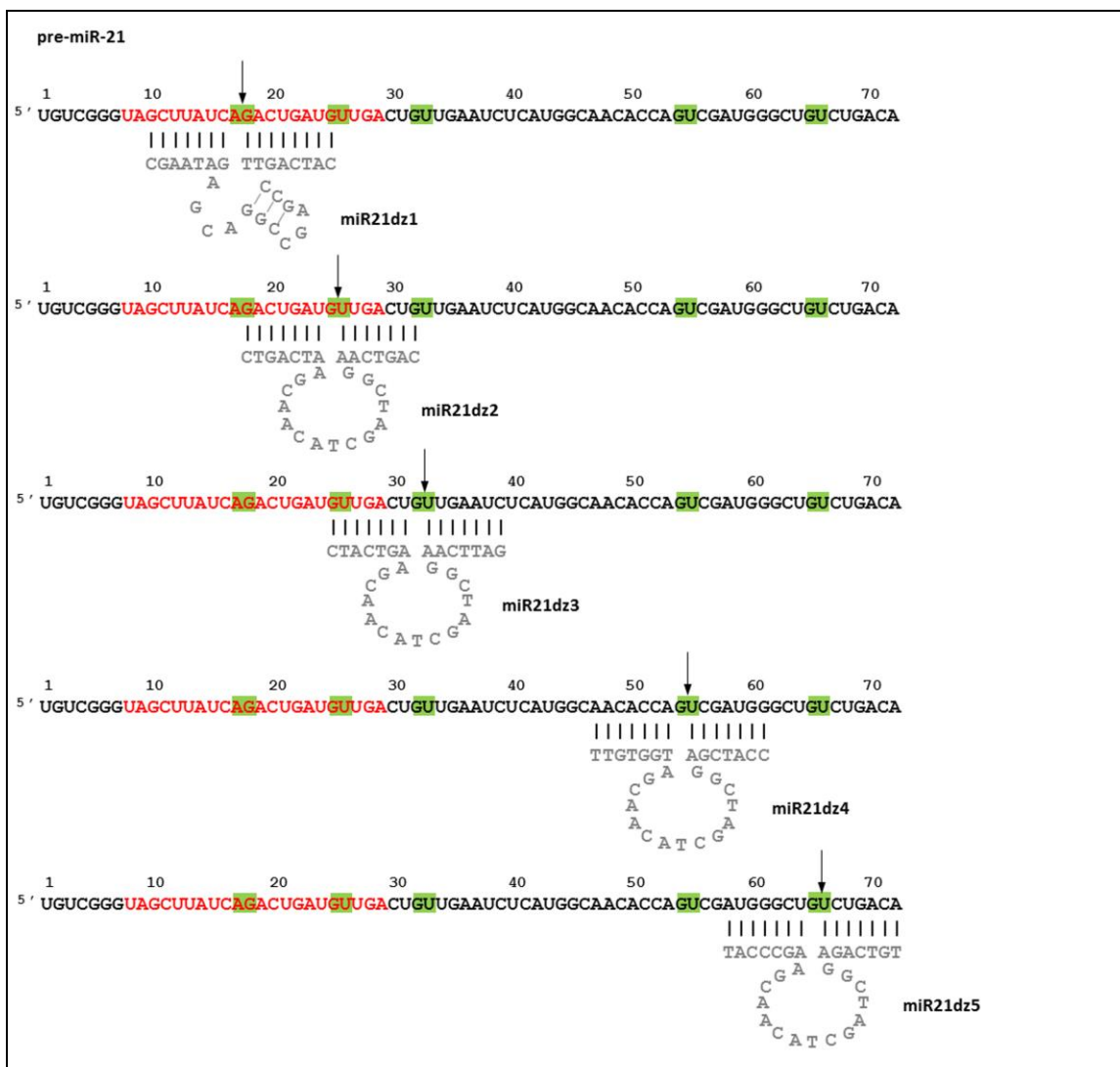
Rysunek 4.8

Porównanie sekwencji w obrębie pre-mi-21, pre-miR-10b, pre-miR-15b oraz ich dojrzałych miRNA komplementarnych do ramion DNAzymów. Sekwencje AG oraz GU podkreślono. Kolorem ciemnoszarym zaznaczono nukleotydy identyczne we wszystkich sekwencjach, jasnoszarym identyczne w co najmniej połowie sekwencji w obrębie porównywanej grupy. W analizie nie uwzględniono fragmentów komplementarnych do ramion wydłużonych wariantów DNAzymów (miR15bdz5+ oraz miR15bdz6+).

4.1.6. Projektowanie DNAzymów

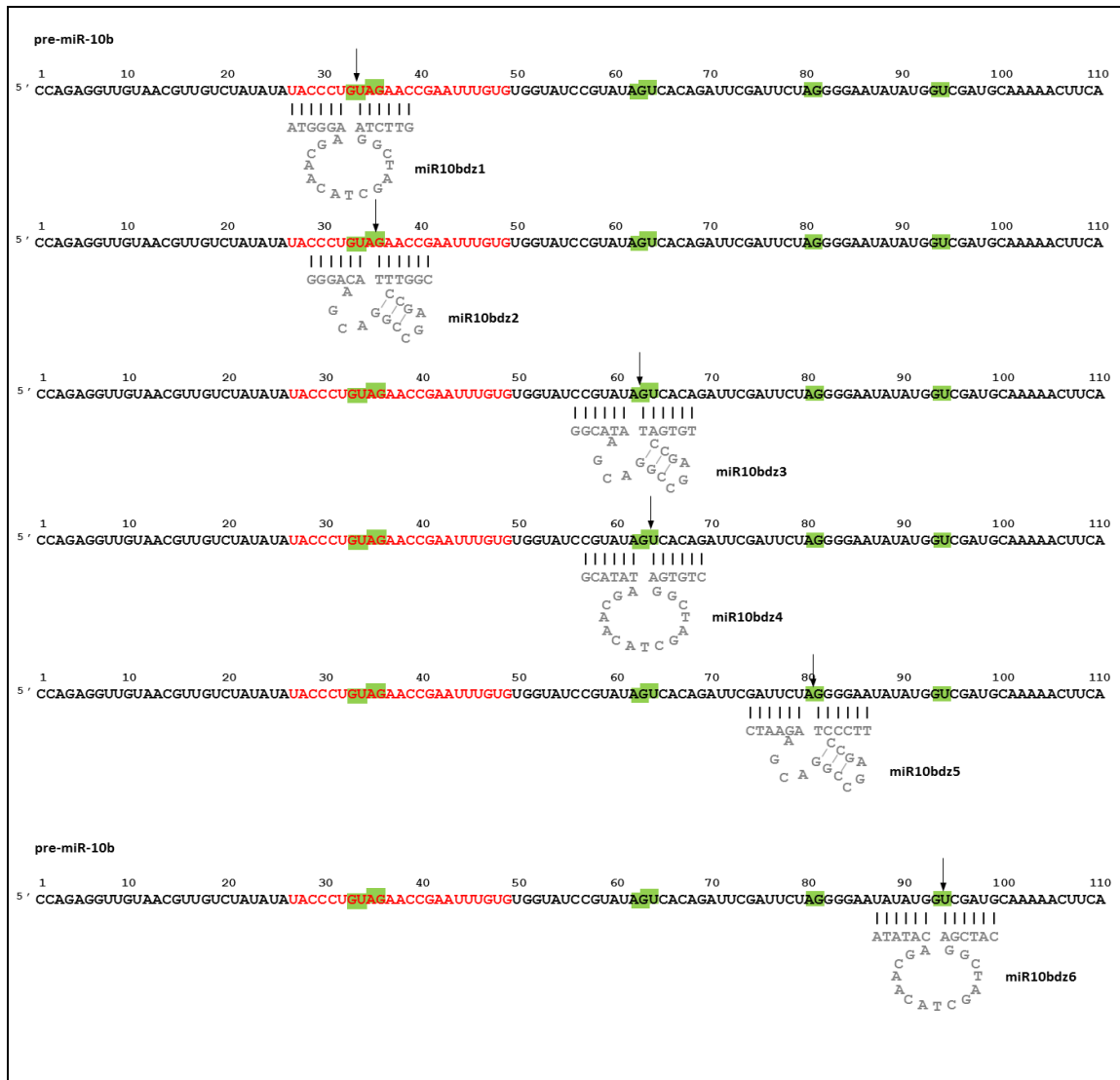
Zaprojektowałam DNAzimy typu '8-17' oraz typu '10-23' skierowane na pre-miR-21, pre-miR-10b, pre-miR-15b oraz odpowiadające im dojrzałe miRNA (Tabela 1.5, Rysunek 4.9-4.11). 28 nt sekwencja DNAzimu '8-17' obejmuje 14 nt rdzeń katalityczny o sekwencji 5'-TCCGAGCCGGACGA-3'. DNAzimy '10-23' to 29-oligonukleotydy zawierające 15 nt rdzeń katalityczny o sekwencji 5'-GGCTAGCTACAACGA-3'. Obecność sekwencji AG lub GU w obrębie substratu oraz komplementarność ramion rybozymów do substratu są warunkami koniecznymi do

zaistnienia hydrolizy. W obu wariantach DNAzymów domenę katalityczną otaczają sześć- bądź siedmionukleotydowe ramiona o sekwencjach komplementarnych do różnych rejonów miRNA i/lub pre-miRNA. Długość ramion oraz ich pełna komplementarność do substratów powinny determinować wysoką aktywność i specyficzność DNAzymów. Dodatkowo zaprojektowano DNAzemy o wydłużonych o 4 nt ramionach (miR15bdz5+ oraz miR15bdz6+). Strukturę drugorzędową DNAzymów, miejsca hydrolizy pre-miR21, pre-miR-10b, pre-miR-15b oraz ich dojrzałych form (miR-21, miR-10b, miR-15b) z udziałem zaprojektowanych DNAzymów przedstawiono na Rysunkach 4.9-4.12.



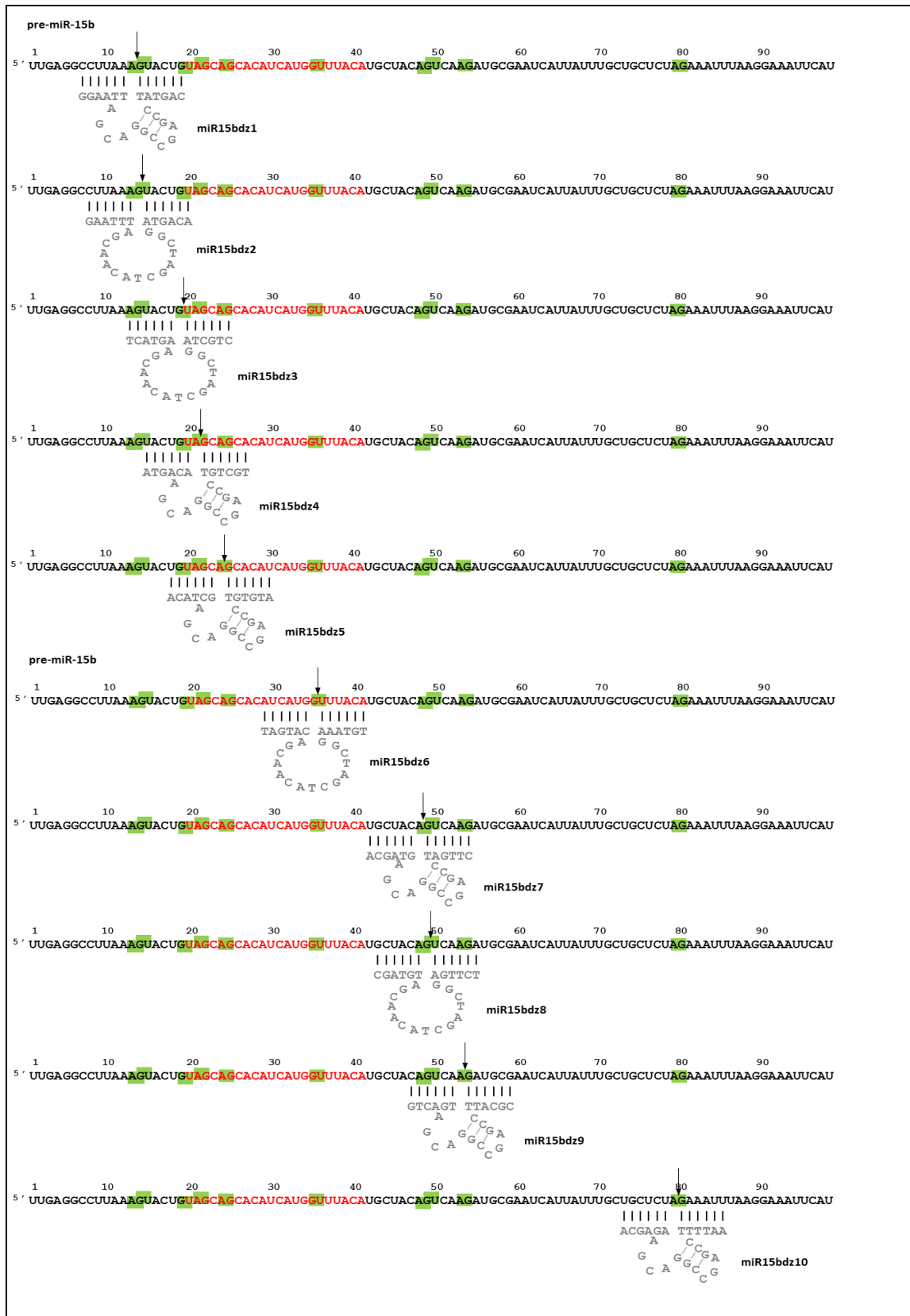
Rysunek 4.9

Struktura drugorzędowa DNAzymów anty-miR-21 (miR-21dz1, miR-21dz2, miR-21dz3, miR-21dz4, miR-21dz5) (szary) w kompleksie z substratem pre-miR-21/miR-21. Na czerwono zaznaczono miR-21, na zielono sekwencje AG i GU rozpoznawane przez DNAzemy. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy pre-miR-21 oraz miR-21 z udziałem DNAzymów.



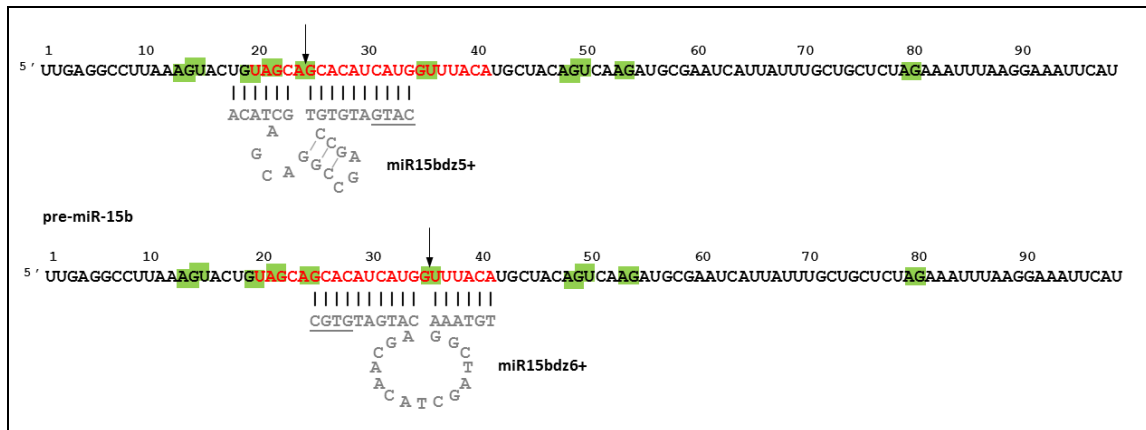
Rysunek 4.10

Struktura drugorzędowa DNAzymów anti-miR-10b (miR10bdz1, miR10bdz2, miR10bdz3, miR10bdz4, miR10bdz5, miR10bdz6) (szary) w kompleksie z substratem pre-miR-10b/miR-10b. Na czerwono zaznaczono miR-10b, na zielono sekwencje AG i GU rozpoznawane przez DNAzymy. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy pre-miR-10b oraz miR-10b z udziałem DNAzymów.



Rysunek 4.11

Struktura drugorzędowa DNAzymów anti-miR-15b (miR15bdz1, miR15bdz2, miR15bdz3, miR15bdz4, miR15bdz5, miR15bdz6, miR15bdz7, miR15bdz8, miR15bdz9, miR15bdz10) (szary) w kompleksie z substratem pre-miR-15b/miR-15b. Na czerwono zaznaczono miR-15b, na zielono sekwencje AG i GU rozpoznawane przez DNAzymy. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy pre-miR-15b oraz miR-15b z udziałem DNAzymów.



Rysunek 4.12

Struktura drugorzędowa wydłużonych DNAzymów anti-miR-15b (miR15bdz5+, miR15bdz6+) (szary) w kompleksie z substratem pre-miR-15b/miR-15b. Na czerwono zaznaczono miR-15b, na zielono sekwencje AG i GU rozpoznawane przez DNAzymy. Strzałki wskazują miejsca hydrolizy pre-miR-15b oraz miR-15b z udziałem DNAzymów. Podkreślono 4-nt sekwencję o które zostały wydłużone podstawowe warianty rybozymów (miR15bdz5 i miR15bdz6).

4.2. Aktywność *in vitro* katalitycznych kwasów nukleinowych

Analizę aktywności zaprojektowanych rybozymów oraz DNAzymów prowadziłam w warunkach reakcji jednoobrotowej z nadmiarem rybozymu względem substratu. Reakcję można podzielić na dwa etapy: denaturację/renaturację (I) oraz transestryfikację (II) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1

Warunki reakcji katalizowanej przez rybozymy hammerhead *in vitro*, które podlegały zmianom w trakcie badań z wyszczególnieniem etapów denaturacji/renaturacji (I) oraz transestryfikacji (II).

Etap	Warunki
I	Denaturacja 3 min, 85 °C lub jej brak Schładzanie do 37 °C lub 25 °C w urządzeniu Thermomixer (~2h) lub w łaźni wodnej (przez noc) Denaturacja/renaturacja substratu i rybozymu razem lub osobno
II	Stosunek rybozym:substrat (1:1.5625, 1:3.125, 1:6.25, 1:10, 1:12.5, 1:25, 1:50) Stężenie Mg ²⁺ (1, 5, 10, 25 mM) Obecność jonów jednowartościowych (Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , Li ⁺) Temperatura (25 °C, 37 °C) pH buforu (5.5, 7.5, 8.0) Czas reakcji (30 min – 15 h) Obecność związków imitujących stłoczenie komórkowe i/lub sprzyjających zwijaniu RNA (spermina, spermidyna, PEG200, PEG400, PEG3350, heksamina kobaltu) Długość substratu (110, 98, 72, 23, 22, 13 nukleotydów)

Określiłam wpływ (i) stosunku rybozym:substrat lub DNAzym:substrat, (ii) stężenia Mg^{2+} oraz innych jonów, (iii) długości substratowego RNA, (iv) obecności związków mimikujących stłoczenie komórkowe, (v) czasu reakcji, (vi) pH buforu oraz (vii) temperatury na wydajność reakcji katalizowanej z udziałem DNAzymów i/lub rybozymów.

4.2.1. Rybozomy typu hammerhead oraz DNAzomy anty miR-21

4.2.1.1. Aktywność względem pre-miR-21

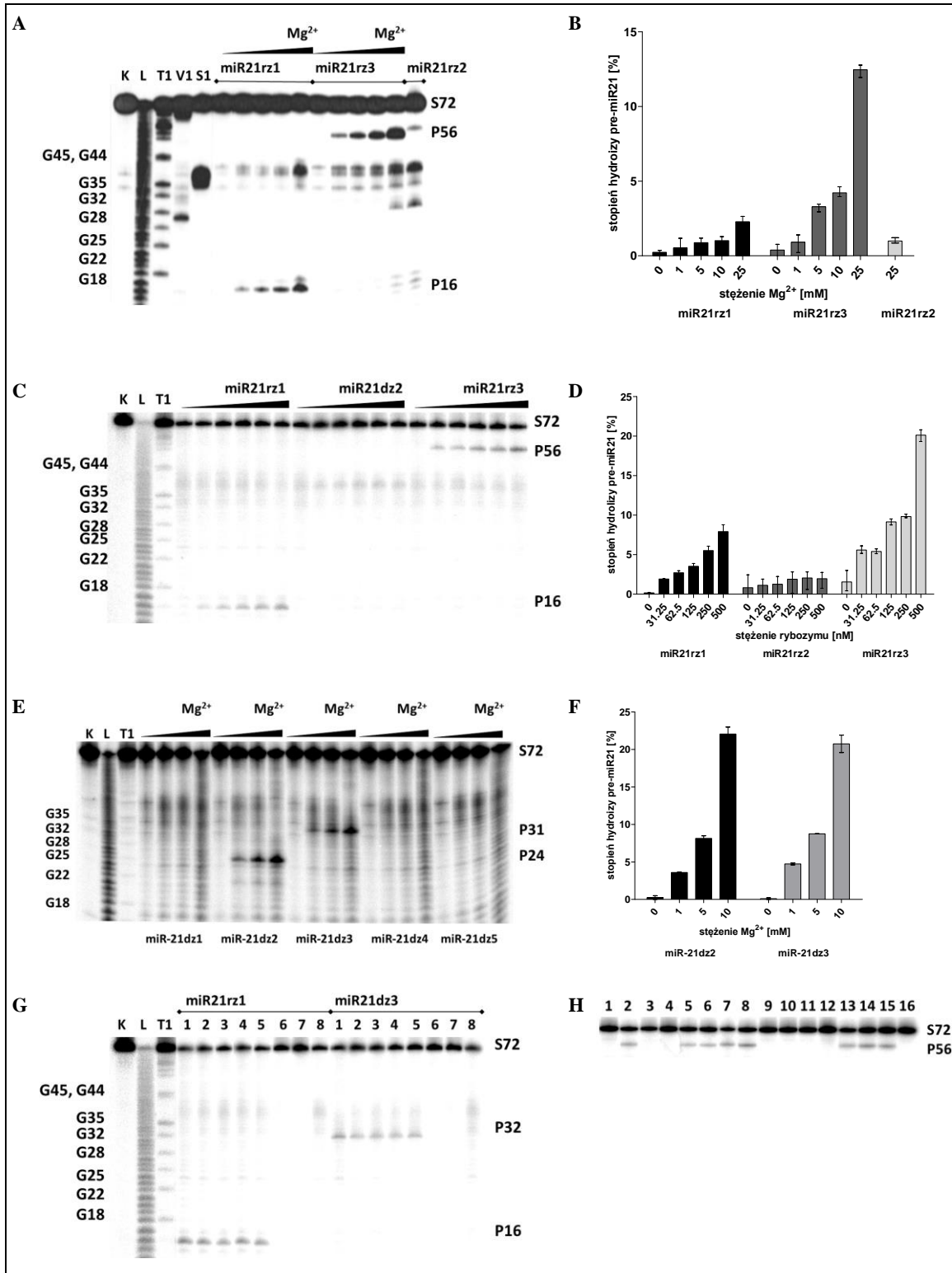
Rybozomy miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 hydrolizują pre-miR-21 z różną wydajnością. W 25-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu, w 25 mM Mg^{2+} po 15 h reakcji miR21rz3 hydrolizuje pre-miR-21 na poziomie 12.5 % - prawie 5.5-krotnie wyższym niż miR21rz1. Rybozym miR21rz2 w żadnych z zastosowanych warunków *in vitro* nie wykazuje aktywności hydrolitycznej względem pre-miR-21 (Rysunek 4.13 (A, B)). Wydajność hydrolizy pre-miR-21 przez miR21rz1 i miR21rz3 wzrasta wraz ze wzrostem stosunku rybozym:substrat. W 10 mM Mg^{2+} , przy 3-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu wydajność hydrolizy pre-miR-21 wynosi 2 % i 3 %, odpowiednio dla rybozymu miR21rz1 oraz miR21rz3, przy 50-krotnym nadmiarze rybozymu odpowiednio 9 % i 20 % (Rysunek 4.13 (C, D)). Aktywność zaprojektowanych rybozymów wzrasta wraz ze wzrostem stężenia jonów Mg^{2+} , w zakresie 0 – 25 mM. Hydroliza pre-miR-21 przez rybozym zachodzi wydajnie już w 1 mM Mg^{2+} (stężenie zbliżone do fizjologicznego), korzystniej w 5 mM i 10 mM, najkorzystniej w 25 mM Mg^{2+} (Rysunek 4.13 (A, B)).

Do zaistnienia hydrolizy nie wystarcza obecność jonów jednowartościowych (Na^+ , NH_4^+ , Li^+). Związki imitujące stłoczenie komórkowe, politlenki etylenu, polimery z grupy polieterów, o niskiej masie cząsteczkowej (200 oraz 400), hamują aktywność rybozymów, PEG3350 oraz MPD pozostają bez wpływu na wydajność reakcji (Rysunek 4.13 (H)). Ponadto, wykazałam, że warunki denaturacji, renaturacji oraz inicjacji reakcji nie wpływają istotnie na aktywność rybozymów oraz DNAzymów względem pre-miR-21 (Rysunek 4.13 (G)). Reakcje przebiegają ze zbliżoną efektywnością niezależnie od tego czy próba była denaturowana czy nie została poddana denaturacji, prędkości schładzania prób po denaturacji (0.5/2 °C/min) oraz momentu inicjacji reakcji (w 85 °C bądź po schłodzeniu do 37 °C) (Rysunek 4.13 (G)).

Dodatkowo na aktywność rybozymów nie wpływa istotnie pH na pH 5.5 lub na 8.0 oraz obniżenie jej temperatury do 25 °C.

Porównałam aktywność rybozymów miR21rz1 oraz miR21rz1_TLR, jego wydłużonego wariantu posiadającego przy końcu 5' motyw receptora dla czteronukleotydu pętli GAAA (TLR, ang. tetraloop receptor), który ma mu zapewnić wysoką aktywność katalityczną w niskich stężeniach Mg^{2+} (Rysunek 4.5). Aktywność miR21rz1_TLR, podobnie jak miR21rz1, względem pre-miR-21 jest zależna od stężenia jonów magnezu oraz stosunku rybozym:substrat. Wbrew oczekiwaniom rybozym zawierający TLR wykazuje nieco niższą aktywność niż wariant podstawowy rybozymu względem badanego RNA (Rysunek 4.15). Przykładowo, pre-miR-21 w reakcji z 50-krotnym nadmiarem rybozymu miR21rz1 względem substratu po 15 h inkubacji ulega hydrolizie na poziomie 3.3 i 5.3 % odpowiednio przy 5 i 10 mM Mg^{2+} , dla porównania w obecności miR21rz1_TLR w 1.1 i 3.5 % (Rysunek 4.15).

Następnie określiłam aktywność DNAzymów anty-miR-21 (miR21dz1, miR21dz2, miR21dz3, miR21dz4, miR21dz5) względem pre-miR-21. Aktywność DNAzymów miR21dz2 i miR21dz3 jest zbliżona i podobnie jak w przypadku rybozymów wzrasta wraz ze wzrostem stężenia jonów Mg^{2+} , w zakresie 0 – 10 mM. Hydroliza pre-miR-21 zachodzi już w 1 mM Mg^{2+} (stężenie zbliżone do fizjologicznego) na poziomie 4 %, korzystniej w 5 mM (~8 %), najkorzystniej w 10 mM Mg^{2+} , powyżej 20 % zarówno z udziałem miR21dz2 jak i miR21dz3 (Rysunek 4.13 (E, F)). W badanych warunkach miR21dz1, miR21dz4 i miR21dz5 nie wykazują aktywności hydrolitycznej względem pre-miR-21.



Rysunek 4.13

Hydrolyza pre-miR-21 z użyciem rybozymów oraz DNazymów anty-miR-21.

A i B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiający zależność hydrolyzy pre-miR-21 z udziałem rybozymów anty-miR-21 od stężenia Mg^{2+} . Reakcje prowadzono przy stałym stężeniu rybozymu (miR21rz1/miR21rz2/miR21rz3) (250 nM, 25-krotny nadmiar względem substratu) oraz różnych stężeniach Mg^{2+} (0, 1, 5, 10, 25 mM). Dla rybozymu miR21rz2 pokazano jedynie reakcję w 25 mM Mg^{2+} .

C i D. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiający zależność hydrolizy pre-miR-21 z udziałem rybozymów anty-miR-21 od ich stężenia. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu jonów Mg^{2+} (10 mM), różnych stężeniach rybozymów (miR21rz1/miR21rz2/miR21rz3) (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 nM).

E i F. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiający zależność hydrolizy pre-miR-21 z użyciem DNAzymów anty-miR-21 od stężenia Mg^{2+} . Reakcje prowadzono przy stałym stężeniu DNAzymów (250 nM, 25-krotny nadmiar względem substratu) w różnych stężeniach $MgCl_2$ (0, 1, 5, 10 mM).

G. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego przedstawiający zależność hydrolizy pre-miR-21 z udziałem rybozymu miR21rz1 oraz DNAzymu miR21dz3 od warunków denaturacji/renaturacji oraz inicjacji reakcji.

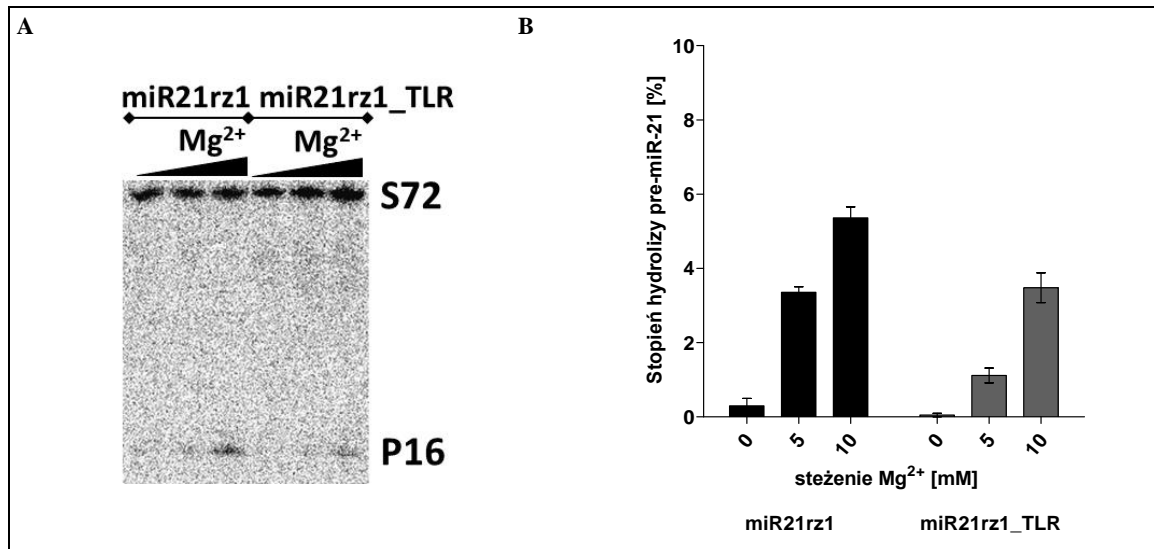
Reakcje prowadzono przez 15 h w 37 °C. 1 – pre-miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) oddzielnie, połączono po schłodzeniu do 37 °C, następnie suplementowano $MgCl_2$; 2 - pre-miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) łącznie, schłodzono do 37 °C, następnie suplementowano $MgCl_2$; 3 - pre-miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) oddzielnie w obecności Mg^{2+} , po schłodzeniu do 37 °C próby połączono i inkubowano dalej w 37 °C; 4 - pre-miR-21 oraz rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) łącznie w obecności $MgCl_2$, następnie schłodzono do 37 °C; 5 i 6 – próby niedenaturowane, suplementowane (5) bądź niesuplementowane (6) $MgCl_2$; 7 - pre-miR-21 oraz rybozym/DNAzym denaturowane (85 °C, 3 min) łącznie, niesuplementowane $MgCl_2$; 8 - pre-miR-21 (bez dodatku rybozym oraz DNAzymu) denaturowany (85 °C, 3 min), po schłodzeniu do 37 °C suplementowany $MgCl_2$.

H. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego przedstawiający zależność hydrolizy pre-miR-21 z udziałem rybozymu miR21rz3 od obecności różnych jonów jednowartościowych lub czynników imitujących stłoczenie wewnątrzkomórkowe.

Reakcje prowadzono w 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 (1-13), 10 mM $MgCl_2$ (2-8, 13), 10 mM NaCl (10), 10 mM NH_4Cl (11), 10 mM LiCl (12), 16 % PEG200 (3), 16 % PEG400 (4), 16 % PEG 3350 (5), 16 % PEG4000 (6), 40 mM spermina (7), 40 mM spermidyna (8), 5 % MPD, 20 mM kakodylan sodu, pH 5.5, 10 mM LiCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM heksaamina kobaltu (14), 5 % MPD, 20 mM kakodylan sodu, pH 5.5, 20 mM LiCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM heksaamina kobaltu (15), 5 % MPD, 20 mM kakodylan sodu, pH 5.5, 30 mM LiCl, 10 mM heksaamina kobaltu (16). Reakcje prowadzono w 25-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu.

A, C, H. Reakcje prowadzono przez 15 h w 37 °C. Przed reakcją próby denaturowano w 85 °C przez 3 min.

K - kontrola reakcji; L – OH ladder (50 mM NaOH, 10 mM EDTA, 95 °C, 2 min); T – hydroliza z użyciem RNazy T1 (20 mM CH_3COONa pH 4.5, 7 M mocznik, 1 mM EDTA, 0.025 u/ μ l RNaza T1, 55 °C, 20 min).



Rysunek 4.14

Porównanie aktywności rybozymów miR21rz1 oraz miR21rz1_TLR względem pre-miR-21

Autoradiogram 20 % żeli poliakrylamidowych (A) oraz wykres (B) przedstawiające zależność hydrolizy pre-miR-21 z udziałem rybozymu miR21rz1 oraz miR21rz1_TLR od stężenia Mg²⁺. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu pre-miR-21 (10 nM) oraz rybozymów (500 nM). Próby suplementowano różnymi stężeniami Mg²⁺ (0, 5, 10 mM), po czym inkubowano w 37 °C przez 15 h.

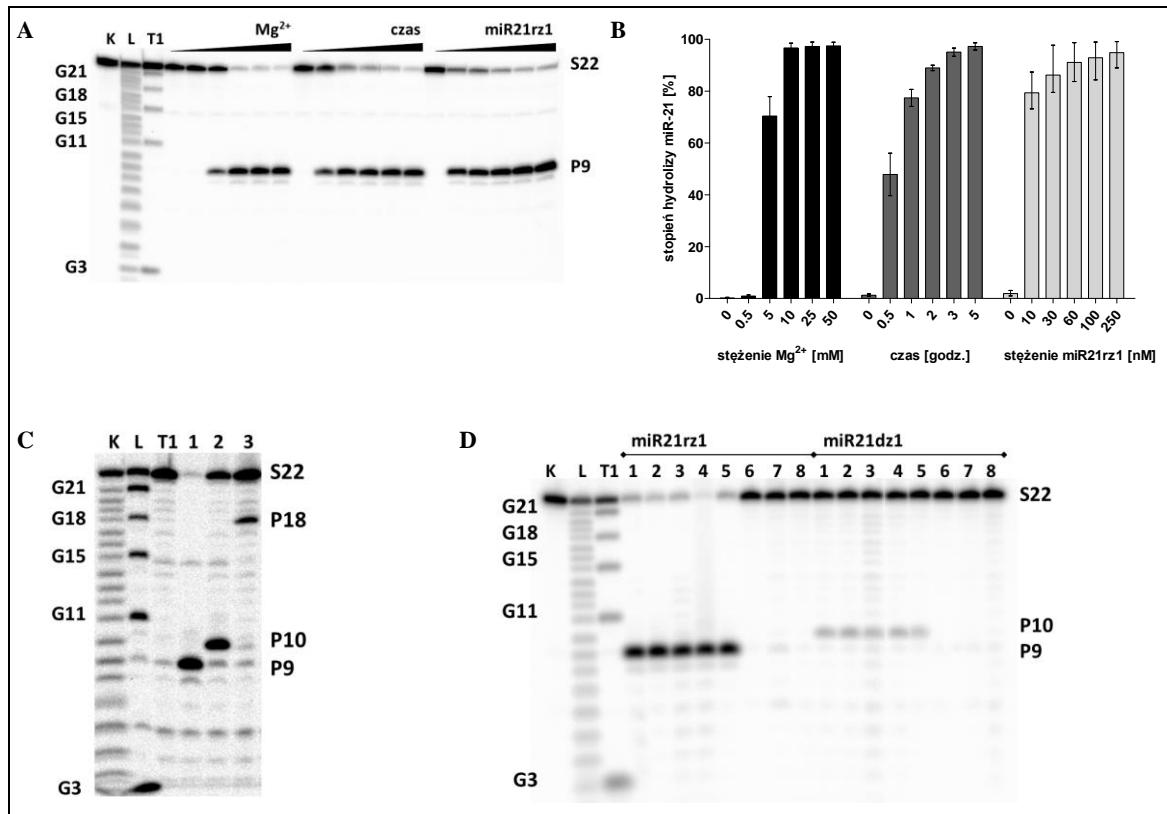
4.2.1.2. Aktywność względem miR-21 oraz 13-nt substratów

miR-21 oraz krótkie 13-nt substraty (pre-miR-21_S1, pre-miR-21_S2, pre-miR-21_S3) komplementarne do ramion rybozymów anti-miR-21 są bardziej podatne na hydrolizę z użyciem rybozymów oraz DNAzymów niż prekursor miRNA. W warunkach *in vitro* miR21rz1 wykazuje znacznie wyższą aktywność względem miR-21 niż względem jego 72-nt prekursora (pre-miR21). W 10-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu oraz 10 mM Mg²⁺ już po 30 min prawie 60 % miR-21 ulega hydrolizie, tymczasem w przypadku pre-miR-21 taki poziom hydrolizy nie jest osiągnięty nawet po 15 h inkubacji (Rysunek 4.13 (C, D) oraz 4.15 (A, C)). Wydłużenie czasu inkubacji do 1 i 2 h daje odpowiednio ~80 % i ponad 90 % zhydrolizowanego miR-21. Przy równym stężeniu (10 nM) miR21rz1 oraz miR-21, w 10 mM Mg²⁺, po 1 h wydajność hydrolizy sięga 80 %, w 3-krotnym nadmiarze rybozymu prawie 90 %. Dalsze zwiększanie ilości rybozymu jedynie nieznacznie zwiększa wydajność hydrolizy substratu. Ponadto hydroliza miR-21 z użyciem miR21rz1 zachodzi w niższych stężeniach Mg²⁺ niż ma to miejsce w przypadku pre-miR-21. W 10-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu, po 1 h w 5 mM Mg²⁺ 70 % miR-21 ulega hydrolizie, w 10 mM Mg²⁺ - ponad 90 % (Rysunek 4.15 (A, C)).

Hydroliza krótkiego 13-nt RNA (pre-miR-21_S1) w pełni komplementarnego do ramion rybozemu miR21rz1 przebiega znacznie wydajniej niż hydroliza pre-miR-21, a nawet miR-21. Podobnie jest w przypadku pre-miR-21_S2 i pre-miR-21_S3 w obecności komplementarnych do nich rybozymów. W 10-krotnym nadmiarze rybozemu względem substratu, w 10 mM Mg^{2+} już po 30 min obserwovałam hydrolizę pre-miR-21_S1, pre-miR-21_S2 oraz pre-miR-21_S3 odpowiednio przez miR21rz1, miR21rz2 oraz miR21rz3 na poziomie, odpowiednio 71, 69 i 74 %. Dodatkowo przy dziesięciokrotnym niższym stężeniu Mg^{2+} (1 mM) widać różnice w ich aktywności. W 10-krotnym nadmiarze rybozemu względem substratu, miR21rz3 hydrolizuje ponad 25 % pre-miR-21_S3, miR21rz1 ponad 5 % pre-miR-21_S1, miR21rz2 niemal 2.5 % pre-miR-21_S2.

Rybozym wydłużony o TLR, podobnie jak miR21rz1, wykazuje znacząco wyższą aktywność względem miR-21 oraz 13-nt RNA niż w stosunku do jego prekursora. Jednakże również w tych przypadkach zaobserwovałam, że wariant podstawowy rybozemu wykazuje wyższą aktywność niż rybozym wydłużony. Przykładowo w reakcji z 10-krotnym nadmiarem rybozemu miR21rz1 względem substratu po 1h inkubacji miR-21 ulega hydrolizie na poziomie 9.19, 22.42, 73.23, 93.96 % odpowiednio przy 0.5, 1, 5 i 10 mM Mg^{2+} . Dla porównania, w obecności miR21rz1_TLR odpowiednio w 1.81, 11.99, 27.8 i 43.78 % (Rysunek 4.16 (C, D)). W reakcji z 13-nt RNA, w 10:1, 1:1 oraz 1:10 stosunku substrat:rybozym, 10 mM Mg^{2+} , po 0.5 h pre-miR-21_S1 ulega hydrolizie na poziomie 1.48, 16.46, 70.69 % oraz 1.19, 8.62, 67.12 % odpowiednio z udziałem miR21rz1 oraz miR21rz1_TLR. Dodatkowo, w tych samych warunkach ale w 1 mM Mg^{2+} zaobserwowano, że hydroliza pre-miR-21_S1 z udziałem miR21rz1 jest wydajniejsza niż w obecności miR21rz1_TLR (Rysunek 4.17).

DNAzymy anty-miR-21 hydrolizują miR-21 z różną efektywnością (Rysunek 4.15). W 10-krotnym nadmiarze DNAzymu względem substratu oraz 10 mM Mg^{2+} po 1 h 60 % miR-21 ulega hydrolizie w obecności miR21dz1 oraz 15 % w obecności miR21dz2. Dla porównania rybozym miR21rz1 w tych samych warunkach hydrolizuje miR-21 z wydajnością przekraczającą 90 % (Rysunek 4.15).



Rysunek 4.15

Hydroliza miR-21 z użyciem rybozymu oraz DNAzymów anti-miR-21.

A i B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiające zależność hydrolizy miR-21 z udziałem rybozymu miR21rz1 od stężenia Mg^{2+} oraz stosunku rybozym:substrat. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu miR-21 (10 nM) w różnych stężeniach rybozymu lub $MgCl_2$.

1-6. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu rybozymu (100 nM). Próby suplementowano różnymi stężeniami Mg^{2+} (0, 0.5, 5, 10, 25, 50 mM), po czym dalej inkubowano w 37 °C przez 1 h.

7-12. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu rybozymu (100 nM) i Mg^{2+} (10 mM), przez 0.5, 1, 2, 3, 5 h.

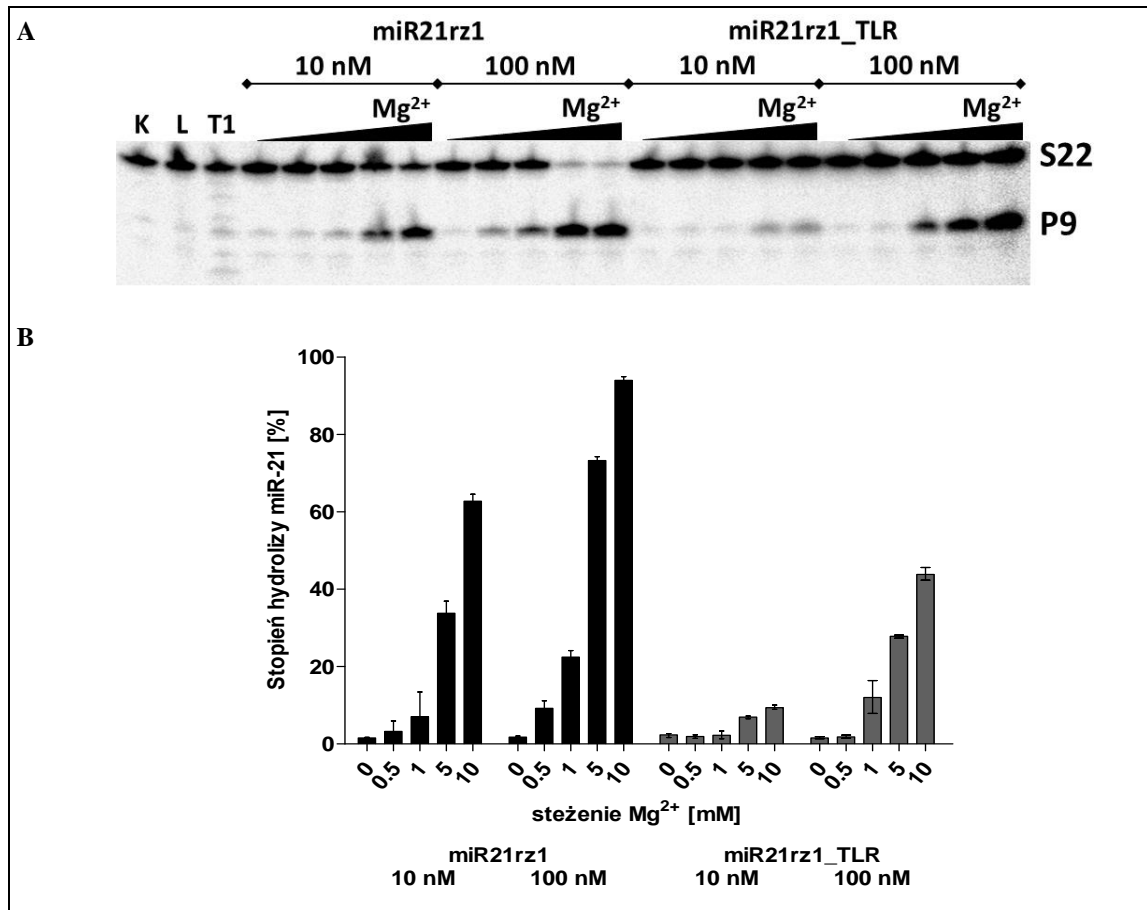
13-18. Reakcje prowadzono w różnych stężeniach rybozymu (0, 10, 30, 60, 100, 250 nM). Próby suplementowano 10 mM Mg^{2+} , po czym dalej inkubowano w 37 °C przez 1 h.

C. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego przedstawiający wydajność hydrolizy miR-21 z udziałem rybozymu miR21rz1 (1), miR21dz1 (2) oraz miR21dz2 (2). Reakcje prowadzono w stałym stężeniu miR-21 (10 nM) oraz miR21rz1/miR21dz1/miR21dz2 (100 nM) i $MgCl_2$ (10 mM) w 50 mM Tris-HCl pH 7.5 przez 1 h.

D. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego przedstawiający zależność hydrolizy miR-21 z udziałem rybozymu miR21rz1 oraz DNAzymu miR21dz1 od warunków denaturacji/renaturacji oraz inicjacji reakcji.

1 – miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) oddzielnie, połączono po schłodzeniu do 37 °C, następnie suplementowano $MgCl_2$; 2 – miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) łącznie, schłodzono do 37 °C, następnie suplementowano $MgCl_2$; 3 – miR-21 i rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) oddzielnie w obecności Mg^{2+} , po schłodzeniu do 37 °C próby połączono i inkubowano dalej w 37 °C; 4 – miR-21 oraz rybozym/DNAzym denaturowano (85 °C, 3 min) łącznie w obecności $MgCl_2$, następnie schłodzono do 37 °C; 5 i 6 – próby niedenaturowane, suplementowane (5) bądź niesuplementowane (6) $MgCl_2$; 7 – miR-21 oraz rybozym/DNAzym denaturowane (85 °C, 3 min) łącznie, niesuplementowane $MgCl_2$; 8 – miR-21 (bez dodatku rybozymu oraz DNAzymu) denaturowany (85 °C, 3 min), po schłodzeniu do 37 °C suplementowany $MgCl_2$

K - kontrola reakcji; L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych (50mM NaOH, 10mM EDTA, 95 °C, 2 min); T – hydroliza z użyciem RNazy T1 (20mM CH_3COONa pH 4.5, 7M mocznik, 1mM EDTA, 0.025 u/μl RNazy T1, 55 °C, 20 min).

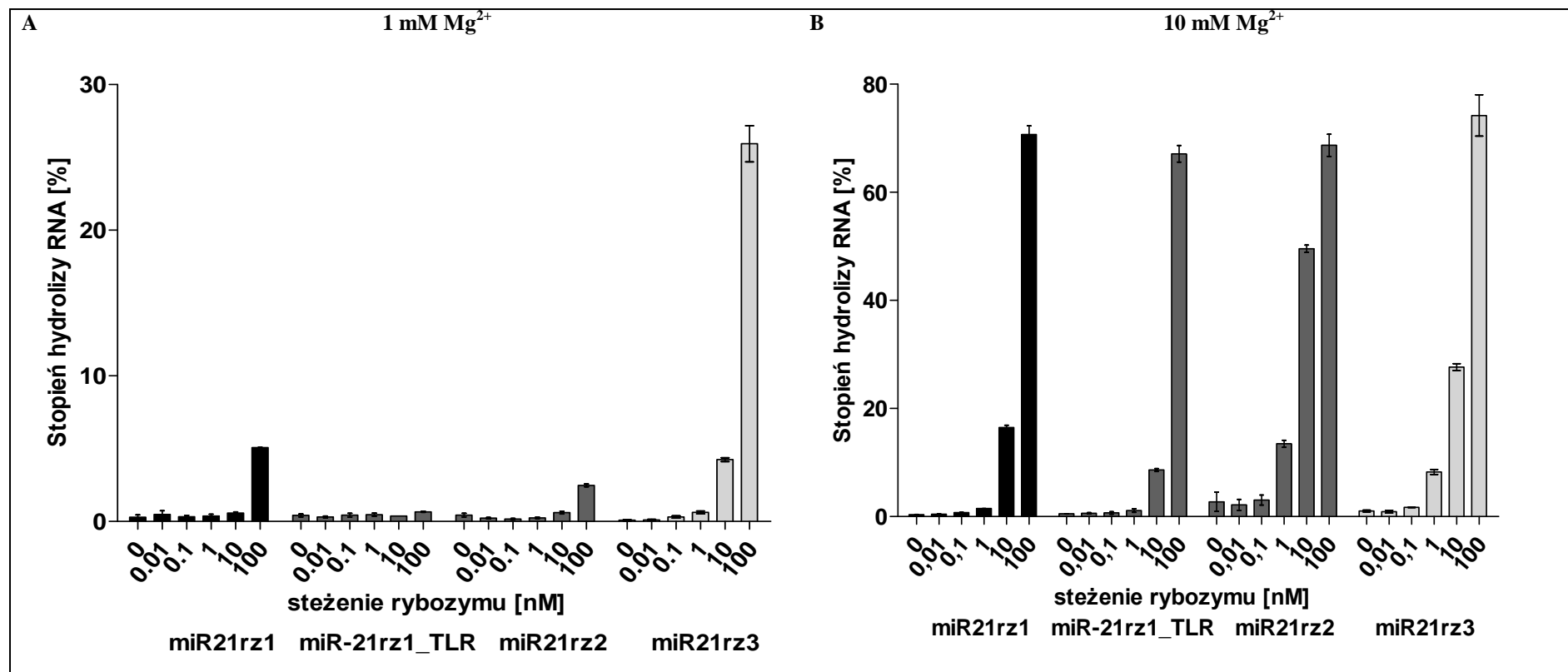


Rysunek 4.16

Porównanie aktywności rybozymów miR21rz1 oraz miR21rz1_TLR względem pre-miR-21

Autoradiogram 20 % żeli poliakrylamidowych (A) oraz wykres (B) przedstawiające zależność hydrolizy miR-21 z udziałem rybozymu miR21rz1 oraz miR21rz1_TLR od stężenia rybozymu oraz Mg²⁺. Reakcje prowadzono w stałym stężeniu miR-21 (10 nM), różnych stężeniach rybozymów (10 nM oraz 100 nM) i Mg²⁺ (0.5, 1, 5, 10 mM), w 37 °C przez 1 h.

K - kontrola reakcji; L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych (50mM NaOH, 10mM EDTA, 95 °C, 2 min); T1 – hydroliza z użyciem RNazy T1 (20mM CH₃COONa pH 4.5, 7M mocznik, 1mM EDTA, 0.025 u/μl RNazy T1, 55 °C, 20 min).



Rysunek 4.17

Porównanie aktywności miR21rz1, miR21rz1_TLR względem pre-miR21_S1 oraz miR21rz2 i miR21rz3 odpowiednio względem pre-miR21_S2 i pre-miR21_S3, w 1 mM (A) oraz 10 mM (B) Mg²⁺.

Reakcje prowadzono w stałym stężeniu (10 nM) pre-miR-21_S1, pre-miR-21_S2 oraz pre-miR-21_S3, w 1 oraz 10 mM Mg²⁺ oraz różnych stężeniach (0.01, 0.1, 1, 10, 100 nM) rybozymów, odpowiednio miR21rz1 oraz miR21rz1_TLR w obecności pre-miR-21_S1, miR21rz2 i miR21rz3 odpowiednio dla pre-miR-21_S2 oraz pre-miR-21_S3.

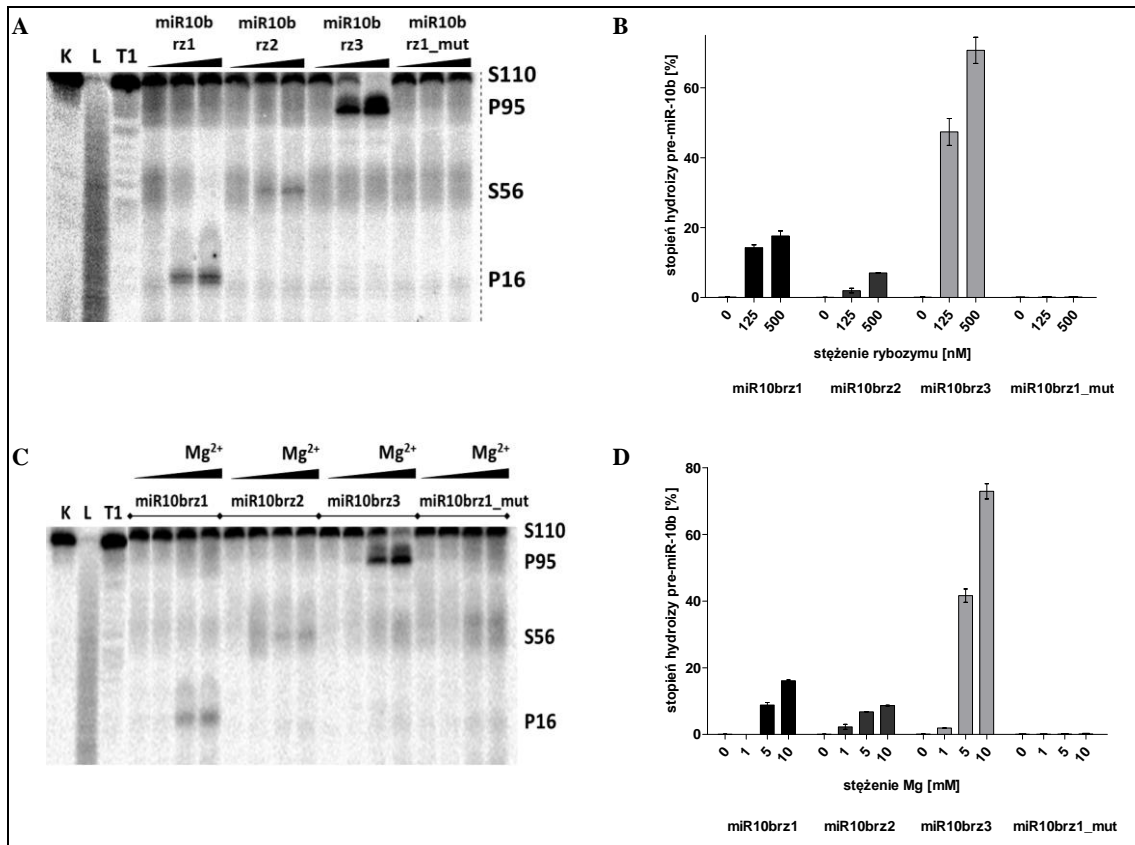
4.2.2. Rybozomy typu hammerhead oraz DNAzomy anty-miR-10b

4.2.2.1. Aktywność względem pre-miR-10b

Zaprojektowane przez mnie rybozomy typu hammerhead oraz DNAzomy anty-miR-10b w reakcji *in vitro* wykazują specyficzność względem substratu. Rybozym zmutowany w obrębie rdzenia katalitycznego (miR10brz1_mut) nie hydrolizuje pre-miR-10b ani miR-10b.

Rybozomy hydrolizują pre-miR-10b z różną wydajnością. Najaktywniejszy jest miR10brz3, kolejno miR10brz1 oraz miR10brz2 (Rysunek 4.18). Wydajność hydrolizy RNA z użyciem zaprojektowanych narzędzi zależy od stosunku rybozym:substrat. W 12.5- oraz 50-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu, w 10 mM Mg²⁺ po 15 h obserwowałam hydrolizę pre-miR-10b na poziomie 14.3 i 17.6 %, 2 i 6 % oraz 47.4 i 70.7 % odpowiednio w reakcji z miR10brz1, miR10brz2 oraz miR10brz3 (Rysunek 4.18 (A, B)). Aktywność rybozymów wzrasta wraz ze stężeniem jonów Mg²⁺. Hydroliza pre-miR-10b zachodzi już w 1 mM Mg²⁺ (stężenie zbliżone do fizjologicznego) na poziomie ~ 2 % w przypadku miR10brz2 i miR10brz3. W wyższych stężeniach jonów magnezu, 5 i 10 mM, obserwowałam hydrolizę pre-miR-10b na poziomie 8.8 % i 16.1 %, 6.8 % i 8.6 % oraz 41.6 % i 72.9 % odpowiednio w obecności miR10brz1, miR10brz2 oraz miR10brz3. Rybozym zmutowany nie wykazuje aktywności w żadnym z przetestowanych warunków (Rysunek 4.18 (C, D)).

Przetestowałam również aktywność DNAzymów względem pre-miR-10b. Reakcję prowadziłam w warunkach identycznych do reakcji z użyciem DNAzymów anty-miR-21. Żaden z zaprojektowanych DNAzymów nie hydrolizuje pre-miR-10b w badanych warunkach. Nie udało się otrzymać specyficznych produktów hydrolizy nawet w 100-krotnym nadmiarze DNAzymu względem substratu oraz 25 mM Mg²⁺. Aktywność zaprojektowanych narzędzi (miR10bdz1 i miR10bdz2) potwierdzono natomiast w reakcji z dojrzałym miR-10b. Postuluję, że brak hydrolizy pre-miR-10b z udziałem DNAzymów może wynikać ze struktury tego RNA.



Rysunek 4.18

Hydroliza pre-miR-10b z użyciem rybozymów typu hammerhead anty-miR-10b.

A, B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiające zależność hydrolizy pre-miR-10b z udziałem rybozymów anty-miR-10b od stężenia rybozymów. Reakcje prowadzono w 10 nM pre-miR-10b, w różnych stężeniach rybozymów (0, 125, 500 nM), w 10 mM MgCl₂.

C, D. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiające zależność hydrolizy pre-miR-10b z udziałem rybozymów anty-miR-10b od stężenia Mg²⁺. Reakcje prowadzono w 50-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu, w 0, 1, 5, 10 mM Mg²⁺.

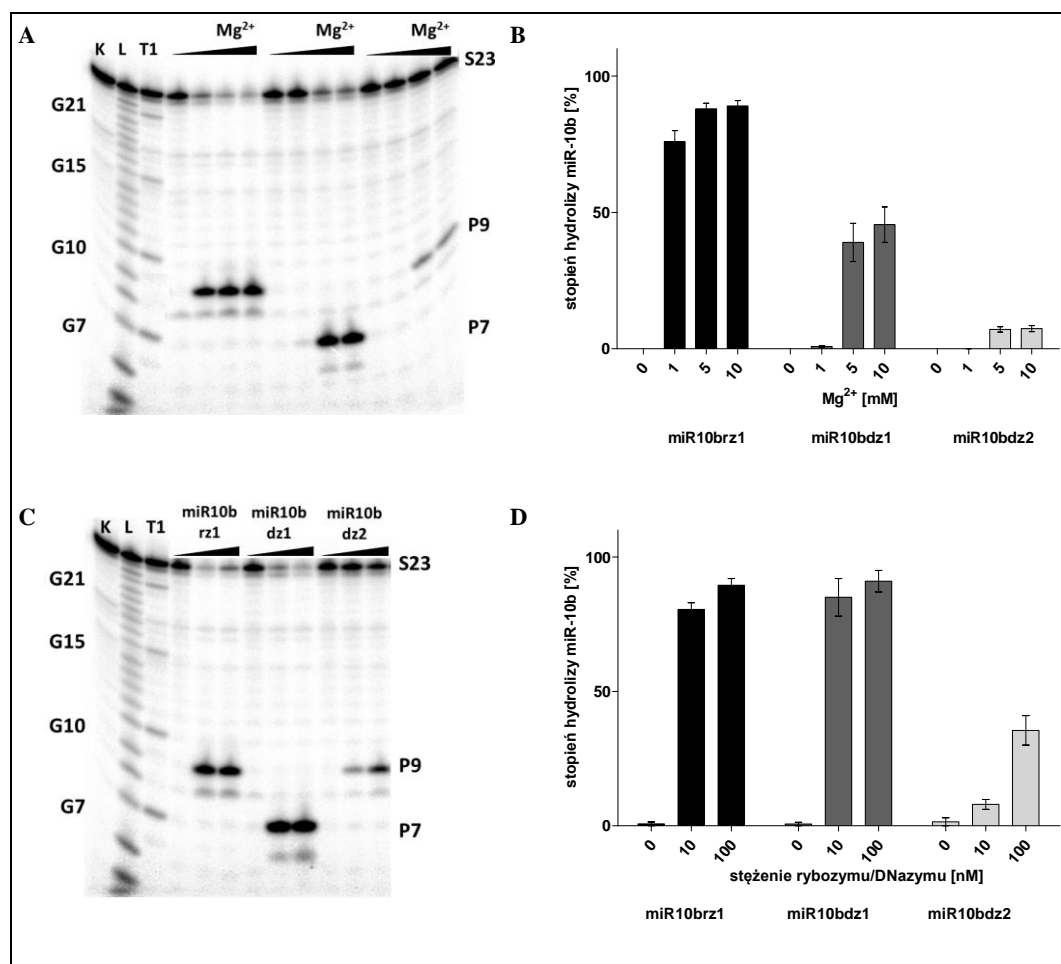
A-D. Reakcje prowadzono przez 15h w 37 °C. Przed reakcją próby denaturowano w 85 °C przez 3 min.

K – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych (50 mM NaOH, 10 mM EDTA, 95 °C, 2 min), T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 w warunkach denaturujących (20 mM CH₃COONa pH 4.5, 7 M mocznik, 1 mM EDTA, 0.025 u/μl RNazy T1, 55 °C, 20 min). Wskazano wzrastające stężenia Mg²⁺ (groty) oraz produkty hydrolizy indukowanej przez DNazy (po prawej stronie autoradiogramu) oraz RNazę T1 w warunkach denaturujących (po lewej stronie autoradiogramu).

4.2.2.2. Aktywność względem miR-10b

Wszystkie zaprojektowane rybozomy typu hammerhead oraz DNazy anty-miR-10b, których ramiona są komplementarne do dojrzałego miR-10b, tj. miR10brz1, miR10bdz1 oraz miR10bdz2 wydajnie go hydrolizują. Ich aktywność zależy zarówno od stosunku rybozym/DNAzym:substrat jak również stężenia jonów magnezu w mieszaninie reakcyjnej (Rysunek 4.19). Najwyższą aktywność wykazuje rybozym miR10brz1, następnie miR10bdz1, najniższą miR10bdz2. W 10-krotnym nadmiarze rybozymu

względem substratu, w 1, 5, 10 mM Mg^{2+} wydajność hydrolizy miR-10b wynosi odpowiednio dla miR10brz1: 76, 88 i 89 %, dla DNAzymów miR10bdz1: 0.9, 39 i 45.5 %, dla miR10bdz2: 0.2, 7.1 i 7.4 % (Rysunek 4.19 (A, B)). Obserwowałam wysoką aktywność (76 % zhydrolizowanego RNA) zaprojektowanych katalitycznych kwasów nukleinowych względem miR-10b, w szczególności rybozemu miR10brz1 w zbliżonym do komórkowego stężeniu Mg^{2+} (1 mM). Dodatkowo miR10brz1 oraz miR10bdz1 wykazują znaczącą aktywność już w równomolowych ilościach substratu i rybozemu. Po godzinnej inkubacji obserwowałam hydrolizę z miR-10b na poziomie 80.5 % i 85 % odpowiednio w obecności rybozemu i DNAzymu (Rysunek 4.19 (C, D)).



Rysunek 4.19

Hydroliza miR-10b z użyciem rybozymów typu hammerhead oraz DNAzymów anty-miR-10b.

A, B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiające zależność hydrolizy miR-10b z udziałem rybozymów oraz DNAzymów anty-miR-10b od stężenia Mg^{2+} . Reakcje prowadzono w 10-krotnym nadmiarze rybozemu względem substratu, w 0, 1, 5, 10 mM Mg^{2+} .

C, D. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiające zależność hydrolizy miR-10b z udziałem rybozymów oraz DNAzymów anty-miR-10b od stężenia rybozymów. Reakcje prowadzono w różnych stężeniach (0, 10, 100 nM) rybozymów lub DNAzymów, w 10 mM $MgCl_2$.

A-D. Reakcje prowadzono przez 1h w 37 °C. Przed reakcją próby denaturowano w 85 °C przez 3 min.

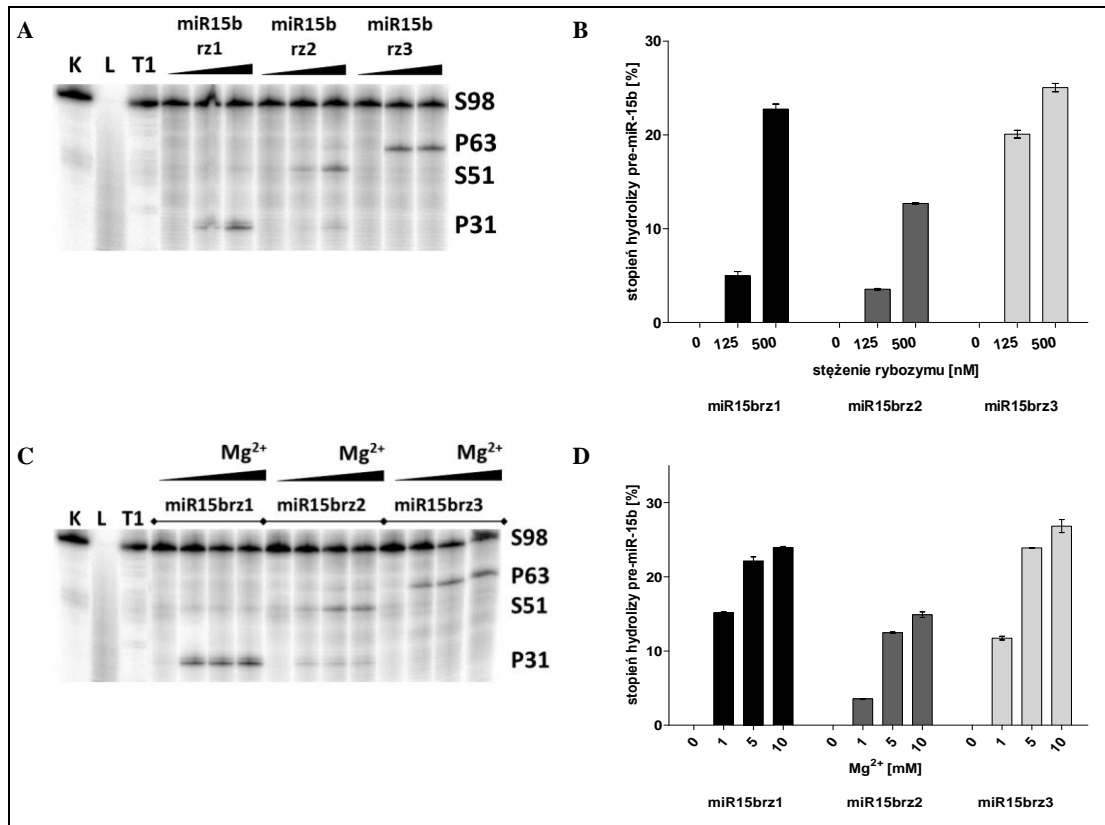
K – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych (50 mM NaOH, 10 mM EDTA, 95 °C, 2 min), T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 w warunkach denaturujących (20 mM CH₃COONa pH 4.5, 7 M mocznik, 1 mM EDTA, 0.025 u/μl RNaza T1, 55 °C, 20 min). Wskazano wzrastające stężenia Mg²⁺ (groty) oraz produkty hydrolizy indukowanej przez rybozomy lub DNazy (po prawej stronie autoradiogramu) oraz RNazę T1 w warunkach denaturujących (po lewej stronie autoradiogramu).

4.2.3. Rybozomy typu hammerhead oraz DNazy anty-miR-15b

4.2.3.1. Aktywność względem pre-miR-15b

Zaprojektowane rybozomy typu hammerhead oraz DNazy anty-miR-15b w reakcji *in vitro* wykazują specyficzność względem substratu. Wszystkie cechuje zbliżona aktywność, przy czym najaktywniejszy jest miR-15brz3, następnie miR15brz1, nieznacznie mniej aktywny miR15brz2 (Rysunek 4.20). Ich aktywność zależy od stosunku rybozym:substrat oraz od stężenia Mg²⁺. W 12.5- oraz 50-krotnym nadmiarze rybozomu względem substratu, w 10 mM Mg²⁺ po 15 h reakcji miR15brz1, miR15brz2 oraz miR15brz3 hydrolizują pre-miR-15b z wydajnością wynoszącą odpowiednio: 5 i 23.1 %, 3.5 i 12.7 % oraz 20.1 i 25.6 % (Rysunek 4.20 (A, B)). W 50-krotnym nadmiarze rybozomu względem substratu, hydrolizują one pre-miR-15b już w fizjologicznym stężeniu magnezu na poziomie 3.6 % (miR15brz2), 11.7 % (miR15brz3) a nawet ponad 15 % (miR15brz1). W wyższych stężeniach Mg²⁺, 5 i 10 mM, obserwowałam hydrolizę pre-miR-15b na poziomie 22.2 i 24.3 %, 12.5 i 14.9 % oraz 23.9 i 26.2 % odpowiednio w obecności miR15brz1, miR15brz2 oraz miR15brz3 (Rysunek 4.20 (C, D)).

DNazy anty-miR-15b (również wydłużone warianty), podobnie jak DNazy anty-miR-10b, nie wykazują aktywności względem pre-miRNA, nawet w 100-krotnym nadmiarze DNazy względem substratu oraz 25 mM Mg²⁺. Postuluję, że może to wynikać ze struktury pre-miR-15b.



Rysunek 4.20

Hydroliza pre-miR-15b z użyciem rybozymów typu hammerhead anty-miR-15b.

A, B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiające zależność hydrolizy pre-miR-15b z udziałem rybozymów anty-miR-10b od stężenia rybozymów. Reakcje prowadzono w 10 nM pre-miR-15b, w różnych stężeniach rybozymów (0, 125, 500 nM), w 10 mM $MgCl_2$.

C, D. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego oraz wykres przedstawiające zależność hydrolizy pre-miR-15b z udziałem rybozymów anty-miR-15b od stężenia Mg^{2+} . Reakcje prowadzono w 50-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu, w 0, 1, 5, 10 mM Mg^{2+} .

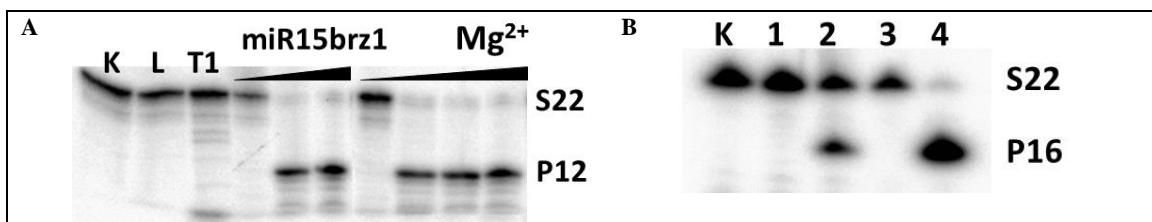
A-D. Reakcje prowadzono przez 15 h w 37 °C. Przed reakcją próby denaturowano w 85 °C przez 3 min.

K – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych (50 mM NaOH, 10 mM EDTA, 95 °C, 2 min), T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 w warunkach denaturujących (20 mM CH_3COONa pH 4.5, 7 M mocznik, 1 mM EDTA, 0.025 u/μl RNaza T1, 55 °C, 20 min). Wskazano wzrastające stężenia Mg^{2+} (groty) oraz produkty hydrolizy indukowanej przez DNAzymy (po prawej stronie autoradiogramu) oraz RNazę T1 w warunkach denaturujących (po lewej stronie autoradiogramu).

4.2.3.2. Aktywność względem miR-15b

W równomolowym stężeniu miR15brz1 oraz miR-15b, w 10 mM Mg^{2+} obserwowałam hydrolizę miR-15b na poziomie przekraczającym 90 %. Rybozym hydrolizuje niemal w 100 % miR-15b już w 1 mM Mg^{2+} przy 10-krotnym nadmiarze rybozymu względem substratu (Rysunek 4.21 (A)).

Spośród zaprojektowanych DNAzymów anty-miR-15b jedynie miR15bdz5, miR15bdz6 i ich wydłużone warianty (miR15bdz5+, miR15bdz6+) wykazują komplementarność do miR-15b. DNAzomy miR15bdz6 oraz miR15bdz6+ wykazują aktywność hydrolityczną względem miR-15b. miR15bdz5 i miR15bdz5+ nie hydrolizują miR-15b nawet przy 100-krotnym nadmiarze DNAzemu względem substratu oraz 25 mM Mg^{2+} . Wydłużenie ramion DNAzemu miR15bdz5 nie przyniosło pożądanych rezultatów, nie uzyskano hydrolizy miR-15b. Odmienne, wydłużenie ramienia 5' DNAzemu miR15bdz6 znacząco zwiększa wydajność hydrolizy miR-15b (Rysunek 4.21 (B)). Pomimo, że miR15bdz6 i miR15bdz6+ wydajnie hydrolizują miR-15b nie hydrolizują one pre-miR-15b, co może wynikać ze struktury pre-miR-15b. Ramiona znajdujące się na końcach 3' DNAzymów miR15bdz5 oraz miR15bdz5+ wykazują komplementarność z miR-15b jedynie na długości 4 nukleotydów. Postuluję, że uniemożliwia to efektywne rozpoznawanie substratu przez DNAzomy, a w efekcie brak hydrolizy miR-15b.



Rysunek 4.21

Hydroliza miR-15b z użyciem rybozymów typu hammerhead oraz DNAzymów anty-miR-15b.

A. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego przedstawiający zależność hydrolizy miR-15b z udziałem miR15brz1 (i) od stężenia rybozemu (0, 10, 100 nM) przy stałym stężeniu miR-15b (10 nM) oraz Mg^{2+} (10 mM) oraz (ii) od stężenia Mg^{2+} (0, 1, 5, 10 mM) przy stałym stężeniu miR-15b (10 nM) oraz rybozemu (100 nM).

Reakcje prowadzono przez 1 h w 37 °C. Przed reakcją próby denaturowano w 85 °C przez 3 min, K – kontrola reakcji, L - alkaliczna hydroliza w warunkach kontrolowanych (50 mM NaOH, 10 mM EDTA, 95 °C, 2 min), T1 - ograniczona hydroliza z udziałem RNazy T1 w warunkach denaturujących (20 mM CH_3COONa pH 4.5, 7 M mocznik, 1 mM EDTA, 0.025 u/ μ l RNaza T1, 55 °C, 20 min).

B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego przedstawiający zależność hydrolizy miR-15b z udziałem DNAzymów miR15bdz5 (1), miR15bdz6 (2) oraz ich wydłużonych form miR15bdz5+ (3) oraz miR15bdz6+ (4).

Reakcje prowadzono w 10 nM miR-15b oraz 100 nM DNAzymach, w 10 mM Mg^{2+} przez 1 h w 37 °C. K – kontrola reakcji (bez DNAzemu).

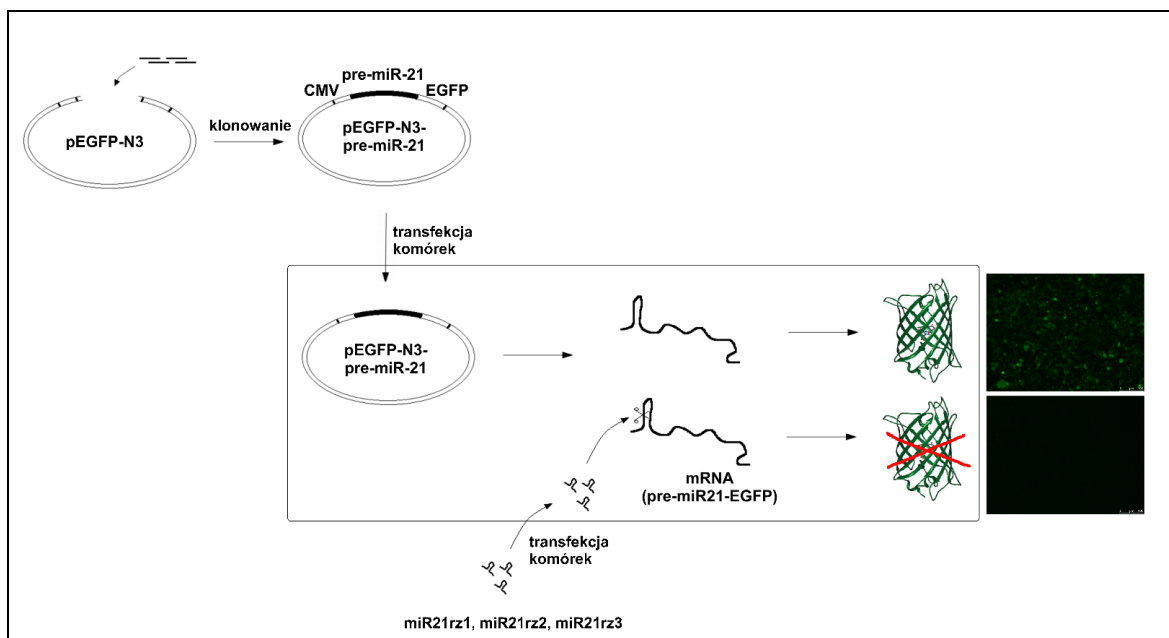
Wskazano wzrastające stężenia Mg^{2+} (groty) oraz produkty hydrolizy indukowanej przez rybozomy lub DNAzomy (po prawej stronie autoradiogramu).

4.3. Aktywność rybozymów oraz DNAzymów w liniach komórkowych

4.3.1. Aktywność rybozymów w liniach komórkowych z wykorzystaniem układu reporterowego opartego na białku zielonej fluorescencji

4.3.1.1. Projektowanie modelu do określania aktywności rybozymów

Wydajność hydrolizy pre-miR-21 z użyciem rybozymów, w liniach komórkowych, oceniałam wykorzystując system reporterowy oparty na białku zielonej fluorescencji (GFP). Do wektora pEGFP-N3 (BD Biosciences Clontech), pod promotorem cytomegalowirusa (CMV), w ramce odczytu dla białka EGFP wklonowano sekwencję kodującą pre-miR-21. Linie komórkowe transfekowano równocześnie plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR-21 oraz poszczególnymi rybozymami. Po 24 h od momentu transfekcji na podstawie pomiaru fluorescencji oraz poziomu białka EGFP oceniałam stopień hydrolizy transkryptu zawierającego sekwencję pre-miR-21 oraz mRNA białka EGFP. Hydroliza mRNA w obrębie sekwencji pre-miR-21 uniemożliwia syntezę białka EGFP. Obniżony poziom tego białka oraz spadek fluorescencji w komórkach traktowanych rybozymem w stosunku do kontroli bez rybozymu odzwierciedla aktywność użytego rybozymu (Rysunek 4.22).

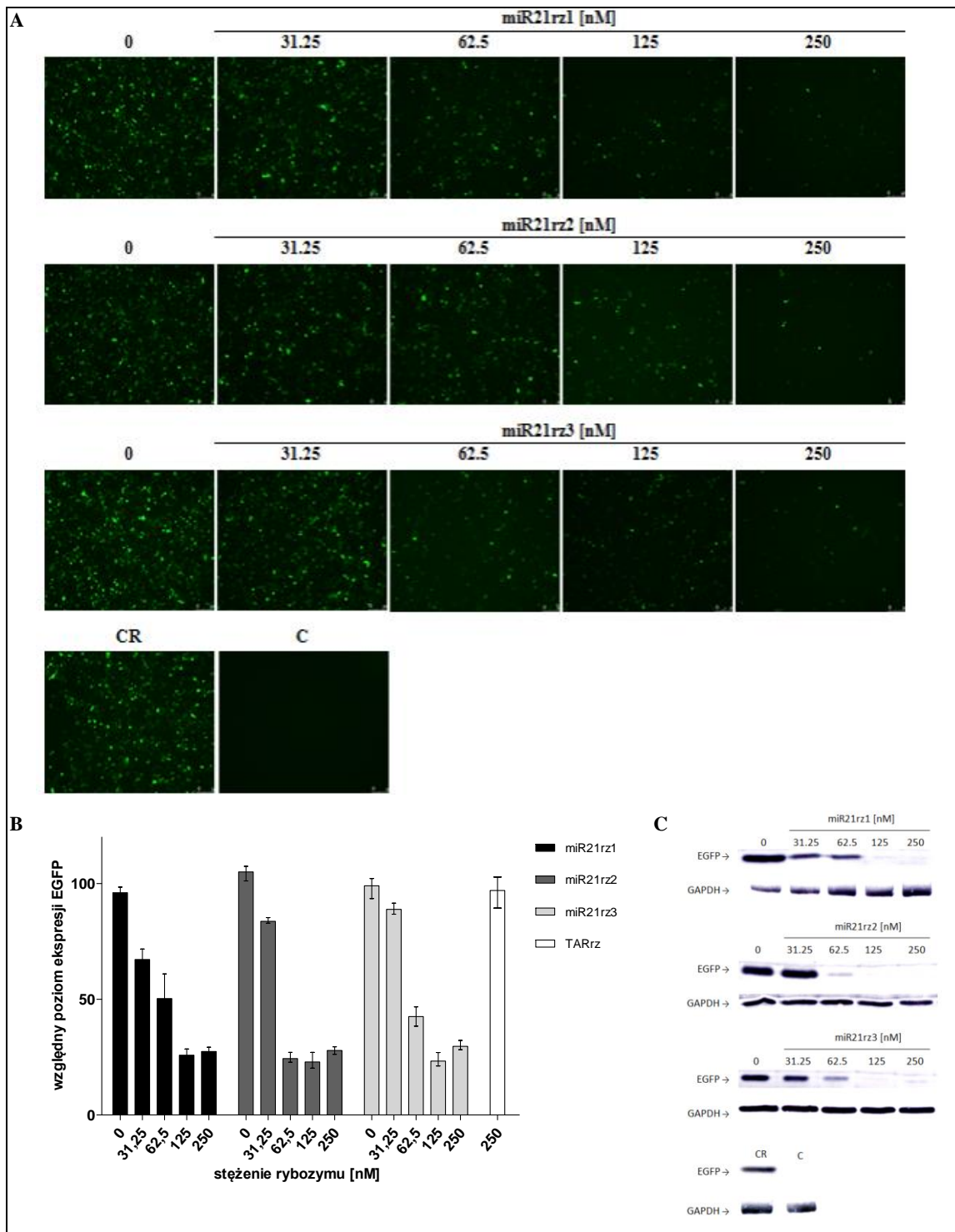


Rysunek 4.22

Schemat przygotowania oraz funkcjonowania układu opartego na białku GFP użytego do pomiaru aktywności rybozymów anty-miR-21.

4.3.1.2. Wpływ rybozymów na poziom białka zielonej fluorescencji

Wszystkie zastosowane rybozimy (miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3) wykazują zbliżoną aktywność w liniach komórkowych, przy czym w linii T98G jest ona nieznacznie wyższa (Rysunek 4.24), w porównaniu z linią HeLa (Rysunek 4.23). Nie wynika to z różnic w podatności tych linii na transfekcję, gdyż wydajność transfekcji obu tych linii z użyciem znakowanego fluorescencyjnie dsRNA jest zbliżona (~45 %), z niewielką (2 %) przewagą na korzyść komórek T98G (Rysunek 4.25). Najwyższą aktywność wykazuje miR21rz2, $IC_{50} = 91.2$ nM oraz 53 nM, odpowiednio w liniach T98G i HeLa (Tabela 4.2). W badanych warunkach maksymalny stopień wyciszenia ekspresji EGFP jest zbliżony dla wszystkich rybozymów, wynosi 76 % oraz 69 %, odpowiednio w linii HeLa i T98G. Postuluję, że różnice w aktywności rybozymów w różnych liniach mogą wynikać z różnego poziomu endogennej puli miR-21 oraz pre-miR-21 w tych liniach. pre-miR-21 oraz miR-21 jest wyższe w linii T98G niż w komórkach HeLa. Niewątpliwie część z dostarczonych do komórek rybozymów zaangażowana jest w hydrolizę endogennych pre-miR-21 oraz miR-21. Przy wysokim endogennym poziomie miR-21 oraz pre-miR-21 spadek fluorescencji oraz poziomu białka EGFP nie odzwierciedla w pełni stopnia hydrolizy pre-miR-21 w komórkach, a jedynie stopień hydrolizy transkryptów zawierających sekwencję pre-miR-21 skoniugowaną z mRNA białka EGFP.



Rysunek 4.23

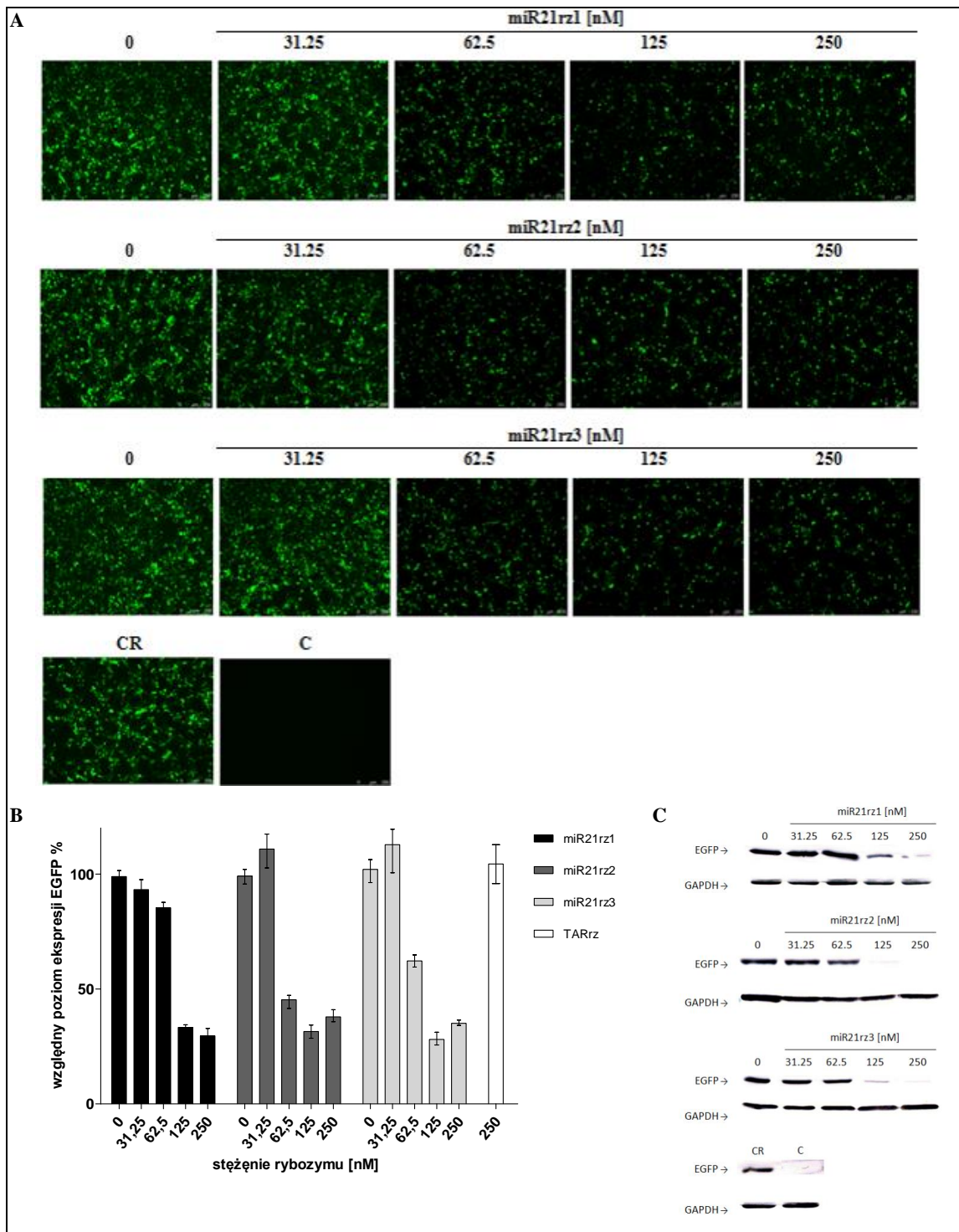
Wpływ rybozymów anti-miR-21 na stopień hydrolizy pre-miR-21 w systemie reporterowym opartym na białku EGFP, w linii komórkowej HeLa.

A. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego Leica komórek linii HeLa po 24 h od transfekcji plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR-21 oraz różnymi stężeniami rybozymów.

B. Diagram obrazujący zależność poziomu fluorescencji białka EGFP od stężenia poszczególnych rybozymów. Pomiary fluorescencji wykonano z użyciem Multi-mode Microplate Reader BioTek Synergy2.

C. Analiza Western blot wskazująca zależność ekspresji białka EGFP od stężenia i rodzaju zastosowanego rybozymu.

C – kontrola (komórki traktowane jedynie Lipofektaminą 2000), CR – rybozym kontrolny (TARrz).



Rysunek 4.24

Wpływ rybozymów anti-miR-21 na stopień hydrolizy pre-miR-21 w systemie reporterowym opartym na białku EGFP, w linii komórkowej T98G.

A. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego Leica komórek linii HeLa po 24 h od transfekcji plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR-21 oraz różnymi stężeniami rybozymów.

B. Diagram obrazujący zależność poziomu fluorescencji białka EGFP od stężenia poszczególnych rybozymów. Pomiary fluorescencji wykonano z użyciem Multi-mode Microplate Reader BioTek Synergy2.

C. Analiza Western blot wskazująca zależność ekspresji białka EGFP od stężenia i rodzaju zastosowanego rybozymu.

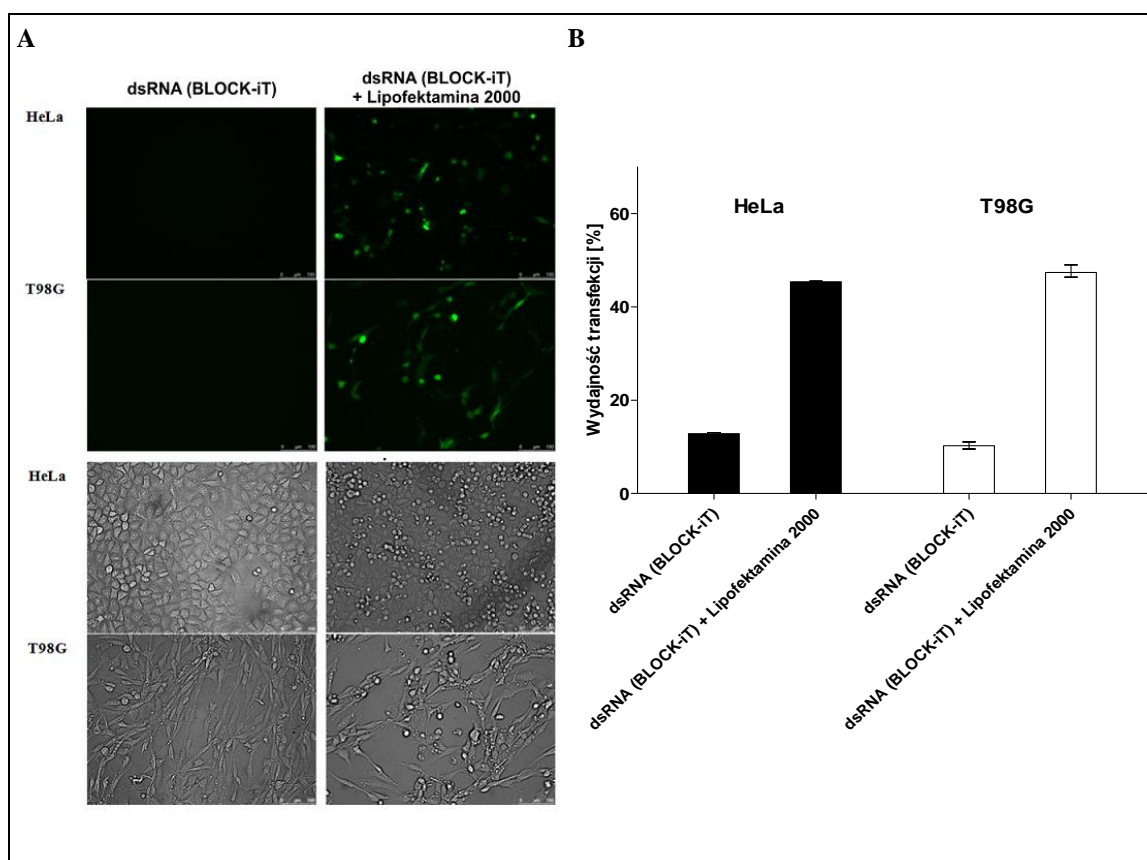
C – kontrola (komórki traktowane jedynie Lipofektaminą 2000, CR – rybozym kontrolny (TARrz).

Tabela 4.2

Wartości IC_{50} dla rybozymów miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 w liniach T98G oraz HeLa.

Wartości otrzymano na podstawie pomiaru fluorescencji komórek po 24 h od transfekcji plazmidem pEGFP-N3 zawierającym sekwencję kodującą pre-miR-21. Kalkulację IC_{50} oraz obliczenia statystyczne wykonano w programie GraphPrism.

	miR21rz1	miR21rz2	miR21rz3
IC_{50} (T98G)	115.5 nM	91.2 nM	99.2 nM
IC_{50} (HeLa)	60.2 nM	53.0 nM	69.2 nM

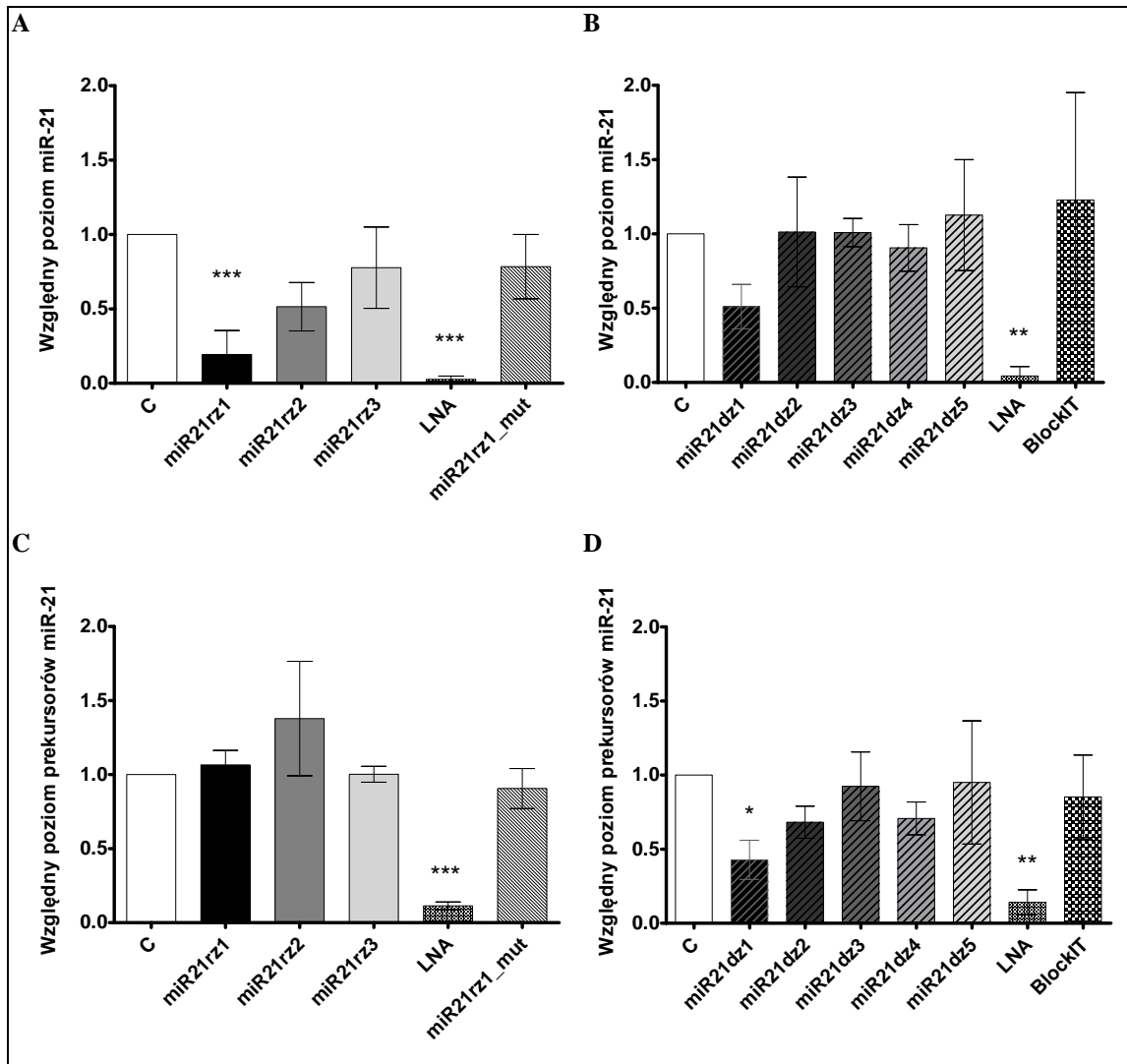
**Rysunek 4.25**

Porównanie wydajności transfekcji komórek linii HeLa oraz T98G z użyciem znakowanego fluorescencyjnie dsRNA.

4.3.1. Wpływ rybozymów oraz DNAzymów na endogenną pulę miR-21 oraz jego prekursorów

Wpływ rybozymów oraz DNAzymów na poziom endogennej puli miR-21 oraz jego prekursorów przedstawiono na (Rysunek 4.26). Poziom miR-21 jest znacząco niższy, o ponad 80, 50 oraz 23 %, w komórkach transfekowanych odpowiednio miR21rz1, miR21rz2 oraz miR21rz3 w porównaniu z komórkami traktowanymi jedynie Lipofektaminą. Rybozym zmutowany w obrębie rdzenia katalitycznego (miR21rz1_mut, kontrola negatywna) obniża poziom miR-21 o 20 %. Poziom miR-21 ulega obniżeniu o prawie 50 % względem kontroli po zastosowaniu miR21dz1. Pozostałe DNAzyny nie wywierają istotnego wpływu na stężenie miRNA (Rysunek 4.26 (A, B)). Poziom prekursorów miR-21 pozostaje niemal niezmienny w komórkach traktowanych rybozymami anti-miR-21, a ulega obniżeniu po zastosowaniu jedynie dwóch DNAzymów miR21dz1 i miR21dz2 odpowiednio o 57 i 32 % (Rysunek 4.26 (C, D)). Postuluję, że cząsteczka miR-21 ze względu na to, że tworzy mniej stabilną strukturę niż pre- i pri-miR-21 jest łatwiejszym celem działania katalitycznych kwasów nukleinowych.

miR21rz1 najskuteczniej spośród zaprojektowanych rybozymów, miR21dz1 spośród DNAzymów obniżają poziom miR-21 w komórkach. W przypadku miR21dz1 uzyskany poziom wyciszenia miR-21 jest sumarycznym efektem działania DNAzymu na poziomie zarówno miR-21 jak i jego prekursorów. Obrazuje to przewagę narzędzi anti-miRNA, które działają zarówno na poziomie dojrzałych miRNA i ich prekursorów nad tymi, które hydrolizują jedynie pri- i/lub pre-miRNA.



Rysunek 4.26

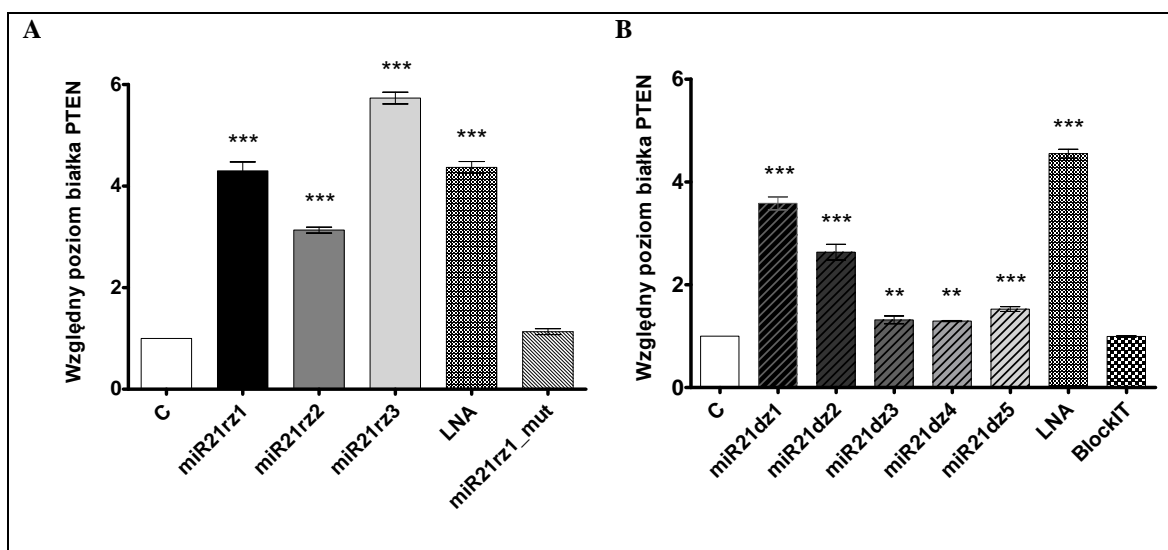
Wpływ rybozymów (A, C) oraz DNAzymów (B, D) anti-miR-21 na endogenną pulę miR-21 (A, B) oraz ich prekursorów (C, D) w komórkach T98G.

Komórki transfekowano rybozymami, DNAzymami oraz oligonukleotydem znakowanym fluorescencyjnie w stężeniu 100 nM oraz antysensowym LNA (kontrola pozytywna) w stężeniu 50 nM. Komórki traktowane jedynie Lipofektaminą 2000 przyjęto jako kontrolę (C). Wpływ katalitycznych kwasów nukleinowych na poziom miR-21 oraz prekursorów miR-21 oceniono po 24 h od transfekcji z użyciem techniki PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki normalizowano względem 18S rRNA. Zmiany poziomu miR-21 oraz pre-miR-21 istotnie statystycznie zaznaczono gwiazdkami (* dla p-value = 0.05, ** dla p-value = 0.01, *** dla p-value = 0.001).

4.3.2. Wpływ rybozymów oraz DNAzymów poziom białka PTEN

mRNA PTEN jest targetem dla miR-21. Poziom białka PTEN w komórce jest skorelowany z poziomem tego miRNA. W komórkach traktowanych rybozymami miR21rz1, miR21rz2, miR21rz3 oraz DNAzymami miR21dz1 i miR21dz2 stwierdziłam istotnie, 3- do 6-krotnie wyższy poziom białka PTEN w stosunku do komórek

traktowanych jedynie Lipofektaminą (Rysunek 4.27). Zastosowanie kwasów nukleinowych, które zgodnie z moimi wcześniejszymi obserwacjami nie wpływają istotnie na poziom miR-21, tj. DNAzymów miR21dz3-5, rybozymu miR21rz1_mut zmutowanego w obrębie rdzenia katalitycznego oraz kontrolnego oligonukleotydu (BlockIT) nie powoduje znaczących zmian w poziomie białka PTEN (Rysunek 4.27). Na przykładzie miR-21 oraz białka PTEN pokazałam, że zastosowanie katalitycznych kwasów nukleinowych anti-miRNA pozwala regulować nie tylko poziom miRNA, ale również ich targetów.

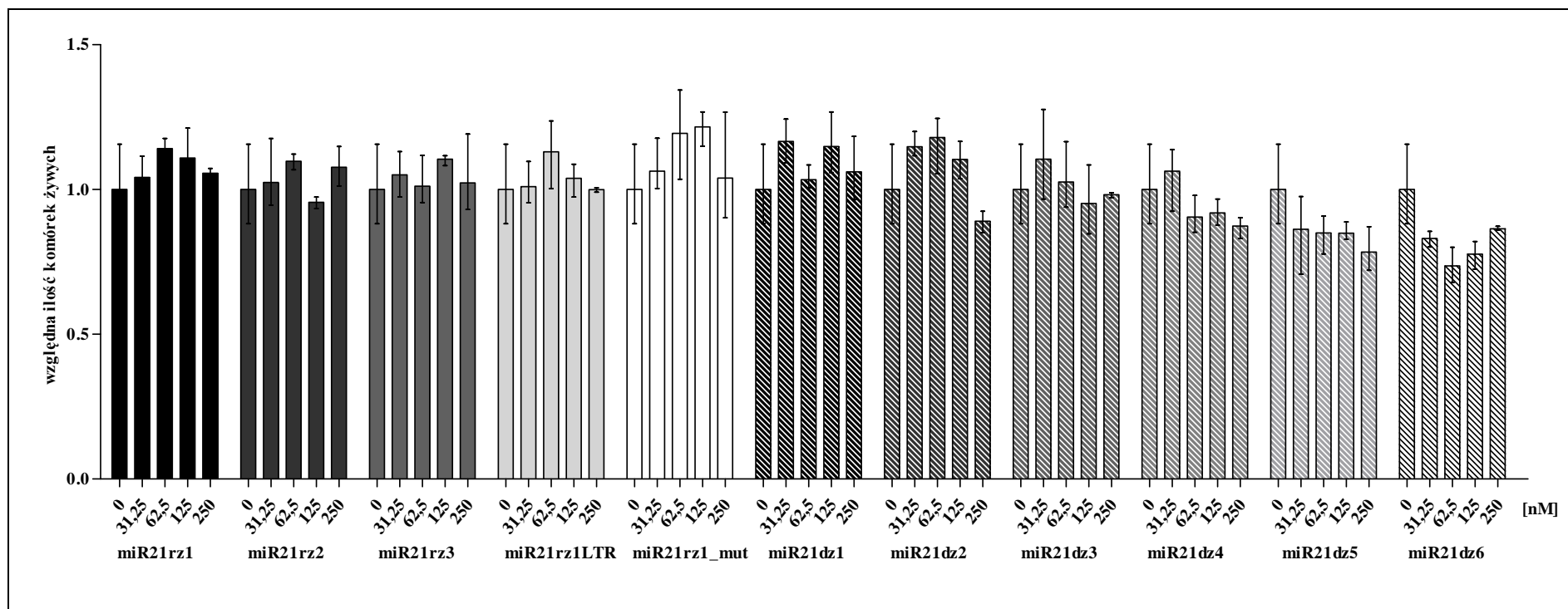


Rysunek 4.27

Wpływ rybozymów (A) oraz DNAzymów (B) anti-miR-21 na poziom białka PTEN w komórkach T98G. Komórki transfekowano rybozymami, DNAzymami oraz oligonukleotydem znakowanym fluorescencyjnie w stężeniu 100 nM oraz antysensowym LNA (kontrola pozytywna) w stężeniu 50 nM. Komórki traktowane jedynie Lipofektaminą 2000 przyjęto jako kontrolę (C). Wpływ katalitycznych kwasów nukleinowych na poziom białka PTEN oceniono po 24 h od transfekcji z użyciem techniki Western blot. Wyniki normalizowano względem białka GAPDH. Zmiany poziomu białka PTEN istotnie statystycznie zaznaczono gwiazdkami (** dla p-value = 0.01, *** dla p-value = 0.001).

4.3.3. Wpływ rybozymów oraz DNAzymów na przeżywalność komórek linii T98G

Zaprojektowane rybozomy oraz DNAzomy w badanym zakresie stężeń (31.25-250 nM) nie wpływają znacząco na proliferację komórek. Proliferację komórek transfekowanych rybozymami oraz DNAzymami w porównaniu z komórkami traktowanymi jedynie Lipofektaminą oceniono na podstawie wyników testu MTT (Rysunek 4.28) oraz z wykorzystaniem systemu Excelgence.



Rysunek 4.28

Analiza wpływu rybozymów oraz DNAzymów na proliferację komórek linii T98G.

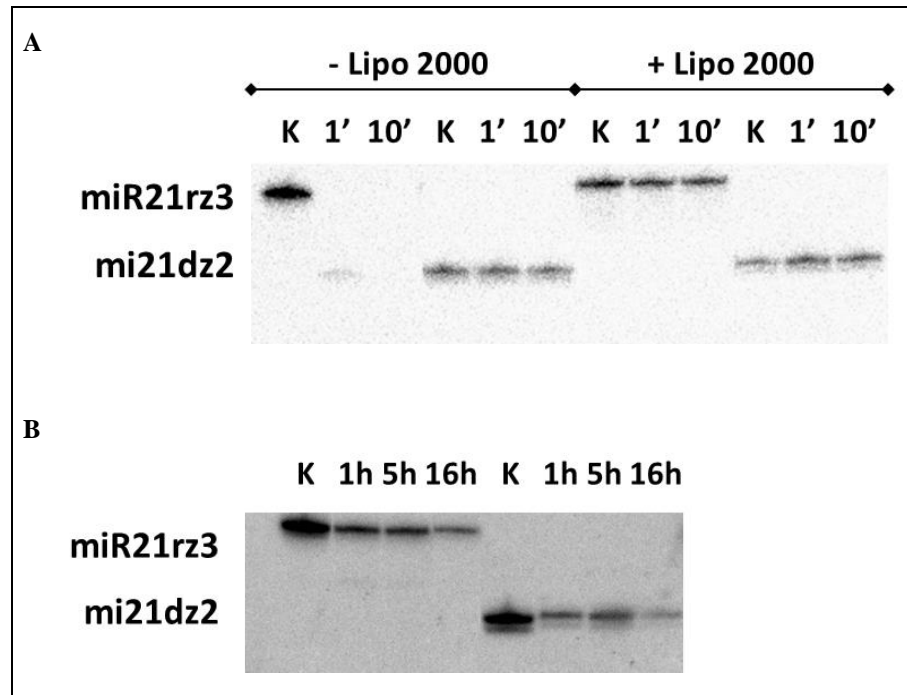
Hodowle komórek T98G na płytkach 96 dołkowych transfekowano rybozymami oraz DNAzymami anty-miR-21 (31.25-250 nM). Po upływie 24 h od transfekcji komórki analizowano z przy użyciu testu MTT. Pomiar absorbancji przy długości fali 590 nm po normalizacji wobec pomiaru tła przy $\lambda=620$ nm odzwierciedla aktywność metaboliczną i żywotność komórek w hodowlach. Przedstawiono względną ilość komórek żywych w odniesieniu do komórek traktowanych jedynie Lipofektaminą 2000. Wyniki dotyczą trzech niezależnych eksperymentów, słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe.

4.4. Trwałość rybozymów hammerhead oraz DNAzymów w surowicy krwi, lizacie przygotowanym z guza oraz płynie mózgowo-rdzeniowym

Rybozym miR21rz3 jest nietrwały w surowicy krwi (Rysunek 4.29). Po 1 min inkubacji w surowicą ulega niemal 100 % hydrolizie. Dla porównania w tych samych warunkach, DNAzym miR21dz2 wykazuje znacznie wyższą trwałość niż rybozym. Po 10 min nie zaobserwowałam jego ubytku. Trwałość miR21rz3 znacząco wzrasta w obecności Lipofektaminy 2000. Po 10 min inkubacji rybozymu i DNAzymu w surowicy, w obecności Lipofektaminy nie stwierdziłam ich ubytku (Rysunek 4.29). Zbliżone wyniki otrzymano w lizacie przygotowanym z guza oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym.

W warunkach komórkowych (linia T98), zaledwie 1 h po transfekcji, zaobserwowano znaczący (~80 %) ubytek zarówno rybozymu miR21rz3 jak i DNAzymu miR21dz2 (Rysunek 4.29). Niewątpliwie, również w tym przypadku trwałość zastosowanych kwasów nukleinowych w znacznym stopniu zależy od obecności Lipofektaminy. Otrzymane wyniki oraz wcześniejsze doniesienia literaturowe dotyczące wykorzystania kwasów nukleinowych jako terapeutyki jednoznacznie wskazują na zalety użycia nośników w terapii opartej na kwasach kwasów nukleinowych [232, 233].

Dodatkowo, postuluję, że zastosowanie modyfikowanych chemicznie rybozymów oraz DNAzymów o zwiększonej trwałości może znacząco wpłynąć na wydajność regulacji miRNA w komórkach. Hipoteza zostanie zweryfikowana w najbliższym czasie.



Rysunek 4.29

Trwałość rybozemu miR-21rz3 oraz DNAzemu miR-21dz2 w surowicy ludzkiej (A) oraz w linii komórkowej T98G (B).

A. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego obrazujący hydrolizę miR21rz3 oraz miR21dz2 inkubowanego w surowicy krwi przez 1 lub 10 min, w 37 °C w 10 µl z dodatkiem 1 µl Lipofektaminy 2000 (Invitrogen) lub bez jej dodatku. Inkubację kwasów nukleinowych w surowicy poprzedzono ich inkubacją z Lipofektaminą.

B. Autoradiogram 20 % żelu poliakrylamidowego obrazujący hydrolizę miR21rz3 oraz miR21dz2 po transfekcji do komórek linii komórkowej T98G w obecności Lipofektaminy 2000, 2, a następnie izolacji po 1, 5 i 16 h od transfekcji.

4.5. Możliwość zastosowania katalitycznych kwasów nukleinowych anty-miRNA w terapii

Niezmiennie od wielu lat standardem w leczeniu glejaków pozostaje leczenie operacyjne wspomagane jedynie radio- i chemioterapią. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w poznaniu molekularnych podstaw GBM. Zidentyfikowano wiele celów terapeutycznych oraz potencjalnych terapeutyków. Większość z nowych podejść wykorzystuje inhibitory małowcząsteczkowe, przeciwciała monoklonalne oraz szczepionki peptydowe stosowane w celu regulacji szlaków komórkowych kluczowych dla rozwoju nowotworu, angiogenezy, a także zniesienia lekooporności komórek nowotworowych. Pomimo, że podejścia te rokowały bardzo dobrze, większość z nich została odrzucona na etapie badań klinicznych. Niezmiennie od wielu lat glejaki

pozostają jednymi z najtrudniejszych w leczeniu, najgorzej rokujących nowotworów, ze średnim czasem przeżycia wynoszącym mniej niż rok.

Wobec braku skutecznych metod leczenia glejaków, ich oporności na konwencjonalne metody leczenia istnieje zapotrzebowanie na nowe cele oraz narzędzia terapeutyczne GBM. Pokazałam użyteczność niektórych miRNA oraz potencjalnie również ich prekursorów jako celów terapeutycznych w terapii złośliwych nowotworów glejowych mózgu oraz opracowałam katalityczne kwasy nukleinowe skutecznie obniżające poziom miRNA w komórkach. Zaprojektowałam łącznie dwanaście rybozymów typu hammerhead, dziewięć podstawowych, po trzy dla każdego pre-miRNA, rybozym wydłużony zawierający przy końcu 5' motyw receptora dla czteronukleotydowej pętli GAAA oraz rybozomy zmutowane w obrębie rdzenia katalitycznego, które użyto w charakterze kontroli negatywnych. Rybozomy miR21rz1, miR21rz1_TLR, miR21rz1_mut, miR10brz1, miR10brz1_mut oraz miR15brz1 rozpoznają zarówno pre-miRNA jak i ich formy dojrzałe. Pozostałe jedynie prekursor miRNA.

Zaprojektowane rybozomy precyzyjnie, z dokładnością do 1 nt, rozpoznają oraz hydrolizują RNA. Pomimo znacznego podobieństwa sekwencji 13-nt fragmentów substratów komplementarnych do ramion poszczególnych rybozymów, wynoszącego przykładowo dla fragmentów rozpoznawanych przez miR15brz1 i miR15brz3 niemal 70 % nie zaobserwowano cięć krzyżowych.

Aktywności poszczególnych rybozymów w warunkach *in vitro* różnią się między sobą (Tabele 4.3 i 4.4). Ich aktywność zależy od stosunku rybozym:substrat oraz stężenie Mg^{2+} . Zależności te opisano już wcześniej w literaturze [234, 235].

Otrzymane wyniki wskazują, że zaprojektowane rybozomy do zaistnienia aktywności wymagają jonów magnezu, pomimo, że znane są w literaturze przykłady rybozymów, w przypadku których zastąpienie jonów metali dwuwartościowych wysokim stężeniem jonów monowalencyjnych nie wiąże się z utratą ich właściwości katalitycznych [236] [237]. Aktywność rybozymów warunkowana jest przyjęciem przez niego odpowiedniej struktury trzeciorzędowej stabilizowanej przez oddziaływanie czwartorzędowe. Jego zwijaniu towarzyszy eksponowanie naładowanych ujemnie rejonów RNA, które oddziałują z dodatnio naładowanymi jonami. W komórce są to najczęściej z Na^+ , K^+ , Ca^{2+} oraz Mg^{2+} [238]. Pozwalają rybozymowi przyjąć odpowiednią strukturę, co z kolei jest warunkiem koniecznym zaistnienia hydrolizy [239].

Jednym z ograniczeń związanych z zastosowaniem katalitycznych RNA jako terapeutyków jest zależność ich aktywności od wysokiego stężenia jonów magnezu [228]. Większość minimalnych rybozymów typu hammerhead opisanych do tej pory w literaturze do zaistnienia aktywności wymaga 10 mM Mg^{2+} [240], podczas gdy stężenie magnezu w komórce waha się w zakresie 0.5 - 1 mM [241]. Podstawowym celem w projektowaniu nowych katalitycznych kwasów nukleinowych jest zwiększenie ich aktywności katalitycznej w fizjologicznym stężeniu jonów magnezu. Zaobserwowano, że rybozomy anty-mRNA gp41 wirusa HIV-1 wydłużone o element receptora czteronukleotydowych pętli (ang. tetraloop receptor, TLR) wykazują wyższą aktywność w niższych stężeniach jonów magnezu niż rybozym podstawowy [228]. Oddziaływanie pętli TL (ang. tetra loop) z receptorem TLR zależy od obecności magnezu. Pomiędzy 0 i 10 mM stężeniem $MgCl_2$ występuje około 40-krotny wzrost siły wiązania. Jednakże kompleks pętla:receptor jest tworzony nawet w środowisku pozbawionym jonów Mg^{2+} [242]. Sugeruje się, że istnieje energetyczne sprzężenie pomiędzy zmianami konformacyjnymi receptora, koordynacją specyficznych jonów magnezu oraz wiązaniem TL [243]. Z drugiej strony wykazano, że w warunkach zbliżonych do fizjologicznych oddziaływanie to wykazuje pewną niestabilność [244]. W oparciu o te dane zaprojektowałam rybozym wydłużony przy końcu 5' o motyw receptora dla czteronukleotydowej pętli GAAA (TLR, ang. tetraloop receptor), miR21rz1_TLR. TLR stanowi wysoce specyficzny element struktury trzeciorzędowej rybozomu i zapewnia rybozomowi wysoką aktywność katalityczną w niskich stężeniach jonów Mg. Aktywność miR21rz1_TLR podobnie jak miR21rz1 jest zależna od stężenia jonów magnezu oraz stosunku rybozym:substrat, jednakże wbrew oczekiwaniom rybozym zawierający TLR wykazuje nieco niższą aktywność niż wariant podstawowy rybozomu, zarówno względem miR-21 jak i jego prekursora.

Aktywność zaprojektowanych rybozymów zależy od struktury zarówno substratu jak i rybozomu, co jest zbieżne z wcześniejszymi obserwacjami [245]. Otrzymane modele struktury miRNA oraz ich prekursorów wskazują, że niektóre z trójek nukleotydowych wytypowanych w obrębie substratów mogą być niedostępne dla rybozymów, gdyż zaangażowane są w tworzenie struktury tych RNA. Projektując rybozomy wzięto jednak pod uwagę fakt, że może dojść do wymuszenia dostępności sekwencji RNA [87]. Z tego względu nie odrzucano miejsc docelowych o cechach sugerujących brak dostępności ze względu na charakter dwuniciowy. Zauważono, że rybozomy o

ramionach komplementarnych do pętli spinek pre-miRNA i/lub ich najbliższego sąsiedztwa nie wykazują aktywności (miR21rz2) lub najmniejszą aktywność spośród rybozymów dla danego pre-miRNA (miR10brz2, miR15brz2). Rybozym miR21rz2 nieaktywny względem pre-miR-21 wydajnie rozpoznaje i hydrolizuje 13-nt RNA, będący fragmentem pre-miR-21 wykazującym komplementarność do ramion rybozemu. Pokazałam również, że pętla pre-miR-21 jest dostępna do oddziaływań. W przeciwieństwie do rejonów dwuniciowych spinki jest rozpoznawana przez oligodeoksyrybonukleotydy, gdyż zaobserwowano hydrolizę pre-miRNA z udziałem RNazy H w obecności DNA komplementarnego do pętli pre-miR-21. Postuluję, że miR21rz2 rozpoznaje pre-miR-21, jednak struktura substratu uniemożliwia rybozymowi przyjęcie prawidłowej konformacji, a w efekcie zaistnienie hydrolizy. Rybozomy o ramionach komplementarnych do fragmentów ulokowanych w dwuniciowych trzonach spinek pre-miRNA wykazują wyższą aktywność w porównaniu do rybozymów skierowanych na ich pętle. Postuluję, że rybozomy mogą wymuszać dostępności sekwencji RNA w obrębie pre-miRNA. Wcześniej zaobserwowano tego typu zjawisko dla spinek pre-miRNA oraz krótkich oligodeoksyrybonukleotydów [246]. Określiłam energie fragmentów pre-miR-21 w obrębie których dochodzi do tego typu wymuszenia dostępności. Zaobserwowałam korelację między energią a wydajnością hydrolizy RNA przez rybozomy. Im wyższa energia, tym łatwiej dochodzi do wymuszenia, a w efekcie tym wyższa wydajność hydrolizy pre-miRNA z udziałem rybozemu. Zależność tą zobrazowano w Tabeli 4.5.

Ponadto na wydajność hydrolizy RNA, oprócz struktury substratu może wpływać również struktura rybozymów. Określiłam struktury drugorzędowe rybozymów oraz zaangażowanie ich domen katalitycznych w tworzenie struktury drugorzędowej rybozemu oraz dostępności ich ramion do oddziaływań z substratem. Znaczna stabilność (niska energia) niektórych struktur rybozymów oraz zaangażowanie fragmentów domeny katalitycznej w tworzenie trzonu spinki, przykładowo w rybozymach zmutowanych, może tłumaczyć ich niską aktywność bądź zupełny jej brak (Rysunek 4.30).

Dodatkowo zaprojektowano łącznie 23 DNAzomy skierowane na pre-miR-21 (5), pre-miR-10b (6) oraz pre-miR-15b (12). Sześć spośród nich rozpoznaje dojrzałe miRNA, po dwa dla miR-21, miR-10b oraz miR-15b. W badanych warunkach, jedynie dwa DNAzomy wykazują aktywność względem pre-miRNA (miR21dz2 i miR21dz3). Dla

reszty nie udało się otrzymać specyficznych produktów hydrolizy prekursorów miRNA nawet w 100-krotnym nadmiarze DNA względem substratu oraz 25 mM Mg^{2+} (Tabele 4.3 i 4.4). Pożądanego efektu nie przyniosło nawet wydłużenie ramion DNAzymów rozpoznających substraty. Pomimo, że tylko nieliczne DNAzomy wykazują aktywność względem pre-miRNA, wszystkie DNAzomy, których ramiona wykazują komplementarność do dojrzałych miRNA wydajnie je hydrolizują. Postuluję, że brak hydrolizy pre-miRNA może wynikać ze struktury prekursorów miRNA oraz niższego potencjału DNAzymów, w porównaniu z rybozymami, do wymuszania dostępności sekwencji docelowej. Aktywność DNAzymów, podobnie jak rybozymów wzrasta wraz ze wzrostem stężenia jonów Mg^{2+} , oraz stosunku DNAzym:substrat, w badanych zakresach.

Tabela 4.3

Wydajność hydrolizy pre-miRNA z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych

Warunki reakcji			Stopień hydrolizy pre-miR-21 z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych [%]							
L.p.	Rybozym [nM]	Mg ²⁺ [mM]	miR21rz1	miR21rz2	miR21rz3	miR21dz1	miR21dz2	miR21dz3	miR21dz4	miR21dz5
1.	125	10	3.5	1.9	9.1	bd	bd	bd	bd	bd
2.	500	10	5.5	2.0	9.8	bd	bd	bd	bd	bd
3.	100	1	0.5	<0.5	0.9	<0.5	3.6	4.7	<0.5	<0.5
4.	100	5	0.9	<0.5	3.3	<0.5	8.1	8.7	<0.5	<0.5
5.	100	10	1	<0.5	4.2	<0.5	22.0	20.8	<0.5	<0.5

Warunki reakcji			Stopień hydrolizy pre-miR-10b z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych [%]								
L.p.	Rybozym [nM]	Mg ²⁺ [mM]	miR10brz1	miR10brz2	miR10brz3	miR10bdz1	miR10bdz2	miR10bdz3	miR10bdz4	miR10bdz5	miR10bdz6
1.	125	10	14.3	2.0	47.4	bd	bd	bd	bd	bd	bd
2.	500	10	17.6	7.0	70.7	bd	bd	bd	bd	bd	bd
3.	100	1	<0.5	2.3	1.9	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
4.	100	5	8.8	6.8	41.6	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
5.	100	10	16.1	8.6	72.9	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

Warunki reakcji			Stopień hydrolizy pre-miR-15b z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych [%]														
L.p.	Rybozym [nM]	Mg ²⁺ [mM]	miR15brz1	miR15brz2	miR15brz3	miR15bdz1	miR15bdz2	miR15bdz3	miR15bdz4	miR15bdz5	miR15bdz5+	miR15bdz6	miR15bdz6+	miR15bdz7	miR15bdz8	miR15bdz9	miR15bdz10
1.	125	10	5	3.6	20.1	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
2.	500	10	23.1	12.7	25.6	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd
3.	100	1	15.2	3.6	11.7	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
4.	100	5	22.2	12.5	23.9	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
5.	100	10	24.3	14.9	26.2	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5

bd – brak danych

Tabela 4.4

Wydajność hydrolizy dojrzałych miRNA z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych

Warunki reakcji			Stopień hydrolizy pre-miR-21 z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych [%]							
L.p.	Rybozym [nM]	Mg ²⁺ [mM]	miR21rz1	miR21rz2	miR21rz3	miR21dz1	miR21dz2	miR21dz3	miR21dz4	miR21dz5
1.	10	10	79.4	x	x	bd	bd	x	x	x
2.	100	10	92.9	x	x	bd	bd	x	x	x
3.	100	1	0.6	x	x	bd	bd	x	x	x
4.	100	5	70.4	x	x	bd	bd	x	x	x
5.	100	10	96.7	x	x	61.5	22.0	x	x	x

Warunki reakcji			Stopień hydrolizy pre-miR-10b z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych [%]								
L.p.	Rybozym [nM]	Mg ²⁺ [mM]	miR10brz1	miR10brz2	miR10brz3	miR10bdz1	miR10bdz2	miR10bdz3	miR10bdz4	miR10bdz5	miR10bdz6
1.	10	10	80.5	x	x	85.0	8.0	x	x	x	x
2.	100	10	89.5	x	x	91.0	35.5	x	x	x	x
3.	100	1	76.0	x	x	<0.5	<0.5	x	x	x	x
4.	100	5	88.1	x	x	39.3	7.1	x	x	x	x
5.	100	10	89.5	x	x	45.5	7.4	x	x	x	x

Warunki reakcji			Stopień hydrolizy pre-miR-15b z użyciem katalitycznych kwasów nukleinowych [%]															
L.p.	Rybozym [nM]	Mg ²⁺ [mM]	miR15brz1	miR15brz2	miR15brz3	miR15bdz1	miR15bdz2	miR15bdz3	miR15bdz4	miR15bdz5	miR15bdz5+	miR15bdz6	miR15bdz6+	miR15bdz7	miR15bdz8	miR15bdz9	miR15bdz10	
1.	10	10	92.8	x	x	x	x	x	x	bd	bd	bd	bd	x	x	x	x	
2.	100	10	93.5	x	x	x	x	x	x	bd	bd	bd	bd	x	x	x	x	
3.	100	1	89.0	x	x	x	x	x	x	bd	bd	bd	bd	x	x	x	x	
4.	100	5	93.9	x	x	x	x	x	x	bd	bd	bd	bd	x	x	x	x	
5.	100	10	95.5	x	x	x	x	x	x	<0.5	37.2	<0.5	92.1	x	x	x	x	

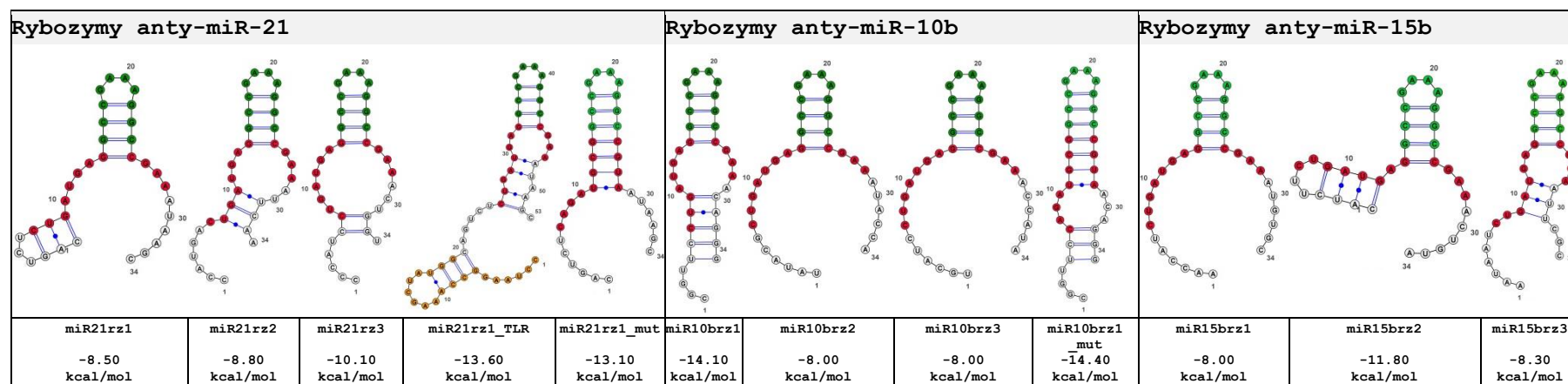
bd – brak danych

x – brak miejsca rozpoznawania dla danego katalitycznego kwasu nukleinowego w obrębie miRNA

Tabela 4.5

Stopień hydrolizy pre-miRNA przez poszczególne rybozomy oraz ΔG [kcal/mol] dwuniciowych rejonów pre-miRNA w obrębie którego występuje fragment komplementarny do ramion rybozomu.

Sekwencja rejonu pre-miRNA w obrębie którego występuje nić komplementarna do ramion rybozomu (zaznaczona na czerwono)	Sekwencja rybozomu	Stopień hydrolizy pre-miRNA [%] (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 nM pre-miRNA, 100 nM rybozym, 10 mM MgCl ₂)	ΔG [kcal/mol] dwuniciowego rejonu pre-miRNA w obrębie którego występuje fragment komplementarny do ramion rybozomu
pre-miR-21			
<p style="text-align: center;">A</p> <p>GCUUA<u>AUC</u> GACUG CGGGUAG CUGAC</p>	miR21rz1 CAGUCUAUAAGC	1.0	-10.26
<p style="text-align: center;">C</p> <p>A CAGUC GAUGGG U GUCAG CUAUUC A A</p>	miR21rz3 CCCAUCACUGGU	4.2	-8.74
pre-miR-10b			
<p style="text-align: center;">G C</p> <p>CCCU <u>UAGAA</u> CG GGGG AUCUU GC A</p>	miR10brz1 CGGUUCACAGGG	16.1	-10.79
<p style="text-align: center;">U CA</p> <p>UAUGG <u>CGAUG</u> AUAUC GUUGC U AA</p>	miR10brz3 UGCAUCAGGAUA	72.9	-8.33
pre-miR-15b			
<p style="text-align: center;">C C</p> <p>GCA <u>AU</u> AUGGUU CGU UA ACCAA U U</p>	miR15brz1 AACCAUAUGUGC	24.3	-5.68
<p style="text-align: center;">C U U</p> <p>G GAAU<u>CAU</u> AU C UUUGGUA UA A C C</p>	miR15brz3 AAUAAUAUUCGC	26.2	-4.97



Rysunek 4.30

Struktury drugorzędowe rybozymów anty-miRNA.

Modele struktury oraz wartości ich energii minimalnej otrzymano z użyciem RNAfold. Kolorami zaznaczono domeny funkcjonalne rybozymów, na czerwono - domenę katalityczną, na zielono – domenę strukturalną, na żółto – TLR, domeny wiążącej substrat nie oznaczono kolorem.

Skuteczność zaprojektowanych narzędzi anty-miRNA została potwierdzona w warunkach komórkowych. Otrzymane wyniki wskazują, że dojrzałe miRNA są łatwiejszym celem działania dla katalitycznych kwasów nukleinowych niż ich prekursory, które przyjmują stabilne struktury. Dodatkowo, rybozomy oraz DNAzomy, które rozpoznają i hydrolizują zarówno dojrzałe miRNA jak i ich prekursory, tj. miR21rz1 i miR21dz1, najskuteczniej obniżają poziom miR-21.

Brak w literaturze doniesień opisujących tego typu podejście w projektowaniu narzędzi anty-miRNA. Do tej pory dyskutowano jedynie możliwość zastosowania inhibitorów małowcząsteczkowych [247] oraz oligonukleotydów antysensowych (AS-ON) jako narzędzia skierowanych na dojrzałe miRNA [248]. Wady inhibitorów małowcząsteczkowych: słabo poznany mechanizm działania, niska specyficzność związków oraz niski indeks terapeutyczny, oraz AS-ON: krótki okres półtrwania w osoczu, degradacja przez endo- i egz nukleazy [249], niska specyficzność AS-ON (tzw. off-target effect), utrudniony transport AS-ON przez błony komórkowe i barierę krew-mózg, konieczność stosowania nośnika, indukowanie odpowiedzi immunologicznej przez syntetyczne AS-ON zawierające niemetylowane dinukleotydy CpG, oraz fakt, że degradacja heterodupleksu AS-ON:miRNA jest zależna od endogennej maszynerii białkowej, głównie RNazy H spowodowały, że do tej pory nie zostały one wdrożone do praktyki w klinice.

Zaletą rybozymów oraz DNAzymów jest to, że w przeciwieństwie do oligonukleotydów antysensowych do swojego działania nie wymagają endogennej maszynerii białkowej. Dodatkowo wykazano, że stabilizowane rybozomy dużo efektywniej niż AS-ON są pobierane przez komórkę bez żadnego systemu transfekcyjnego. Po ich bezpośrednim podaniu do mazi stawowej obserwowano, na przykład, spadek poziomu mRNA metaloproteiny stromelizyny indukowanej interleukiną 1 α [250]. Obecność nośników transfekcyjnych przynosić dodatkowe korzyści: poprawę wydajności wnikania kwasów nukleinowych do komórki oraz odporność na komórkowe nukleazy, a w efekcie zwiększenie efektywności ich działania [251].

Do tej pory żaden z testowanych rybozymów ani DNAzymów nie przeszedł pozytywnie badań klinicznych. Jednak wysoka skuteczność na etapie badań przedklinicznych wielu nowych katalitycznych kwasów nukleinowych sprawia, że nadal wiąże się z nimi duże nadzieje. Zaproponowałam nowe podejście w projektowaniu DNAzymów i

rybozymów, mianowicie kierowanie ich na miRNA oraz ich prekursorzy, nie jak dotychczas na mRNA. Pokazałam, że zastosowanie zarówno rybozymów jak i DNAzymów pozwala skutecznie i selektywnie regulować poziom konkretnych miRNA, a w efekcie wpływać na stężenie ich białek docelowych co potwierdziło słuszność tego podejścia.

PODSUMOWANIE**Uzyskane wyniki pozwoliły mi wyciągnąć następujące wnioski:**

- profil miRNA jest zmieniony w tkankach guzów mózgu oraz obrzeży w porównaniu ze zdrową kontrolą,
- miR-21, miR10b, miR-15b, miR-93 oraz miR-296, których poziom jest znacząco wyższy w tkankach guza w porównaniu ze zdrową kontrolą, są zaangażowane w rozwój GBM oraz mogą stanowić potencjalny cel terapii guzów mózgu,
- miR-21, miR-93, miR-296 przyjmują strukturę drugorzędową, zarówno spinki do włosów jak i dupleksu, a równowaga między tymi formami zależy od ich stężenia, temperatury oraz stężenia soli. miR-10b oraz miR-15b tworzą homodupleksy,
- przesunięcia równowagi między strukturą monomeru i homodupleksu miRNA wpływają na właściwości i funkcje miRNA
- niektóre miRNA za sprawą ich struktury mogą specyficznie oddziaływać z białkami spoza kompleksu RISC
- rybozomy i DNazy skierowane na miR-21, miR-10b, miR-15b oraz ich prekursorzy obniżają stężenie tych miRNA. Uzyskany poziom wyciszenia miRNA jest sumarycznym efektem ich działania na poziomie miRNA jak i ich prekursorów. Efektywność i precyzja działania katalitycznych kwasów nukleinowych oraz łatwość ich dostarczenia do komórek z użyciem kationów lipidowych świadczą dużym potencjale aplikacyjnym tych narzędzi w terapii chorób związanych z zaburzeniami poziomu miRNA.

REFERENCJE

- [1] Bartel DP, *MicroRNAs: target recognition and regulatory function*. Cell 136, 215-233 (2009).
- [2] Carey J, Cameron V, de Haseth PL and Uhlenbeck OC, *Sequence-specific interaction of R17 coat protein with its ribonucleic acid binding site*. Biochemistry 22, 2601-2610 (1983).
- [3] Cheong C, Varani G and Tinoco Jr, *Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'GGAC(UUCG)GUCC*. Nature 346, 680-682 (1990).
- [4] Jucker FM and Pardi A, *GNRA tetraloops make a U-turn*. RNA 1, 219-222 (1995).
- [5] Volkin E and Astrachan L, *Phosphorus incorporation Escherichia coli ribonucleic acid after infection bacteriophage T2*. Virology 2, 149-161 (1956).
- [6] Astrachan E and Volkin E, *The absence of ribonucleic acid in bacteriophage T2r+*. Virology 2, 594-598 (1956).
- [7] Brenner S, Jacob F and Meselson M, *An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis*. Nature 190, 576-581 (1961).
- [8] Jacob F and Monod J, *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. J Mol Biol 3, 318-356 (1961).
- [9] Kloc M, *Teaching egg: new unexpected functions of RNAs*. Mol Rep Dev 76, 922-932 (2009).
- [10] Kloc M, *Emerging novel function of RNA, and binary phenotype?* Dev Biol 317, 401-404 (2008).
- [11] Barciszewska MZ, Keith G, Kubli E and Barciszewski J, *The primary structure of wheat germ tRNA^{Arg} - the substrate for arginyl-tRNA^{Arg}:protein transferase*. Biochimie 68, 319-323 (1986).
- [12] Ling J, Reynolds N and Ibba M, *Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control*. Annu Rev Microbiol 63, 61-78 (2009).
- [13] Ogle JM and Ramakrishnan V, *Structure insights into translational fidelity*. Annu Rev Biochem 74, 129-177 (2005).
- [14] Mannoor K, Liao J and Jiang F, *Small nucleolar RNAs in cancer*. Biochim Biophys Acta 1826, (2012).
- [15] Gardner PP, Bateman A and Poole AM, *SnoPatrol: how many snoRNA genes are there?* J Biol 9, (2010).
- [16] Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schbert F, Wood V, Goofhead I, Penkett CJ, Rogers J and Bahler J, *Dynamic repertoire of an eucariotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution*. Nature 453, 1239-1243 (2008).

- [17] Affymetrix ENCODE transcriptome projekt, Cold Spring Harbor Laboratory ENCODE Transcriptome Project. *Post-transcriptional processing generates a diversity of 5'-modified long and short RNAs*. *Nature* 457, 1028-1032 (2009).
- [18] Knowling S and Morris KV, *Non-coding RNA and antisense RNA. Nature's trash or treasure?* *Biochimie* 93, 1922-1927 (2011).
- [19] Gabryelska M, Szymanski M, Barciszewska MZ and Barciszewski J, *Regulatorowe RNA w mózgu*. *Nauka* 2, 95-114 (2008).
- [20] Żywicki M, Szymański M and Barciszewski J, *Różnorodność i funkcje niekodujących regulatorowych RNA*. *Postępy Biochemii* 50, 90-102 (2004).
- [21] Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdman VA and Barciszewski J, *A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs*. *Biochim Biophys Acta* 1765, 65-75 (2005).
- [22] Finnegan EJ and Matzke MA, *The small RNA world*. *J Cell Sci* 116, 4689-4693 (2003).
- [23] Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S and Spiegel S, *Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival*. *J Cell Biol* 147, 545-558 (1999).
- [24] Imamura T, Yamamoto S, Ohgane J, Hattori N, Tanaka S and Shiota K, *Non-coding RNA directed DNA demethylation of Sphk1 CpG island*. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 593-600 (2004).
- [25] Heard E, *Recent advances in X-chromosome inactivation*. *Curr Opin Cell Biol* 16, 247-255 (2004).
- [26] Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B and Zhang Y, *Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation*. *Science* 300, 131-135 (2003).
- [27] Chureau C, Prissette M, Bourdet A, Barbe V, Cattolico L, Jones L, Eggen A, Avner P and Duret L, *Comparative sequence analysis of the X-interaction center region in mouse, human, and bovine*. *Genome Res* 12, 894-908 (2002).
- [28] Shibata S and Lee JT, *Tsix transcription-versus RNA-based mechanisms in Xist repression and epigenetic choice*. *Curr Biol* 14, 1747-1754 (2004).
- [29] Escobar MA and Dandekar AM, *Post-transcriptional gene silencing in plants*. *Noncoding RNAs: molecular biology and molecular medicine* (Barciszewski J, Erdmann VA, eds) 129-141 (2003).
- [30] Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell* 75, 843-854 (1993).
- [31] Mitsuya K, Meguro M, Lee MP, Katoh M, Schulz TC, Kugoh H, Yoshida MA, Niikawa N, Feinberg AP and Oshimura M, *LIT1, an imprinted*

- antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids.* Hum Mol Genet 8, 1209-1217 (1999).
- [32] Mandal M and Breaker RR, *Gene regulation by riboswitches.* Nat Rev Mol Cell Biol 5, 451-463 (2004).
- [33] Mandal M, Boese B, Barrick JE, Winkler WC and Breaker RR, *Riboswitches control fundamental biochemical pathways in Bacillus subtilis and other bacteria.* Cell 113, 577-586 (2003).
- [34] Grundy FJ, Lehman SC and Henkin TM, *The L box regulon: lysine sensing by leader RNAs of bacterial lysine biosynthesis genes.* Proc Natl Acad Sci USA 100, 12057-12062 (2003).
- [35] Hermann T and Partel DJ, *RNA bulges as architectural and recognition motifs.* Structure 8, R47-R54 (2000).
- [36] Winkler WC and Breaker RR, *Regulation of bacterial gene expression by riboswitches.* Annu Rev Microbiol 59, 487-5017 (2005).
- [37] Wasserman KM and Storz G, *6 S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity.* Cell 101, 613-623 (2000).
- [38] Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai MJ and O'Malley BW, *A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex.* Cell 97, 17-27 (1999).
- [39] Westhof E and Auffinger P, *RNA tertiary structure.* Encyclopedia of Analytical Chemistry 5222-5232 (2000).
- [40] Holbrook SR, *Structural principles from large RNAs.* Annu Rev Biophys 37, 445-464 (2008).
- [41] Leonitis NB and Westhof E, *Conserved geometrical base-pairing patterns in RNA.* Q Rev Biophys 31, 399-455 (1998).
- [42] Leontis NB Stombaugh J and Westhof E, *The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices.* Nucl Acids Res 30, 3497-3531 (2002).
- [43] Ulyanov NB and James TL, *RNA structural motifs that entail hydrogen bonds involving sugar phosphate backbone atoms of RNA.* New J Chem 34 910-917 (2010).
- [44] Julien KR, Sumita M, Chen PH, Laird-Offringa IA and Hoogstraten CG, *Conformationally restricted nucleotides as a probe of structure-function relationships in RNA.* RNA 14, 1632-1643 (2008).
- [45] Mortimer SA and Weeks KM, *C2'-endo nucleotides as molecular timers suggested by the folding of an RNA domain.* Proc Natl Acad Sci USA 106, 15622-15627 (2009).
- [46] Richardson JS, Schneider B, Murray LW, Kapral GJ, Immormino RM, Headd JJ, Richardson DC, Ham D, Hershkovits E, Williams LD, Keating KS, Pyle AM, Micallef D, Westbrook J, Berman HM and RNA Ontology

- Consortium, *RNA backbone: consensus all-angle conformations and modular string nomenclature (an RNA Ontology Consortium contribution)*. *RNA* 14, 465-481 (2008).
- [47] Marek MS, Johnson-Buck A and Walter NG, *The shape-shifting quasispecies of RNA: one sequence, many functional folds*. *Phys Chem Chem Phys* 13, 11524-11537 (2011).
- [48] Zhao Y, Huang Y, Gong Z, Wang Y, Man J and Xiao Y, *Automated and fast building of tree-dimensional RNA structures*. *Sci Rep* 2, 734-740 (2012).
- [49] Woodson SA, *Metal ions and RNA folding: a highly charged topic with a dynamic future*. *Curr Opin Chem Biol* 9, 104-109 (2005).
- [50] Hermann T and Westhof E, *Exploration of metal ion binding in RNA folds by Brownian-dynamics simulations*. *Structure* 6, 1303-1314 (1998).
- [51] Butcher SE and Pyle AM, *The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks*. *Accounts Chem Res* 44, 1302-1311 (2011).
- [52] Thirumalai D and Woodson SA, *Kinetics of folding of protein and RNA*. *Accounts Chem Res* 29, 433-439 (1996).
- [53] Masquida B, Beckeret B and Jossinet F, *Exploring RNA structure by integrative molecular modelling*. *N Biotechnol* 27, 170-183 (2010).
- [54] Brion P and Westhof E, *Hierarchy and dynamics of RNA folding*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 113-137 (1997).
- [55] Sheehy JP, Davis AR and Znosko BM, *Thermodynamic characterization of naturally occurring RNA tetraloops*. *RNA* 16, 417-429 (2010).
- [56] Tuerk C, Gauss P, Thermes C, Groebe DR, Gayle M, Guild N, Stormo G, D'Aubenton-Carafa Y, Uhlenbeck OC, Tinoco I, Brody JEN and Gold L, *CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 1364-1368 (1988).
- [57] Bevilacqua PC and Blose JM, *Structure, kinetics, thermodynamics, and biological functions of RNA hairpins*. *Annu Rev Phys Chem* 59, 79-103 (2007).
- [58] Westhof E, Dumas P and Moras D, *Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA*. *J Mol Biol* 184, 119-145 (1985).
- [59] Allain FHT, Gubser CC, Howe PWA, Nagai K, Neuhaus D and Varani G, *Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formation*. *Nature* 380, 646-650 (1996).
- [60] Murphy FL and Cech TR, *GAAA tetraloop and conserved bulge stabilize tertiary structure of a group I intron domain*. *J Mol Biol* 236, 49-63 (1994).
- [61] Costa M and Michel F, *Frequent use of the same tertiary motif by self-folding RNAs*. *EMBO J* 14, 1276-1285 (1995).

- [62] Schimmel P and Ribas de Pouplana L, *Formation of two classes of tRNA synthetases in relation to editing functions and genetic code*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 66, 161-166 (2001).
- [63] Pan B, Xiong Y, Shi K, Deng J and Sundaralingam M, *Crystal structure of an RNA purine-rich tetraplex containing adenine tetrads: implications for specific binding in RNA tetraplexes*. Structure 11, 815-823 (2003).
- [64] Yang D and Hurley LH, *Structure of the biologically relevant G-quadruplex in the c-myc promoter*. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 25, 951-968 (2006).
- [65] Yang D and Hurley LH, *Structure and biochemically relevant G-quadruplex in the c-MYC promoter*. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 25, 951-968 (2006).
- [66] Balasubramanian S, Hurley LH and Neidle S, *Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?* Nat Rev Drug Discov 10, 261-275 (2011).
- [67] Xu Y, Kaminaga K and Komiyama M, *G-quadruplex formation by human telomeric repeats-containing RNA in Na⁺ solution*. J Am Chem Soc 130, 11179-11184 (2008).
- [68] Russel RS, Hu J, Beriault V, Mouland AJ, Kleiman L, Wainberg MA and Liang C, *Sequences downstream of the 5' splice donor site are required for both packaging and dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA*. J Virol 77, 84-96 (2003).
- [69] Bonham-Smith PC and Bourque DP, *Translation of chloroplast-encoded mRNA: potential initiation and termination signals*. Nucl Acids Res 17, 2057-2080 (1989).
- [70] Rould MA and Steitz TA, *Structure of the glutamyl tRNA synthetase-tRNA^{Glu}-ATP*. Mol Biol 6, 225-245 (1992).
- [71] Agris PF, *The importance of being modified: roles of modified nucleosides and Mg²⁺ in RNA structure and function*. Prog Nucl Acid Res Molec Biol 53, 79-129 (1996).
- [72] Rozenski J, Crain PF and McCloskey JA, *The RNA modification database: 1999 update*. Nucl Acids Res 27, 196-197 (1999).
- [73] Kiesewetter S, Ott G and Sprinzl M, *The role of modified purine 64 in initiator/elongator discrimination of tRNA_i^{Met} from yeast and wheat germ*. Nucl Acids Res 18, 4677-4682 (1990).
- [74] Testa SM, Disney MD, Turner DH and Kierzek R, *Thermodynamics of RNA-RNA duplex with 2- or 4-thiouridines: implications for antisense design and targeting a group I intron*. Biochemistry 38, 16655-16662 (1999).
- [75] Kierzek E and Kierzek R, *Influence of N6-isopentenyladenosine (i(6)A) on thermal stability of RNA duplexes*. Biophys Chem 91, 135-140 (2001).

- [76] Ashraf SS, Guenther RH, Ansari G, Malkiewicz A, Sochacka E and Agris PF, *Role of modified nucleosides of yeast tRNA^{Phe} in ribosomal binding*. Cell Biochem Biophys 33, 241-252 (2000).
- [77] Ashraf SS, Sochacka E, Cain R, Guenther R, Malkiewicz A and Agris PF, *Single atom modification (O*S) of tRNA confers ribosome binding*. RNA 5, 188-194 (1999).
- [78] Yarian CS, Cain R, Basti MM, Ansari G, Guenther RH, Sochacka E, Malkiewicz A and Agris PF, *Structural and functional roles of the N1- and N3-protons of Y at tRNA's position 39*. Nucl Acids Res 27, 3543-3549 (1999).
- [79] Shigi N, Suzuki T, Tamakoshi M, Oshima T and Wanatabe K, *Conserved bases in the TΨi C loop of tRNA are determinants for thermophile-specific 2-thiouridylation at position 54*. J Biol Chem 277, 39128-39135 (2002).
- [80] Dalluge JJ, Hamamoto T, Horikoshi K, Morita RY, Stetter KO and McCloskey JA, *Posttranscriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria*. J Bacteriol 179, 1918-1923 (1997).
- [81] Thomas B and Akoulitchev AV, *Mass spectrometry of RNA*. Trends Biochem Sci 31, 173-181 (2006).
- [82] Ke A and Doudna JA, *Crystallization of RNA and RNA-protein complexes*. Methods 34, 408-414 (2004).
- [83] Kim SH, *Crystal structure of yeast tRNA^{Phe} and general structural features of other tRNAs*. Cold Spring Harbor Monographs 09A, 83-100 (1979).
- [84] Scott WG, Finch JT and Klug A, *The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage*. Cell 81, 991-1002 (1995).
- [85] Tuck AC and Tollervey D, *RNA in pieces*. Trends Genet 27, 422-432 (2011).
- [86] Silverman SK, *Rube Goldberg goes (ribo)nuclear? Molecular switches and sensors made from RNA*. RNA 9, 377-383 (2003).
- [87] Serikov R, Petyuk V, Vorobijev Y, Koval V, Fedorova O, Vlassov V and Zenkova M, *Mechanism of antisense oligonucleotide interaction with natural RNAs*. J Biomol Struct Dyn 29, 27-50 (2011).
- [88] Mueller F, Sommer I, Baranov P, Matadeen R, Stoldt M, Wohnert J, Gorkl M, van Heel M and Brimacombe R, *The 3D arrangement of the 23 S and 5 S rRNA in the Escherichia coli 50 S ribosomal subunit based on cryo-electron microscopic reconstruction at 7.5 Å resolution*. J Mol Biol 298, 35-59 (2000).
- [89] Serganov A, Yuan YR, Pikovskaya O, Polonskaia A, Malinina L, Phan AT, Hobartner C, Micura R, Breaker RR and Patel DJ, *Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs*. Chem Biol 11, 1729-1741 (2004).

- [90] Reiter NJ, Osterman A, Torres-Larios A, Swinger KK, Pan T and Mondragon A, *Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA*. *Nature* 468, 784-789 (2010).
- [91] Wang Z, *A matter of life or death*. *World J Biol Chem* 1, 41-54 (2010).
- [92] Isik M, Korswagen HC and Berezikov E, *Expression patterns of intronic microRNAs in Caenorhabditis elegans*. *Silence* 1, 5 (2010).
- [93] Shomron N and Levy C, *MicroRNA - biogenesis and pre-mRNA splicing crosstalk*. *J Biomed Biotechnol* 2009, (2009).
- [94] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH and Kim VN, *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. *EMBO J* 20, 4051-4060 (2004).
- [95] Borchert GM, Lanier W and Davidson BL, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097-1101 (2006).
- [96] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL and Bradley A, *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. *Genome Res* 14, 1902-1910 (2004).
- [97] Ouellet DL, Perron MP, Gobeli LA, Plante P and Provost P, *MicroRNA in gene regulation: when the smallest governs it all*. *J Biomed Biotechnol* 2006, (2006).
- [98] Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT and Kim VN, *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. *Cell* 125, 887-901 (2006).
- [99] Zeng Y and Cullen BR, *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5*. *Nucl Acids Res* 32, 4776-4785 (2004).
- [100] Bartel DP, *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell* 116, 281-297 (2004).
- [101] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N and Zamore PD, *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. *Cell* 115, 199-208 (2003).
- [102] Okamura K, Liu N and Lai EC, *Distinct mechanism for microRNA stranded selection by Drosophila Argonautes*. *Mol Cell* 36, 431-444 (2009).
- [103] Abdelfattah AM, Park C and Choi MY, *Update on non-canonical microRNAs*. *BioMol Concepts* 5, 275-287 (2014).
- [104] Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM and Lai EC, *The mintron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. *Cell* 130, 89-100 (2007).
- [105] Ruby JG, Jan CH and Bartel DP, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. *Nature* 448, 83-86 (2007).
- [106] Cavaille J, Buiting K, Kiefmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J and Huttenhofer A, *Identification of brain-specific*

- and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization.* Proc Natl Acad Sci U. S. A. 97, 14311-14316 (2000).
- [107] Taft RJ, Glazov EA, Lassmann T, Hayashizaki Y, Carninci P and Mattick JS, *Small RNAs derived from snoRNAs.* RNA 15, 1233-1240 (2009).
- [108] Ender C, Krek A, Fridlander MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, Pfeffer S, Rajewsky N and Meister G, *A human snoRNA with microRNA-like functions.* Mol Cell 32, 519-528 (2008).
- [109] Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, B and Ielloch R, *Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs.* Genome Dev 22, 2773-2785 (2008).
- [110] Lee YS, Shibata Y, Malhotra A and Dutta A, *A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs).* Genes Dev 23, 2639-2649 (2009).
- [111] Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM and Hannon GJ, *A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis.* Nature 465, 584-589 (2010).
- [112] Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA and Giraldez AJ, *A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity.* Science 328, 1694-1698 (2010).
- [113] Kozomara A and Griffiths-Jones S, *MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data.* Nucl Acids Res 39, D152-D157 (2011).
- [114] Bogerd HP, Karnowski HW, Cai X, Shin J, Pohlers M and Cullen BR, *A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral microRNAs.* Mol Cell 37, 135-142 (2010).
- [115] Kincaid RP, Burke JM and Sullivan CS, *RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomir.* Proc Natl Acad Sci U. S. A. 109, 3077-3082 (2012).
- [116] Kincaid RP and Sullivan CS, *Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future.* PLOS Pathog 8, e1003018 (2012).
- [117] Kincaid RP, Chen Y, Cox JE, Rethwilm A and Sullivan CS, *Noncanonical microRNA (miRNA) biogenesis gives rise to retroviral mimics of lymphoproliferative and immunosuppressive host miRNAs.* MBio 5, e00074 (2014).
- [118] Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, Gotch F and Boshoff C, *miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator.* Nat Cell Biol 12, 513-519 (2010).
- [119] Braun JE, Huntzinger E, Fauser M and Izaurralde E, *GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets.* Mol Cell 44, 120-133 (2011).

- [120] Wienholds Plasterk RH, *MicroRNA function in animal development*. FEBS Lett 579, 5911-5922 (2005).
- [121] Helak A, Kudla G, Dudnakova T and Tollervey D, *Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding*. Cell 153, 654-665 (2013).
- [122] Orom UA, Nielson FC and Lund AH, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Mol Cell 30, 460-471 (2008).
- [123] Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C and Agami R, *miR-148 targets human DNMT3b protein coding region*. RNA 14, 872-877 (2008).
- [124] Wu L, Fan J and Belasco JG, *MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA*. Proc Natl Acad Sci USA 103, 4034-4039 (2006).
- [125] Nishihara T, Zekri L, Braun JE and Izaurralde E, *miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation*. Nucl Acids Res 41, 8692-8705 (2013).
- [126] Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK and Preiss T, *MicroRNA control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function*. Proc Natl Acad Sci USA 102, 16961-16966 (2005).
- [127] Zdanowicz A, Thermann R, Kowalska J, Jemielity J, Duncan K, Preiss T, Darzynkiewicz E and Hentze MW, *Drosophila miR2 primarily targets the m7G pppN cap structure for translational repression*. Mol Cell 35, 881-888 (2009).
- [128] Wang B, Yanez A and Novina CD, *MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components*. Proc Natl Acad Sci USA 105, 5343-5348 (2008).
- [129] Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J and Sharp P, *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Mol Cell 21, 533-542 (2006).
- [130] Politz JCR, Zhang F and Pederson T, *MicroRNA-206 colocalizes with ribosome-rich regions in both the nucleus and cytoplasm of rat myogenic cells*. Proc Natl Acad Sci USA 103, 18957-18962 (2006).
- [131] Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C, Junermann C and Niepmann M, *MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA*. EMBO J 27, 3300-3310 (2008).
- [132] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Schithauer BW and Kleihues P, *The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system*. Acta Neuropathol 114, 97-109 (2007).
- [133] Adamson C, Kanu O, Mehta A, Di C, Lin N, Mattox AK and Bringer DD, *Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going*. Expert Opin Investig Drugs 18, 1061-1083 (2009).
- [134] Chamberlain MS and Kormanik PA, *Practical guidelines for treatment of malignant gliomas*. West J Med 168, 114-120 (1998).

- [135] Westermarck B, *Glioblastoma - a moving target*. Ups J Med Sci 117, 251-256 (2012).
- [136] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA and Cavenee WK, *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment*. Genes Dev 21, 2683-2710 (2007).
- [137] Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault R, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jaaskelainen J and Ram Z, *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma*. Neuro Oncol 5, 79-88 (2003).
- [138] Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med 352, 987-996 (2005).
- [139] Louis DN, *Molecular pathology of malignant gliomas*. Annu Rev Pathol 1, 97-117 (2006).
- [140] Weil RJ, *Incorporating molecular tools into early-stage clinical trials*. PLOS Med 5, e21 (2008).
- [141] Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM and Farace MG, *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun 334, 1351-1358 (2005).
- [142] Riddick G and Fine HA, *Integration and analysis of genome-scale data from gliomas*. Nat Rev Neurol 7, 439-450 (2011).
- [143] Kim TM, Huang W, Park R and Johnson MD, *A development taxonomy of glioblastoma defined and maintained by microRNAs*. Cancer Res 71, 3387-3399 (2011).
- [144] Srinivasan S, Patric IR and Somasundarman K, *A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma*. PLOS One 6, e17438 (2011).
- [145] Roth P, Wischhusen J, Hoppold C, Chandran PA, Hofer S, Eisele G, Weller M and Keler A, *A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients*. J Neurochem 118, 449-457 (2011).
- [146] D'Urso PI, D'Urso OF, Storelli C, Mallardo M, Gianfreda CD, Montinaro A, Cimmino A, Pietro C and Marsigliante S, *miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumor growth by inhibiting GABA receptors*. Int J Oncol 41, 228-234 (2012).

- [147] Dong H, Siu H, Luo L, Fang X, Jin L and Xiong M, *Investigation gene and microRNA expression in glioblastoma*. BMC Genomics 11, S16 (2010).
- [148] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Stsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA and Lawler S, *Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal*. Cancer Res 68, 9125-9130 (2008).
- [149] Hua D, Mo F, Ding D, Li L, Han X, Zhao N, Foltz G, Lin B, Lan Q and Huang Q, *A catalogue of glioblastoma and brain microRNAs identified by deep sequencing*. OMICS 16, 690-699 (2012).
- [150] Huse JT, Brennan C, Hambarzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T and Holland EC, *The PTEN-regulating miRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo*. Genes Dev 23, 1327-1337 (2009).
- [151] Jiang L, Lin C, Song L, Wu J, Chen B, Ying Z, Fang L, Yan X, He M, Li J and Li M, *MicroRNA-30e* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disturbing the NF-kappaB/IkappaBalpha negative feedback loop*. J Clin Invest 122, 33-47 (2012).
- [152] Lages E, Guttin A, El Atifi M and et al, *MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes*. PLOS One 6, e20600 (2011).
- [153] Lavon I, Zrihan D, Granit A, Einstein O, Fainstein N, Cohen MA, Cohen MA, Zelikovitch B, Shoshan Y, Spektor S, Reubinoff BE, Felig Y, Gerlitz O, Ben-Hur T, Smith Y and Siegal T, *Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells*. Neuro Oncol 12, 422-433 (2010).
- [154] Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Stuhler K, Meyer HE and Reifenberger G, *Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas*. Brain Pathol 20, 539-550 (2010).
- [155] Rao SA, Santosh V and Somasundaram K, *Genome-wide expression profiling identifies dysregulated miRNAs in malignant astrocytoma*. Mod Pathol 23, 1404-1417 (2010).
- [156] Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarezbuylla A and Hodgson JG, *miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells*. BMC Med 6, 14-31 (2008).
- [157] Skalsky RL and Cullen BR, *Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene*. PLOS One 6, e24248 (2011).

- [158] Slaby O, Lakomy R, Fadrus P, Hrstka R, Kren L, Lzicarova E, Smrcka M, Svoboda M, Dolezalova H, Novakova J, Valik D, Vyzula R and Michalek J, *MicroRNA-181 family predicts response to concomitant chemoradiotherapy with temozomide in glioblastoma patients*. *Neoplasma* 57, 264-269 (2014).
- [159] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T and Sander C, *The microRNA.org resource: targets and expression*. *Nucl Acids Res* 36, D149-D153 (2008).
- [160] Stroynowska-Czerwinska A, Fiszer A and Krzyzosiak W, *The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells*. *Cell Mol Life Sci* 71, 2253-2270 (2014).
- [161] Long D, Lee R, Williams P, Chan YCh, Ambros V and Ding Y, *Potent effect of target structure on microRNA function*. *Nat Struct Mol Biol* 14, 287-294 (2007).
- [162] Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Orom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E and Agami R, *RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA*. *Cell* 131, 1273-1286 (2007).
- [163] Jens M and Rajewsky N, *Competition between target sites of regulators shapes post-transcriptional gene regulation*. *Nature Rev Genet* 16, 113-126 (2015).
- [164] Di Giammartino DC, Nishida K and Manley JL, *Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation*. *Mol Cell* 43, 853-866 (2011).
- [165] Borchert GM, Gilmore BL, Spengler RM, Xing Y, Lanier W, Bhattacharya D and Davidson BL, *Adenosine deamination in human transcripts generates novel microRNA binding sites*. *Hum Mol Genet* 18, 4801-4807 (2009).
- [166] Liang H and Landweber LF, *Hypothesis: RNA editing of microRNA target sites in human?* *RNA* 13, 463-467 (2007).
- [167] Sumazion P, Yang X, Chiu HS, Chung WJ, Iyer A, Llobet-Navas D, Rajbhandari P, Bansal M, Guarnieri P, Silva J and Califano A, *An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma*. *Cell* 147, 370-381 (2011).
- [168] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK and Kjems J, *Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges*. *Nature* 495, 384-388 (2013).
- [169] Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ and Pandolfi PP, *A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumor biology*. *Nature* 465, 1033-1038 (2010).
- [170] Cazalla D, Yario T and Steitz J, *Down-regulation of a host micro-RNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA*. *Science* 328, 1563-1566 (2010).
- [171] Chi SW, Zang JB, Mele A and Darnell RB, *Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps*. *Nature* 460, 479-486 (2009).

- [172] Wang B, *Base composition characteristics of mammalian miRNAs*. *J Nucleic Acids* 2013, 951570 (2013).
- [173] Fitzgerald ME and Drohat AC, *Structural studies of RNA/DNA polypurine tracks*. *Chem Biol* 15, 203-204 (2008).
- [174] Alon S and Eisenberg E, *Identifying RNA editing sites in miRNAs by deep sequencing*. *Methods Mol Biol* 1038, 159-170 (2013).
- [175] Mulders SAM, van den Broek WJAA, Whehler TM, Croes HJE, van Kuik-Romeijn P, de Kimpe SJ, Furling D, Platenburg GJ, Gourdon G, Thornton CA, Wieringa B and Wansink DG, *Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 13915-13920 (2009).
- [176] Sobczak K, Michlewski G, de Mezer M, Kierzek E, Krol J, Olejniczak M, Kierzek R and Krzyzosiak WJ, *Structural diversity of triplet repeat RNAs*. *J Biol Chem* 285, 12755-12764 (2010).
- [177] Miller JW, Urbinati CR, Teng-umnuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton ChA and Swanson MS, *Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expressions associated with myotonic dystrophy*. *EMBO J* 19, 4439-4448 (2000).
- [178] Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu A, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, Endres S and Hartmann G, *Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7*. *Nat Med* 11, 263-270 (2005).
- [179] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttlet P, Soond DR, van Dangen S, Grocock RJ, Das PP and Miska EA, *Requirements of bic/microRNA-155 for normal immune function*. *Science* 316, 608-611 (2007).
- [180] Johnnides JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD and Camargo FD, *Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223*. *Nature* 451, 1125-1129 (2008).
- [181] Fontana L, Pelosi LE, Greco P, Racanicchi S, Testa U, Liuzzi F, Croce CM, Brunetti E, Grignani F and Peschle C, *MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation*. *Nat Cell Biol* 9, 775-787 (2007).
- [182] O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G and Baltimore D, *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 1604-1609 (2007).
- [183] Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S and Reis e Sousa C, *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. *Science* 303, 1529-1531 (2004).

- [184] Alexopoulou L, Czopik Holt A, Medzhitov R and Flavell R, *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by toll-like receptor 3*. *Nature* 413, 732-738 (2001).
- [185] Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K and MacLachlan I, *Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA*. *Nat Biotechnol* 23, 457-462 (2005).
- [186] Stewart CR, Karpala AJ, Lowther S, Lowenthal JW and Bean AG, *Immunostimulatory motifs enhance antiviral siRNAs targeting highly pathogenic avian influenza H5N1*. *PLOS One* 6, e21552 (2011).
- [187] Kulkarni M, Ozgur S and Stoecklin G, *On track with P-bodies*. *Biochem Soc Trans* 38, 242-251 (2010).
- [188] Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI and Filipowicz W, *Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress*. *Cell* 125, 1111-1124 (2006).
- [189] Maiti M, Nauwelaerts K, Lescrinier E, Schuit FC and Herdewijn P, *Self-complementary sequence context in mature miRNAs*. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 572-576 (2010).
- [190] Adhikary M, Ganguli S, Das SG and Datta A, *Secondary structural analyses of microRNAs and precursors in Pan troglodytes*. *Int J Comp Biol* 2, 35-37 (2011).
- [191] Das AK, Ganguli S, Gupta S and Datta A, *Secondary structural analysis of microRNA and their precursors in plants*. *Int J Agr Sci* 3, 62-64 (2011).
- [192] Musier-Forsyth K and Chimmel P, *Aminoacylation of RNA oligonucleotides: minimalist structures and origin of specificity*. *FESEB J* 7, 282-289 (1993).
- [193] Mashima T, Matsugami A, Nishikawa F, Nishikawa S and Katahira M, *Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein*. *Nucl Acids Res* 37, 6249-6258 (2009).
- [194] Popena M, Szachniuk M, Antczak M, Purzycka KJ, Lukasik P, Bartol N, Blazewicz J and Adamiak RW, *Automated 3D structure composition for large RNAs*. *Nucl Acids Res* 40, e112 (2012).
- [195] Cormack BP, Valdivia RH and Falkow S, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. *Gene* 173, 33-38 (1996).
- [196] Digweed M, Pieler T and Erdmann VA, *RNA sequencing, Advanced Methods in Protein Microsequencing*. Springer-Verlag Heidelberg (1986).
- [197] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York I, 4.7.1-4.7.6 (1994).
- [198] Farrell RE, *RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization*. Elsevier Academic Press, London (2005).
- [199] Hu HY, Guo S, Xi J, Yan Z, Fu N, Zhang X, Menzel H, Liang H, Yang H, Zhao M, Zeng R, Chen W, Paabo S and Khaitovich P, *MicroRNA expression*

- and regulation in human, chimpanzee, and macaque brains*. PLOS Genet 7, e1002327 (2011).
- [200] Smyth GK, *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol 3, (2004).
- [201] You QM, Veldhoen N, Baudin F and Romaniuk PJ, *Mutations in 5S DNA and 5S RNA have different effects on the binding of Xenopus transcription factor IIIA*. Biochemistry 30, 2495-2500 (1991).
- [202] Barciszewska MZ, Lorenz S, Erdmann VA and Barciszewski J, *Structural analysis of plant ribosomal 5S RNAs. Visualisation of novel tertiary interactions by cleavage of lupin and wheat 5S rRNAs with ribonuclease H*. Biochim Biophys Acta 1087, 68-72 (1990).
- [203] Bernhart SH, Tafer H, Muckstein U, Flamm C, Stadler PF and Hofacker IL, *Partition function and base pairing probabilities of RNA heterodimers*. Algorithms Mol Biol 16, 3 (2006).
- [204] Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neubock R and Hofacker IL, *The Vienna RNA Websuite*. Nucl Acids Res 36, W70-W74 (2008).
- [205] Laemmli UK, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227, 680-685 (1970).
- [206] Hall TA, *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl Acids Symp Ser 41, 95-98 (1999).
- [207] Loftus JC, Ross JT, Paguette KM, Paulino VM, Nasser S, Yang Z, Kloss J, Kim S, Berens ME and Tran NL, *miRNA expression profiling in migrating glioblastoma cells: regulation of cell migration and invasion by miR-23b via targeting of Pyk2*. PLOS One 7, e39818 (2012).
- [208] Lang MF, Yang S, Zhao C, Sun G, Murai K, Wu X, Wang J, Gao H, Brown CE, Liu X, Zhou J, Peng L, Rossi JJ and Shi Y, *Genome-wide profiling identified a set of miRNAs that are differentially expressed in glioblastoma stem cells and normal neural stem cells*. PLOS One 7, e36248 (2012).
- [209] Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Maghnouj A, Zollner H, Schmiegel W, Hahn S and Schroers R, *Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma*. Neuro Oncol 14, 29-33 (2012).
- [210] Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri FF, Maio F, Cama A, Germano A, Vita G and Tomasello F, *miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors*. J Neurooncol 93, 325-332 (2009).
- [211] Jiang L, Mao P, Song L, Wu J, Huang J, Chuyong L, Yuan J, Qu L, Cheng S-Y and Li J, *miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival*. Am J Pathol 177, 29-38 (2010).

- [212] Sun L, Yan W, Wang Y, Sun G, Luo H, Zhang J, Wang X, You Y, Yang Z and Liu N, *MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression via HOXD10*. *Brain Res* 1389, 9-18 (2011).
- [213] Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z and You Y, *hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells*. *Brain Res* 1236, 185-193 (2008).
- [214] Ragan Ch, Zuker M and Ragan MA, *Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations*. *PLOS Computational Biology* 7, e1001090 (2011).
- [215] www.bioNumbers.org . www bioNumbers org (2013).
- [216] Janas MM, Wang B, Harris AS, Aquiar M, Shaffer JM, Subrahmanyam YV, Behlke MA, Wucherpfennig KW, Gygi SP, Gagnon E and Novina CD, *Alternative RISC assembly: binding and repression of microRNA-mRNA duplexes by human Ago proteins*. *RNA* 18, 2041-2055 (2012).
- [217] Grune M, Furstel JP, Klussmann S, Erdmann V and Brown LR, *Detection of multiple conformations of the E-domain of 5S rRNA from Escherichia coli in solution and in crystals by NMR spectroscopy*. *Nucl Acids Res* 24, 2592-2596 (1996).
- [218] Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, Irving AT, Behlke MA, Hertzog PJ, Mackay F and Williams BRG, *Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation*. *Nucleic Acids Res* 39, 5692-5703 (2011).
- [219] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL and Massague J, *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. *Nature* 451, 147-154 (2008).
- [220] Stalder L, Heusermann W, Sokol L, Trojer D, Wirz J, Hean J, Fritzsche A, Aeschmann F, Pfanzagi V, Basselet P, Weiler J, Hintersteiner M, Morrissey DV and Meisner-Kober NC, *The rough endoplasmic reticulum is a nucleation site of siRNA-mediated RNA silencing*. *EMBP J* 32, 1115-1127 (2013).
- [221] Flores O, Nakayama S, Whisnant AW and et al, *Mutational inactivation of herpes virus 1 microRNAs identifies viral mRNA targets and reveals phenotypic effects in culture*. *J Virol* 87, 6589-6603 (2013).
- [222] Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A and Gerlach WL, *Catalytic nucleic acids: from lab to applications*. *Pharmacol Rev* 52, 325-347 (2000).
- [223] Fedor M and Uhlenbeck OC, *Substrate sequence effects on 'hammerhead' RNA catalytic efficiency*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1668-1672 (1990).
- [224] Kurreck J, Bieber B, Jahnle R and Erdmann VA, *Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA and the vanilloid receptor subtype I*. *J Biol Chem* 277, 7099-7107 (2002).

- [225] Hertel KJ, Herschlag D and Uhlenbeck OC, *A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction*. *Biochemistry* 33, 3374-3385 (1994).
- [226] Scaloni KJ, *Anti-genes: siRNA, ribozymes and antisenses*. *Curr Pharma Biotech* 5, 415-420 (2004).
- [227] Gabryelska MM, Wyszko E, Szymanski M, Popeda M and Barciszewski J, *Prediction of hammerhead ribozyme intracellular activity with catalytic core fingerprint*. *Biochem J* 451, 439-451 (2013).
- [228] Fedoruk-Wyszomirka A, Szymanski M, Wyszko E, Barciszewska MZ and Barciszewski J, *Highly active low magnesium hammerhead ribozyme*. *J Biochem* 145, 451-459 (2009).
- [229] Santoro SW and Joyce GF, *Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme*. *Biochemistry* 37, 13330-13342 (1998).
- [230] Cairns MJ, King A and Sun LQ, *Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites*. *Nucl Acids Res* 31, 2883-2889 (2003).
- [231] Abdelgany A, Uddin MK, Wood M, Taira K and Beeson D, *Design of efficient DNAzymes against muscle AChR alpha-subunit cRNA in vitro and HEK 298 cells*. *J RNAi and gene silencing* 1, 88-96 (2005).
- [232] Ibrahim AF, Weirauch U, Thomas M, Gruweller A, Hartmann RK and Aigner A, *MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma*. *Cancer Res* 71, 5214-5224 (2011).
- [233] Pramanik D, Campbell NR, Karikari C, Chivukula R, Kent OA, Mendell JT and Maitra A, *Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibitors pancreatic cancer growth in mice*. *Mol Cancer Ther* 10, 1470-1480 (2011).
- [234] Ferre-D'Amare AR and Scott WG, *Small self-cleaving ribozymes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003574 (2010).
- [235] Khorova A, Lescoute A, Westhof E and Jayasena SD, *Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity*. *Nat Struct Biol* 10, 708-712 (2003).
- [236] Murray JB, Seyhan AA, Walter NG, Burke JM and Scott WG, *The hammerhead, hairpin and vs. ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone*. *Chem Biol* 5, 587-595 (1998).
- [237] Curtis EA and Bartel DP, *The hammerhead cleavage reaction in monovalent cations*. *RNA* 7, 546-552 (2001).
- [238] Frieisinger E and Sigel RKO, *From nucleotides to ribozymes - a comparison of their metal ion binding properties*. *Coord Chem Rev* 251, 1834-1851 (2007).

- [239] Stahley MR and Strobel SA, *Structural evidence for a two-metal-ion mechanism of group I intron splicing*. Science 309, 1587-1590 (2014).
- [240] Stage-Zimmermann TK and Uhlenbeck OC, *Hammerhead ribozyme kinetics*. RNA 4, 875-889 (1998).
- [241] Uetani T, Matsubara T, Nomura H, Murohara T and Nakayama S, *Ca²⁺ - dependent modulation of intracellular Mg²⁺ concentration with amiloride and KB-R7943 in pig carotid artery*. J Biol Chem 278, 47491-47497 (2000).
- [242] Hodak JH, Downey CD, Fiore JL, Pardi A and Nesbitt DJ, *Docking kinetics and equilibrium of a GAA tetraloop-receptor motif probed by single-molecule FRET*. Proc Natl Acad Sci USA 102, 10505-10510 (2005).
- [243] Nguyen P and Qin PZ, *RNA dynamics: perspectives from spin labels*. Wiley Interdiscip Rev RNA 3, 62-72 (2011).
- [244] Fiore JL, Kraemer B, Koberling F, Edmann R and Nesbitt DJ, *Enthalpy-driven RNA folding: single-molecule thermodynamics of tetraloop-receptor tertiary interaction*. Biochemistry 48, 2550-2558 (2009).
- [245] Amarzguioui M, Brede G, Babaie E, Grotli M, Sproat B and Prydz H, *Secondary structure prediction and in vitro accessibility of miRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes*. Nucl Acids Res 28, 4113-4124 (2000).
- [246] Kurzynska-Kokorniak A, Koralewska N, Tyczewska A, Twardowski T and Figlerowicz M, *A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation on microRNA processing by Dicer*. PLOS One 8, e77703 (2013).
- [247] Gumireddy K, Young DD, Xiong X, Hogenesch J, Huang Q and Deiters A, *Small molecule inhibitors of microRNA miR-21 function*. Angew Chem Int Ed Engl 47, 7482-7484 (2008).
- [248] Kurreck J, *Antisense technologies. Improvement through novel chemical modification*. Eur J Biochem 270, 1628-1644 (2003).
- [249] Campbell JM, Bacon TA and Wickstorm E, *Oligodeoxynucleotide phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid*. J Biochem Biophys Methods 20, 259-267 (1990).
- [250] Flory CM, Pavco PA, Jarvis TC, Lesch ME, Wincott FE, Beigelman L, Hunt SW and Schrier DJ, *Nuclease-resistant ribozymes decrease stromelysin mRNA levels in rabbit synovium following exogenous delivery to the knee joint*. Proc Natl Acad Sci USA 93, 754-758 (1996).
- [251] Aigner A, Fischer D, Merdan T, Brus C, Kissel T and Czubayko F, *Delivery of unmodified bioactive ribozymes by an RNA-stabilizing polyethylenimine (LMW-PEI) efficiently down-regulates gene expression*. Gene Ther 9, 1700-1707 (2002).

STRESZCZENIE

Kierując się chęcią zrozumienia molekularnych podstaw nowotworów glejowych mózgu, w oparciu o analizę mikromacierzową, określiłam profil miRNA w tkankach GBM. Jest on istotnie zmieniony w porównaniu z profilem miRNA w komórkach zdrowych pochodzenia mózgowego. Wytypowałam miRNA, miR-21, miR10b, miR-15b, miR-93 oraz miR-296, których poziom jest znacząco wyższy w tkankach guza w porównaniu ze zdrową kontrolą. Próbując zrozumieć wielofunkcyjność, a zarazem specyficzność ich działania, z wykorzystaniem metod biochemicznych oraz spektroskopii NMR, UV oraz CD określiłam ich strukturę. Po raz pierwszy pokazałam, że miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b oraz miR-15b przyjmują strukturę drugorzędową, miR-21, miR-93 oraz miR-296 zarówno strukturę spinki do włosów jak i dupleks, miR10b i miR-15b w badanych warunkach jedyne homodupleksy. Spinki do włosów oraz dupleksy miR-21, miR-93 oraz miR-296 współistnieją w warunkach wykonanych eksperymentów, a równowaga między tymi formami zależy od stężenia RNA, temperatury oraz siły jonowej badanego roztworu RNA. Biorąc pod uwagę fakt, że stężenie pojedynczego miRNA w komórce z reguły jest niższe niż 200 pM postuluje, że spinka do włosów miRNA jest dominującą w komórce.

Do niedawna uważano, że miRNA funkcjonują jedynie w kompleksie RISC. Pokazałam, że miRNA mogą występować w komórce w postaci spinki do włosów i/lub dupleksu, co może przekładać się na ich właściwości, dostępność i funkcje. Istnieje zależność między trwałością miRNA przyjmujących strukturę spinki do włosów, a energią tych spinek. Struktura miRNA chroni je przed działaniem nukleaz komórkowych, w efekcie odgrywa istotną rolę w regulacji poziomu miRNA w komórce. Ponad to, struktura miRNA wpływa na termodynamikę oddziaływań mRNA-miRNA, w efekcie na zależną od miRNA regulację ekspresji genów. Motyw spinki do włosów znany jest jako miejsce kontaktu RNA z innymi kwasami nukleinowymi i białkami. Zaobserwowałam podobieństwo sekwencji miRNA i innych krótkich RNA których funkcja determinowana jest przez ich strukturę, m.in. tRNA, minihelis tRNA, aptamerów RNA. Na tej podstawie zasugerowałam, że spinki do włosów miRNA, podobnie jak wspomniane RNA, mogą bezpośrednio, niezależnie od kompleksu RISC, oddziaływać z białkami. Potwierdziłam to eksperymentalnie. Sugeruje to nowy mechanizm działania miRNA i jest krokiem do zrozumienia zależnych od miRNA

mechanizmów regulacji komórkowej oraz patogenezy chorób, w tym nowotworów glejowych mózgu, u podłoża których leżą te krótkie niekodujące RNA.

Dodatkowo, w odpowiedzi na brak skutecznych metod leczenia nowotworów glejowych mózgu, ich oporności na konwencjonalne metody leczenia, zaprojektowałam katalityczne kwasy nukleinowe, rybozomy typu hammerhead oraz DNAzomy, skierowane zarówno na pre-miRNA jak i ich formy dojrzałe. Precyzyjnie, z dokładnością do 1 nt, i wydajnie rozpoznają one oraz hydrolizują swoje cele. Ich skuteczność potwierdziłam w warunkach komórkowych. Otrzymane wyniki wskazują, że dojrzałe miRNA są łatwiejszym celem działania dla katalitycznych kwasów nukleinowych niż pri- i pre-miRNA. Uzyskany poziom wyciszenia miRNA jest sumarycznym efektem działania katalitycznych kwasów nukleinowych na poziomie miRNA i ich prekursorów. Obrazuje to przewagę narzędzi anty-miRNA działających zarówno na poziomie dojrzałych miRNA i ich prekursorów nad tymi, które hydrolizują jedynie pre- i/lub pre-miRNA. Efektywność i precyzja działania katalitycznych kwasów nukleinowych oraz łatwość ich dostarczenia do komórek z użyciem kationów lipidowych świadczą dużym potencjale aplikacyjnym tych narzędzi w terapii chorób związanych z zaburzeniami poziomu miRNA.

ABSTRACT

Aiming at understanding of molecular basis of gliomagenesis, based on microarray analysis, we provided a comprehensive overview of miRNA signature in malignant gliomas and proposed a set of miRNAs, which expression is the most frequently deregulated. It includes GBM oncomirs: miR-21, miR-93, miR-296, miR-10b and miR-15b,. Using specific nucleases, T1, V1 and S1 as well as NMR, UV/Vis and CD spectroscopies, I found that miR-21, miR-93 and miR-296 can adopt hairpin and/or homoduplex structures, miR-10b and miR-15b under experimental condition only duplexes. The partitioning of individual miRNAs among intra- and intermolecular conformations is governed by both kinetic and thermodynamic factors, and in general depends on ionic conditions and miRNA concentration. I expect that in an average cellular miRNA concentration (below 200 pM), majority of miRNAs which are not knotted in RISC complex, exist as hairpins. The knowledge of the miRNA structure may give a new insight into specificity of miRNA-dependent gene regulation beyond RISC and may be a step forward in the understanding their function and involvement in cancerogenesis,

The generally accepted model of the miRNA-guided RNA down-regulation suggests that mature miRNA functions within RISC complex and targets mRNA in a nucleotide sequence-specific manner. However, miRNAs adopt secondary structure, which may have functional consequences. I have shown that miRNA stability correlates with ΔG of their structure. miRNA structure determines resistance to nucleases, which explain the distinct turnover time for the different miRNAs. Moreover, miRNA structure may affect the thermodynamics of the mRNA-miRNA, and as a result also miRNA-dependent regulation of gene expression. Looking for new functional consequences of miRNA structure, I perceived that sequences of selected miRNAs and other short, structural and functional non-coding RNAs, such as tRNAs, tRNA minihelis, RNA aptamers, are similar. It indicates that miRNAs may function also beyond RISC and are even more sophisticated regulators, that it was previously expected.

Currently, invariably for many years, the glioblastoma therapy includes surgical reaction and adjuvant radiotherapy and chemotherapy. Despite they are very aggressive do not prolong patients survival satisfactory. Therefore there is a constant need for progress in both understanding of the molecular basis of the disease and in new therapeutic approaches. I designed catalytic nucleic acids, hammerhead ribozymes and

DNAzymes, for inactivation of both miRNA and their precursors. They specifically and highly effectively hydrolyze both miRNAs (preferentially) and their precursors, and thus lower oncomiRs level in the cells.