

PRACA DOKTORSKA

Badania procesu interferencji RNA
sekwencji powtórzonych CAG i CUG
w kontekście terapii choroby Huntingtona
i niektórych ataksji rdzeniowo-mózdkowych

Agnieszka Fiszer

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Włodzimierza J. Krzyżosiaka

Pracownia Biomedycyny Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2012

*Dziękuję Panu Profesorowi Włodzimierzowi Krzyżosiakowi
za przekazaną wiedzę, ukierunkowanie zainteresowań naukowych,
cenne dyskusje w trakcie prowadzenia badań
oraz uwagi w trakcie przygotowania niniejszej rozprawy.*

*Serdecznie dziękuję Koleżankom i Kolegom z Pracowni
za pomoc, wsparcie oraz pozytywną i motywującą atmosferę w pracy.*

*Gorąco dziękuję Rodzinie i Najbliższym, w szczególności Remigiuszowi
za nieustające wsparcie.*

SPIS TREŚCI

I. WSTEP **6-34**

1. Wprowadzenie	6
2. Endogenne mechanizmy i wybrane strategie wyciszania ekspresji genów w komórkach ssaczych	7
2.1 REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PRZEZ MIRNA	8
2.1.1 Biogeneza miRNA	8
2.2.1 Mechanizm działania miRNA	8
2.2 INTERFERENCJA RNA / CHARAKTERYSTYKA I DZIAŁANIE SIRNA	10
2.2.1 Mechanizm działania siRNA	10
2.2.2 Budowa i działanie RISC	12
2.2.3 Zasady projektowania siRNA naczelnianych na regiony SNP	17
2.3 CHARAKTERYSTYKA I DZIAŁANIE OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSSENSOWYCH	18
2.4 CHARAKTERYSTYKA I DZIAŁANIE AGRNA	19
3. Charakterystyka chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych	21
3.1 CHARAKTERYSTYKA POWTÓRZEŃ TRÓJNUKLEOTYDOWYCH I WYBRANYCH CHORÓB POLIQ	21
3.2 CHOROBA HUNTINGTONA	24
3.3 ATAKSJA RDZENIOWO-MÓZDŻKOWA TYPU 3	25
3.4 ATAKSJA RDZENIOWO-MÓZDŻKOWA TYPU 1	26
4. Strategie wyciszania ekspresji genów TREDs	27
4.1 PODEJŚCIA TERAPEUTYCZNE Z WYKORZYSTANIEM OLIGONUKLEOTYDÓW DLA TREDs	27
4.2 STRATEGIA CELOWANIA W REGION SNP DLA HD, SCA3 I SCA7	28
4.3 STRATEGIA CELOWANIA W REGION POWTÓRZEŃ DLA WYBRANYCH TREDs	30
4.4 STRATEGIE TERAPEUTYCZNE DLA CHORÓB POLIGLUTAMINOWYCH TESTOWANE NA MODELACH ZWIERZĘCYCH	32

II. CEL BADAŃ **35**

III. WYNIKI **36-80**

1. Wprowadzenie	36
2. Wyciszanie nie-allelo-selektywne	37
3. Strategia celowania w region SNP	39

3.1 WYBÓR WARIANTÓW SNP DO TESTOWANIA STRATEGII	39
3.2 CELOWANIE W SNP DLA SCA3	40
3.2.1 Wybór SNP i projektowanie reagentów	40
3.2.2 Aktywność siRNA w komórkach SCA3	41
3.3 CELOWANIE W SNP DLA HD	42
3.3.1 Wybór SNP i projektowanie reagentów	42
3.3.2 Aktywność siRNA w komórkach HD	43
3.4 CELOWANIE W SNP DLA SCA1	44
3.4.1 Wybór SNP i projektowanie reagentów	44
3.4.2 Aktywność siRNA w komórkach SCA1	45
3.5 PODSUMOWANIE WYNIKÓW CELOWANIA W SNP	46
4. Strategia celowania w region powtórzeń trójnukleotydowych	47
4.1 WYKORZYSTANIE TYPOWYCH REAGENTÓW INTERFERENCJI RNA	47
4.1.1 Charakterystyka działania siRNA złożonego z sekwencji powtórzonych CAG/CUG	47
4.1.2 Porównanie efektywności siRNA działających na sekwencje specyficzne lub powtórzone genu <i>HTT</i>	49
4.1.3 Wykrywanie wprowadzanych do komórek RNA złożonych z sekwencji powtórzonej	50
4.1.4 Badanie mechanizmu działania siRNA na sekwencje powtórzone CAG/CUG	52
4.2 MODYFIKACJE SEKWENCJI REAGENTÓW ZŁOŻONYCH Z POWTÓRZEŃ	54
4.2.1 Projektowanie modyfikowanych reagentów	54
4.2.2 Testowanie reagentów w liniach HD	55
4.2.2.1 Analiza efektów działania reagentów przeprowadzona dla RNA i białka	55
4.2.2.2 Testowanie reagentów ze skróconą nicią sensową	59
4.2.2.3 Analiza wyciszenia transkryptu i białka huntingtyny w zależności od czasu	60
4.2.3 Testowanie reagentów w linii SCA3	61
4.2.3.1 Analiza wyciszenia transkryptu i białka <i>ATXN3</i>	61
4.2.3.2 Analiza wyciszenia transkryptu i białka <i>ATXN3</i> w zależności od czasu	62
4.2.3.3 Identyfikacja miejsc cięcia transkryptu przez RISC	64
4.2.4 Badania toksyczności reagentów	65
4.3 SAMODUPLEKSUJĄCE REAGENTY ZŁOŻONE Z SEKWENCJI POWTÓRZONEJ	66
4.3.1 Projektowanie i charakterystyka reagentów	66
4.3.2 Testowanie reagentów w liniach HD	71
4.3.2.1 Wstępne testowanie 31 <i>sd-miRNA</i>	71
4.3.2.2 Zależności stężeniowe dla 15 <i>sd-miRNA</i>	72
4.3.2.3 Aktywność <i>sd-miRNA</i> w innych liniach HD	74
4.3.2.4 Analiza wyciszenia transkryptu i białka <i>HTT</i> w zależności od czasu	75

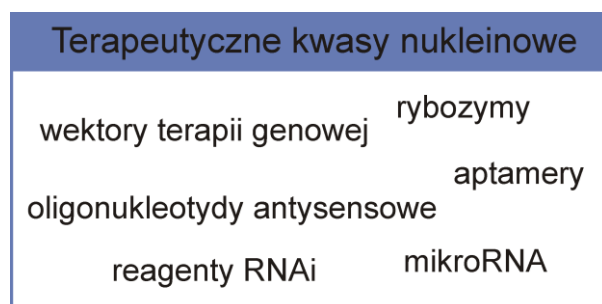
4.3.2.5 Analiza wpływu wybranych sd-miRNA na ekspresję genów zawierających normalne ciągi powtórzeń CAG lub CTG	77
4.3.2.6 Badania toksyczności sd-miRNA	78
4.4 MODYFIKACJE CHEMICZNE REAGENTÓW ZŁOŻONYCH Z POWTÓRZEŃ	78
4.4.1 Projektowanie reagentów	78
4.4.2 Testowanie reagentów w linii HD	79
IV. DYSKUSJA	81-91
1. Porównanie strategii wyciszania ekspresji genów odpowiedzialnych za choroby poliglutaminowe	81
2. Interferencja sekwencji powtórzonych CAG/CUG	84
3. Mechanizm działania różnych reagentów złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych	86
4. Perspektywy	91
V. STRESZCZENIE	92-93
VI. MATERIAŁY I METODY	94-113
VII. WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW	114-115
VIII. BIBLIOGRAFIA	116-128
IX. WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH WYNIKIEM PRACY DOKTORSKIEJ	129
X. ŹRÓDŁA FINANSOWANIA BADAŃ	130

I. WSTĘP

1. Wprowadzenie

Niektóre choroby człowieka są wywoływane przez mutację w pojedynczym genie, co prowadzi do utraty funkcji genu lub nabycia przez niego szkodliwych dla komórki właściwości. W przypadku nabycia toksycznych cech ekspresja zmutowanego genu uruchamia kaskadę zdarzeń prowadzących do wystąpienia objawów choroby. Różne podejścia terapeutyczne mogą mieć na celu zatrzymanie na określonym etapie tej kaskady lub łagodzenie objawów przez znoszenie toksycznego efektu zmutowanego genu.

Różnego rodzaju strategie terapeutyczne z wykorzystaniem kwasów nukleinowych były rozwijane na przestrzeni ostatnich 30 lat (Ryc. 1) (Rayburn i Zhang 2008; Burnett i Rossi 2012; Watts i Corey 2012). Bardzo atrakcyjne wydaje się podejście prowadzące do wyeliminowania bezpośredniej przyczyny choroby, czyli ekspresji zmutowanego genu. To podejście może być realizowane na różne sposoby, m.in. przez zahamowanie transkrypcji genu, indukcję degradacji transkryptu czy blokadę translacji białka. Induktorami tych procesów są wprowadzane do komórek kwasy nukleinowe, z reguły w postaci krótkich oligonukleotydów. Takie reagenty oddziałują z sekwencjami komplementarnymi i mogą aktywować specyficzną maszynę białkową.

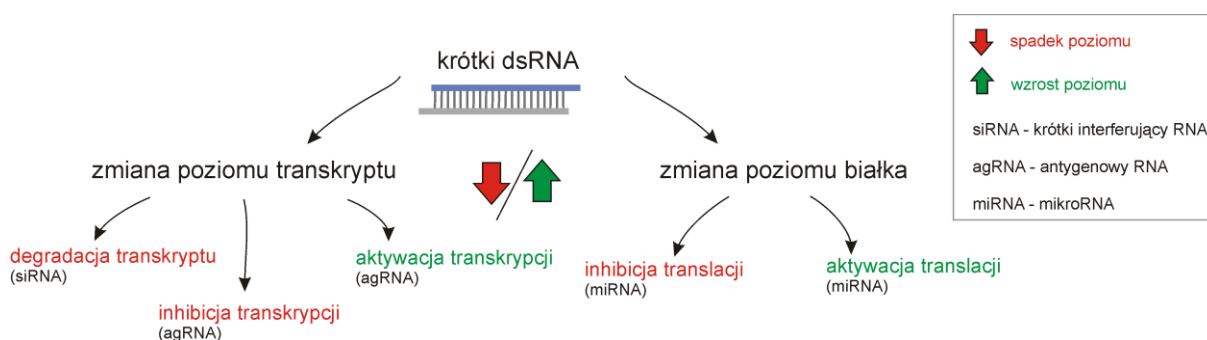


Rycina 1. Główne typy terapeutycznych kwasów nukleinowych wykorzystywane obecnie w badaniach biomedycznych mających na celu zwalczanie chorób człowieka.

Podejścia terapeutyczne wykorzystujące wprowadzane do komórek oligonukleotydy są rozwijane m.in. dla grupy chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych. W przypadku tych schorzeń mutacja występująca w jednym allelu genu prowadzi do indukcji patogenezy w określonych tkankach. Proponowane strategie hamujące ekspresję zmutowanego genu mogą stanowić skuteczną metodę leczenia.

2. Endogenne mechanizmy i wybrane strategie wyciszania ekspresji genów w komórkach ssaczych

Istnieje szerokie spektrum swoistych komórkowych procesów aktywowanych przez krótkie dwuniciowe RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*). Wiedza o nich może być wykorzystana do projektowania narzędzi terapeutycznych. Należy mieć jednak na uwadze, że działanie krótkich dsRNA może powodować nie tylko obniżanie poziomu ekspresji genu, ale niekiedy również podwyższanie poziomu transkryptu i/lub białka (Ryc. 2).



Rycina 2. Główne szlaki działania krótkich dwuniciowych RNA w komórce oraz znane induktory tych szlaków.

Regulacja ekspresji genu może być osiągnięta na etapie jego transkrypcji (TGS, ang. *transcriptional gene silencing*) i potranskrypcyjnie (PTGS, ang. *posttranscriptional gene silencing*). W transkrypcyjnej regulacji biorą udział agRNA (antygenowe RNA, ang. *antigene RNA*) oddziałujące w regionach promotorowych. Najlepiej poznane mechanizmy wyciszania potranskrypcyjnego są związane z cząsteczkami siRNA (ang. *short interfering RNA*) oraz miRNA (mikroRNA). Te krótkie, około 22-nt, dwuniciowe RNA wykorzystują w komórce podobną maszynę białkową w oddziaływaniu z sekwencjami komplementarnymi. Dla rozróżniania krótkich dsRNA jako miRNA lub siRNA, stosuje się kryterium pochodzenia i funkcjonalności tych cząsteczek, natomiast samo ich działanie, na zasadzie inhibicji translacji lub degradacji transkryptu, jest zamienne, tyle że częściej opisywane dla miRNA lub siRNA. Działanie miRNA to powszechny w komórkach roślinnych i zwierzęcych mechanizm regulacji ekspresji genów, natomiast komórkowe siRNA powstają zwykle w wyniku infekcji wirusem oraz dwukierunkowej transkrypcji, i są też powszechnym narzędziem wprowadzanym do komórek w celu wyciszania ekspresji genów.

Induktorem mechanizmów prowadzących do regulacji ekspresji genu mogą być także jednoniciowe oligonukleotydy, takie jak: oligonukleotydy antysensowe, katalityczne kwasy

nukleinowe (np. rybozymy), czy aptamery (w odróżnieniu od poprzednich nie oddziałujące z transkryptami, ale bezpośrednio białkami i modulujące ich aktywność).

2.1 Regulacja ekspresji genów przez miRNA

2.1.1 Biogeneza miRNA

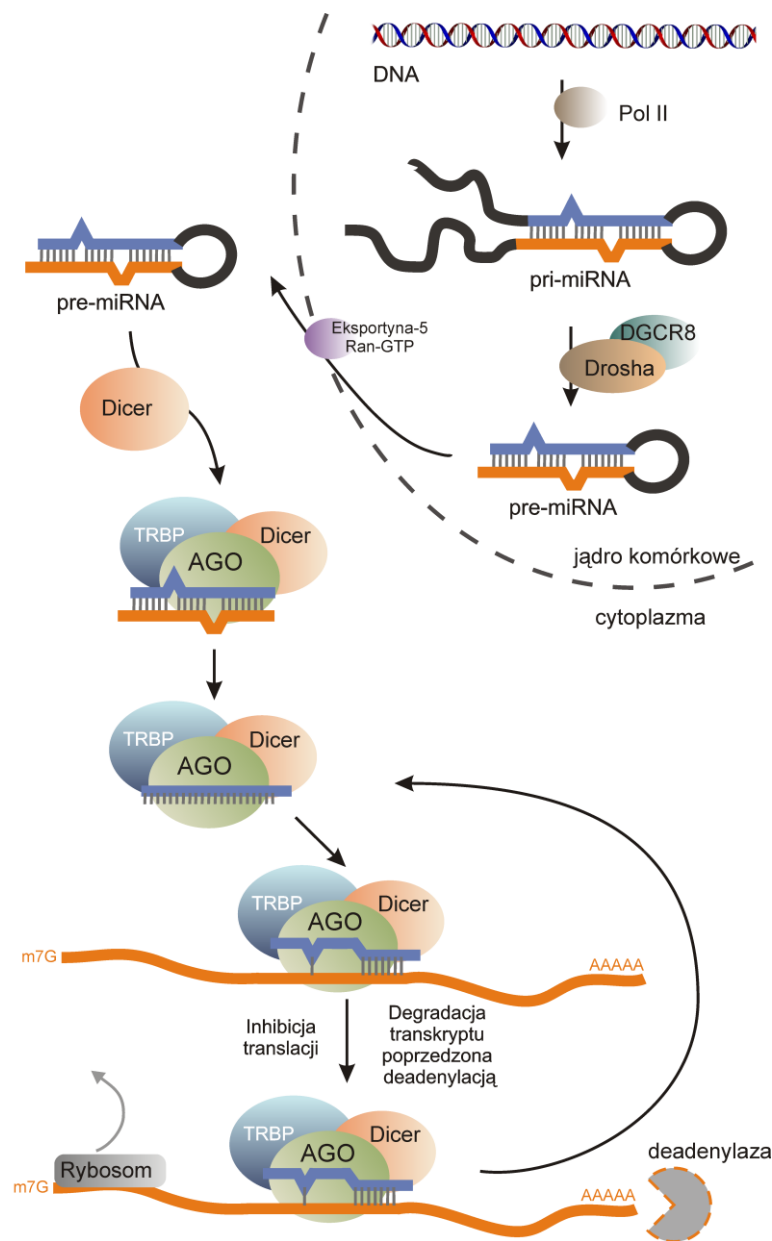
U człowieka, jak się szacuje, około 1500 różnych miRNA reguluje ekspresję większości genów kodujących białka. Ekspresja genów kodujących miRNA jest zależna od rodzaju tkanki, stadium rozwoju, jak również zmienna w przypadku różnych chorób (Ambros 2004; Bartel 2004).

Za transkrypcję genów miRNA odpowiedzialna jest głównie Polimeraza RNA II. Pierwszy etap obróbki pierwotnego prekursora pri-miRNA zachodzi w jądrze gdzie ulega on przycięciu do pre-miRNA z udziałem kompleksu Mikroprocesora (cały szlak biogenezy przedstawiony skrótowo na Ryc. 3). Trzon tego kompleksu tworzą rybonukleaza Drosha i białko DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (Gregory i wsp. 2004). Cechą charakterystyczną pre-miRNA jest jego struktura typu spinki (ang. *hairpin*), składająca się z kilkunukleotydowej pętli oraz trzonu zawierającego niesparowania oraz wybrzuszenia nukleotydów. Pre-miRNA z udziałem Eksportyny-5 zostaje przetransportowany do cytoplazmy gdzie jest rozpoznawany przez rybonukleazę Dicer, która działając w kompleksie z białkowymi partnerami TRBP (ang. *TAR RNA binding protein*) i AGO wycina z pre-miRNA dupleks zawierający miRNA (Hutvagner i wsp. 2001; Liu i wsp. 2004; Chendrimada i wsp. 2005). Dicer, podobnie jak Drosha, należy do rybonukleaz typu III, składa się m.in. z 2 domen o aktywności RNazy, domeny wiążącej dsRNA, domeny PAZ i helikazowej (Zhang i wsp. 2004). Charakterystyczne dla reakcji katalizowanych przez Drosha i Dicer jest pozostawianie 2-nt niesparowanych końców 3' po przecięciu dsRNA.

2.2.1 Mechanizm działania miRNA

Dupleks miRNA funkcjonuje w kompleksie białkowym miRISC (ang. *miRNA-induced silencing complex*), który po zaprogramowaniu przez jedną z nici miRNA poszukuje sekwencji komplementarnych w cząsteczkach mRNA, przyłącza się do nich i potranskrypcyjnie wpływa na ekspresję genu (Martinez i wsp. 2002; Gregory i wsp. 2005). U roślin zwykle miRNA wykazują prawie pełną komplementarność do sekwencji zlokalizowanych w regionach kodujących lub 3'UTR transkryptu, co skutkuje degradacją

mRNA. Taki mechanizm jest typowo związany z działaniem siRNA w komórkach zwierzęcych i zostanie opisany w następnym rozdziale.



Rycina 3. Główny szlak biogenezy i dominujący mechanizm działania miRNA w komórkach zwierzęcych. Opis w tekście.

W komórkach zwierzęcych, sekwencje docelowe dla miRNA są zlokalizowane głównie w regionie 3'UTR transkryptu. Dla aktywności miRNA wymagane jest zwykle oddziaływanie tylko 6-8 nt z sekwencją w transkrypcie, przy czym kluczowe jest wiązanie nukleotydów zlokalizowanych na końcu 5' nici miRNA, tworzący tzw. region *seed*. Aby proces wyciszania ekspresji genu zachodził efektywnie wymagana jest zwykle obecność kilku miejsc wiązania miRNA w 3'UTR danego mRNA. Ponadto, dla efektywnego oddziaływania miRNA z sekwencją komplementarną lub częściowo komplementarną istotne są różne

czynniki, m.in. pełne oddziaływanie sekwencji *seed* miRNA z sekwencją docelową (Lewis i wsp. 2003; Doench i Sharp 2004) oraz dostępność tej sekwencji (Kertesz i wsp. 2007). MiRNA funkcjonuje w kompleksie rybonukleoproteinowym RISC. Najważniejszym składnikiem kompleksu RISC jest białko z grupy Argonaute (AGO). W komórkach ssaczych zidentyfikowano 4 białka AGO: AGO1, AGO2, AGO3 i AGO4, z których tylko AGO2 posiada zdolność katalityczną przecinania mRNA. Poszczególne białka AGO różnią się między sobą poziomem ekspresji w różnych komórkach. Wszystkie z białek AGO mogą uczestniczyć w zależnej od miRNA inhibicji translacji (Su i wsp. 2009). miRNA mogą także indukować degradację transkryptu w sposób niezależny od AGO2. Proces deadenylacji mRNA może być zaangażowany w ten mechanizm (Wu i wsp. 2006).

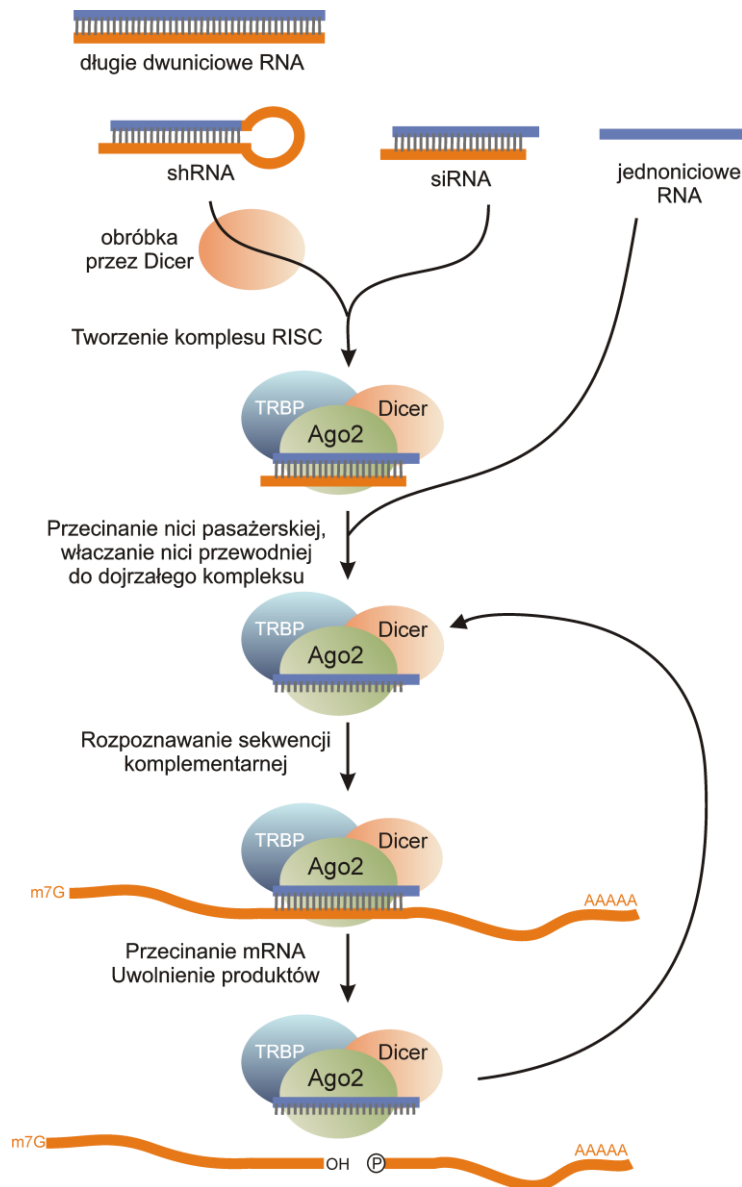
Do niedawna uważano, że mechanizm działania miRNA w komórkach ssaczych polega głównie na inhibicji translacji. Translacja może być hamowana z udziałem miRISC zarówno na etapie inicjacji tego procesu, jak i na późniejszych etapach. Oddysocjowanie rybosomu może prowadzić do przekazania mRNA do ciałek-P, gdzie są one przechowywane lub ulegają degradacji (Liu i wsp. 2005). Badania wskazują jednak, że w około 80% przypadków działania miRNA w komórkach ssaczych mamy do czynienia z obniżeniem poziomu mRNA regulowanego genu i dzieje się tak głównie w wyniku indukcji procesu deadenylacji (Guo i wsp. 2010). miRISC może rekrutować białka GW182, PABC1 i kompleks CAF1-CCR-NOT1, który przeprowadza usunięcie ogona poliA, po czym następuje usunięcie struktury cap z końca 5' i egzonukleolityczna degradacja transkryptu (Fabian i wsp. 2010).

2.2 Interferencja RNA / Charakterystyka i działanie siRNA

2.2.1 Mechanizm działania siRNA

Interferencja RNA (RNAi) jest procesem, w którym dwuniciowy RNA indukuje zależne od homologii sekwencji wyciszanie ekspresji genu, co zostało po raz pierwszy opisane dla *Caenorhabditis elegans* (Fire i wsp. 1998). Wykazano wyciszenie kilku genów *C.elegans* po iniekcjach różnymi dsRNA złożonymi z kilkuset par zasad, zarówno u osobnika, do którego podawano oligonuleotydy, jak i u jego potomstwa. Co istotne proces ten wymagał podania mieszaniny nici sensowej i antysensowej, jako że iniekcja jednej z nich nie skutkowałą wyciszeniem ekspresji genów. Występowanie mechanizmu RNAi potwierdzono szybko u innych zwierząt, jak i powiązano z zaobserwowanymi wcześniej zjawiskami u roślin – ang. *cosuppression* (Vaucheret i wsp. 1998; Waterhouse i wsp. 1998)

i u grzybów – ang. *quelling* (Cogoni i wsp. 1996). Niedługo potem wykazano, analizując proces RNAi *in vitro* w ekstrakcie z komórek *Drosophila melanogaster*, że właściwymi efektorami RNAi są krótkie, złożone z około 22 par zasad siRNA (Elbashir i wsp. 2001b), powstające w wyniku działania RNazy Dicer na długie dsRNA (Bernstein i wsp. 2001), a kluczowym składnikiem kompleksu wyciszającego jest białko AGO2 (Hammond i wsp. 2001).



Rycina 4. Szlak działania reagentów RNAi w komórce zwierzęcej.

Zjawisko RNAi może odgrywać istotną rolę w ochronie genomu przed akumulacją sekwencji transpozonowych (Tabara i wsp. 1999), czy też mieć duże znaczenie przy infekcjach wirusowych (Ratcliff i wsp. 1999). U roślin, owadów czy *C.elegans* powszechne jest występowanie endogennych siRNA, co jest związane z aktywnością polimerazy RNA

zależnej od RNA (RdRP, ang. *RNA dependent RNA Polymerase*). Jeśli chodzi o komórki ssacze, prowadzone w ostatnich latach badania wykazały obecność endogennych siRNA w mysich oocytach i macierzystych komórkach embrionalnych (Babiarz i wsp. 2008; Tam i wsp. 2008; Watanabe i wsp. 2008). Natomiast być może ich występowanie jest bardziej powszechne i związane np. z obecnością transkryptów antysensowych.

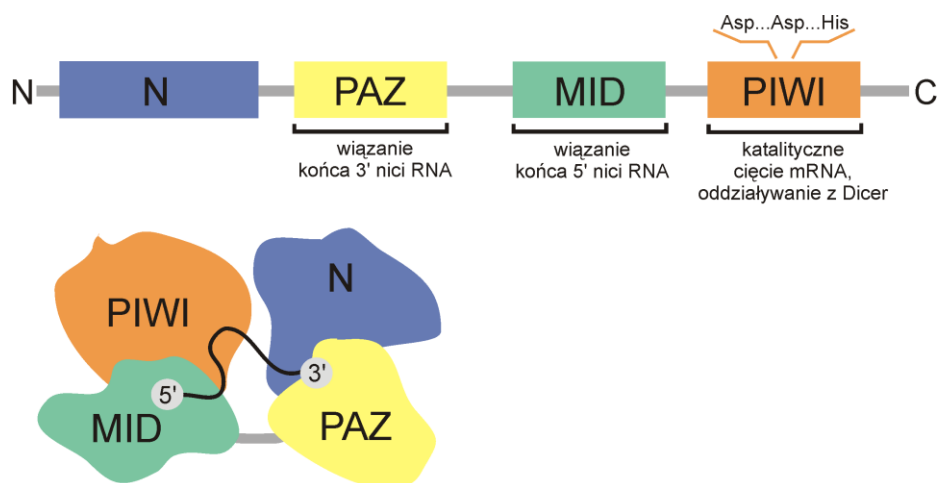
Co jednak istotne, z łatwością technologia RNAi może być szeroko wykorzystywana do wyciszania ekspresji dowolnego genu w celu poznania jego funkcji, a w przypadku wadliwie działającego genu do obniżenia poziomu jego produktu i uzyskania pożądanego efektu terapeutycznego. Aby osiągnąć ten cel do komórek wprowadzane są reagenty RNAi o różnej budowie: siRNA, shRNA (krótkie RNA tworzące strukturę typu spinki, ang. *short hairpin RNA*), shmiR (shRNA zaprojektowane na podstawie sekwencji, np. pętli pre-miRNA) które wchodzą na szlak komórkowy miRNA na różnych jego etapach i wyciszają ekspresję wybranych genów (Elbashir i wsp. 2001a; McManus i wsp. 2002; Paddison i wsp. 2002; Shin i wsp. 2006). Kompleks efektorowy RISC po zaprogramowaniu przez jedną z nici siRNA poszukuje transkryptów zawierających sekwencje komplementarne, przyłącza się do nich i powoduje przecinanie mRNA.

2.2.2 Budowa i działanie RISC

Zakres długości efektorowych RNA dla kompleksu RISC to 18-30 nt. Tworzący się RISC wiąże dupлексы RNA, natomiast na etapach dojrzewania kompleksu jedna z nici jest usuwana (nić pasażerska, ang. *passenger strand*), a druga (nić wiodąca, ang. *guide strand*) jest nicią funkcjonalną. O tym, która nić zostanie w kompleksie decydują właściwości termodynamiczne dupлексы, tj. wybierana jest ta nić, której koniec 5' jest mniej stabilnie związany w dupлексы (Khvorova i wsp. 2003; Schwarz i wsp. 2003; Król i wsp. 2004; Tomari i wsp. 2004). Po załadowaniu jedną z nici, kompleks w sposób cykliczny wykonuje wiązanie do cząsteczek docelowego mRNA i ich przecinanie w miejscu wiązania fosfodiesterowego między 10 i 11 nukleotydem nici siRNA, licząc od końca 5' (Elbashir i wsp. 2001c; Martinez i wsp. 2002).

Dojrzały RISC, o zdolności przecinania transkryptów, posiada masę około 500 kDa. Najważniejsze składniki kompleksu to białka: AGO2 (92 kDa), Dicer (225 kDa) i TRBP (45 kDa, ang. *TAR RNA binding protein*) (Chendrimada i wsp. 2005; Gregory i wsp. 2005; MacRae i wsp. 2008). Samo białko AGO2 wraz z pojedynczą nicią siRNA stanowi tzw. minimalny RISC i jest w stanie przeprowadzać cięcie katalityczne *in vitro*, ale nie „ładuje” się

dupleksem (Martinez i wsp. 2002). Białko AGO2 składa się z domen: PIWI - posiadającej aktywność RNazy, PAZ - rozpoznającej niesparowany koniec 3' nici siRNA, MID – wiążącej koniec 5' nici siRNA oraz domeny N, o nieznaną dotąd funkcję (Ryc. 5) (Liu i wsp. 2004; Ma i wsp. 2004; Parker i wsp. 2005). Domena PIWI wykazuje podobieństwo do RNazy H. Centrum katalityczne domeny PIWI jest złożone z aminokwasów Asp-Asp-His.



Rycina 5. Schemat budowy domenowej białka AGO2 ze związaną nicią antysensową siRNA, wg (Frank i wsp. 2010).

Badania krystalograficzne prowadzone dla białka Ago z bakterii *Pyrococcus furiosus* i *Thermus thermophilus*, czy domeny PIWI z *Archaeoglobus fulgidus*, dostarczają bardziej szczegółowych informacji na temat wiązania cząsteczki kwasu nukleinowego przez poszczególne domeny tego białka (Song i wsp. 2004; Parker i wsp. 2005; Wang i wsp. 2008; Wang i wsp. 2009). Kieszonka wiążąca koniec 5' oligonukleotydu jest utworzona przez domenę MID, natomiast nukleotydy regionu *seed* są wyeksponowane i mogą oddziaływać z komplementarną sekwencją w mRNA. Dla ludzkiego AGO2 przeanalizowano dotychczas strukturę domeny MID, wiążącej koniec 5' RNA (Frank i wsp. 2010). Istotna dla efektywnego wiązania przez tę domenę jest struktura końca 5' nici siRNA, gdzie niezbędne jest występowanie grupy fosforanowej i istnieje także silna preferencja dla nukleotydów A i U. Domena PAZ podlega największym przemieszczeniom, co warunkuje tworzenie kieszeni wiążącej RNA. Wykazano, że bezpośrednie oddziaływanie białka AGO2 z Dicer odbywa się przez domenę PIWI AGO2 i jedną z domen RNazowych Dicer (Tahbaz i wsp. 2004).

W świetle aktualnej wiedzy jest bardzo prawdopodobne, że kompleks białkowy RNazy Dicer jak również kompleks RLC (ang. *RISC-loading complex*) tworzą te same białka.

Poszczególne składniki tego kompleksu mogą odgrywać pierwszoplanową rolę na różnych etapach szlaku RNAi. Dicer generuje właściwe induktory RNAi z długich dsRNA i pełni istotną rolę na dalszych etapach szlaku (Doi i wsp. 2003), ale nie jest czynnikiem niezbędnym w komórce do indukowania AGO2-zależnego przecinania transkryptów po podaniu siRNA (Martinez i wsp. 2002; Murchison i wsp. 2005). Udział białek Dicer i TRBP w kompleksie RISC prawdopodobnie polega na wstępnym rozpoznawaniu dupleksów siRNA o pożądanych właściwościach, wyborze nici wiodącej na podstawie termodynamicznych właściwości i ułatwianiu jej „załadowania” do AGO2 (Chendrimada i wsp. 2005; Sakurai i wsp. 2010; Noland i wsp. 2011). Ostatnio pojawiły się jednak sprzeczne doniesienia, sugerujące brak udziału Dicer w wyborze jednej z nici duplesu (Betancur i Tomari 2012). Zidentyfikowano dodatkowe czynniki białkowe, które są zasocjowane z kompleksem RISC w komórkach zwierzęcych, m.in. PACT (Lee i wsp. 2006), RNA helikazę A (RHA) (Robb i Rana 2007); RNA helikazę MOV10, białka TNRC6 i PRMT3 (Meister i wsp. 2005); czy też białko czaperonowe HSP90 (Johnston i wsp. 2010). Mogą one uczestniczyć w tworzeniu RISC, pełnić funkcję pomocniczą dla Dicer i TRBP, lub ułatwiać oddysocjowanie kompleksu od mRNA po wykonaniu katalitycznego cięcia. Ostatnio zidentyfikowano dodatkowe czynniki: autoantygen La (Liu i wsp. 2011) i endonukleazę C3PO (Ye i wsp. 2011), które mogą odgrywać kluczową rolę w aktywacji RISC i zwiększać jego liczbę obrotów. Wykazano, że w warunkach *in vitro* AGO2 z C3PO, po załadowaniu dupleksem siRNA, jest w stanie przeprowadzić katalityczne cięcie mRNA (bez obecności Dicer i TRBP). Postuluje się kluczowy udział C3PO w wyłączeniu jednej z nici siRNA z kompleksu RISC (Ye i wsp. 2011).

Reakcja katalityczna przeprowadzana przez AGO2 jest warunkowana obecnością jonów magnezu, ale niezależna od ATP (Haley i Zamore 2004; Rivas i wsp. 2005). Fakt ten potwierdza brak w strukturze Ago2 z *T.thermophilus* potencjalnych miejsc wiązania ATP. Jednakże funkcjonowanie RISC jest zależne od ATP, prawdopodobnie działanie innych składników kompleksu, na etapie „ładowania” duplesu, czy uwalniania z wiązania z mRNA, jest zależne od ATP (Yoda i wsp. 2010).

Ważnym etapem jest przecinanie nici pasażerskiej, w celu usunięcia jej z kompleksu (Matranga i wsp. 2005). Po przecięciu mRNA prawdopodobnie następuje rearanżacja struktury RISC, która umożliwia jego uwolnienie od mRNA i przeprowadzenie kolejnego cyklu katalitycznego procesu.

Stwierdzono, że reagenty które muszą być wstępnie przycięte przez Dicer są bardziej aktywne w procesie wyciszania niż krótkie dupleksy siRNA (Kim i wsp. 2005; Siolas i wsp. 2005), a dupleksy siRNA są bardziej aktywne niż pojedyncze nici siRNA (Martinez i wsp. 2002; Holen i wsp. 2003). Stwierdzono również, że efektywność działania RISC zależy od stopnia zaangażowania sekwencji docelowej mRNA w tworzenie struktury (Kretschmer-Kazemi Far i Szczakiel 2003; Luo i Chang 2004; Kertesz i wsp. 2007). Silnie sparowane sekwencje docelowe tworzące struktury spinki są odporne na działanie RISC (Brown i wsp. 2005; Schubert i wsp. 2005; Shao i wsp. 2007; Westerhout i Berkhout 2007).

Białka z rodziny AGO są zlokalizowane głównie w cytoplazmie, ale wykazano, że są one także aktywne na terenie jądra komórkowego (Robb i wsp. 2005; Guang i wsp. 2008). Dotychczas, nie poznano czynników determinujących odmienną aktywność AGO2 od innych AGO (np. AGO3 posiada identyczne centrum katalityczne, a nie przeprowadza cięcia transkryptu). Nie jest także dokładnie poznany mechanizm poszukiwania sekwencji komplementarnej przez RISC. Dwa główne modele zakładają skanowanie transkryptów przez RISC lub asocjacje kompleksu z mRNA w określonych miejscach. Powiązanie maszynerii RISC z maszyną przeprowadzającą translację mogłoby wskazywać na mechanizm skanowania, ale nie znaleziono takiego ścisłego związku (Gu i Rossi 2005). Wykazano natomiast, że RISC oddziałuje, niezależnie od sekwencji, z regionami jednoniciowymi w mRNA, przy czym do jego aktywacji dochodzi tylko w przypadku odpowiedniej komplementarności nici siRNA z fragmentem mRNA (Brown i wsp. 2005; Ameres i wsp. 2007).

2.2.3 Zasady projektowania siRNA

Celem zastosowań technologii RNAi jest specyficzne obniżenie poziomu wybranego transkryptu w komórce. W praktyce nie uzyskuje się pełnej specyficzności, a jedynie większą lub mniejszą preferencję wyciszania genu. Wynika to między innymi z samego mechanizmu rozpoznawania sekwencji docelowej w mRNA przez RISC, w którym jedynie fragment nici siRNA wstępnie rozpoznaje mRNA (Ameres i wsp. 2007). Powszechnym zjawiskiem jest niezamierzone wyciszanie również innych transkryptów zawierających podobną sekwencję docelową (efekt *off-target*) (Jackson i wsp. 2003; Jackson i wsp. 2006). W projektowaniu dupleksu siRNA planuje się nić wiodącą jako antysensową, tj. komplementarną do sekwencji docelowej, natomiast nić pasażerska to tzw. nić sensowa.

Opracowano różne zasady projektowania efektywnie działających reagentów RNAi (Reynolds i wsp. 2004; Patrick Walton i wsp. 2010). Obejmują one zalecenia co do:

- zawartości procentowej par C/G w zakresie 36-52%
- sekwencji 3'-końcowych niesparowanych nukleotydów, preferowane UU lub TT
- temperatury topnienia pojedynczej nici siRNA poniżej 20°C

Wykazano także, że efektywność działania siRNA może zależeć od stopnia ustrukturalizowania fragmentu mRNA, z którym ma oddziaływać siRNA, a więc od dostępności sekwencji docelowej (Ameres i wsp. 2007; Westerhout i Berkhout 2007; Tafer i wsp. 2008).

Tabela 1. Zestawienie głównych zagadnień dotyczących niepożądanych efektów wywoływanych przez reagenty RNAi w komórce i możliwe rozwiązania poszczególnych problemów. *sisiRNA – ang. *small internally segmented interfering RNA* (Bramsen i wsp. 2007)

Zgadnienia istotne dla wykorzystania RNAi	Proponowane modyfikacje reagentów
efekty „ <i>off-target</i> ” związane z działaniem nici antysensowej i sensowej na transkrypty zawierające nie w pełni komplementarną sekwencję	<ul style="list-style-type: none"> - użycie puli siRNA na różne regiony tego samego mRNA (ang. „<i>pooled siRNA</i>”) - zwiększenie preferencji włączania nici antysensowej do RISC przez wprowadzenie asymetrii termodynamicznej w duplesie siRNA - inaktywacja nici sensowej przez jej skrócenie, chemiczne modyfikacje lub konstrukcję sisiRNA*
aktywacja odpowiedzi niespecyficznej	<ul style="list-style-type: none"> - unikanie motywów sekwencji o charakterze immunostymulującym - zachowanie niesparowanych końców 3' w strukturze siRNA
wysycenie endogennych szlaków wyciszania	- konstrukcja shRNA koniugowanych z tRNA transportowanych przez eksportynę-t
zapewnienie większej trwałości efektu wyciszania	<ul style="list-style-type: none"> - konstrukcja shRNA - chemiczne modyfikacje siRNA, zwiększające stabilność w komórce
zapewnienie efektywnego dostarczenia reagentów do komórek i specyficznych tkanek	<ul style="list-style-type: none"> - użycie odpowiednich odczynników transfekcyjnych - użycie tkankowo-specyficznych promotorów dla shRNA

Proponowane są różne podejścia do modyfikowania struktury oraz sekwencji siRNA i shRNA, mające na celu przewyższanie różnych problemów związanych z użyciem tego typu reagentów, co zostało skrótowo opisane w Tabeli 1. Główne problemy dotyczą zaburzania endogennych szlaków komórkowych poprzez działanie siRNA na niepożądane

sekwencje (Aleman i wsp. 2007) lub wykorzystywanie przez reagenty interferencji maszynerii białkowej, która uczestniczy w innych procesach (Khan i wsp. 2009). Inne aspekty dotyczą wymagań jakie są stawiane reagentom RNAi ze względu na ich terapeutyczny potencjał, tj. efektywne dostarczenie do komórek i zapewnienie większej trwałości efektu wyciszania. Modyfikacje siRNA polegają na zmianie struktury dupletu (Sun i wsp. 2008; Grimm 2009) lub wprowadzaniu chemicznych modyfikacji (Watts i wsp. 2008; Shukla i wsp. 2010).

2.2.3 Zasady projektowania siRNA naczelnymi na regiony SNP

Celowanie siRNA w regiony sekwencji zawierającej różne warianty SNP (polimorfizmu pojedynczego nukleotydu, ang. *single nucleotide polymorphism*) dla dwóch alleli, umożliwia selektywne działanie reagentów na tylko jeden allel, co może być pożądane w przypadku określonych chorób. Dla projektowania siRNA naczelnymi na sekwencje transkryptu zawierające warianty SNP lub mutacje punktowe najbardziej istotna jest pozycja oddziaływania siRNA z docelowym mRNA. To oddziaływanie polega na tworzeniu pełnego sparowania (oddziaływań typu Watson-Crick) z sekwencją zawierającą jeden wariant SNP i powstawaniu niesparowania (ang. *mismatch*, oddziaływanie par zasad inne niż Watson-Crick) w miejscu występowania drugiego wariantu SNP, co powinno skutkować obniżeniem aktywności RISC względem jednego z alleli.

Zasady projektowania tego typu siRNA zostały opracowane na podstawie wiedzy odnośnie działania RISC oraz na wnioskach z badań bezpośrednio analizujących wpływ różnych pozycji i rodzaju niesparowań siRNA:mRNA na efektywność działania maszynerii interferencji RNA. Celując w region wybranego genu, zawierający mutację punktową, często testowano szerokie spektrum reagentów, uwzględniając wszystkie możliwe pozycje niesparowań siRNA z allelem nie zawierającym mutacji. Takie badania wykonano m.in. dla mutacji punktowej w genie *SOD1*, która jest przyczyną stwardnienia zanikowo-bocznego (Schwarz i wsp. 2006). Specyfika danej sekwencji nie pozwala jednak na wyciągnięcie daleko idących wniosków odnośnie projektowania tego typu reagentów. Opisano także wyniki szeroko zakrojonych analiz badania aktywności reagentów o różnej sekwencji i przy uwzględnieniu różnego typu wprowadzanego niesparowania (Du i wsp. 2005; Huang i wsp. 2009). Opracowane zasady projektowania siRNA naczelnymi na regiony SNP dotyczą głównie lokalizacji niesparowania (wskazanie na pozycje centralne) i typu wprowadzanego niesparowania (preferowane puryna:puryna).

2.3 Charakterystyka i działanie oligonukleotydów antysensowych

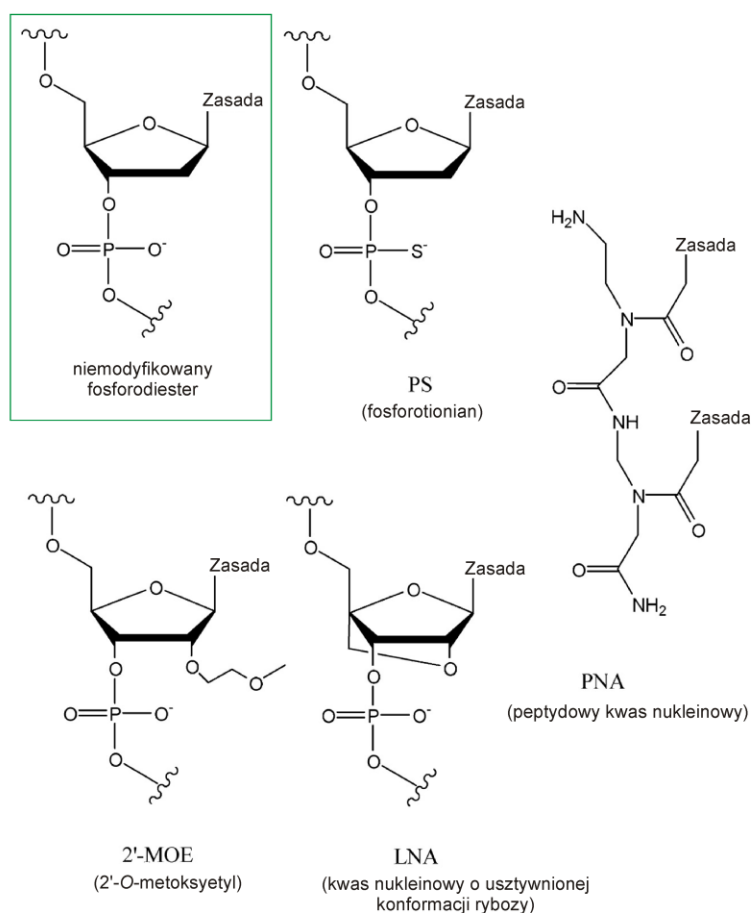
Oligonukleotydy antysensowe (ASO, ang. *antisense oligonucleotides*) to najczęściej około 20-nukleotydom DNA lub RNA, zawierające zwykle modyfikacje chemiczne, które przez oddziaływanie z sekwencją komplementarną mogą hamować ekspresję genu. Główny mechanizm działania ASO to aktywacja RNazy H i w konsekwencji degradacja transkryptu. RNaza H jest powszechnie występującym enzymem przecinającym RNA w duplesie DNA/RNA (oligonukleotyd DNA i odcinek mRNA). Minimalna długość oligonukleotydu DNA, komplementarnego do RNA, potrzebna do aktywacji enzymu to 5-7 nt (Wu i wsp. 1999).

Oligonukleotydy antysensowe mogą także działać na zasadzie tworzenia sterycznej blokady translacji, jak i są wykorzystywane do ukierunkowanej naprawy splicingu (Sazani i Kole 2003) czy hamowania aktywności miRNA (Elmen i wsp. 2008).

Modyfikacje chemiczne ASO mają na celu podniesienie stabilności oligonukleotydów po wprowadzeniu do komórek oraz zwiększają siłę ich wiązania z sekwencją komplementarną. Testowane modyfikacje obejmują wprowadzanie zmian w wiązaniu fosfordiestrowym: podstawienie atomu tlenu atomem siarki (PS, fosforotioan) lub całkowitą modyfikację łańcucha oligomeru: PNA (ang. *peptide nucleic acid*), morfolino; jak i zmiany w części cukrowej, m.in. LNA (ang. *locked nucleic acid*), 2'-O-Metylo (2'OMe), 2'-O-Metoksyetylo (2'MOE), 2'-Fluoro (2'F) (Ryc. 6) (Dias i Stein 2002; Kurreck 2003). Większość z tych modyfikacji jest także wprowadzana do sekwencji siRNA (Corey 2007; Bramsen i wsp. 2009; Bramsen i Kjems 2011).

W toku są liczne testy kliniczne z użyciem ASO, wykorzystujących głównie aktywację RNazy H (Crooke 2004; Monteleone i wsp. 2012; Watts i Corey 2012). Istotne problemy z użyciem tego rodzaju potencjalnych terapeutów mogą być związane z efektami cytotoksycznymi, wywoływanych przez produkty degradacji ASO (Koziołkiewicz i wsp. 2001).

Technologia oligonukleotydów antysensowych w aspekcie terapeutycznym jest już rozwijana od dawna i wydawało się, że ustąpi technologii RNAi. Jednakże, wykorzystanie ASO oferuje wiele możliwości zastosowania i zoptymalizowane reagenty wykazują się dużą efektywnością działania (Vickers i wsp. 2003). Jak dotąd jedyny wprowadzony do użycia lek, to oligonukleotyd antysensowy zawierający modyfikacje PS, *fomivirsen*, stosowany u pacjentów z AIDS przy zapaleniu siatkówki wywołanej infekcją wirusa cytomegalii (Orr 2001).



Rycina 6. Wybrane modyfikacje chemiczne oligonukleotydów antysensowych, wg (Juliano i wsp. 2005).

2.4 Charakterystyka i działanie agRNA

Chociaż głównym nurtem procesu RNAi jest wyciszanie potranskrypcyjne, w ostatnich latach opisano szereg przypadków transkrypcyjnego wyciszania ekspresji genów (TGS) w ludzkich komórkach. Efekty te osiągane są z udziałem krótkich dupleksów RNA nazwanych agRNA (antygenowy RNA), wycelowanych w regiony promotorowe genów lub sekwencje poniżej 3'UTR (Janowski i wsp. 2005; Morris 2005; Han i wsp. 2007). Badając mechanizm transkrypcyjnego wyciszania rozważano historycznie kilka możliwości: indukowaną przez agRNA metylację DNA, modyfikację histonów lub fizyczną blokadę promotora bez udziału modyfikacji DNA i histonów. W niektórych przypadkach stwierdzono, że agRNA powodują transkrypcyjną aktywację (RNAa) niektórych genów (Li i wsp. 2006; Janowski i wsp. 2007; Chen i wsp. 2008; Morris i wsp. 2008).

Stwierdzono, że w różnych szlakach działania agRNA istotną rolę odgrywa oddziaływanie z niekodującymi transkryptami danego genu (Morris i wsp. 2008; Schwartz i wsp. 2008). Obecnie przyjmuje się, że ponad 50% ludzkich genów posiada transkrypty niekodujące, które

dotyczą również sekwencji promotora i poniżej regionu 3'UTR (He i wsp. 2008). Transkrypty te pochodzą zarówno z nici sensowej, jak i antysensowej. Transkrypty niekodujące mogą regulować poziom ekspresji mRNA na różne sposoby, m.in. przez blokadę transkrypcji wynikającą z obecności kompleksu polimerazy RNA II na przeciwnych niciach, rekrutację czynników modyfikujących chromatynę, oraz przez tworzenie dwuniciowego RNA z nicią komplementarną i indukcję szlaków zależnych od dsRNA (Lapidot i Pilpel 2006). Zaburzenie tych procesów przez wprowadzane do komórek agRNA może w różny sposób wpływać na poziom mRNA. Mechanizmy działania agRNA są bardzo słabo poznane i istnieją sprzeczne informacje odnośnie zaangażowania różnych białek AGO1-4 w te procesy (Janowski i wsp. 2006; Chu i wsp. 2010).

3. Charakterystyka chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydydowych

3.1 Charakterystyka powtórzeń trójnukleotydydowych i wybranych chorób poliQ

Mutacje polegające na wydłużaniu ciągu powtórzeń kilkunukleotydydowych w pojedynczych genach są odpowiedzialne za ponad 30 chorób neurologicznych. W większości ekspansje dotyczą powtórzeń trójnukleotydydowych, głównie typu CNG, i grupa chorób wywoływana tego typu mutacjami jest znana pod wspólną nazwą TREDs (ang. *Triplet Repeat Expansion Diseases*) (Mirkin 2007).

Spośród sekwencji mikrosatelitarnych, stanowiących około 30% ludzkiego genomu, powtórzenia trójnukleotydydowe są preferowane w regionach kodujących białka, ze względu na brak zmiany ramki odczytu w przypadku ekspansji ciągu. W regionach eksonów łącznie zidentyfikowano ponad 1000 ciągów trójnukleotydydowych zawierających 6 lub więcej motywów powtórzonych. Najczęstsze spośród nich są ciągi typu CNG (kolejno CGG, CAG, CCG, CTG), CGA oraz AGG, i większość z nich jest zlokalizowana w regionach ORF (Kozłowski i wsp. 2010). Powtórzenia trójnukleotydydowe wykazują polimorfizm długości w populacji, jak i dla niektórych ciągów charakterystyczne jest występowanie zaburzeń sekwencji, tzw. interupcji, np. częste są zaburzenia CAA w ciągach CAG (Rożanska i wsp. 2007).

Ekspansja ciągów powtórzeń trójnukleotydydowych to tzw. mutacja dynamiczna, polegająca na coraz większej tendencji do wydłużania ciągu wraz z kolejnymi mutacjami. Do ekspansji ciągów powtórzeń dochodzi zarówno w DNA komórek rozrodczych, jak i somatycznych. Mechanizm tej mutacji jest związany z „poślizgiem” na sekwencjach powtórzonych podczas procesu replikacji, naprawy czy rekombinacji DNA (McMurray 2010). Z niestabilnością ciągów powtórzeń trójnukleotydydowych związane jest zjawisko antycypacji, polegające na występowaniu objawów choroby wcześniej i z ostrzejszym przebiegiem w kolejnych pokoleniach (Mirkin 2007).

Ciągi powtórzeń trójnukleotydydowych, występujące w transkryptach, mogą tworzyć struktury drugorzędowe typu spinki (ang. *hairpin*). Stabilność tych struktur jest determinowana zarówno długością ciągu powtórzeń, jak i rodzajem trójnukleotydydowego motywu (Sobczak i wsp. 2003; Sobczak i wsp. 2010).

Tabela 2. Zestawienie wybranych chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydydowych.

choroba	gen	kodowane białko	typ powtórzeń i ich zakres normalny / zmutowany	lokalizacja powtórzeń
FXS/Zespół łamliwego chromosomu X	<i>FMRI</i>	FMRP	CGG 6-54 / 200-1000	5'UTR
FXTAS/Zespół drżenia i ataksji związany z łamliwym chromosomem X	<i>FMRI</i>	FMRP	CGG 6-54 / 55-200	5'UTR
SCA12/Ataksja rdzeniowo - mózdkowa typu 12	<i>PPP2R2B</i>	podjednostka białkowej fosfatazy 2	CAG 7-28 / 66-78	5'UTR
DRPLA /zanik jądra zębatego, czerwiennej gałki bladej i jądra Luysa	<i>ATN1</i>	atrofina-1	CAG 3-38 / 49-88	ORF
HD /Choroba Huntingtona	<i>HTT</i>	huntingtyna	CAG 6-35 / 36-121	ORF
SBMA/Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni, choroba Kennedy'ego	<i>AR</i>	receptor androgenu	CAG 6-36 / 37-62	ORF
SCA1/Ataksja rdzeniowo - mózdkowa typu 1	<i>ATXN1</i>	ataksyna-1	CAG 6-40 / 41-83	ORF
SCA2/Ataksja rdzeniowo - mózdkowa typu 2	<i>ATXN2</i>	ataksyna-2	CAG 14-33 / 34-77	ORF
SCA3/Ataksja rdzeniowo - mózdkowa typu 3	<i>ATXN3</i>	ataksyna-3	CAG 14-44 / 45-86	ORF
SCA6/Ataksja rdzeniowo - mózdkowa typu 6	<i>CACNA1A</i>	podjednostka $\alpha 1A$ kanału wapniowego	CAG 12-40 / 62-86	ORF
SCA7/Ataksja rdzeniowo -mózdkowa typu 7	<i>ATXN7</i>	ataksyna-7	CAG 7-18 / 38-200	ORF
SCA17/Ataksja rdzeniowo - mózdkowa typu 17	<i>TBP</i>	białko wiążące sekwencję TATA	CAG 25-44 / 45-63	ORF
SCA8/Ataksja rdzeniowo - mózdkowa typu 8	<i>ATXN8OS/ ATXN8</i>	- / białka poliQ,A,S	CTG / CAG 16-37 / 110-250	3'UTR/ ORF
DM1/ Dystrofia miotoniczna typu I	<i>DMPK</i>	kinaza miotoniczna	CTG 5-37 / 50-5000	3'UTR
FRDA/Ataksja Friedreicha	<i>FXN</i>	frataksyna	GAA 7-34 / 100-1300	intron

Stwierdzono, że spośród 20 różnych typów trójnukleotydów, stabilne struktury typu spinki są tworzone *in vitro* przez powtórzone 17 razy motywy typu CNG oraz CGA i CGU. Tworzona przez powtórzenia struktura może mieć znaczenie funkcjonalne, a w przypadku transkryptów zmutowanych odgrywać znaczącą rolę w patogenezie.

Charakterystyka wybranych chorób z grupy TREDs została przedstawiona w Tabeli 2. Obecnie opisanych jest ponad 20 schorzeń wywoływanych ekspansją trójnukleotydowego motywu, są to m.in. choroba Huntingtona (HD, ang. *Huntington's Disease*), dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1, ang. *Myotonic Dystrophy type 1*), zespół łamliwego chromosomu X (FXS, ang. *Fragile X Syndrome*) i niektóre ataksje rdzeniowo-mózdkowe (SCA, ang. *Spinocerebellar Ataxia*) (Orr i Zoghbi 2007). Lokalizacja ciągu powtórzeń determinuje czy dla patogenezy kluczowy jest efekt zmutowanego transkryptu czy zmutowanego białka. Ekspansje w regionach niekodujących białka są z reguły większe i sięgają kilku tysięcy powtórzeń, jak w przypadku DM1. Mutacje w regionach 3'UTR lub 5'UTR mogą wpływać na proces transkrypcji, translacji lub stabilność mRNA czy lokalizację transkryptu (Li i Bonini 2010). Ekspansje w regionach ulegających translacji dochodzą do 200 powtórzeń i skutkują obecnością wydłużonego ciągu aminokwasów w sekwencji białka.

Mechanizm patogenezy polegający na nabyciu przez RNA toksycznej funkcji jest charakterystyczny dla DM1. W tym przypadku zlokalizowany w regionie 3'UTR i sięgający nawet kilku tysięcy powtórzeń CUG ciąg tworzy stabilną strukturę typu spinki, co skutkuje toksycznymi właściwościami transkryptu. Zmutowany transkrypt DMPK zostaje zatrzymany w jądrze komórkowym, gdzie wraz z oddziałującymi z nim białkami tworzy agregaty, zwane jądrowymi *foci* RNA (Timchenko i wsp. 1996; Miller i wsp. 2000). Kluczowa dla patogenezy jest sekwestracja przez transkrypt *DMPK* białek uczestniczących w komórce normalnej w *splicingu* wielu transkryptów, np. białka MBNL1 uczestniczącego w dojrzewaniu transkryptów m.in. kanału chlorkowego (*CLCN1*) i receptora insulinowego (*INSR*) (Jiang i wsp. 2004).

Choroby poliglutaminowe (poliQ) są powodowane ekspansją powtórzeń CAG występujących w regionie kodującym genu i zaliczono do nich 9 schorzeń: HD, DRPLA (zanik jądra zębatego, czerwienego gałki bladej i jądra Luysa, ang. *dentatorubral-pallidoluysian atrophy*), SBMA (rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni, choroba Kennedy'ego, ang. *spinal and bulbar muscular atrophy*) oraz SCA typu 1, 2, 3, 6, 7 i 17. Patogeneza chorób poliQ jest głównie związana z nabyciem toksycznej funkcji przez białko posiadające ciąg poliglutaminowy (Trottier i wsp. 1995; Cooper i wsp. 1998; Marsh i wsp. 2000).

Charakterystyczne jest tworzenie agregatów zawierających fragmenty białek z wydłużonymi ciągami poliQ. Do końca nie określono czy tworzenie tych agregatów jest przyczyną postępującej neurodegeneracji czy pełnią one pewną funkcję ochronną „magazynując” toksyczne fragmenty białek (Truant i wsp. 2008; Williams i Paulson 2008). Wzrasta także liczba dowodów wskazujących na znaczący udział toksyczności samego zmutowanego transkrypty w patogenezie chorób poliglutaminowych (Li i wsp. 2008; Hsu i wsp. 2011; Mykowska i wsp. 2011; Shieh i Bonini 2011). Powtórzenia CAG, które uległy ekspansji, mogą tworzyć stabilne struktury typu spinki w komórce. Patomechanizm związany z obecnością takiego transkrypty jest podobny do toksycznego efektu, jaki wywołuje struktura spinki tworzona przez powtórzenia CUG w DM1.

3.2 Choroba Huntingtona

Choroba Huntingtona (HD, zwana także płasawicą Huntingtona) jest powodowana ekspansją powtórzeń CAG zlokalizowanych w eksonie 1 genu *HTT*, co skutkuje obecnością długiego poliglutaminowego ciągu przy końcu N białka huntingtyny (MacDonald i wsp. 1993). Większość pacjentów posiada 40-45 powtórzeń CAG w genie *HTT* i objawy choroby pojawiają się zwykle w wieku około 40 lat. Formy młodzieńcze HD występują przy obecności ponad 100 powtórzeń w genie *HTT* i charakteryzują się pojawieniem objawów choroby przed 20 rokiem życia. Od momentu wystąpienia objawów pacjent przeżywa 10-20 lat, ponieważ nie istnieją żadne metody leczenia pacjentów z HD, jedynie kuracje pozwalające łagodzić objawy choroby.

Częstość występowania choroby Huntingtona szacuje się na około 5-10 osób na 100 tys. w Europie i Ameryce Północnej (Walker 2007). Schorzenie to charakteryzuje występowanie niekontrolowanych ruchów (ruchy płasawicze), drżenia rąk i nóg oraz postępujące zaburzenia umysłowe i otępienie (OMIM). Objawy HD są powodowane obumieraniem neuronów w niektórych częściach mózgu, głównie prążkowie i korze mózgu. Huntingtyna ulega ekspresji w wielu tkankach ludzkich, choć najwyższy jej poziom obserwowany jest w prążkowie i jądrach. Neurony, szczególnie ciała prążkowanego (łac. *striatum*) są zdecydowanie najbardziej wrażliwe na obecność zmutowanej formy tego białka.

Funkcja huntingtyny nie jest dobrze poznana. Zidentyfikowano różne białka, z którymi oddziałuje huntingtyna, przy czym stwierdzono, że często w te oddziaływania jest zaangażowany fragment zawierający ciąg poliQ i siła tej interakcji może być zależna od długości ciągu (Li i Li 2004). Huntingtyna oddziałuje m.in. z czynnikiem transkrypcyjnym

REST, odpowiedzialnym na regulację transkrypcji wielu genów specyficznych dla neuronów (Zuccato i wsp. 2003). W przypadku HD dochodzi m.in. do obniżenia poziomu czynnika BDNF, który pełni istotną rolę w komunikacji między neuronami kory i prążkowie (Gauthier i wsp. 2004). Efektem obniżonego poziomu huntingtyny normalnej lub obecności huntingtyny zmutowanej (lub obu tych czynników) jest dysfunkcja mitochondriów, obniżenie wydajności endosomów, tworzenie złogów białkowych i zaburzenie transportu aksonalnego w neuronach prążkowie (Zuccato i wsp. 2010). Interesującym aspektem funkcji huntingtyny w komórkach jest jej oddziaływanie z AGO2 i kolokalizacja tych białek w ciałkach P (Savas i wsp. 2008). Te badania sugerują możliwy udział normalnej huntingtyny w wyciszaniu potranskrypcyjnym.

Huntingtyna podlega proteolitycznemu przecinaniu w komórkach, przy czym wydajność tego procesu jest wyższa w przypadku zmutowanego białka i ma związek z patogenezą choroby (Wellington i wsp. 2000). Agregaty tworzone przez huntingtynę są zlokalizowane zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym, przy czym inkluzje cytoplazmatyczne zawierają głównie fragmenty poliQ, natomiast jądrowe także całej długości białko (Scherzinger i wsp. 1997; Martindale i wsp. 1998).

3.3 Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 (SCA3, ang. *Spinocerebellar Ataxia type 3*, zwana także chorobą Machado-Joseph) jest wywoływana przez ekspansję powtórzeń CAG w regionie kodującym genu *ATXN3* na chromosomie 14 (Kawaguchi i wsp. 1994). Obecnie SCA3 jest uznawana za najczęściej występującą w grupie autosomalnych, dziedziczonych dominująco ataksji. Objawy SCA3 mogą występować przy ekspansji w zakresie 45-86 powtórzeń, ale u większości pacjentów obecne jest ponad 60 powtórzonych tripletów CAG. Choroba zaczyna się zwykle w wieku 30-50 lat a jej główne objawy to głównie drżenie kończyn, dystonia (OMIM). Regiony mózgu dotknięte najsilniej zmianami patologicznymi to: neurony rdzeniowe mózdku, zwoje podstawy mózgu, rdzeń mózgu i rdzeń kręgowy.

Cechą charakterystyczną SCA3 jest tworzenie się w komórkach mózgu złogów białkowych, zawierających ataksynę-3 (Ikeda i wsp. 1996; Goti i wsp. 2004). Ostatnio wykazano, że proces agregacji ataksyny-3 związany jest z podwyższonym poziomem jonów wapnia i aktywacją zależnych od Ca^{2+} proteaz podczas depolaryzacji komórek neuronów, i dlatego jest on charakterystyczny dla tego typu komórek (Koch i wsp. 2011).

Funkcja ataksyny-3 jest nie dobrze poznana, ale wykazano jej udział w zależnej od ubikwiny degradacji białek (Doss-Pepe i wsp. 2003). Ataksyna-3 posiada aktywność enzymu de-ubikwytynującego oraz oddziałuje z łańcuchami poliubikwitynowymi. Zidentyfikowano także oddziaływania ataksyny-3 z czynnikami biorącymi udział w procesie degradacji białek, przebiegającym na strukturach retikulum (Zhong i Pittman 2006), jak i interakcje z białkami cytoszkieletu (Rodrigues i wsp. 2010) oraz regulatorami acetylacji histonów (Li i wsp. 2002).

3.4 Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 1

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 1 (SCA1) jest powodowana ekspansją ciągu CAG do ponad 40 powtórzeń w regionie kodującym genu *ATXN1* (Orr i wsp. 1993; Banfi i wsp. 1994). Główne objawy choroby to drżenie, zaburzenia mowy, problemy z połykaniem i oddychaniem. Regiony mózgu dotknięte najsilniej zmianami patologicznymi to: komórki Purkinje'go w mózdku, jądro zębate mózdku i rdzeń mózgu (Orr i Zoghbi 2001).

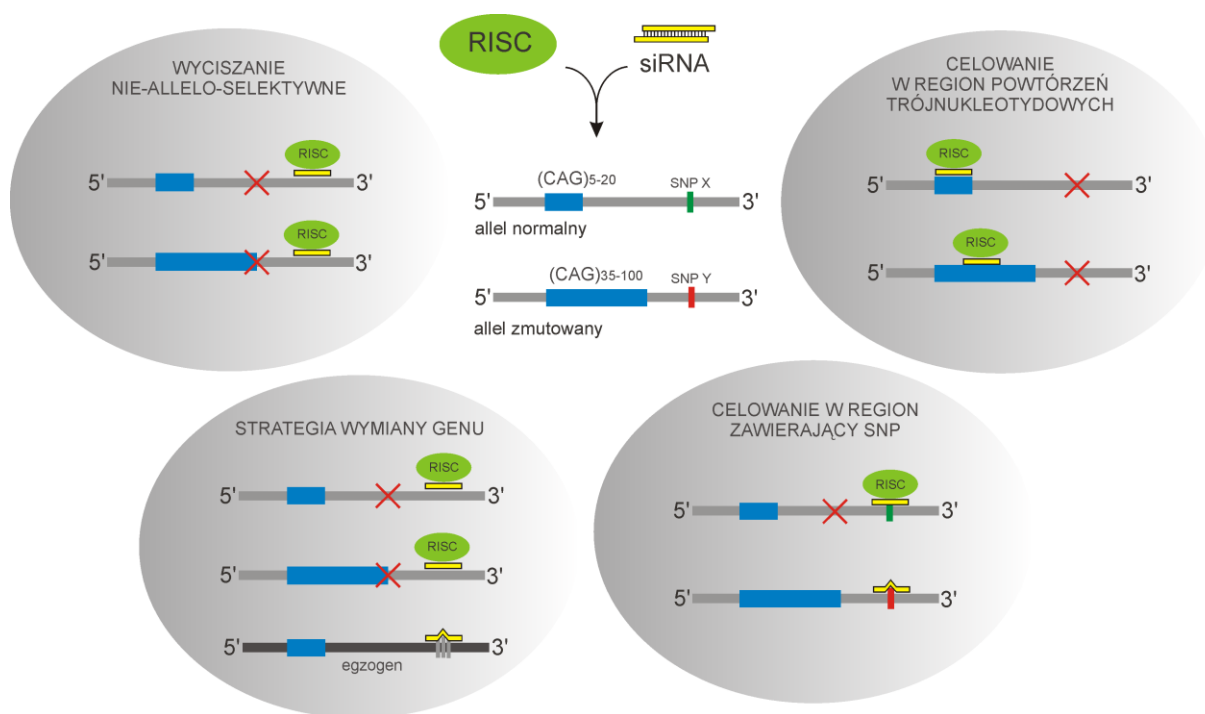
Ataksyna-1 jest białkiem o lokalizacji jądrowej, zdolnym do multimeryzacji (Burright i wsp. 1997). Jak inne białka zawierające wydłużone ciągi poliglutaminowe, zmutowana ataksyna-1 tworzy agregaty, jednak postuluje się że głównymi czynnikami patogennymi w przypadku SCA1 są zaburzone oddziaływania ataksyny-1 z innymi białkami (Tsuda i wsp. 2005; Lim i wsp. 2008). Istotną rolę przypisuje się interakcji ataksyny-1 z represorem transkrypcyjnym Capitia, co w przypadku SCA1 skutkuje podwyższonym poziomem Capitia (Lam i wsp. 2006; Fryer i wsp. 2011).

4. Strategie wyciszania ekspresji genów TREDs

4.1 Podejścia terapeutyczne z wykorzystaniem oligonukleotydów dla TREDs

Jak opisano w Rozdziale 2, nadal poznawane są mechanizmy działania krótkich kwasów nukleinowych w komórce. Dotychczasowa wiedza umożliwia już jednak projektowanie reagentów mających potencjał terapeutyczny. Dla chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych opracowano różne strategie z wykorzystaniem oligonukleotydów i ich analogów. Celem testowanych podejść była degradacja transkryptu genu wywołującego chorobę, inhibicja translacji kodowanego białka czy blokowanie patogennych oddziaływań zmutowanych transkryptów z białkami.

Różne podejścia zostały przetestowane dla strategii wykorzystującej zjawisko RNAi. W przypadku chorób poliglutaminowych, degradacja transkryptu przez RISC zapobiega powstawaniu toksycznego białka. Istotne jest również, a kluczowe w przypadku innych chorób z grupy TREDs, pozbycie się zmutowanego transkryptu, który jest współodpowiedzialny za patogenezę. Cztery podejścia wykorzystujące indukowaną przez RISC degradację transkryptów związanych z chorobami poliglutaminowymi są przedstawione na Ryc. 7.



Rycina 7. Różne strategie wyciszania ekspresji genów, odpowiedzialnych za choroby poliglutaminowe, z wykorzystaniem zjawiska RNAi. Szczegółowy opis strategii w tekście.

Aktywność RISC, zaprogramowanego przez nić antysensową siRNA, może być nakierowana na różne regiony genu i jego intencjonalne działanie może mieć charakter tylko geno-selektywny lub również allelo-selektywny. W kontekście różnych chorób dyskutowana jest konieczność zachowania ekspresji allelu normalnego w komórce. W tym zakresie istnieją nadal sprzeczne doniesienia w kontekście, m.in. genu odpowiedzialnego za HD, wskazujące z jednej strony na istotną funkcję huntingtyny, z drugiej pokazujące tolerowanie wyciszenia huntingtyny w modelach zwierzęcych (White i wsp. 1997; Dragatsis i wsp. 2000; Cattaneo i wsp. 2005; Boudreau i wsp. 2009; Grondin i wsp. 2012). Trudno też przewidzieć efekt nie-allelo-selektywnego wyciszania ekspresji danego genu u człowieka, dlatego strategie uwzględniające dyskryminację allelu normalnego od zmutowanego są szeroko rozwijane.

Regiony, które różnią dwa allele genu odpowiedzialnego za chorobę z grupy TREDs, to region mutacji, czyli różnej długości ciąg powtórzeń trójnukleotydowych, oraz miejsca występowania SNP (Ryc. 7). Dotychczasowe badania dla tych strategii zostaną opisane w następnych podrozdziałach.

Zmniejszona aktywność kompleksu w przypadku występowania niesparowań siRNA z sekwencją docelową, będąca podstawą strategii celowania w region SNP, jest także wykorzystywana w strategii wymiany genu. Polega ona na wyciszeniu ekspresji obu alleli genu i wprowadzeniu egzogenu, który jest odporny dzięki wprowadzonym modyfikacjom na działanie czynnika wyciszającego. Spośród chorób poliglutaminowych, strategia wymiany genu została przetestowana na modelu komórkowym SCA6 (Kubodera i wsp. 2005).

4.2 Strategia celowania w region SNP dla HD, SCA3 i SCA7

Spośród chorób z grupy TREDs, dotychczas opisano testowanie strategii celowania w SNP dla HD, SCA3 i SCA6. W ulegających transkrypcji regionach genów odpowiedzialnych za te choroby zidentyfikowano stosunkowo częste warianty SNP, które mogłyby być użyteczne w strategii wykorzystującej zjawisko RNAi do allelo-selektywnej degradacji transkryptów.

W modelu SCA3 wykorzystano warianty SNP zlokalizowane tuż za ciągiem powtórzeń CAG (rs12895357), dla których wykazano wcześniej silną korelację występowania wariantu C z allelem zmutowanym (Matsumura i wsp. 1996; Gaspar i wsp. 2001). Na modelach komórkowych przetestowano siRNA zawierające niesparowanie z SNP w pozycji: 6, 9, 12, 11, 13 lub 15, licząc od końca 5' nici antysensowej siRNA (Miller i wsp. 2003; Li i wsp. 2004). Na sztucznych konstrukcjach zawierających odpowiednie warianty SNP (T/C)

i różnej długości ciągi powtórzeń (28/166 Q lub 22/79 Q) w otoczeniu sekwencji ataksyny-3, wykazano efektywne wyciszenie ekspresji egzogenu zmutowanego przez siRNA z niesparowaniem w pozycji 9 i 11, przy zachowaniu ekspresji egzogenu normalnego (Miller i wsp. 2003; Li i wsp. 2004).

W badaniach przeprowadzonych na modelu szczurzym SCA3 celowano w ten sam wariant SNP z użyciem shRNA (prekursor siRNA z niesparowaniem w pozycji 9) kodowanym w wektorze lentiwirusowym (Alves i wsp. 2008). Efektywne wyciszenie ekspresji zmutowanej ataksyny-3 po wstrzyknięciu wektora do prądkowia znacząco zmniejszyło neuropatologiczne objawy związane z SCA3.

Choroba Huntingtona należy do najczęstszych spośród chorób poliQ i dla genu wywołującego HD wykonano szeroko zakrojone analizy występujących w populacji haplotypów (Warby i wsp. 2009). Kilka wariantów SNP w genie *HTT* zostało zweryfikowanych eksperymentalnie pod kątem ich potencjalnego wykorzystania w allelo-selektywnej strategii dla HD (van Bilsen i wsp. 2008; Pfister i wsp. 2009). Zestawienie badań w tym zakresie przedstawione jest w Tabeli 3. W najszerzej zakrojonych badaniach, przeprowadzonych na modelach komórek fibroblastów pochodzących od pacjentów, wykazano, że zestaw 5 siRNA zaprojektowanych dla określonych wariantów SNP byłby wystarczający dla 75% pacjentów HD (Pfister i wsp. 2009). W innych badaniach wykazano, że w zestawie siRNA opracowanych dla 7 wariantów SNP w genie *HTT* znalazłby się co najmniej 1 użyteczny w przypadku 85% pacjentów HD (Lombardi i wsp. 2009).

Spośród chorób poliglutaminowych, testowanie strategii celowania w regiony zawierające SNP wykonano także dla SCA7 (Scholefield i wsp. 2009). Testowano reagenty shRNA w modelu komórkowym z egzogenną ekspresją konstruktów kodujących ataksynę-7 w wariantach: SNP A / 100 Q i SNP G / 10 Q. Najlepszą allelo-selektywność uzyskano dla reagentów zawierających niesparowanie w pozycji 16, licząc od końca 5' nici antysens, także dla siRNA kodowanych w kasetach zaprojektowanych na podstawie sekwencji pri-miRNA.

Tabela 3. Zestawienie i skrótowy opis badań, w których testowano podejście terapeutyczne z wykorzystaniem reagentów interferencji celujących w regiony SNP zlokalizowane w genie *HTT*. Lokalizacja niesparowania odnosi się do pozycji w nici antysensowej siRNA licząc od jej końca 5'; w sposób „n/x” oznaczono: n- pozycję podstawowego niesparowania, x – pozycję dodatkowego niesparowania. Podkreślono pozycje w siRNA, dla których uzyskano znaczącą dyskryminację alleli.

Nr SNP (dbSNP)	Model badawczy	Lokalizacja niesparowań siRNA/mRNA (<u>najlepsze reagenty</u>)	Referencje
5 SNP	komórki HeLa (układ egzogenny)	<u>16</u>	(Schwarz i wsp. 2006)
rs363125	fibroblasty HD	<u>4</u>	(van Bilsen i wsp. 2008)
rs363125 rs362331 rs2276881	komórki NIH3T (układ egzogenny) i fibroblasty HD	<u>4</u> , <u>11</u> , 11/10 4, <u>10</u> , 16 <u>10</u> , 10/11, 16	(Lombardi i wsp. 2009)
rs363125 rs362307 rs362273	fibroblasty HD	10, <u>16</u> 10, 10/2, 10/3, 10/4, <u>10/5</u> , <u>10/6</u> , 10/7, 16 10, 10/2, <u>10/3</u> , <u>10/4</u> , <u>10/5</u> , <u>10/6</u> , <u>10/7</u> , 16	(Pfister i wsp. 2009)
rs363009 rs362331 rs362273 rs362272	komórki HeLa (układ egzogenny) i limfoblasty HD	9, 9/13, <u>9/14</u> , 9/15, 9/16, <u>10</u> , 11, 12 8, 9, <u>9/14</u> , <u>9/15</u> , <u>10</u> , 11, 11/14, 11/15, 12 8, <u>9</u> , 10, 11, 12 8, <u>9</u> , 10, 11, <u>12</u>	(Takahashi i wsp. 2010)

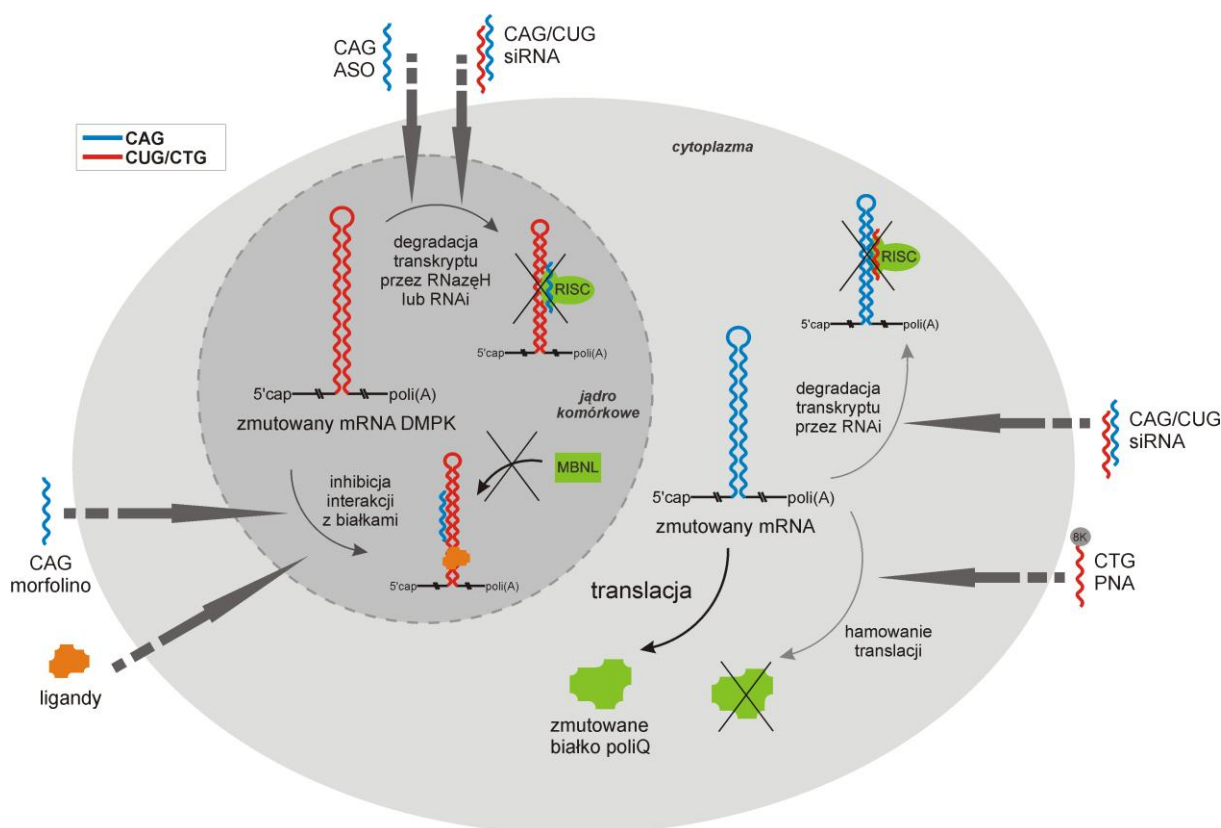
4.3 Strategia celowania w region powtórzeń dla wybranych TREDs

Region powtórzeń trójnukleotydowych, stanowiący bezpośrednio miejsce mutacji, wydaje się atrakcyjnym celem dla reagentów terapeutycznych (Ryc. 8). Dążąc do osiągnięcia jak największej geno-selektywności w wyciszaniu, początkowo nie kierowano reagentów RNAi w sekwencje powtarzające się, o których wiadomo, że występują w wielu mRNA (Jasińska i wsp. 2003; Kozłowski i wsp. 2010). W pierwszych latach zastosowań technologii RNAi zbadano działanie dupleksów złożonych z powtórzeń komplementarnych sekwencji CUG i CAG na transkrypty genów *AR*, *HTT* i *ATXN3* zawierające normalne i patologicznie wydłużone ciągi powtórzeń CAG. Badania prowadzono w kontekście eksperymentalnej terapii SBMA, HD lub SCA3. Stwierdzono jednak wyciszanie obydwu alleli zmutowanego i normalnego co, wykluczało zastosowanie tych reagentów w planowanej terapii (Caplen i wsp. 2002; Miller i wsp. 2003; Xia i wsp. 2004).

Większą allelo-selektywność działania wykazywały chemicznie modyfikowane, złożone z powtórzeń CTG, reagenty antysensowe PNA. Wykazywały one dużą preferencję w inhibicji

translacji białka zmutowanego huntingtyny i ataksyny-3 (Hu i wsp. 2009). Analogiczne działanie stwierdzono dla innych modyfikowanych chemicznie oligomerów: carba-LNA, 2'MOE, 2'F-RNA (Gagnon i wsp. 2010). Co istotne dla tego typu reagentów nie zaobserwowano efektu wyciszania ekspresji innych genów zawierających powtórzenia CAG.

Efekt skutecznego celowania w region powtórzeń opisano także dla powtórzeń CGG na modelu *Drosophila* (Sofola i wsp. 2007). Specyficzną dla modelu FXTAS degenerację komórek obserwowano, zarówno przy ekspresji ciągów (CGG) \times 90, charakterystycznych dla genu *FMRI* z pre-mutacją, jak i ciągów (CCG) \times 90. Natomiast łączna ekspresja tych konstruktów, o sekwencji komplementarnych do siebie powtórzeń, powodowała zahamowanie degeneracji komórek i proces ten był zależny od maszynierii RNAi.



Rycina 8. Schemat różnych strategii celowania w region powtórzeń dla genów z grupy TREDs zawierających ekspansję powtórzeń CAG lub CUG. Zmutowany ciąg powtórzeń został przedstawiony w postaci struktury typu spinki.

Różnego rodzaju strategie, uwzględniające celowanie reagentów w region powtórzeń, testowano dla DM1. W przypadku tej choroby cel stanowi wydłużony ciąg powtórzeń CUG zlokalizowany w jądrze komórkowym (Ryc 8). Reagenty interferencji, złożone częściowo lub

całkowicie z sekwencji powtórzonej okazały się skuteczne w strategii dla DM1 testowanej na komórkach mioblastów i modelu mysim, szczególnie gdy ukierunkowano jądro-specyficzną lokalizację reagentów (Furling i wsp. 2003; Francois i wsp. 2011).

Do degradacji zmutowanego transkryptu DMPK użyto także oligonukleotydów (CAG)₇, zawierających modyfikacje chemiczne 2'OMe i PS (Mulders i wsp. 2009). Inne podejście z użyciem analogów nukleotydów dotyczy użycia oligomerów morfolino (CAG)₂₅ (Wheeler i wsp. 2009). W tym przypadku oligomery blokowały oddziaływanie prowadzące do patogenezy DM1, tj. wiązanie białka MBNL do wydłużonego ciągu CUG w transkrypcie *DMPK*. W efekcie, obserwowano na modelu mysim DM1 zmniejszenie liczby *foci* RNA i brak zaburzeń splicingowych. Podobne podejście było testowane z użyciem wyselekcjonowanych *in vitro* ligandów (Arambula i wsp. 2009; Lee i wsp. 2009; Disney i wsp. 2010; Garcia-Lopez i wsp. 2011).

4.4 Strategie terapeutyczne dla chorób poliglutaminowych testowane na modelach zwierzęcych

Dla wybranych modeli chorób poliglutaminowych podjęto próby przetestowania reagentów RNAi na modelach zwierzęcych, głównie mysich, tych chorób (wyniki zebrane w Tabeli nr 4). Badania obejmowały wprowadzanie reagentów w postaci siRNA lub shRNA, metodą iniekcji stereotaktycznych do wybranych obszarów mózgu. Z reguły reagent projektowano tak, aby celował jedynie w zmutowany transgen, którym był cały ludzki gen lub jego fragment. W ten sposób stosując strategie niedyskryminujące dwóch alleli, zmutowanego od normalnego, badano efekt wyciszania jedynie zmutowanego transgenu (Xia i wsp. 2004; Harper i wsp. 2005; Rodriguez-Lebron i wsp. 2005; Wang i wsp. 2005; DiFiglia i wsp. 2007; Huang i wsp. 2007). W niektórych badaniach stosowano reagenty o sekwencji komplementarnej zarówno do wprowadzanego ludzkiego transgenu, jak i mysiego lub szczurzego endogenu, i sprawdzano czy wyciszanie tych alleli jest tolerowane (Boudreau i wsp. 2009; Drouet i wsp. 2009; Alves i wsp. 2010). Charakterystycznym efektem działania różnych reagentów terapeutycznych dla chorób poliQ, jest obserwowane zmniejszenie liczby i wielkości inkluzji zawierających ciągi poliQ.

Tabela 4. Zestawienie i opis badań, w których testowano podejścia terapeutyczne z wykorzystaniem reagentów interferencji, na modelach zwierzęcych chorób poliglutaminowych. Skrót: AV – adenowirus, AAV –wirus stowarzyszony z adenowirusem, LV – lentiwirus.

Strategia terapeutyczna	Model choroby	Reagent	Efekt terapeutyczny	Referencje
wyciszanie allelu zmutowanego	SCA1 / myszy model transgeniczny (ludzka ataksyna-1 z 82Q)	shRNA w wektorze AAV	zmniejszenie inkluzji ataksyny-1 i poprawa zdolności motorycznych zwierząt	(Xia i wsp. 2004)
wyciszanie allelu zmutowanego	HD / myszy model transgeniczny R6/2	siRNA	zmniejszenie inkluzji huntingtyny, poprawa zdolności motorycznych i wydłużenie czasu życia	(Wang i wsp. 2005)
wyciszanie allelu zmutowanego	HD / myszy model transgeniczny HD-N171-82Q	shRNA w wektorze AAV	zmniejszenie inkluzji huntingtyny, poprawa zdolności motorycznych	(Harper i wsp. 2005)
wyciszanie allelu zmutowanego	HD / myszy model transgeniczny R6/1	shRNA w wektorze AAV	poprawa koordynacji ruchowej zwierząt	(Rodriguez-Lebron i wsp. 2005)
wyciszanie allelu zmutowanego	HD /myszy model transgeniczny R6/2 i indukowany iniekcją wektora AAV z fragmentem ludzkiej HTT	shRNA w wektorze AV	zmniejszenie agregatów huntingtyny	(Huang i wsp. 2007)
wyciszanie allelu zmutowanego	HD / model myszy indukowany iniekcją wektora AAV z fragmentem ludzkiej HTT	siRNA skoniugowane z cholesterolem	zahamowanie neurodegeneracji, poprawa zdolności motorycznych	(DiFiglia i wsp. 2007)
celowanie w region SNP	SCA3 / model szczurzy indukowany iniekcją wektora LV z ludzką ataksyną-3	shRNA w wektorze LV	specyficzne celowanie w transgen zmutowany, zmniejszenie inkluzji ataksyny-3, zahamowanie neurodegeneracji	(Alves i wsp. 2008)
wyciszanie ludzkiego i mysiego allelu	HD /mysie modele: <i>knock-in</i> CAG140 i transgeniczny HD-N171-82Q	shRNA w wektorze AAV	poprawa koordynacji ruchowej myszy, wydłużenie czasu życia	(McBride i wsp. 2008) (Boudreau i wsp. 2009)
wyciszanie allelu zmutowanego lub obu alleli	HD / myszy i szczury z dostarczoną, do prądkowia w wektorze LV, fragmentem ludzkiego genu <i>HTT</i> (18 lub 82Q)	shRNA w wektorze LV	zarówno w przypadku wyciszenia tylko zmutowanej <i>HTT</i> , jak i dla równoczesnego wyciszenia endogennej normalnej <i>htt</i> , obserwowano zmniejszenie inkluzji w prądkowiu	(Drouet i wsp. 2009)
wyciszanie ludzkiego i szczurzego allelu	SCA3 / model szczurzy indukowany miejscową iniekcją wektora LV z ludzką <i>ATXN3</i> (27 lub 72Q)	shRNA w wektorze LV	w przypadku wyciszenia endogennej normalnej <i>atxn3</i> , oprócz zmutowanego transgeny, nie odnotowano efektów ubocznych, toksycznych	(Alves i wsp. 2010)
celowanie w region SNP	HD / mysie modele transgeniczne BACHD i YAC18 posiadające różne warianty badanego SNP	ASO modyfikowane chemicznie	efektywne i specyficzne wyciszanie <i>htt</i> tylko w modelu zawierającym celowany wariant SNP	(Carroll i wsp. 2011)

W kontekście HD, ciekawe badania przeprowadzono ostatnio na organizmach małpy z gatunku makaka, gdzie wyciszono endogenną huntingtynę, z użyciem siRNA specyficznych dla genu *Htt*, dostarczanych do mózgu z użyciem pompy infuzyjnej (Stiles i wsp. 2011), lub shRNA w wektorze AAV (Grondin i wsp. 2012). Dla badań z użyciem siRNA, wykazano zarówno efektywne wyciszenie huntingtyny w prążkowie, o około 50%, jak i badania histopatologiczne wykazały dobrą tolerancję na stosowaną metodę dostarczania reagentów oraz obniżenie poziomu endogennej huntingtyny, przy podawaniu reagenta maksymalnie przez 28 dni. Badania nie obejmowały na tym etapie szczegółowych analiz zmiany profilu ekspresji genów czy analiz behawioralnych (Stiles i wsp. 2011). Z kolei w badaniach z użyciem shRNA przeprowadzono analizy 6 miesięcy po iniekcji wektorów, demonstrując obniżenie poziomu białka huntingtyny w prążkowie o 45% oraz brak znaczących zmian histopatologicznych w mózgu zwierząt (Grondin i wsp. 2012).

II. CEL BADAŃ

Neurodegeneracyjne choroby poliglutaminowe są wywoływane ekspansją ciągu powtórzeń tripletu CAG, znajdującego się w regionie kodującym białko pojedynczych genów. Istnieje potrzeba opracowania skutecznej terapii dla tych, nieuleczalnych jak dotąd, chorób. Jedną z możliwości są strategie, które zakładają usunięcie samej przyczyny choroby, czyli wyeliminowanie produktów ekspresji zmutowanego genu.

Celem badań, opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, było opracowanie nowych podejść terapeutycznych dla chorób poliglutaminowych. Cechą wspólną tych podejść było wykorzystanie krótkich dupleksów RNA oraz jednoniciowych antysensowych oligonukleotydów i ich analogów, wykazujących dużą selektywność w wyciszeniu konkretnego genu (geno-selektywność), preferencję do wyciszenia allelu zmutowanego (allelo-selektywność), i jednocześnie niską toksyczność. Badania polegały głównie na analizie działania różnych reagentów, skierowanych na region zawierający SNP lub region sekwencji powtórzonej CAG w pojedynczych genach, odpowiedzialnych za chorobę Huntingtona i wybrane ataksje rdzeniowo-mózdkowe.

Ważnym etapem badań była szczegółowa charakterystyka procesu interferencji sekwencji powtórzonych CAG/CUG. Umożliwiła ona zaprojektowanie dupleksów RNA wykazujących działanie dyskryminujące pomiędzy różnej długości sekwencjami powtórzonymi CAG występującymi w allelu normalnym i zmutowanym. Istotnym zadaniem było przeprowadzenie wstępnej analizy mechanizmu działania wybranych reagentów, wyjaśniającego ich obserwowaną aktywność.

Cele pracy były osiągane przez realizację następujących głównych zadań:

- testowanie dla wybranych chorób poliglutaminowych strategii celowania w regiony zawierające warianty SNP;
- charakterystykę działania siRNA złożonego z powtórzeń CAG/CUG;
- testowanie oligonukleotydów i ich analogów złożonych z powtórzeń CUG lub CTG, zawierających substytucje zasad lub modyfikacje chemiczne.

III. WYNIKI

1. Wprowadzenie

W opisanych w niniejszej rozprawie badaniach stosowano jednolity system eksperymentalny, którego główne elementy przedstawiają się następująco:

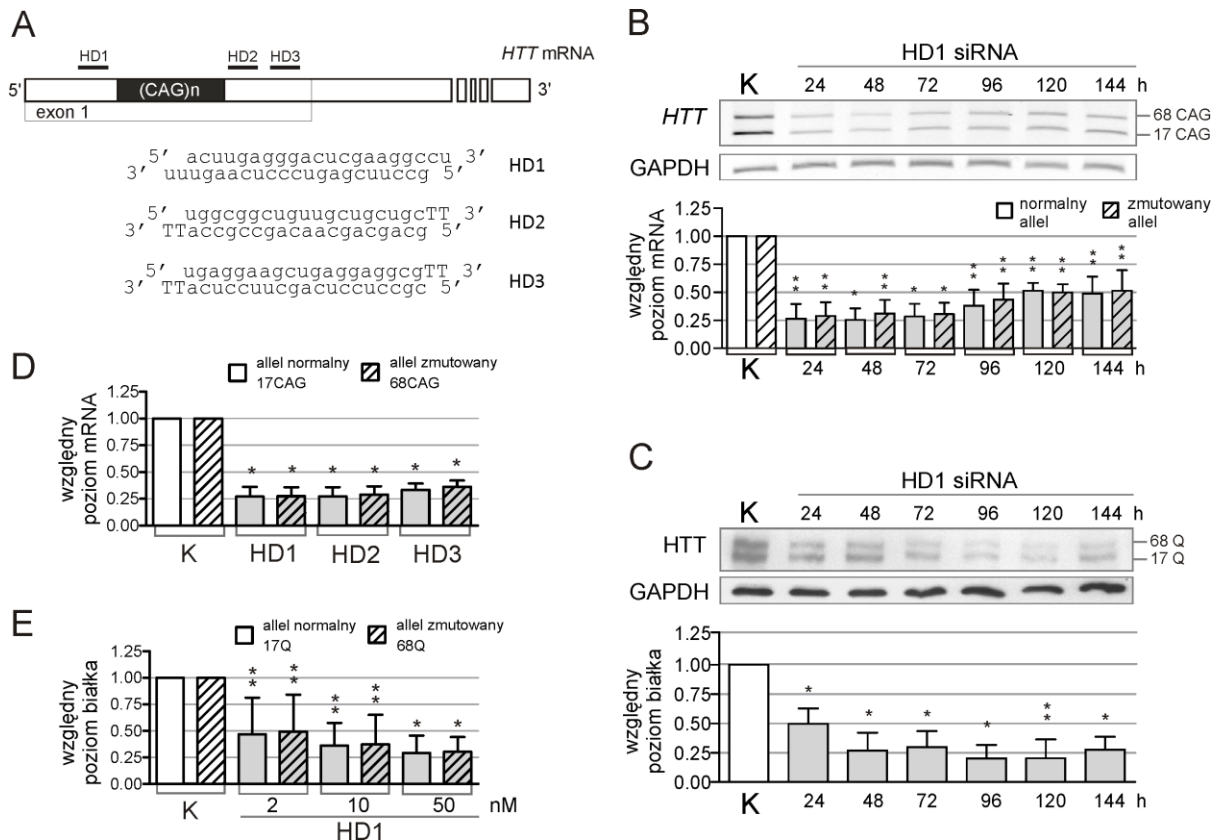
- Model badawczy stanowią komórki fibroblastów, wyprowadzone od pacjentów z trzema chorobami poliglutaminowymi: chorobą Huntingtona i ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 1 i typu 3. W komórkach tych ulegają ekspresji zarówno geny sprawcze, odpowiednio: *HTT*, *ATXN1* i *ATXN3*, zawierające wydłużone ciągi powtórzeń CAG, jak i normalne allele tych genów oraz inne geny z powtórzeniami CAG i CTG.
- Do wyciszenia ekspresji genów użyto syntetycznych oligonukleotydów i ich analogów.
- Oligonukleotydy wprowadzano do komórek metodą transfekcji z użyciem lipidów kationowych.
- Analizę wyciszenia ekspresji genu prowadzono dla jego transkryptu metodą RT-PCR, natomiast dla produktu białkowego metodą *western blot*. Zastosowane metody umożliwiają, w przypadku komórek z mutacją w genach odpowiedzialnych za choroby poliglutaminowe, niezależną analizę poziomu ekspresji allelu normalnego i zmutowanego. Jest to szczególnie istotne dla strategii zakładających allelo-selektywne działanie reagentów.
- W przeprowadzanych analizach odniesienie dla aktywności testowanych reagentów stanowi poziom ekspresji genu, po podaniu do komórek kontrolnego siRNA, nieposiadającego sekwencji komplementarnej w ludzkim transkryptomie (nazywany poziomem odniesienia lub poziomem kontrolnym).

Testowane w tej pracy strategie terapeutyczne dla chorób poliglutaminowych obejmują: wyciszenie nie-allelo-selektywne, celowanie w region zawierający SNP, oraz celowanie w region powtórzeń trójnukleotydowych CAG.

2. Wyciszanie nie-allelo-selektywne

Reagenty RNAi są zwykle projektowane tak, aby celować w sekwencję specyficzną wybranego genu, występującą w obrębie mRNA. Testowanie siRNA, specyficznie celujących w określony gen bez rozróżniania jego alleli, przeprowadzono dla modelu HD. Zaprojektowano 3 siRNA, których sekwencje docelowe zlokalizowane są w genie *HTT* w odległości kilkudziesięciu nt od ciągu powtórzeń, po stronie 5' ciągu (siRNA HD1) lub po jego stronie 3' (siRNA HD2 i HD3) (Ryc. 9A).

W pierwszym etapie badań określono kinetykę wyciszania ekspresji genu *HTT*, w zależności od czasu, zarówno dla mRNA, jak i białka. Komórki fibroblastów, pochodzące od pacjentów HD (GM04281, 17/68 CAG w genie *HTT*) transfekowano 50 nM siRNA HD1 i analizowano poziom ekspresji *HTT* przez 6 dni, w odstępach 24 h (Ryc. 9B i C).



Rycina 9. Analiza efektów działania siRNA nacelowanych na sekwencję specyficzną mRNA *HTT* w linii komórkowej GM04281 (17/68 CAG w genie *HTT*). (A) Sekwencje siRNA nacelowanych na różne regiony sekwencji specyficznego genu *HTT*. Schematycznie pokazano lokalizację miejsc docelowych dla siRNA w mRNA *HTT*. (B) Analiza RT-PCR poziomu ekspresji *HTT* po transfekcji 50 nM siRNA we wskazanych punktach czasowych. (C) Analiza typu *western* poziomu ekspresji huntingtyny po transfekcji 50 nM siRNA we wskazanych punktach czasowych. (D) Analiza RT-PCR poziomu ekspresji *HTT* po 72 h od transfekcji 50 nM siRNA HD1, HD2 lub HD3. (E) Analiza typu *western* 72 h po transfekcji 2, 10 i 50 nM siRNA HD1. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

Znaczące obniżenie poziomu ekspresji *HTT* obserwowano już po 24 h, do ~25% poziomu kontrolnego w przypadku transkryptu i ~50% w przypadku białka. Po 72 h poziom transkryptu zaczął stopniowo wzrastać, natomiast dla białka obserwowano wyciszenie do ~25% poziomu kontrolnego nawet po 6 dniach od transfekcji. Nie obserwowano dyskryminacji alleli *HTT* w wyciszaniu, co było spodziewanym efektem.

Obniżenie poziomu transkryptu jest zwykle obserwowane już kilka godzin po podaniu siRNA (sprawdzono punkt czasowy 6 h po transfekcji, wyniki niepokazane), natomiast obniżenie poziomu białka następuje z reguły później, co jest związane z okresem półtrwania białek w komórce. Zanikanie efektów wyciszenia ekspresji genu w czasie jest związane z spadkiem stężenia reagentów w komórce, co wynika z ich degradacji oraz podziałów komórek.

Testowane 3 siRNA wykazywały podobną aktywność w obniżaniu poziomu transkryptu *HTT*, do 25-35% poziomu kontrolnego, po podaniu ich do fibroblastów HD w 50 nM stężeniu (Ryc. 9D). Efektywność wyciszania białka huntingtyny była analizowana dla siRNA HD1, 72 h po transfekcji w zakresie stężeń: 2-50 nM (Ryc. 9E). Reagent powodował około 50% obniżenie poziomu białka przy stężeniu 2 nM i wyciszenie do ~25% poziomu kontrolnego przy stężeniu 50 nM.

Efektywność działania różnych siRNA, celujących w ten sam mRNA, jest zależna od właściwości sekwencji docelowej, tj. jej dostępności strukturalnej, jak i właściwości samego reagenta, zależnych od jego sekwencji i warunkujących wiązanie przez kompleks RISC. Dla wybranych trzech siRNA żadne z tych czynników nie okazały się na tyle różne, aby powodować wyraźne różnice w aktywności reagentów.

3. Strategia celowania w region SNP

Strategia celowania w regiony zawierające SNP wykorzystuje zjawisko RNAi i zdolność kompleksu efektorowego RISC, załadowanego przez siRNA, do rozróżniania dwóch alleli genu na podstawie różnic pojedynczych nukleotydów w sekwencji docelowej. W strategii opracowywanej dla chorób poliglutaminowych, reagenty RNAi są nacelowane na sekwencję zawierającą określony wariant SNP występujący w allelu z mutacyjnie wydłużonym ciągiem powtórzeń CAG.

Testowanie strategii celowania w regiony SNP zostało przeprowadzone na modelach trzech chorób poliglutaminowych: SCA3, HD i SCA1. Celowanie w wybrany wariant SNP dla SCA3 (rs12895357) było już opisywane w literaturze, ale testowano jedynie działanie reagentów na egzogenne, ulegające ekspresji w komórkach z wprowadzonymi konstrukcjami wektorowymi. W tej pracy przeprowadzono badania na linii komórkowej zawierającej endogenne allele różniące się wariantami SNP. Wybrany dla HD SNP (rs1065745) nie był badany w żadnej z opublikowanych prac dotyczących tego modelu; natomiast model SCA1, i stąd także wybrany SNP (rs179990), nie był dotąd w ogóle uwzględniany w kontekście tej strategii.

W projektowaniu siRNA nacelowanych na sekwencje zawierające SNP kierowano się opisanymi w literaturze zasadami planowania tego typu reagentów, które uwzględniają lokalizację niesparowania, długość reagentów czy wprowadzanie dodatkowych niesparowań. Metoda wyceny efektów działania siRNA umożliwiła niezależną analizę poziomu transkrypcji normalnego i zmutowanego dla wszystkich badanych modeli, a w przypadku modelu SCA3, również niezależną analizę poziomu obydwu alleli białka.

3.1 Wybór wariantów SNP do testowania strategii

W celu dokonania wyboru odpowiednich wariantów SNP, przeprowadzono najpierw poszukiwania heterozygotycznych SNP w liniach komórkowych fibroblastów pochodzących od pacjentów z SCA3, HD i SCA1. Na podstawie przeglądu publikacji i bazy dbSNP (NCBI), wyselekcjonowano SNP zlokalizowane w eksonach genów *ATXN3*, *HTT* i *ATXN1*. Poszukiwanie heterozygotycznych wariantów SNP, w poszczególnych liniach komórkowych, prowadzono przez sekwencjonowanie produktów PCR zawierających region występowania danego polimorfizmu. Zidentyfikowanie genotypu heterozygotycznego, względem danego SNP, wymagało jeszcze określenia, na którym z alleli występują poszczególne warianty sekwencji. Wybrane SNP dla różnych genów były zlokalizowane na tyle blisko ciągu

powtórzeń, że możliwa była amplifikacja metodą PCR produktu zawierającego różnicujące allele regiony, zarówno powtórzeń trójnukleotydowych, jak i SNP. Różnica w długości ciągu powtórzeń między allelem normalnym a zmutowanym umożliwiała rozdział produktów PCR w żelu agarozowym. Produkty następnie sekwencjonowano i w ten sposób ostatecznie określano występowanie poszczególnych wariantów SNP w allelach genu. Wyniki przeprowadzonych analiz są przedstawione w Tabeli 5.

Tabela 5. Zestawienie wyników poszukiwania SNP w liniach komórkowych z mutacjami w genach *HTT*, *ATXN1* i *ATXN3*. Niebieskim kolorem zaznaczono SNP wybrane do dalszych badań (n.a. – nie analizowano).

<i>HTT</i>	GM01083	GM01187	GM03864	GM04208	GM04281	GM04022
Liczba powtórzeń CAG:	19/44	18/47	15/46	21/44	17/68	19/44
rs362307	n.a.	c/c	c/c	c/c	c/c	n.a.
rs362306	n.a.	g/g	g/g	g/g	g/g	n.a.
rs362305	n.a.	g/g	g/g	g/g	g/g	n.a.
rs362268	n.a.	c/c	c/c	c/c	c/c	n.a.
rs4690074	c/c	c/c	c/c	c/c	c/c	c/c
rs1065745	n.a.	n.a.	n.a.	t/c	c/c	n.a.
<i>ATXN1</i>	GM06927					
Liczba powtórzeń CAG:	27/52					
rs179990	t/c					
<i>ATXN3</i>	GM06151	GM06153				
Liczba powtórzeń CAG:	18/65	18/69				
rs12895357	g/c	g/c				
rs16999141	c/c	c/t				
rs1048755	a/g	a/g				

Nazwa genu
Nr linii komórkowej
Liczba powtórzeń allelu normalnego/zmutowanego
SNP (nr z bazy NCBI) allelu normalnego/zmutowanego

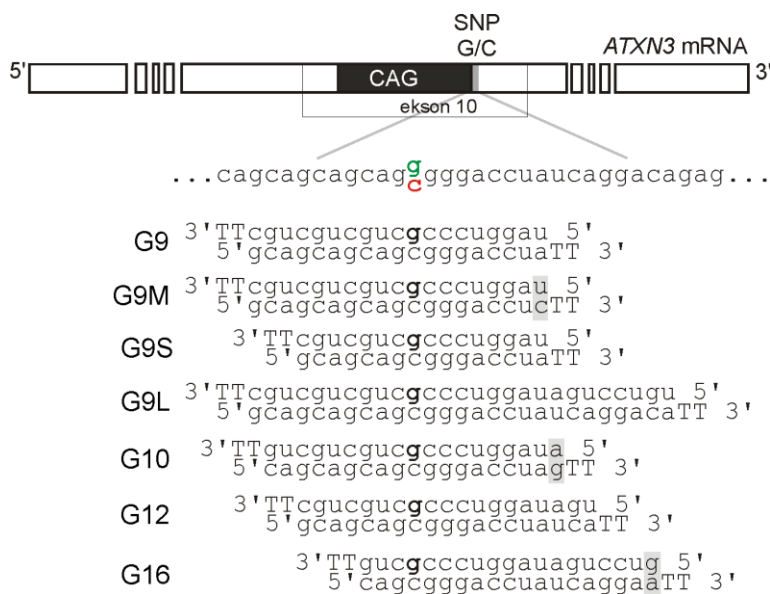
3.2 Celowanie w SNP dla SCA3

3.2.1 Wybór SNP i projektowanie reagentów

Do celowania w zmutowany gen odpowiedzialny za SCA3 wybrano SNP nr rs12895357, zlokalizowany tuż za ciągiem powtórzeń CAG w mRNA *ATXN3*. W linii komórkowej fibroblastów SCA3, z długością ciągu powtórzeń CAG w allelach *ATXN3*:

18/69, występują warianty SNP odpowiednio: G/C. Częstość występowania tego SNP jest określana na ~75% dla wariantu G i ~25% dla wariantu C (dbSNP).

Dla tego SNP zaprojektowano zestaw siRNA, gdzie miejsce niesparowania w oddziaływaniu z allelem normalnym zostało ulokowane w pozycji 9 (G9), 10 (G10), 12 (G12) lub 16 (G16) nukleotydu licząc od końca 5' nici antysens siRNA. Sekwencja reagentów jest przedstawiona na Ryc. 10. Ponadto, zaprojektowano trzy warianty siRNA G9: zawierający dodatkowe niesparowanie w duplesie (G9M), złożony z krótszych, 18-nt nici (G9S) oraz z dłuższych, 27-nt nici (G9L).



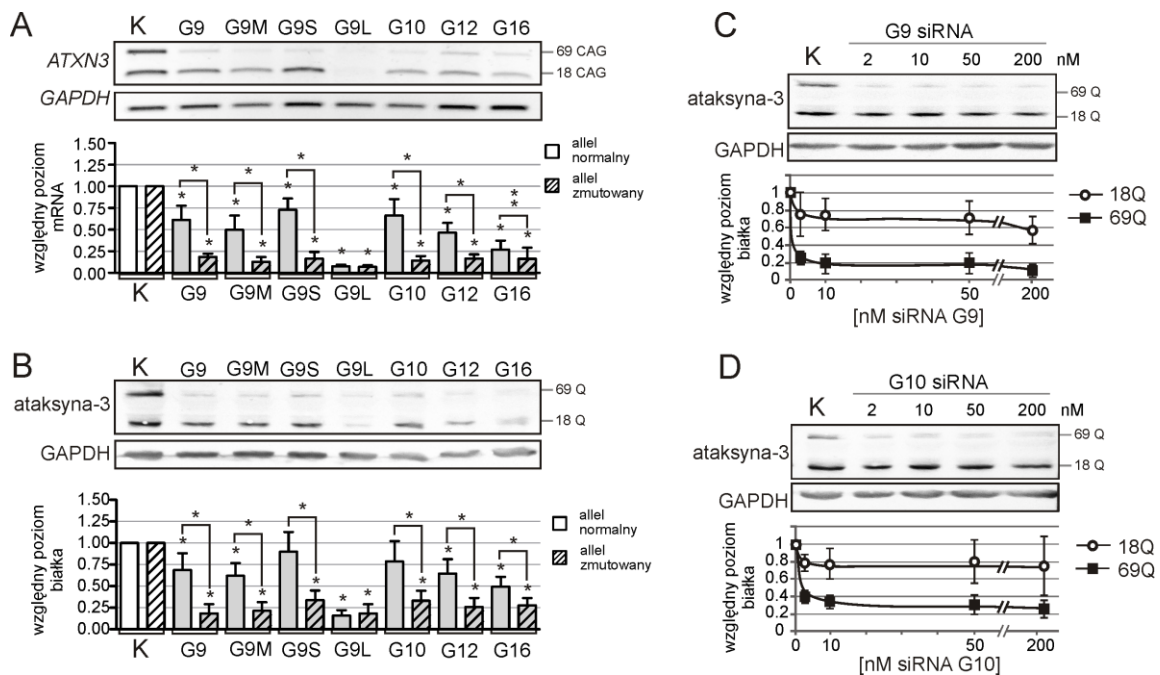
Rycina 10. Sekwencje siRNA nacelowanych na region zawierający SNP w genie *ATXN3* (warianty SNP dla allelu normalnego i zmutowanego oznaczono, odpowiednio, kolorem zielonym i czerwonym). Schematycznie przedstawiono lokalizację sekwencji docelowej dla siRNA w mRNA. Pogrubioną czcionką oznaczono nukleotyd nici antysens siRNA oddziałujący z SNP w mRNA. Nukleotydy na szarym tle oznaczają wprowadzone niesparowanie w duplesie siRNA, które powinno promować włączanie nici antysensowej do AGO2.

3.2.2 Aktywność siRNA w komórkach SCA3

Zaprojektowane siRNA transfekowano do komórek SCA3 (GM06153, 18/69 CAG w genie *ATXN3*) w stężeniu 50 nM i określano poziom mRNA i białka genu *ATXN3* (Ryc. 11A i B). Izolację RNA przeprowadzano po 24 h od transfekcji, natomiast izolację białka po 72 h. Wszystkie siRNA efektywnie wyciszały ekspresję allelu zmutowanego *ATXN3*, powodując obniżenie poziomu jego ekspresji o co najmniej 75%. Większość siRNA wykazywała także dyskryminację alleli, najbardziej znacząca allelo-selektywność działania była zaobserwowana dla G9, G9M, G9S i G10. Reagenty modyfikowane pod względem długości, G9S i G9L

wykazywały odpowiednio zmniejszoną i zwiększoną aktywność w porównaniu do G9, ale bez poprawy pod względem dyskryminacji alleli.

Efekty działania G9 i G10 analizowane były dla białka ataksyny-3 w szerszym zakresie stężeń, od 2 nM do 200 nM (Ryc. 11C i D). Obydwa reagenty wykazywały znaczną allelo-selektywność działania względem allelu zmutowanego w całym testowanym zakresie stężeń. G9 wykazywał wyższą efektywność działania, obniżając poziom zmutowanej ataksyny-3 o około 80%, już w 2 nM stężeniu (Ryc. 11C). Dla obu siRNA obserwowano stosunkowo nieduże wyciszenie normalnej ataksyny-3, maksymalnie o 40%, przy najwyższym, 200 nM stężeniu podawanych reagentów.



Rycina 11. Analiza efektów działania siRNA nacelowanych na SNP w genie *ATXN3* w linii GM06153. (A) Analiza RT-PCR poziomu ekspresji *ATXN3* 24 h po transfekcji 50 nM siRNA. (B) Analiza typu *western* poziomu ekspresji ataksyny-3 72 h po transfekcji 50 nM siRNA. (C) Analiza typu *western* 72 h po transfekcji 2, 10, 50 i 200 nM siRNA G9 lub G10 (D). K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001<p< 0,05; * p<0,001.

3.3 Celowanie w SNP dla HD

3.3.1 Wybór SNP i projektowanie reagentów

Testowanie strategii celowania w SNP dla HD wykonano na przykładzie polimorfizmu rs1065745, zlokalizowanego w eksonie 9, ~1000 nt za ciągiem powtórzeń w mRNA *HTT*. Ten SNP zidentyfikowano w linii fibroblastów HD w wariantach T/C

w allelach zawierających odpowiednio 21/44 powtórzenia CAG, przy czym wariant T występuje stosunkowo rzadko w populacji (dbSNP).

Zaprojektowano 6 siRNA celujących w region wybranego SNP, lokując miejsce niesparowania w oddziaływaniu z allelem normalnym w pozycji 9 (G9), 10 (G10) lub 16 (G16) nukleotydu licząc od końca 5' nici antysens siRNA. Dla G10 zaplanowano 3 dodatkowe warianty siRNA: dwa posiadające dodatkowe, różnie ułożone, niesparowania z mRNA (G10M1 i G10M2), oraz jeden złożony z krótszych 18-nt nici (G10S). Sekwencja reagentów jest przedstawiona na Ryc. 12.



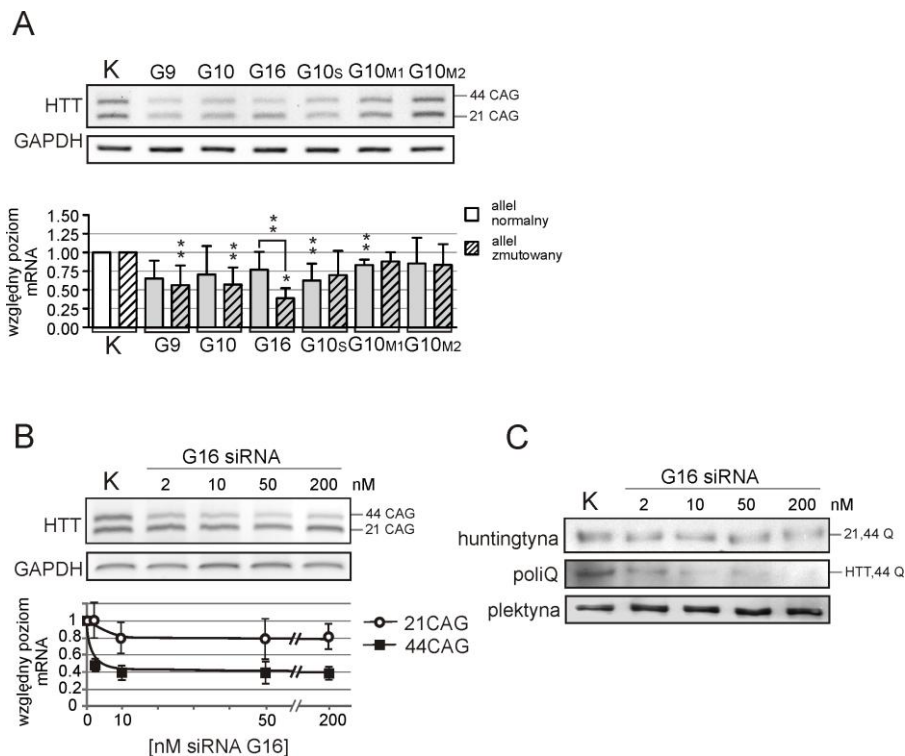
Rycina 12. Sekwencje siRNA naczelnym region zawierający SNP w genie *HTT* (warianty SNP dla allelu normalnego i zmutowanego oznaczono, odpowiednio, kolorem zielonym i czerwonym). Schematycznie przedstawiono lokalizację miejsca docelowego dla siRNA w mRNA. Pogrubioną czcionką oznaczono nukleotydy nici antysens siRNA oddziałujący z SNP w mRNA oraz dodatkowe nukleotydy nieparujące się z mRNA. Nukleotydy na szarym tle oznaczają wprowadzone niesparowanie w dupleksie siRNA, które powinno promować nić antysens do włączenia w RISC.

3.3.2 Aktywność siRNA w komórkach HD

Cząsteczki siRNA transfekowano w stężeniu 50 nM do komórek HD (GM04208, 21/44 CAG w genie *HTT*) i 24 h po transfekcji izolowano z komórek RNA w celu określenia poziomu ekspresji genu *HTT*. Znacząca allelo-selektywność działania charakteryzowała siRNA G16, pozostałe reagenty wyciszały ekspresję obu alleli lub nie wykazywały żadnej aktywności (Ryc. 13A). Zdolność wyciszania transkryptu i białka genu *HTT* przez G16 była następnie analizowana w szerszym zakresie stężeń, od 2 do 200 nM (Ryc. 13B i C). We wszystkich testowanych stężeniach G16 wykazywał znaczące rozróżnianie transkryptu

zmutowanego od normalnego, powodując niewielkie obniżenie poziomu normalnego mRNA, o nie więcej niż 20%, i znaczące wyciszenie ekspresji zmutowanego allelu, do ~40% poziomu kontrolnego (Ryc. 13B).

Analizę wyciszenia białka przeprowadzono z użyciem przeciwciał specyficznych dla białka huntingtyny w celu określenia całkowitego poziomu białka, oraz z przeciwciałami specyficznymi dla zmutowanych ciągów poliQ dla określenia poziomu białka zmutowanego. Stwierdzono znacznie obniżony poziom zmutowanej huntingtyny, do około 20% poziomu kontrolnego (Ryc. 13C).



Rycina 13. Analiza efektów działania siRNA nacelowanych na SNP w genie *HTT* w modelu HD (linia GM04208). (A) Analiza RT-PCR poziomu ekspresji *HTT* 24 h po transfekcji 50 nM siRNA. (B) Analiza RT-PCR poziomu ekspresji *HTT* 24 h po transfekcji 2, 10, 50 i 200 nM G16. (C) Analiza typu *western* z użyciem przeciwciał anty-huntingtyna i anty-poliQ 72 h po transfekcji 2, 10, 50 i 200 nM G16. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001<p< 0,05; * p<0,001.

3.4 Celowanie w SNP dla SCA1

3.4.1 Wybór SNP i projektowanie reagentów

Na modelu SCA1 testowano celowanie w SNP o wariantach C/T (rs179990), zlokalizowany ~250 nt za ciągiem powtórzeń w eksonie 8 genu *ATXN1*. Około 40% populacji ma genotyp heterozygotyczny względem tego SNP (dbSNP), co świadczy o dużej

potencjalnej użyteczności tego SNP w opracowywanej strategii. W linii komórkowej fibroblastów SCA1, allele genu *ATXN1* charakteryzują się długościami ciągu powtórzeń CAG: 27/43, i wariantami SNP, odpowiednio: T/C. Ciąg powtórzeń CAG w allelu normalnym *ATXN1* jest zaburzony interupcjami CAT, kodującymi histydynę. W badanej linii komórkowej sekwencja tego ciągu jest następująca: (CAG)_{x12} (CAT) (CAG) (CAT) (CAG)_{x14}.

Dla wariantu SNP w genie *ATXN1* zaprojektowano zestaw siRNA, gdzie miejsce niesparowania w oddziaływaniu z allelem normalnym zostało ulokowane w pozycji 9 (G9), 10 (G10), 11 (G11) lub 16 (G16) nukleotydu licząc od końca 5' nici antysens siRNA. Sekwencja reagentów jest przedstawiona na Ryc. 14.

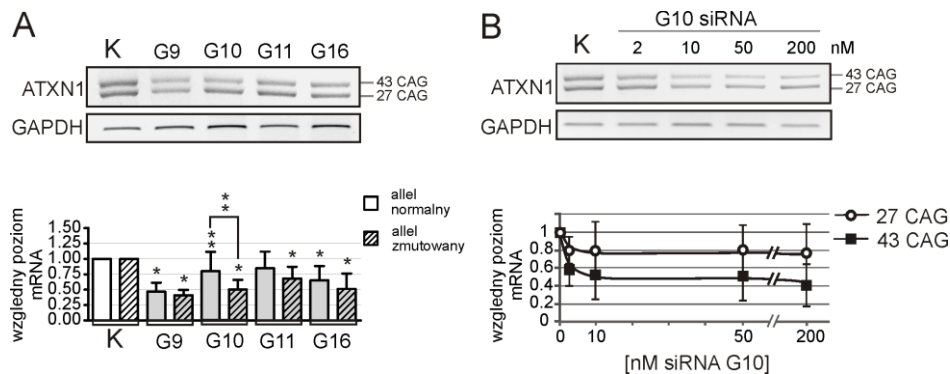


Rycina 14. Sekwencje siRNA nacelowanych na region zawierający SNP w genie *ATXN1* (warianty SNP dla allelu normalnego i zmutowanego oznaczono, odpowiednio, kolorem zielonym i czerwonym). Schematycznie przedstawiono lokalizację miejsca docelowego dla siRNA. Pogrubioną czcionką oznaczono nukleotyd nici antysens siRNA oddziałujący z SNP w mRNA. Nukleotydy na szarym tle oznaczają wprowadzone niesparowanie w duplesie siRNA, które powinno promować nic antysens do włączania w RISC.

3.4.2 Aktywność siRNA w komórkach SCA1

Cząsteczki siRNA transfekowano do komórek SCA1 (GM06927, 27/43 CAG w genie *ATXN1*) w stężeniu 50 nM i określano poziom mRNA *ATXN1* metodą RT-PCR, 24 h po transfekcji. Wszystkie siRNA wskazywały stosunkowo niską efektywność wyciszania allelu *ATXN1*, obniżając poziom transkryptu o nie więcej niż 60% (Ryc. 15A). Jedynie siRNA G10 wykazywał znaczącą allelo-selektywność działania i ten reagent przetestowano w szerszym zakresie stężeń (Ryc. 15B). Przy stężeniu 200 nM obserwowano ~20% i ~60% obniżenie poziomu odpowiednio allelu normalnego i zmutowanego. Nie przeprowadzono analizy

poziomu białka dla modelu SCA1 ze względu na niedostępność specyficznych przeciwciał dla ataksyny-1.



Rycina 15. Analiza efektów działania siRNA nacelowanych na SNP w genie *ATXN1* w linii GM06927. **(A)** Analiza RT-PCR poziomu ekspresji *ATXN1* 24 h po transfekcji 50 nM siRNA. **(B)** Analiza RT-PCR poziomu ekspresji *ATXN1* 24 h po transfekcji 2, 10, 50 i 200 nM G16. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

3.5 Podsumowanie wyników celowania w SNP

Spośród przebadanych SNP, warianty obecne w modelu SCA3 (allele 18x CAG/G i 69x CAG/C) stwarzały potencjalnie większe możliwości rozróżniania alleli przez siRNA. W tym przypadku może być wprowadzone silne niesparowanie purynowe G-G w oddziaływaniu siRNA z sekwencją w allelu normalnym, podczas gdy ten sam siRNA tworzy wiązanie G-C z sekwencją w allelu zmutowanym w miejscu występowania SNP. Dla modelu HD (allele 21x CAG/T i 44x CAG/C) i SCA1 (allele 29x CAG/T i 44x CAG/C) podstawę dyskryminacji alleli stanowi różnica w sile wiązania G-C, które tworzy siRNA z mRNA allelu zmutowanego, i wiązania typu wobble G-U, tworzonego w oddziaływaniu siRNA z mRNA allelu normalnego w miejscu SNP.

Faktycznie obserwowano silniejszą dyskryminację alleli przez siRNA w modelu SCA3, w porównaniu do modeli HD i SCA1. Wprowadzano dodatkowe modyfikacje sekwencji siRNA, które miały na celu zwiększenie działania allelo-selektywnego, tj. niesparowania siRNA z obydwojema allelami transkryptu, czy też skracanie nici siRNA. Zakładano, że być może dla krótszych dupleksów 1-nt niesparowanie będzie mało silniejszy efekt znoszący aktywność, niż w przypadku dłuższych reagentów. Nie zaobserwowano jednak wyraźnie takiej zależności.

Podsumowując, dla wszystkich modeli komórkowych i analizowanych SNP udało się wyselekcjonować siRNA o działaniu allelo-selektywnym w wyciszaniu ekspresji genu.

4. Strategia celowania w region powtórzeń trójnukleotydomych

Wydlużony ciąg powtórzeń CAG w transkrypcie może być miejscem wiązania komplementarnych oligonukleotydów, które spowodują obniżenie poziomu ekspresji genu. W następnych podrozdziałach opisano wykorzystanie różnego rodzaju oligonukleotydów i ich analogów, o sekwencji komplementarnej do powtórzeń CAG, testowanych jako potencjalne narzędzia terapeutyczne dla chorób poliglutaminowych.

4.1 Wykorzystanie typowych reagentów interferencji RNA

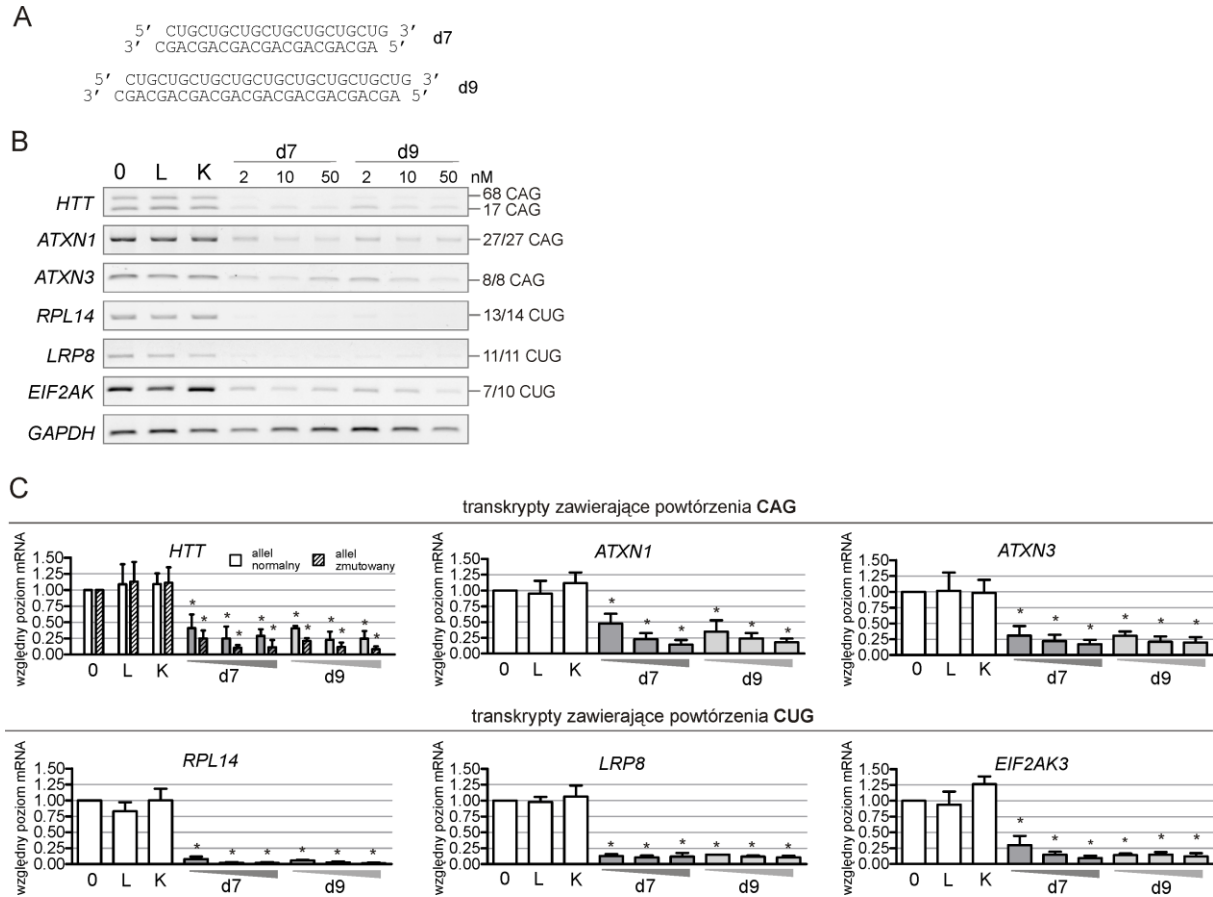
4.1.1 Charakterystyka działania siRNA złożonego z sekwencji powtórzonych CAG/CUG

W ramach badań aktywności dupleksu złożonego z powtórzeń CAG/CUG scharakteryzowano efekty jego działania na różne transkrypty zawierające ciągi powtórzeń CAG lub CUG. Dupleks CAG/CUG (d7) jest złożony z 21-nt nici zawierających wyłącznie sekwencję powtórzoną, preferencyjnie tworzących dupleks z 1-nt niesparowanymi końcami 3'. Przetestowano także działanie dłuższego dupleksu CAG/CUG (d9) złożonego z 27-nt nici (Ryc. 16A).

Reagenty zostały podane do komórek HD (GM04281, 17/68 CAG w genie *HTT*) w stężeniach: 2, 10, 50 nM i po 24 h określono poziom wyciszenia trzech transkryptów z powtórzeniami CAG: *HTT*, *ATXN1*, *ATXN3* oraz trzech z powtórzeniami CUG: *RPL14*, *LPR8*, *EIF2AK3*. Do analizy zostały wybrane geny ulegające ekspresji w komórkach fibroblastów zawierające ciągi co najmniej 7 powtórzeń CAG lub CTG, w wybranej linii komórkowej, co zapewnia obecność pełnej długości sekwencji docelowej dla jednej z nici dupleksu CAG/CUG.

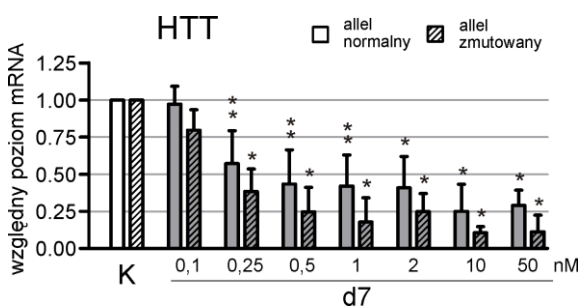
Jak przedstawiono na Ryc. 16B i C, obie nici dupleksów CAG/CUG efektywnie wyciszają ekspresję genów zawierających komplementarne ciągi powtórzeń. Poziom badanych transkryptów jest obniżony o ponad 50% przy najniższym analizowanym stężeniu siRNA (2 nM), a przy najwyższym (50 nM) poziom tych transkryptów wynosił co najwyżej 25% poziomu kontrolnego (Ryc. 16C). Dupleks d9 nie wykazuje znacząco zwiększonej efektywności działania, ani zmienionej allelo-selektywności. Nie zaobserwowano także znaczących różnic w poziomie analizowanych transkryptów dla komórek traktowanych tylko odczynnikiem transfekcyjnym (L) lub kontrolnym siRNA (K), w porównaniu do komórek

nietransfekowanych (0) (Ryc. 16B). Do dalszych analiz wybrano jako poziom odniesienia komórki transfekowane kontrolnym siRNA.



Rycina 16. Analiza efektów działania siRNA złożonych z powtórzeń CAG/CUG na transkrypty zawierające powtórzenia CAG i CUG w linii GM4281 (model HD). (A) Sekwencje dupleksów d7 i d9. (B) Przykładowe wyniki RT-PCR i ich analiza (C), dla transkryptów zawierających ciągi powtórzeń CAG lub CUG, 24 h po transfekcji 2, 10 i 50 nM d7 lub d9. 0- komórki nietransfekowane; L- komórki traktowane tylko odczynnikami transfekcyjnym; K- komórki transfekowane kontrolnym siRNA. * $p < 0,001$.

Dla najniższego użytego stężenia w eksperymencie przedstawionym na Ryc. 16, tj. 2 nM, zaobserwowano już znaczące obniżenie poziomu analizowanych transkryptów. Dla transkryptu *HTT* zbadano także zależność efektywności wyciszania ekspresji genu od stężenia dupleksu d7, w zakresie od 0,1 nM do 50 nM (Ryc. 17).

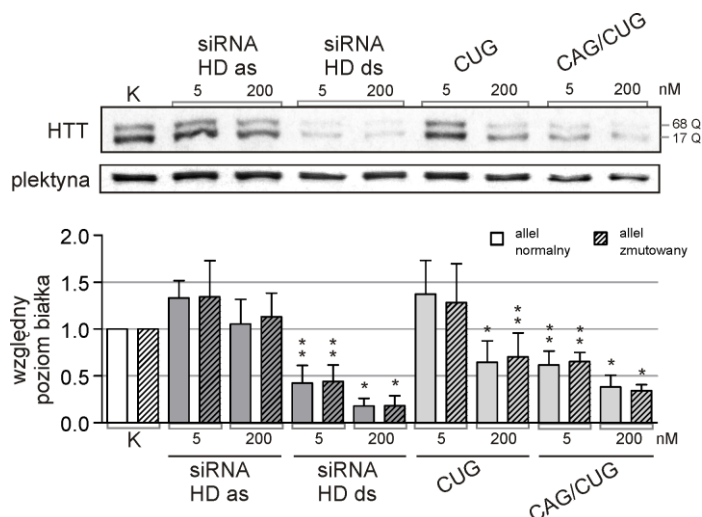


Rycina 17. Analiza efektów działania siRNA d7 na transkrypt *HTT* w zakresie stężeń 0,1 do 50 nM 24 h po transfekcji linii komórkowej GM04281. K- komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** $0,001 < p < 0,05$; * $p < 0,001$.

Stwierdzono istotne obniżenie poziomu transkryptu *HTT*, o około 50%, już przy 0,25 nM stężeniu. W całym spektrum użytych stężeń reagent d7 wykazuje nieznaczną allelo-selektywność działania. Maksymalny efekt wyciszenia *HTT* został osiągnięty przy stężeniu ~10 nM, gdzie poziom allelu zmutowanego został obniżony do około 10%, a allelu normalnego do około 25% (Ryc. 17).

4.1.2 Porównanie efektywności siRNA działających na sekwencje specyficzne lub powtórzone genu *HTT*

Wykonano eksperymenty w celu bezpośredniego porównania efektywności działania pojedynczych nici i dupleksów, nacelowanych zarówno na sekwencję specyficzną, jak i powtórzoną w transkrypcie *HTT*. Reagenty siRNA HD (testowany już wcześniej w eksperymentach przedstawionych na Ryc. 9 siRNA HD1) lub CAG/CUG (d7), w postaci dupleksów lub samych nici antysensowych, transfekowano do komórek HD (GM04281) w stężeniu 5 lub 200 nM i analizowano poziom huntingtyny (Ryc. 18). Wykazano dużo niższą aktywność pojedynczych nici, w porównaniu do dupleksów. Nic antysensowa siRNA HD nie jest w ogóle aktywna, natomiast nic złożona z powtórzeń CUG powoduje obniżenie poziomu huntingtyny o 30-40% przy stężeniu 200 nM. Jak wykazano w badaniach przedstawionych wcześniej (Ryc. 9 i Ryc. 17), obydwa dupleksy są aktywne już w stężeniu 5 nM, przy czym efektywność obniżania poziomu białka jest większa dla siRNA HD1, w porównaniu do d7.



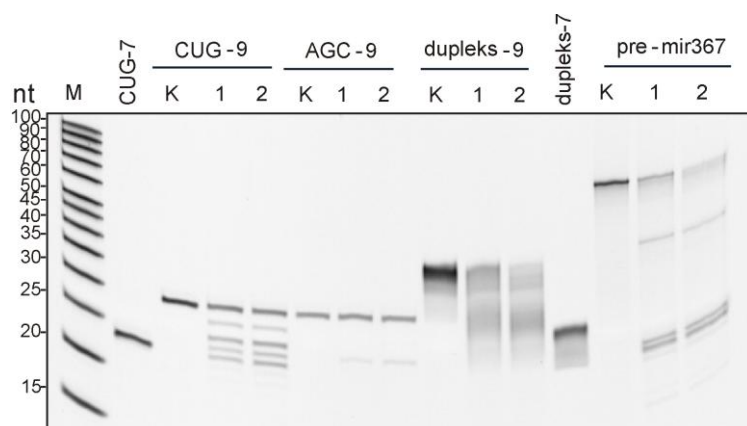
Rycina 18. Analiza efektów działania dupleksów i pojedynczych nici siRNA, nacelowanych na region sekwencji specyficznej i powtórzonej transkryptu *HTT*. Wyniki analizy typu *western* 72 h po transfekcji wskazanymi reagentami komórek HD (GM04281), as – nic antysensowa, ds – dupleks.

Uzyskany podobny wynik wyciszenia huntingtyny przez 200 nM pojedynczą nic CUG i 5 nM dupleks CAG/CUG, pokazuje potrzebę podania do komórek około 40-krotnie większego

stężenia nici antysensowej, aby uzyskać taki sam efekt jak dla dupleksu, w przypadku tego typu reagenta. Natomiast niższa efektywność działania dupleksu CAG/CUG na ekspresję huntingtyny, w porównaniu do siRNA HD, może wynikać z „rozproszenia” efektu z powodu obecności w komórce licznych sekwencji komplementarnych do nici złożonych z powtórzeń trójnukleotydydowych. Takie działanie siRNA celującego w sekwencję powtórzoną zaprezentowano dla sześciu przykładowych transkryptów na Ryc. 16.

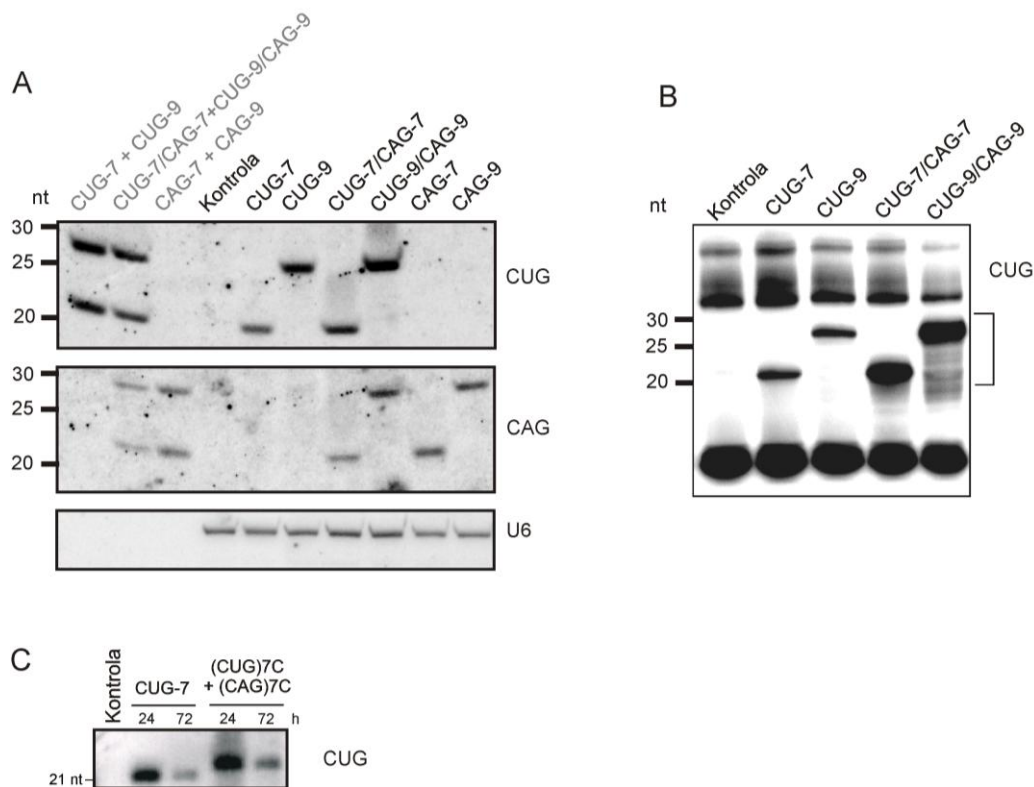
4.1.3 Wykrywanie wprowadzanych do komórek RNA złożonych z sekwencji powtórzonych

Wprowadzane do komórek syntetyczne RNA są rozpoznawane przez specyficzną maszynię białkową, m.in. związaną z procesem interferencji RNA. Krótkie RNA mogą podlegać specyficznemu „obróbce”, a w końcowym etapie degradacji. Dupleksy RNA są wiązane w komórce przez kompleks RISC zawierający, oprócz białka AGO, również RNazę Dicer. W przypadku dłuższych dupleksów niż 21 pz, są one najpierw docinane przez Dicer, analogicznie do prekursorów miRNA lub długich dsRNA. Aby sprawdzić czy stosowane w poprzednich eksperymentach 27 pz siRNA CAG/CUG (d9) podlegają obróbce przez Dicer przeprowadzono najpierw cięcie tych dupleksów *in vitro* z rekombinowaną Dicer. Reakcje wykonano dla d9 i jak również dla pojedynczych nici CUG-9 i AGC-9, z których składa się ten dupleks (Ryc. 19). Kontrolę pozytywną stanowiło cięcie prekursora miRNA pre-miR367. Analiza produktów reakcji w żelu poliakrylamidowym wykazała, że d9 może podlegać cięciu przez Dicer *in vitro*, choć obserwowane produkty nie były zdefiniowane. Pojedyncze nici o długości 27 nt, także mogą być cięte przez Dicer, choć mniej wydajnie, co zaobserwowano dla CUG-9, a w mniejszym stopniu dla AGC-9. Przecinananie tych RNA może być związane z tworzeniem przez nie drugorzędowej struktury, ponieważ nie wykazano dotychczas, aby pojedyncze nici były substratami dla Dicer.



Rycina 19. Analiza produktów cięcia krótkich RNA złożonych z powtórzeń CAG/CUG przez Dicer w reakcji *in vitro*. **M**- marker długości RNA; **K**- mieszanina reakcyjna bez enzymu, **1**- czas inkubacji 2,5 h; **2**- czas inkubacji 5 h.

Aby sprawdzić czy „docinanie” d9 przez Dicer zachodzi także w komórkach, do których jest wprowadzany ten reagent, wykonano analizę typu *northern* w celu wykrycia potencjalnych skróconych produktów (Ryc. 20A). Do linii kontrolnej fibroblastów (GM00024) wprowadzono w stężeniu 20 nM różne RNA złożone z powtórzeń: dupleksy d7 i d9 oraz pojedyncze nici, z których się składają. Po 24 h przeprowadzono izolację całkowitego RNA z komórek i wykonano analizę typu *northern* w celu wykrycia krótkich RNA złożonych z powtórzeń CAG lub CUG. Wykryto produkty odpowiadające wprowadzanym RNA, jednak nie zidentyfikowano produktów docinania przez Dicer (Ryc. 20A). Użyto także bardziej czulej metody, polegającej na hybrydyzacji typu *northern* prowadzonej w roztworze i następnie rozdziale produktów w żelu natywnym (Ryc. 20B). W hybrydyzacji z sondą CAG intensywność uzyskanych sygnałów była większa, chociaż ponownie nie wykryto wyraźnych produktów docinania przez Dicer. Jedynie dla d9 są widoczne krótsze produkty, ale ich udział w porównaniu do nieprzeciętego d9 jest znikomy i może być obrazem degradacji.



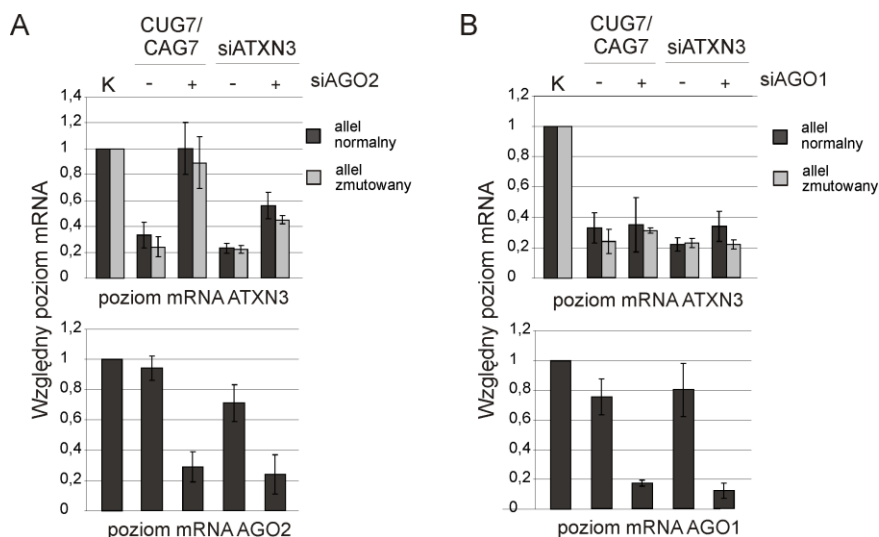
Rycina 20. Analiza typu *northern* wykrywająca wprowadzone uprzednio do komórek GM00024 krótkie RNA złożone z powtórzeń CAG/CUG. **(A)** Analiza typu *northern*, z użyciem sond CAG, CUG i kontrolnie U6, 48 h po transfekcji 20 nM RNA CUG/CAG w formie pojedynczych nici lub dupleksów. W pierwszych trzech ścieżkach nałożono syntetyczne RNA. **(B)** Analiza typu *northern* w roztworze, dla sondy CAG i całkowitego RNA wyizolowanego z komórek 48 h po transfekcji 20 nM wymienionymi RNA. **(C)** Analiza typu *northern* dla wykrycia krótkich RNA CUG z komórek 24 h lub 72 h po transfekcji 20 nM wymienionymi RNA. Kontrola – komórki traktowane kontrolnym siRNA.

Dodatkowo, wykrywanie krótkich RNA wprowadzanych do komórek było prowadzone po 24 i 72 h od transfekcji, dla uzyskania obrazu postępu ich degradacji (Ryc. 20C). Przeprowadzona analiza wskazuje na dużą różnicę w stopniu ich degradacji między analizowanymi punktami czasowymi. Jednocześnie dla wszystkich przeprowadzonych analiz typu *northern*, szczególnie dla przedstawionej na Ryc. 20B, obserwowano większą intensywność sygnałów pochodzących od nici, które były podawane do komórek w formie dupleksów. Potwierdza to większą stabilność dupleksów w porównaniu do pojedynczych nici w komórce.

4.1.4 Badanie mechanizmu działania siRNA na sekwencje powtórzone CAG/CUG

W indukowaniu efektów wyciszania ekspresji genów przez siRNA kluczową rolę odgrywają białka z rodziny AGO. Choć główną rolę pełni AGO2, nie jest to jedyny przedstawiciel tej rodziny, który może prowadzić do obniżania poziomu transkryptu zawierającego sekwencję komplementarną do siRNA.

W celu określenia roli białek AGO1 i AGO2 w działaniu siRNA CAG/CUG, w komórkach fibroblastów SCA3 obniżono poziom ekspresji tych białek z użyciem siRNA siAGO1 i siAGO2. W pierwszym dniu podawano do komórek 50 nM siAGO1 lub siAGO2, następnie po 48 h wykonywano transfekcję 20 nM siRNA CAG/CUG lub siATXN3. Po kolejnych 48 h izolowano RNA i określano poziom mRNA ATXN3.

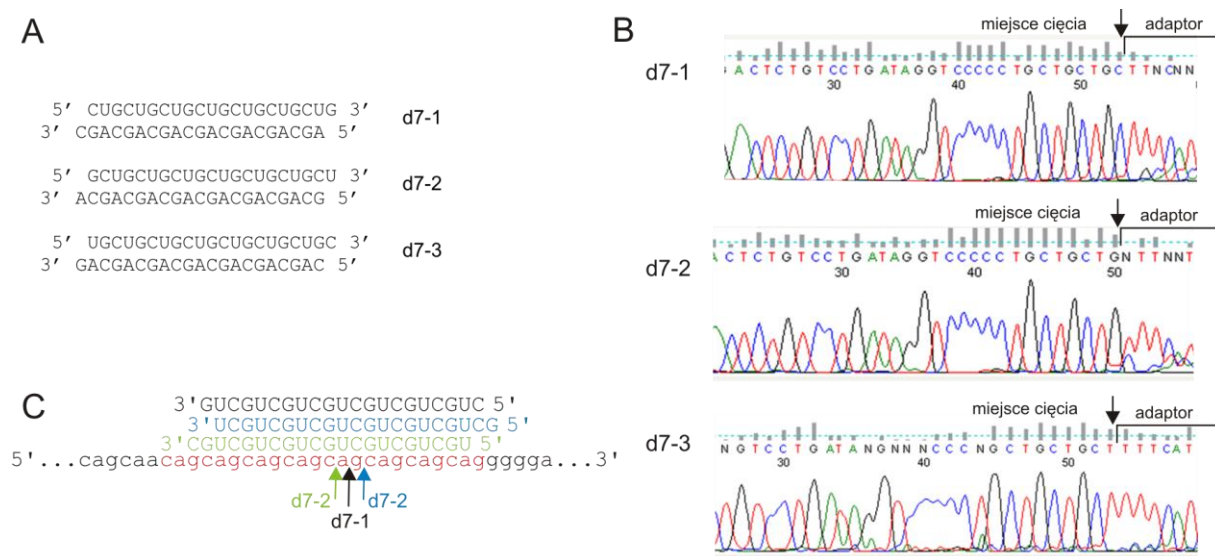


Rycina 21. Wpływ obniżenia ekspresji genów *AGO1* i *AGO2* na efektywność działania siRNA złożonego z powtórzeń CAG/CUG oraz siRNA specyficznego dla genu ataksyny-3 (siATXN3) w linii komórkowej GM06153 (model SCA3). (A) Analiza RT-PCR poziomu ekspresji alleli *ATXN3* i genu *AGO2* po transfekcji wskazanymi siRNA. (B) Analogiczna analiza dla wyciszania ekspresji *AGO1*. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA.

Obniżenie poziomu transkryptu AGO2 do około 30% skutkuje całkowitym zniesieniem aktywności dupleksu CAG/CUG i znaczącym obniżeniem efektywności wyciszania ekspresji ATXN3 przez siATXN3 (Ryc. 21A). Z kolei redukcja poziomu transkryptu AGO1 o ponad 80% wykazała brak zmian w aktywności zarówno siRNA CAG/CUG, jak i siATXN3 (Ryc. 21B).

Podstawowy mechanizm działania siRNA w kompleksie z AGO2 prowadzi do przecinania transkryptu w miejscu wiązania fosfodiesterowego między 10 a 11 nukleotydem, licząc od końca 5' nici antysensowej siRNA. Do wykrycia produktów przecinania transkryptu ATXN3 w komórkach, do których zostały podane siRNA CAG/CUG, wykorzystano metodę 5'RACE (ang. *Rapid Amplification of cDNA Ends*).

Komórki fibroblastów transfekowano 20 nM siRNA CAG/CUG w trzech wariantach: d7-1, d7-2, d7-3, różniących się nukleotydami, od których rozpoczynają się sekwencje nici (Ryc. 22A). Po 24 h izolowano RNA i analizowano metodą 5'RACE.

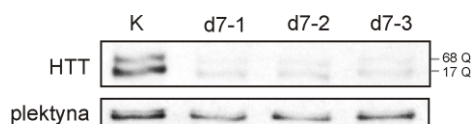


Rycina 22. Wyniki analizy produktów cięcia transkryptu *ATXN3* w regionie powtórzeń po podaniu do komórek GM04208 różnych wariantów siRNA d7. **(A)** Sekwencje testowanych dupleksów CAG/CUG. **(B)** Wyniki sekwencjonowania produktów 5'RACE z zaznaczonym miejscem ligacji przeciętego w komórce transkryptu i adaptoru. **(C)** Zidentyfikowane, indukowane obecnością w komórkach poszczególnych dupleksów, miejsca cięcia w obrębie ciągu 8 powtórzeń CAG transkryptu *ATXN3*.

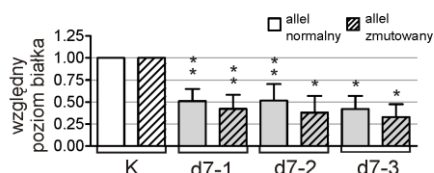
W przeprowadzonych badaniach użyto linię komórkową fibroblastów HD, posiadającą w obu allelach genu *ATXN3* 8 powtórzeń CAG. Tak uproszczony model ograniczał liczbę cięć

w sekwencji powtórzonej ułatwiają analizę specyficznych produktów. Sekwencjonowanie uzyskanych dominujących produktów potwierdziło lokalizację miejsc cięcia transkryptu *ATXN3* w specyficznych dla AGO2 miejscach (Ryc. 22B, C).

Dodatkowo zbadano poziom wyciszenia ekspresji huntingtyny przez dupлексы d7, nieznacznie różniące się sekwencją i nie stwierdzono istotnych różnic w ich działaniu, co sugeruje, że dla tego typu reagentów sekwencja nukleotydu znajdującego się na końcu 5' lub 3' nie ma znaczenia dla efektywności ich działania.



Rycina 23. Porównanie aktywności dupлексы d7. Analiza typu western 72 h po transfekcji 50 nM siRNA d7-1, d7-2 lub d7-3. K- komórki traktowane kontrolnym siRNA.



4.2 Modyfikacje sekwencji reagentów złożonych z powtórzeń

4.2.1 Projektowanie modyfikowanych reagentów

Jak pokazano w poprzednich eksperymentach, dupлексы CAG/CUG są efektywnymi reagentami RNAi, zdolnymi do wyciszenia ekspresji szeregu genów zawierających powtórzenia trójnukleotyдовые. Nie wykazują one jednak pożądanej allelo-selektywności działania względem wariantów zmutowanych. Postanowiono zatem zmodyfikować dupлексы CAG/CUG, tak aby nieznacznie osłabić siłę oddziaływania nici CUG z sekwencją docelową w ciągu powtórzeń CAG. W tym celu w sekwencji dupлексы zostały zmienione wybrane nukleotydy, tak aby zastąpić w niektórych pozycjach silne oddziaływania C-G (siRNA-ciąg CAG) parami typu *wobble*, U-G. W wyborze pozycji dla wprowadzanych zmian kierowano się wiedzą na temat wpływu lokalizacji niesparowań na efektywność działania siRNA (Du i wsp. 2005). Wiedza ta jest głównie wykorzystywana przy projektowaniu reagentów interferencji skierowanych na regiony zawierające mutacje pojedynczego nukleotydu lub warianty SNP.

Modyfikowane dupлексы CAG/CUG zaprojektowano tak, aby modyfikacje występowały w pozycjach: 13 (W13), 16 (W16), 13 i 16 łącznie (W13/16) oraz 1 i 19 łącznie (W1/19), licząc od końca 5' nici CUG (Ryc. 24). Nie uwzględniano pozycji w regionie centralnym i

tw. regionie *seed*, aby nie doprowadzić do całkowitego braku aktywności modyfikowanych siRNA w komórkach. Jednocześnie odpowiednie modyfikacje zostały wprowadzone w nici CAG, tak aby zachować pełną komplementarność dupleksu.



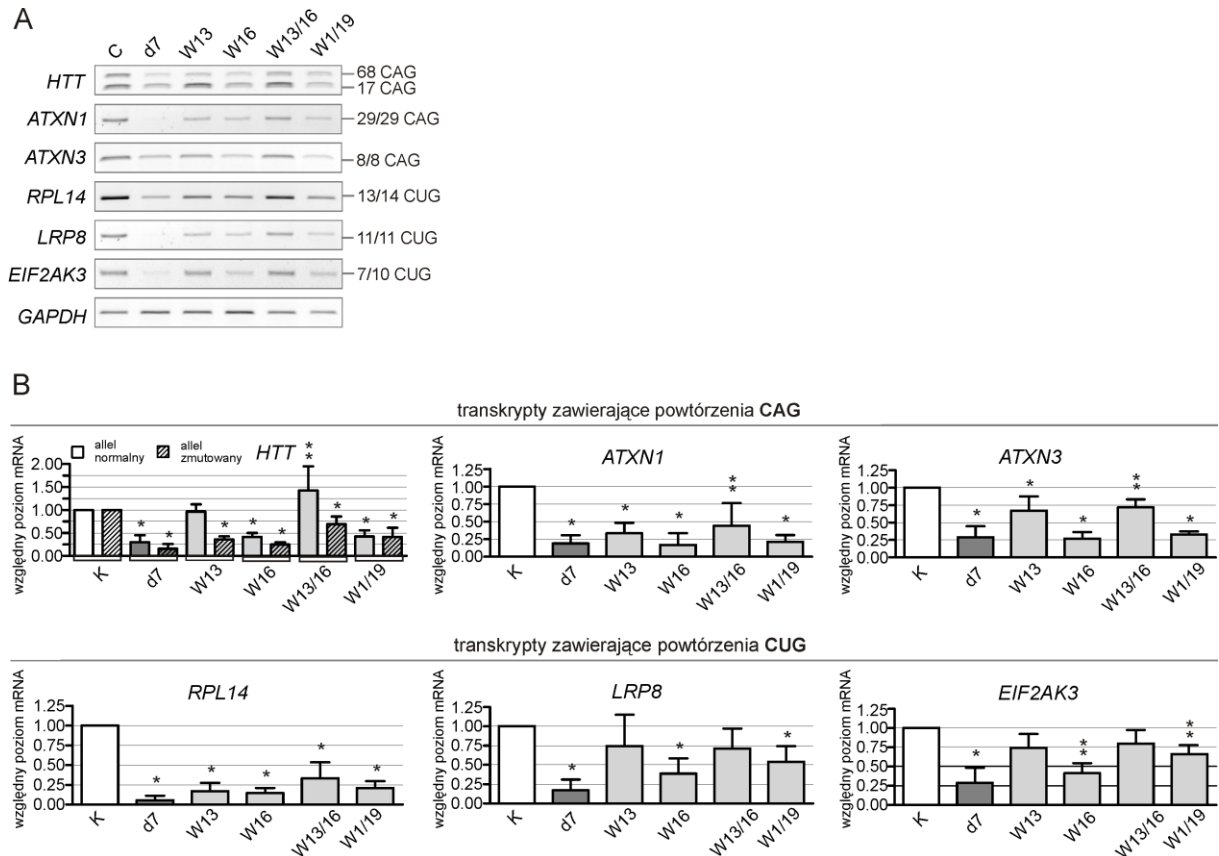
Rycina 24. Sekwencje dupleksów CUG/CAG zawierających substytucje zasad w wybranych pozycjach, zaprojektowanych na podstawie siRNA d7. Z prawej strony pokazane jest oddziaływanie nici CUG tych dupleksów z ciągiem powtórzeń CAG w transkrypcie (transkrypt zaznaczono kolorem czerwonym; w celu wyraźnego zaznaczenia osłabienia oddziaływania w konkretnych pozycjach przedstawiono pary U-G jako niesparowane).

4.2.2 Testowanie reagentów w liniach HD

4.2.2.1 Analiza efektów działania reagentów przeprowadzona dla RNA i białka

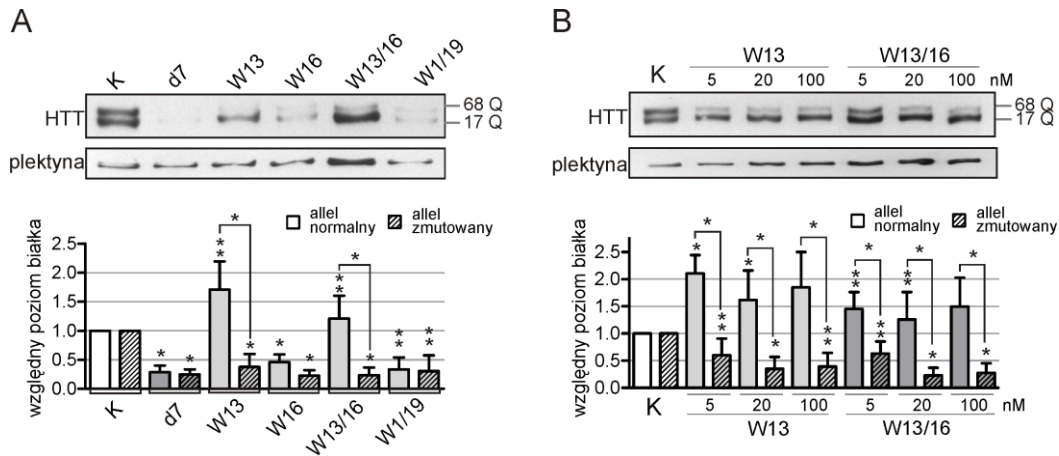
Efektywność i allelo-selektywność reagentów przetestowano na modelu komórkowym HD (linia GM04281, 17/68 CAG w genie *HTT*). Podano do komórek siRNA w stężeniu 20 nM i po 24 h od transfekcji określono poziom wyciszenia różnych transkryptów zawierających powtórzenia CAG i CUG, analogicznie jak w eksperymencie przedstawionym na Ryc. 16. Bezpośrednie odniesienie stanowiła aktywność dupleksu CAG/CUG (d7).

Wszystkie dupleksy, w porównaniu do d7, wykazywały zmniejszoną aktywność w działaniu na różne transkrypty, przy czym wyraźnie osłabione działanie obserwowano dla W13 i W13/16 (Ryc. 25). Efektywność obniżania poziomu transkryptów normalnych zawierających powtórzenia CAG (*ATXN1* i *ATXN3*) i CUG (*RPL14*, *LRP8* i *EIF2AK3*) była zróżnicowana, podobnie działanie na ekspresję alleli *HTT*. Dupleksy W16 i W1/19 wykazywały podobną do d7 aktywność względem *HTT*. Dupleks W13 jako jedyny zachowuje poziom ekspresji transkryptu normalnego *HTT*, natomiast dupleks W13/16 indukuje około 1,5-krotne podwyższenie poziomu tego transkryptu. Jednocześnie dupleksy W13 i W13/16 były jedynymi, które wykazywały allelo-selektywne działanie w wyciszaniu *HTT* (Ryc. 25).



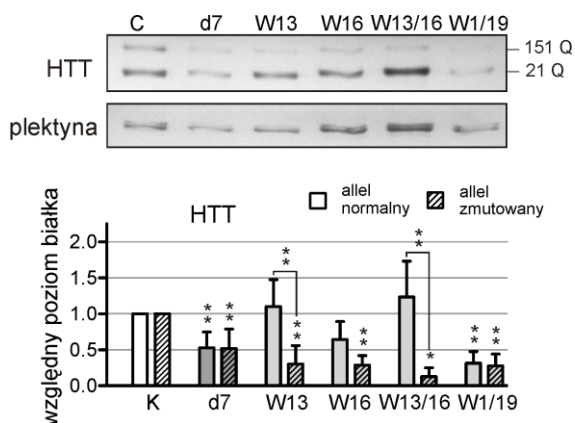
Rycina 25. Analiza efektów działania dupleksów zawierających niesparowania z sekwencją docelową w linii GM04281 (model HD) dla wybranych transkryptów zawierających powtórzenia CAG lub CUG. **(A)** Przykładowe wyniki RT-PCR i **(B)** analiza poziomu wybranych transkryptów zawierających ciągi powtórzeń CAG lub CUG 24 h po transfekcji 2, 10 i 50 nM d7 lub d9. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

Dla tych samych warunków transfekcji, jak w eksperymencie przedstawionym na Ryc. 25, przeprowadzono analizę wyciszenia białka huntingtyny. Wykazano podobną aktywność dupleksów W16 i W1/19 do d7, pod względem efektywności i allelo-selektywności działania (Ryc. 26A). Dla dupleksów W13 i W13/16 zaobserwowano wyraźne obniżenie poziomu zmutowanej huntingtyny, o co najmniej 60%, przy podwyższonym poziomie normalnej huntingtyny. Obserwacje te potwierdzono dla szerszego zakresu stężeń reagentów W13 i W13/16, już przy 5 nM stężeniu obserwowano obniżenie poziomu zmutowanej huntingtyny do około 50%, a przy 100 nM stężeniu efekt był podobny jak dla 20 nM stężenia (Ryc. 26B). Ponadto, powtarzalnie obserwowano podniesienie poziomu ekspresji normalnego allelu *HTT*, około 1,5-krotnie.



Rycina 26. Analiza efektów działania dupleksów zawierających niesparowania z sekwencją docelową w linii GM04281 (model HD) dla białka huntingtyny. (A) Analiza typu *western* poziomu huntingtyny 72 h po transfekcji 20 nM wymienionymi dupleksami. (B) Analiza typu *western* poziomu huntingtyny 72 h po transfekcji 5, 20 i 100 nM W13 lub W13/16. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001<p< 0,05; * p<0,001.

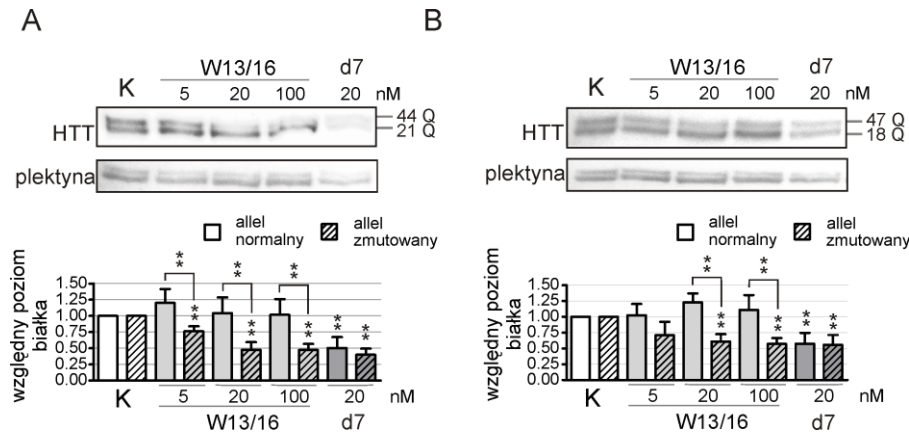
Działanie poszczególnych modyfikowanych dupleksów sprawdzono także w innej linii z mutacją w genie *HTT*, GM09197. Przeprowadzono analogiczny eksperyment jak przedstawiony na Ryc. 26A dla długości ciągów powtórzeń w *HTT*: 21/151 CAG (Ryc. 27). Obserwowano bardzo podobną aktywność testowanych reagentów jak w modelu z 17/68 powtórzeniami CAG w genie *HTT*. Dupleksy W16 i W1/19 wykazywały podobne właściwości w obniżaniu poziomu huntingtyny jak d7, natomiast W13 i W13/16 działały allelo-selektywnie wyciszając ekspresję zmutowanego allelu *HTT* o co najmniej 70% (Ryc. 27).



Rycina 27. Analiza efektów działania dupleksów zawierających niesparowania z sekwencją docelową w linii GM09197 (model HD) przeprowadzona dla białka huntingtyny. Analiza typu *western* poziomu białka HTT 72 h po transfekcji 20 nM wymienionymi dupleksami. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001<p< 0,05; * p<0,001.

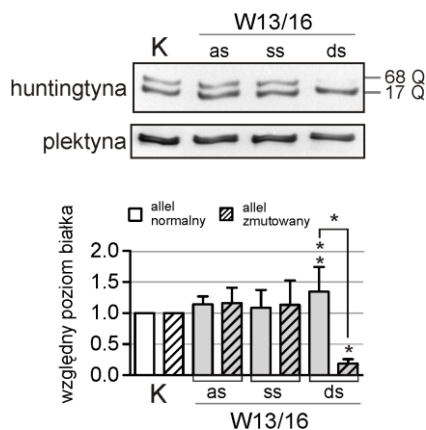
Efekty działania dupleksów W13 i W13/16 sprawdzono także w liniach komórkowych HD, charakteryzujących się długościami ciągów CAG, bardziej odpowiadającymi spotykanym najczęściej u pacjentów z chorobą Huntingtona, tzn. z ~45 powtórzeniami w allelu

zmutowanym genu *HTT*. Obserwowano podobny jak w linii GM04281 (17/68 CAG w *HTT*) trend aktywności dupleksu W13/16, jednakże osiągnęto niższą efektywność wyciszenia ekspresji zmutowanej huntingtyny, do około 50% poziomu kontrolnego, nawet przy 100 nM stężeniu (Ryc. 28).



Rycina 28. Analiza efektów działania dupleksu W13/16 w liniach HD przeprowadzona dla białka huntingtyny. Analiza typu *western* poziomu huntingtyny 72 h po transfekcji 5, 20 i 100 nM W13/16 lub 20 nM d7 dla linii GM04208 (A) lub GM01187 (B). K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

Dodatkowo zbadano czy do aktywności W13/16 względem huntingtyny niezbędny jest dupleks, czy być może sama nić antysensowa może indukować obserwowane efekty. Komórki z mutacją w genie *HTT* transfekowano 20 nM pojedynczymi nici dupleksu W13/16 (as, ss) oraz dupleksem W13/16. Nie stwierdzono aktywności pojedynczych nici względem allelu normalnego lub zmutowanego *HTT* (Ryc. 29).

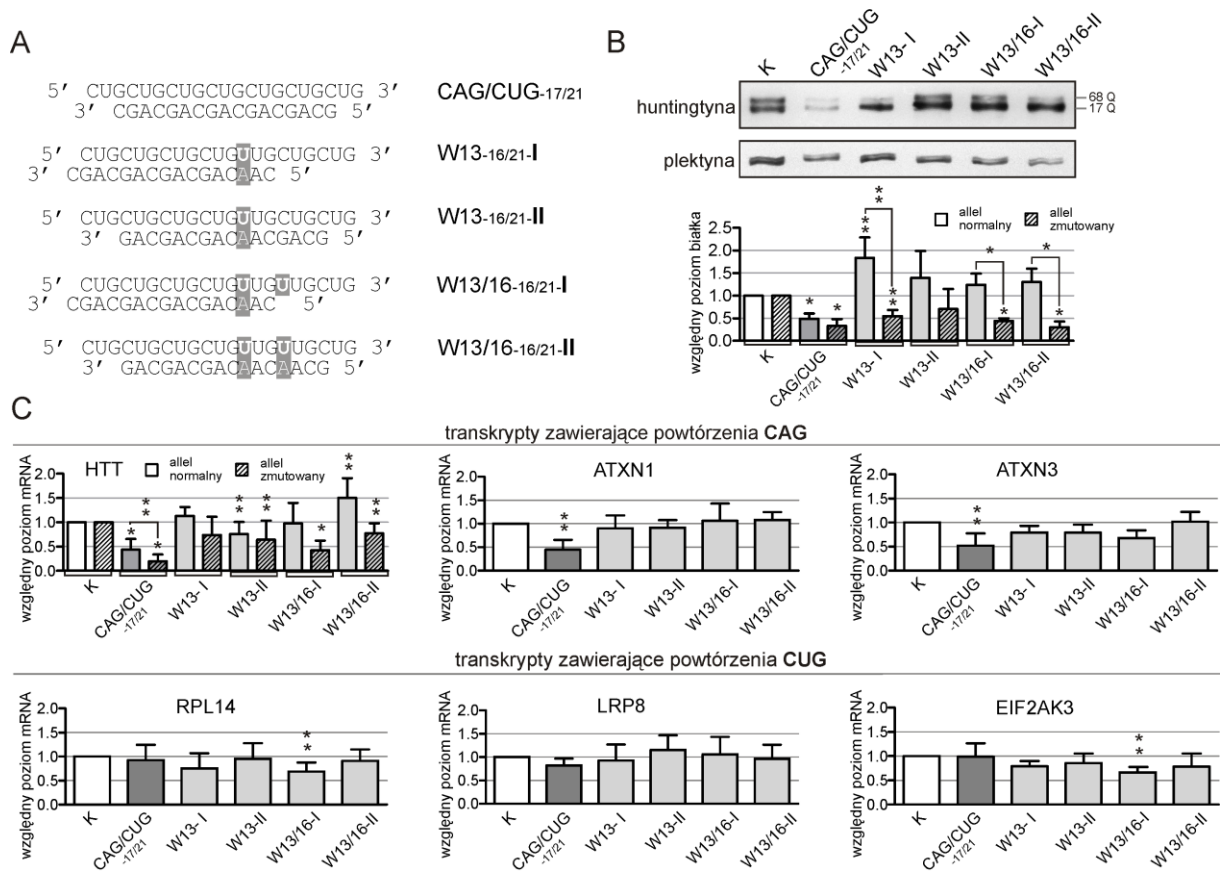


Rycina 29. Analiza aktywności pojedynczych nici W13/16, w porównaniu do dupleksu, względem białka huntingtyny w modelu HD (GM04281). Analiza typu *western* poziomu huntingtyny 72 h po transfekcji 20 nM reagentami: as – nić CUG, ss – nić CAG, ds – dupleks W13/16. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

4.2.2.2 Testowanie reagentów ze skróconą nicią sensową

W wyciszaniu ekspresji genu huntingtyny kluczowa jest aktywność nici złożonej z powtórzeń CUG, natomiast działanie nici CAG, które ma miejsce nawet w przypadku dupleksów o modyfikowanej sekwencji (Ryc. 25), jest niepożądane. Jednym ze sposobów pozabawienia aktywności nici sensowej jest jej skrócenie, jednak przy zachowaniu odpowiedniej długości potrzebnej do wiązania dupleksu przez RISC (Sun i wsp. 2008; Grimm 2009).

Zaprojektowano dodatkowe modyfikacje sekwencji dupleksów d7, W13 i W13/16 polegające na skróceniu długości nici składającej się z powtórzeń CAG do 16 lub 17 nt (Ryc. 30A). Uwzględniono po dwa warianty dla W13 i W13/16 różniące się sekwencją skróconej nici co najprawdopodobniej skutkuje nieco różnymi strukturami dupleksu.



Rycina 30. Analiza efektów działania dupleksów zawierających niesparowania z sekwencją docelową oraz skróconą nić CAG w linii GM04281 (model HD). **(A)** Sekwencje dupleksów zaprojektowanych na podstawie d7, W13 i W13/16 **(B)** Analiza typu *western* poziomu huntingtyny 72 h po transfekcji 100 nM wymienionymi dupleksami. **(C)** Analiza typu RT-PCR poziomu wybranych transkryptów zawierających ciągi powtórzeń CAG lub CUG 24 h po transfekcji 100 nM wymienionymi reagentami. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

Najpierw aktywność dupleksów badano dla białka huntingtyny w linii HD, po transfekcji w 20 nM stężeniu, jednak nie zaobserwowano żadnej aktywności. Znaczącą efektywność wyciszania zmutowanej huntingtyny, o około 50%, stwierdzono dla transfekcji reagentów w 100 nM stężeniu (Ryc. 30B). Większość dupleksów zaprojektowanych na podstawie W13 i W13/16 wykazywała znaczącą dyskryminację alleli w wyciszaniu ekspresji *HTT*, przy zachowanym lub podwyższonym poziomie normalnej huntingtyny.

Aktywność dupleksów ze skróconą nicią CAG badano także dla wybranych innych transkryptów zawierających ciągi powtórzeń CAG lub CUG (Ryc. 30C). Dupleks CAG/CUG-17/21 charakteryzował się, w porównaniu do standardowego dupleksu d7 (CAG/CUG-21/21, Ryc. 16), nieco niższą efektywnością działania na transkrypty z powtórzeniami CAG i brakiem aktywności w stosunku do transkryptów z powtórzeniami CUG (Ryc. 30C). Reagenty zaprojektowane na podstawie W13 i W13/16 wykazywały brak lub nieznaczną aktywność w stosunku do wszystkich analizowanych transkryptów.

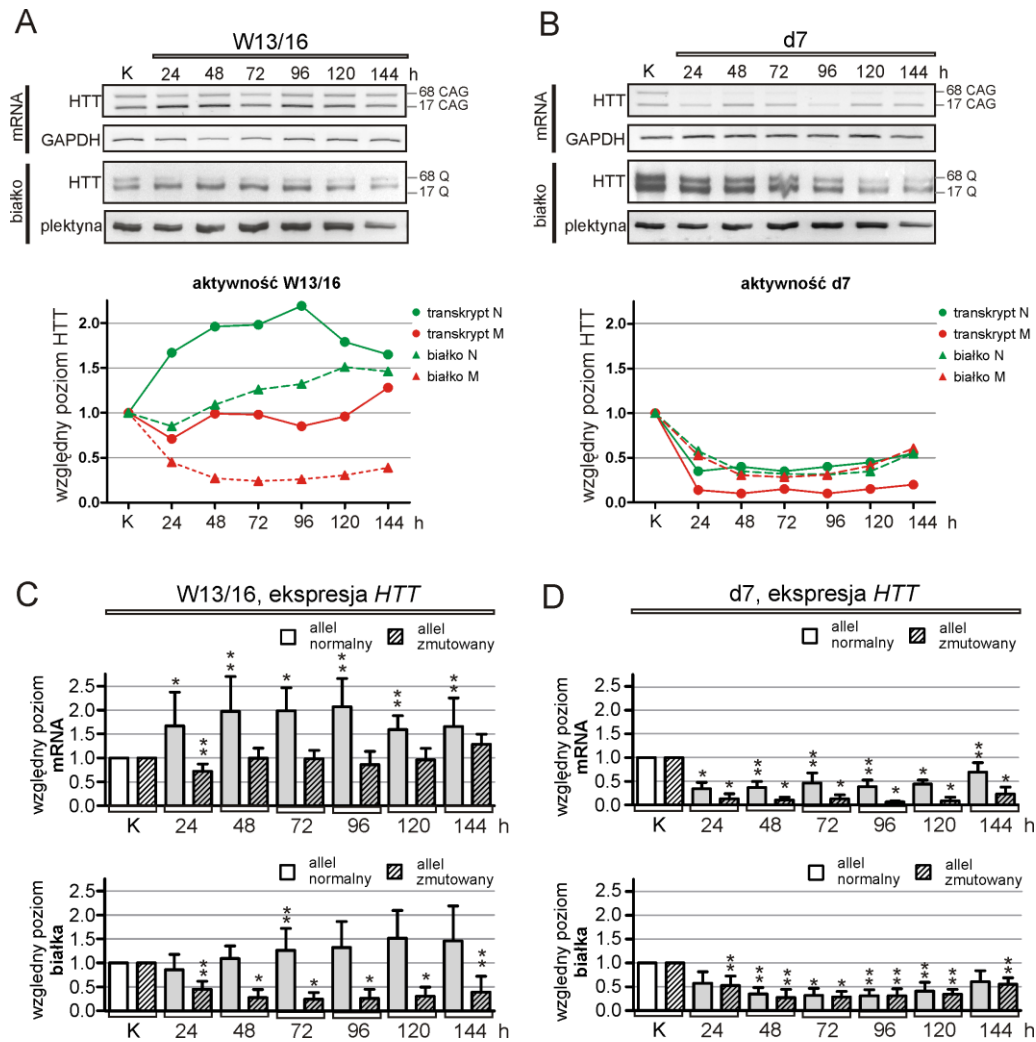
W wyniku przeprowadzonego zabiegu skracania nici CAG uzyskano pożądaný efekt braku aktywności reagentów na transkrypty z powtórzeniami CUG (Ryc. 30C). Szczególnie dupleks W13/16-II charakteryzował się pożądanym działaniem, tzn. wykazywał efektywne obniżenie poziomu zmutowanej huntingtyny do około 30%, przy zachowaniu ekspresji huntingtyny normalnej. Jednakże wymagane stężenie reagentów do uzyskania pożądanego efektu było stosunkowo wysokie (100 nM, Ryc. 30B), dlatego w dalszych badaniach używano dupleksów W13/16 bez skróconej nici.

4.2.2.3 Analiza wyciszenia transkryptu i białka huntingtyny w zależności od czasu

W celu dokładnej charakterystyki działania W13/16, przeprowadzono analizę poziomu transkryptu i białka *HTT* dla materiału izolowanego z komórek w 6 punktach czasowych, co 24 h, od transfekcji 20 nM dupleksem W13/16. Identyczną analizę przeprowadzono dla porównania z użyciem siRNA d7. Potwierdzono znaczące różnice w aktywności tych dwóch reagentów dla transkryptu i białka *HTT*. Wyraźne efekty ich działania były widoczne już po 24 h od transfekcji.

Po podaniu dupleksu W13/16 nie obserwowano znaczących zmian poziomu transkryptu zmutowanego *HTT* przez 6 dni, natomiast poziom zmutowanej huntingtyny był efektywnie obniżony, maksymalnie do 25% poziomu kontrolnego (Ryc. 31 A, C). Z kolei dla allelu

normalnego *HTT* obserwowano podwyższenie poziomu ekspresji. Z użyciem dupleksu d7 osiągnięto efektywne wyciszenie ekspresji obu alleli *HTT* (Ryc. 31 B, D).

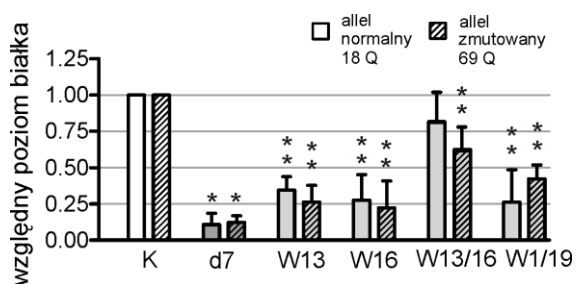


Rycina 31. Analiza wyciszenia transkryptu i białka *HTT* przez 6 dni z użyciem reagentów W13/16 i d7 w linii GM04281. Przedstawiono wykresy uwzględniające średnią uzyskanych wyników analiz RT-PCR i *western blot* poziomu ekspresji *HTT* po określonym czasie od transfekcji W13/16 (A) lub d7 (B) w stężeniu 20 nM. W panelach (C) i (D) przedstawiono szczegółowo uzyskane wyniki dla eksperymentów przedstawionych odpowiednio w (A) i (B). K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001<p<0,05; * p<0,001.

4.2.3 Testowanie reagentów w linii SCA3

4.2.3.1 Analiza wyciszenia transkryptu i białka *ATXN3*

Analogicznie do testowania reagentów w linii HD (Ryc. 26A, 27), przeprowadzono analizę działania czterech dupleksów, w odniesieniu do aktywności d7, w linii komórkowej z mutacją w genie *ATXN3* (Ryc. 32).



Rycina 32. Analiza efektów działania dupleksów zawierających niesparowania z sekwencją docelową w linii SCA3 (GM06153). Analiza typu *western* poziomu ataksyny-3 72 h po transfekcji 20 nM wymienionymi dupleksami. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

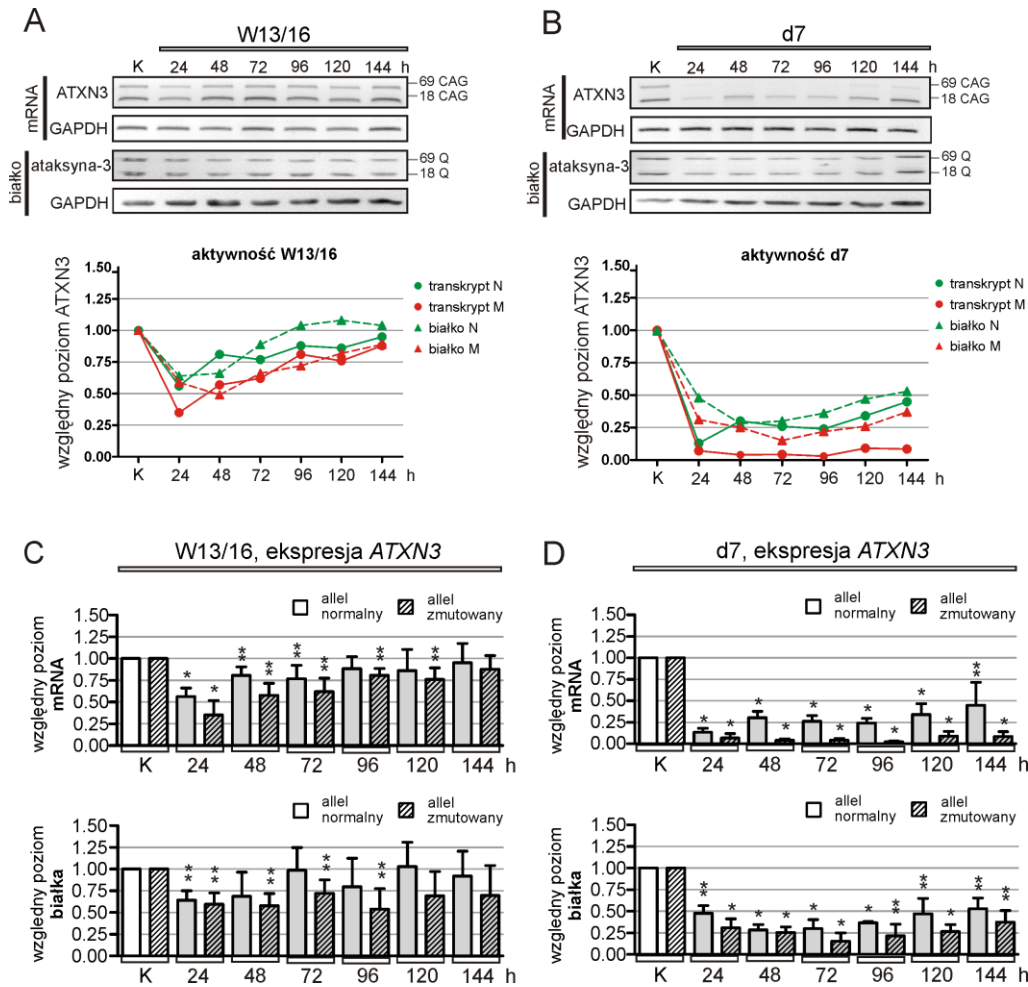
Wykazano obniżanie ekspresji obu alleli *ATXN3* przez większość dupleksów (do około 10% poziomu kontrolnego z użyciem d7 i około 30% po podaniu W13, W16 i W1/19), natomiast W13/16 powodował nieznaczne obniżenie poziomu białka ataksyny-3.

4.2.3.2 Analiza wyciszenia transkryptu i białka *ATXN3* w zależności od czasu

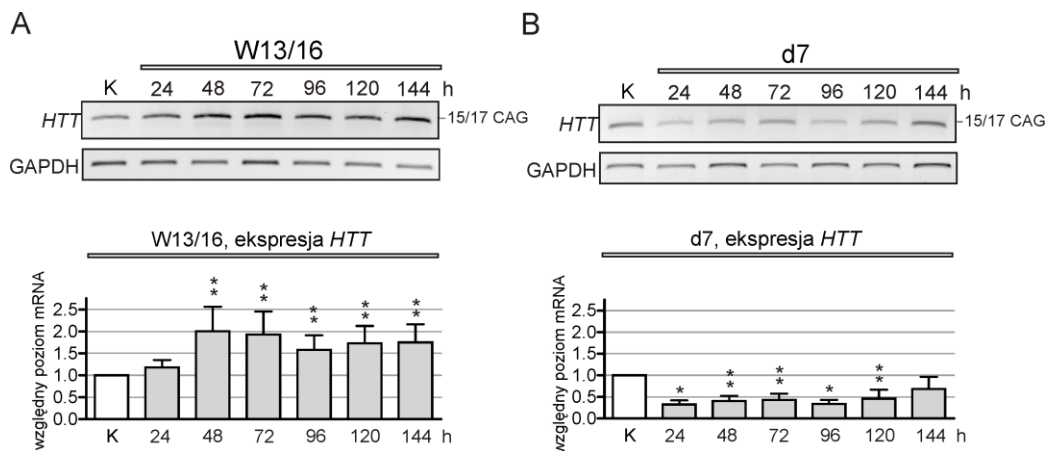
Ze względu na wyraźne rozbieżności w aktywności W13/16 na allele genu *HTT* i *ATXN3*, przeprowadzono szczegółową analizę aktywności tego reagenta w modelu SCA3, w sposób analogiczny jak opisano dla modelu HD.

Wykazano nieznaczne obniżanie poziomu ekspresji *ATXN3* z użyciem 20 nM W13/16, przez 6 dni od transfekcji. Aktywność ta stopniowo zanikała z czasem (Ryc. 33A, C). Aktywność siRNA d7 była podobna jak w modelu komórkowym HD, tzn. efektywnie była obniżona ekspresja obu alleli *ATXN3* z użyciem tego reagenta (Ryc. 33B, D).

Dodatkowo, ze względu na potwierdzone różnice w aktywności W13/16 na ekspresję genu *HTT* i *ATXN3*, wykonano analizę poziomu transkryptu *HTT* w linii komórkowej SCA3, przez 6 kolejnych dni, po transfekcji 20 nM W13/16. Zaobserwowano, podobnie jak w modelu HD, podniesienie poziomu transkryptu normalnego *HTT* do około 150% poziomu kontrolnego (Ryc. 34). Sugeruje to, że proces podnoszenia poziomu ekspresji allelu normalnego *HTT* z użyciem W13/16 jest niezależny od obecności w komórce allelu zmutowanego *HTT*.



Rycina 33. Analiza wyciszenia transkryptu i białka *ATXN3* przez 6 dni z użyciem reagentów W13/16 i d7 w linii GM06153. Przedstawiono wykresy uwzględniające średnią uzyskanych wyników analiz RT-PCR i *western blot* poziomu ekspresji *ATXN3* po określonym czasie od transfekcji W13/16 (A) lub d7 (B) w stężeniu 20 nM. W panelach (C) i (D) przedstawiono szczegółowo uzyskane wyniki dla eksperymentów przedstawionych odpowiednio w (A) i (B). K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

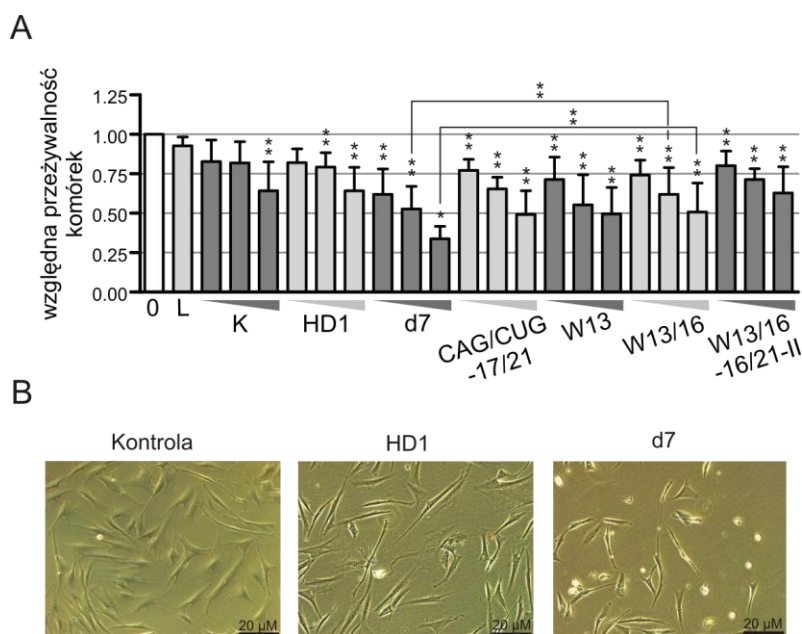


Rycina 34. Analiza wyciszenia transkryptu *HTT* w linii komórkowej SCA3 (GM06153). Analiza RT-PCR po określonym czasie od transfekcji 20 nM W13/16 (A) lub d7 (B). K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001.

Uzyskane wyniki, zarówno badania poziomu ekspresji zmutowanych genów, jak i identyfikacji miejsc cięcia w transkryptach, wskazują, że dla reagentów zawierających niesparowania z sekwencją docelową nie dochodzi do silnej aktywacji typowego mechanizmu RNAi zależnego od AGO2, prowadzącego do specyficznego przecinania i degradacji transkryptu. Szczegółowe analizy przeprowadzone dla dupleksu W13/16, w porównaniu do d7, pokazują znaczące zmiany w aktywności reagenta złożonego z powtórzeń CAG/CUG, po wprowadzeniu dwóch substytucji do sekwencji dupleksu.

4.2.4 Badania toksyczności reagentów

Ważnym aspektem testowania reagentów o potencjale terapeutycznym jest sprawdzenie czy wprowadzany reagent nie wpływa negatywnie na przeżywalność komórek. Już w eksperymentach z dupleksami CAG/CUG (d7) zauważono zwiększoną śmiertelność komórek, którą w teście przeżywalności określono na około 50% spadek liczby komórek po 72 h od transfekcji przy stężeniu 20 nM, w odniesieniu do komórek traktowanych tylko odczynnikami transfekcyjnymi (Ryc. 36A i B). W przypadku dupleksu CAG/CUG efekty toksyczne mogą być głównie związane ze zmianą poziomu wielu transkryptów w komórce, zawierających sekwencje komplementarne do reagenta.



Rycina 36. Analiza przeżywalności komórek fibroblastów HD (GM04281) po transfekcji różnymi krótkimi dsRNA złożonymi z powtórzeń trójnukleotydowych. **(A)** Wyniki testu luminescencyjnego po transfekcji komórek wskazanymi reagentami w stężeniach: 5, 20 i 100 nM, po 72 h od transfekcji. 0 - komórki nietransfekowane, L - komórki traktowane tylko odczynnikami transfekcyjnymi, K – komórki transfekowane kontrolnym siRNA BlockIT. **(B)** – Obraz mikroskopowy komórek w świetle widzialnym po transfekcji 100 nM siRNA specyficznym (HD1) lub złożonym z powtórzeń (d7). ** 0,001<p<0,05; * p<0,001

Niektóre dupleksy CAG/CUG, o sekwencji modyfikowanej przez substytucje jednej lub dwóch zasad (W13, W13/16) lub skracanie nici (CAG/CUG-17/21), powodowały podobną śmiertelność komórek. Dla tych reagentów wykazano spadek liczebności komórek o 25% przy użytym stężeniu 5 nM i o 50% przy stężeniu 100 nM. Spośród testowanych dupleksów złożonych z sekwencji powtórzonej najlepszymi właściwościami, charakteryzował się reagent W13/16-II, dla którego obserwowano podobny profil przeżywalności komórek przy różnych stężeniach jak dla siRNA kontrolnego (K) i specyficznego dla sekwencji HD (siRNA HD1) (Ryc. 36A).

4.3 Samodupleksujące reagenty złożone z sekwencji powtórzonej

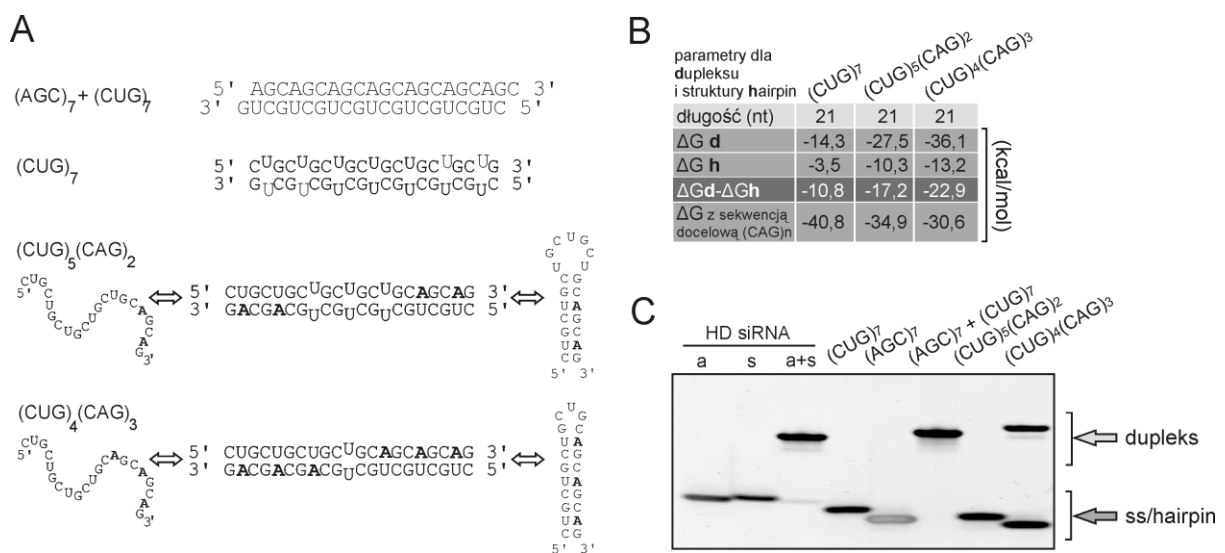
4.3.1 Projektowanie i charakterystyka reagentów

Przetestowany został jeszcze inny sposób modyfikowania sekwencji reagentów celujących w powtórzenia CAG. Polegał on na wprowadzaniu takich substytucji do nici CUG, aby była ona w stanie sama z sobą utworzyć dupleks. Takie podejście, którego celem jest pozbycie się nici sensowej z dupleksu siRNA, zostało wcześniej opisane w literaturze dla sekwencji specyficznych (Hossbach i wsp. 2006).

W przypadku sekwencji powtórzonych, gdy nić złożona z powtórzeń CUG ma być nicią wiodącą, można wprowadzić jedną lub więcej substytucji U→A, i w ten sposób uzyskać samoparującą się nić siRNA. Wcześniejsze badania z reagentami zawierającymi modyfikacje sekwencji (opisane w poprzednim podrozdziale) pokazały, że wprowadzanie substytucji w nici CUG, skutkujących powstawaniem niesparowań w oddziaływaniu z ciągiem powtórzeń CAG w transkrypcie *HTT*, może indukować pożądane, z punktu widzenia terapii, działanie takich RNA.

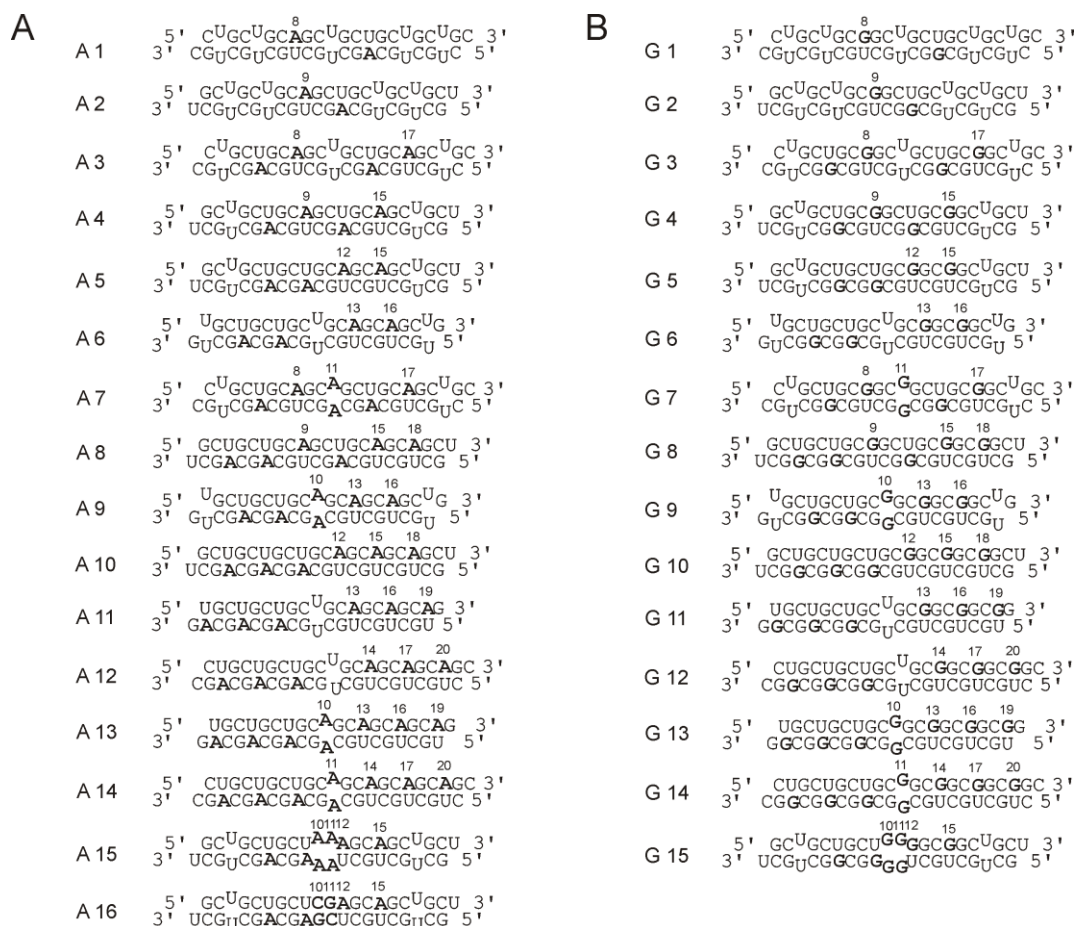
Do badań wstępnych zaprojektowano dwie modelowe cząsteczki: $(CUG)_5(CAG)_2$ i $(CUG)_4(CAG)_3$, zawierające odpowiednio 2 i 3 substytucje U→A w nici $(CUG)_7$. Na Ryc. 37A przedstawione są przewidywane struktury dla tych RNA: struktura dupleksu, zawierającego trzy lub jedno niesparowanie w części centralnej, lub pojedyncza nić o różnym stopniu ustrukturalizowania. Z wcześniej przedstawionych badań wynika, że to struktura dupleksu jest formą pożądaną z punktu widzenia aktywności reagentów w komórkach (Ryc. 18 na stronie 49 i Ryc. 29 na stronie 58). Wprowadzane substytucje do nici CUG wpływają na wzrost tendencji do tworzenia dupleksu przez tę nić, ale jednocześnie wzrasta zdolność do tworzenia struktury typu spinki.

RNA $(CUG)_5(CAG)_2$ i $(CUG)_4(CAG)_3$ różnią się od siebie tylko jednym nukleotydem, jednak ich zdolność do tworzenia struktur drugorzędowych jest znacząco różna, jak wynika z obliczeń termodynamicznych (Ryc. 37B) oraz analizy migracji w żelu w warunkach niedenaturujących (Ryc. 37C). Wartości energii swobodnej Gibbsa (ΔG), przewidywanej z użyciem programu DINAMelt (Markham i Zuker 2005), wskazują, że struktura dupleksu analizowanych cząsteczek jest bardziej stabilna niż struktura typu spinki. Do utworzenia dupleksu potrzebne są dwie pojedyncze nici i destabilizacja tworzonych, najprawdopodobniej, przez nie struktur typu spinki. $(CUG)_4(CAG)_3$ charakteryzuje się, w porównaniu do $(CUG)_5(CAG)_2$, niższymi wartościami przewidywanych ΔG , stąd prawdopodobnie większą stabilnością struktur drugorzędowych. Wyliczono także różnicę między ΔG tworzenia dupleksu (ΔG_d) a ΔG tworzenia struktury typu spinki (ΔG_h). Im większa ta różnica, tym należałoby zakładać większą zdolność do tworzenia dupleksu. Ten parametr ($\Delta G_d - \Delta G_h$) wskazywał na większą podatność $(CUG)_4(CAG)_3$ do tworzenia dupleksu, w porównaniu do $(CUG)_5(CAG)_2$ (Ryc. 37B). Podobna tendencja wyłania się z analizy migracji RNA w żelu niedenaturującym, gdzie dla $(CUG)_5(CAG)_2$ obserwowano tylko formę jednoniciową, natomiast dla $(CUG)_4(CAG)_3$ dodatkowy prążek, odpowiadający migracją formie dupleksu (Ryc. 37C ścieżka 7 i 8, jako odniesienie użyto siRNA o sekwencji specyficznej i siRNA złożone z powtórzeń CAG/CUG).



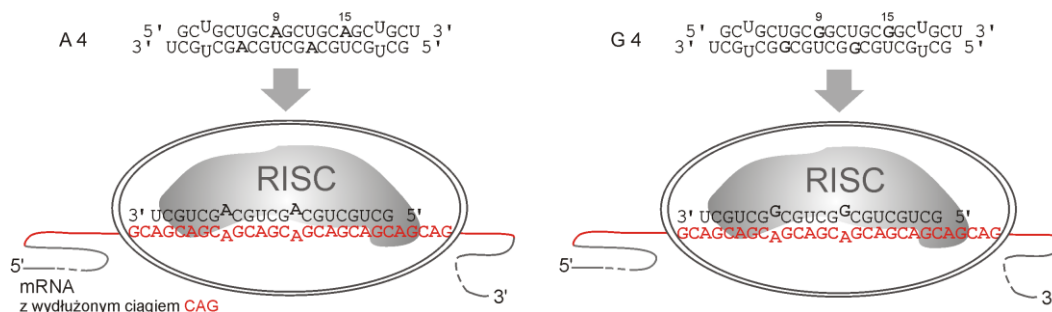
Rycina 37. Projektowanie samodupleksujących reagentów złożonych z powtórzeń i analiza tworzonych przez nie struktur drugorzędowych. **(A)** Sekwencje zaprojektowanych samodupleksujących RNA z ich przewidywanymi strukturami (pogrubioną czcionką oznaczono nukleotydy podstawione względem sekwencji złożonej z powtórzeń CUG). **(B)** Tabela z wartościami energii struktur dupleksu i typu spinki (*hairpin*) dla poszczególnych RNA, przewidywanymi z użyciem programu DINAMelt. **(C)** Analiza migracji krótkich RNA w niedenaturującym 20% żelu PAA. Na żel nakładano 50 pmoli oligonukleotydów, po elektroforezie żel barwiono w 1x GelRed. Oznaczenia: ΔG – energia swobodna Gibbsa, a - nić antysensowa, s - nić sensowa, ds – dupleks, ss – forma jednoniciowa.

Na podstawie tych wstępnych badań zaprojektowano zestaw 31 RNA (Ryc. 38), charakteryzujących się występowaniem jednonukleotydomych niesparowanych końców 3' w przewidywanych strukturach dupleksu, co powinno ułatwić rozpoznawanie tych reagentów w komórkach przez maszynę białkową RISC. Zaprojektowano tzw. „serię A” reagentów, posiadających substytucje U→A, oraz „serię G” z substytucjami U→G, o analogicznym do serii A umiejscowieniu w sekwencji. RNA, nazwane sd-miRNA (samodupleksujące miRNA, ang. *self-duplexing miRNAs*), różnią się między sobą długością (20-22 nt, co było podyktowane wprowadzeniem niesparowanych końców), liczbą (od 1 do 4) i pozycją wprowadzonych substytucji. Substytucje lokalizowano w części centralnej oligonukleotydu i/lub w części 3', czyli poza regionem *seed* kluczowym dla rozpoznawania sekwencji docelowej. Przewidywane struktury dupleksów są zróżnicowane, nieliczne dupleksy są w pełni komplementarne, w większości występują wewnętrzne niesparowania U-U.



Rycina 38. Sekwencje i przewidywane struktury tworzone przez RNA CUG, zawierające substytucje nukleotydomych w określonych pozycjach. Reagenty serii A (**A**) posiadają substytucje U→A, za wyjątkiem RNA A16, który posiada także dodatkowe podstawienia. Reagenty serii G (**B**) są analogiczne do reagentów serii A, jeśli chodzi o pozycje podstawień, natomiast posiadają substytucje U→G. Pogrubioną czcionką oznaczono podstawiony nukleotyd i podano pozycję substytucji, licząc od końca 5' oligonukleotydu.

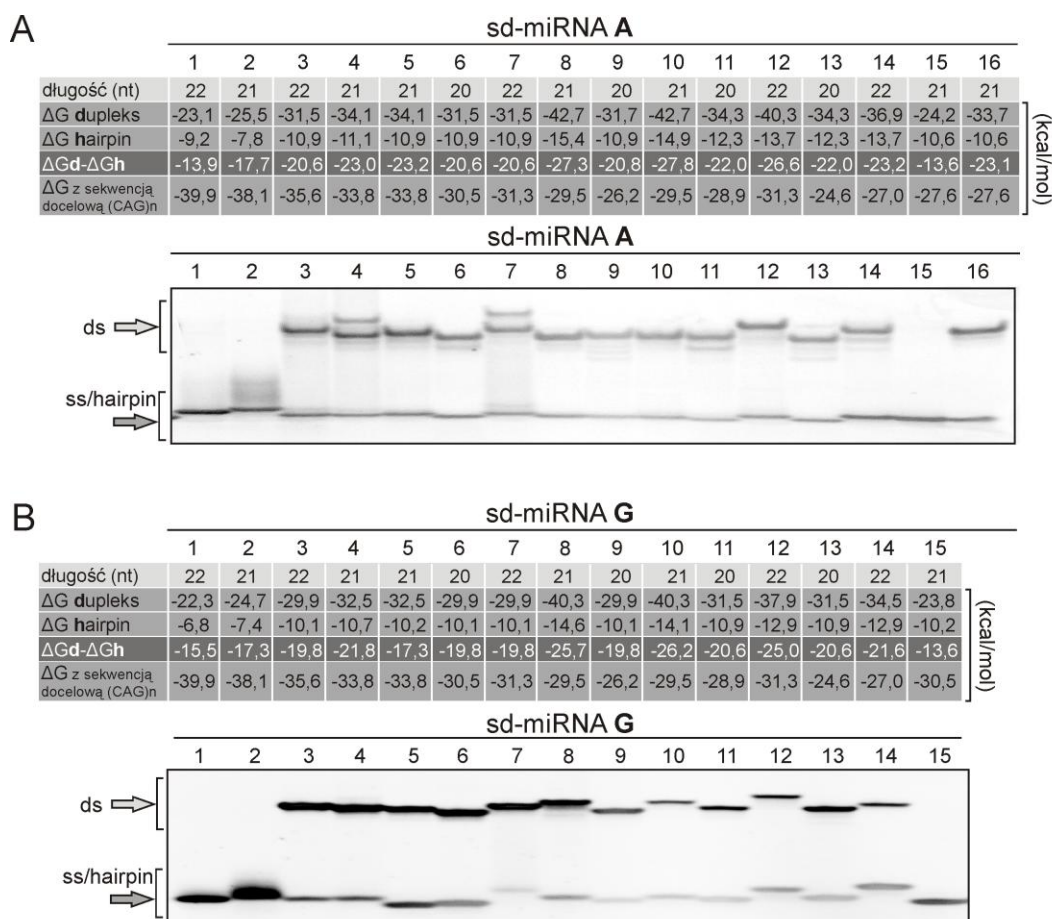
W przypadku RNA z serii A, wprowadzone do sekwencji CUG substytucje skutkują tworzeniem niesparowań A-A w oddziaływaniu z ciągiem powtórzeń CAG w transkrypcie, natomiast dla serii G są to niesparowania G-A (Ryc. 39).



Rycina 39. Schemat przewidywanych oddziaływań z sekwencją ciągu powtórzeń CAG w transkrypcie, dla RNA A4 i G4, po załadowaniu do kompleksu RISC. Kolorem czerwonym oznaczono ciąg (CAG)_n w mRNA.

Dla całego zestawu sd-miRNA wykonano obliczenia termodynamiczne oraz przeprowadzono analizę migracji w żelu niedenaturującym, w celu porównania ich zdolności do tworzenia dupleksów (Ryc. 40). Analizując najpierw przewidywane wartości ΔG dla reagentów serii A, stwierdzono, że najniższą stabilność dupleksów wykazują A1, A2 i A15 ($\Delta G > -23$ kcal/mol, dla pozostałych RNA ΔG wynosiło < -31 kcal/mol) (Ryc. 40A). Jednocześnie dla A1, A2 i A15 obliczenia pokazują najmniejsze różnice między ΔG tworzenia struktury dupleksu i struktury typu spinki ($\Delta G_d - \Delta G_h > -18$ kcal/mol), co również sugeruje ich najmniejszą zdolność do tworzenia dupleksów. Dodatkowo, analiza migracji w żelu niedenaturującym przeprowadzona dla serii A, potwierdziła przewidywane tendencje dla A1, A2 i A15, jako że dla tych RNA nie obserwowano prążków odpowiadających migracją dupleksowi. Dla pozostałych sd-miRNA z serii A, widoczne są zarówno prążki odpowiadające migracją pojedynczej nici i dupleksowi (Ryc. 40A).

Dla RNA z serii G, obliczenia wskazują na niższą stabilność, zarówno struktur dupleksu jak i spinki, w porównaniu do analogicznych reagentów w serii A (Ryc. 40B). Jest to związane z tworzeniem się parowania typu *wobble* (U-G) w przewidywanych strukturach, podczas gdy dla serii A występują w tych miejscach parowania U-A. Tym niemniej, stwierdzono, na podstawie obliczeń termodynamicznych i analizy migracji, niższą tendencję to tworzenia struktury dupleksu dla RNA G1, G2, G15, analogicznie do serii A.



Rycina 40. Analiza struktur drugorzędowych dla samodupleksujących RNA z serii A (**A**) i serii G (**B**). Tabele z wartościami energii struktur dupleksu i typu spinki (*hairpin*) dla poszczególnych RNA, przewidywane z użyciem programu DINAMelt, oraz analiza migracji RNA w niedenaturującym 20% żelu PAA. Na żel nakładano 50 pmoli oligonukleotydów, po elektroforezie żel barwiono w 1x GelRed. Odniesienie dla migracji SD-miRNA stanowiły cząsteczki pokazane na analogicznym żelu na Ryc. 37C. Oznaczenia: ΔG – energia swobodna Gibbsa, ds – dupleks, ss – forma jednoniciowa.

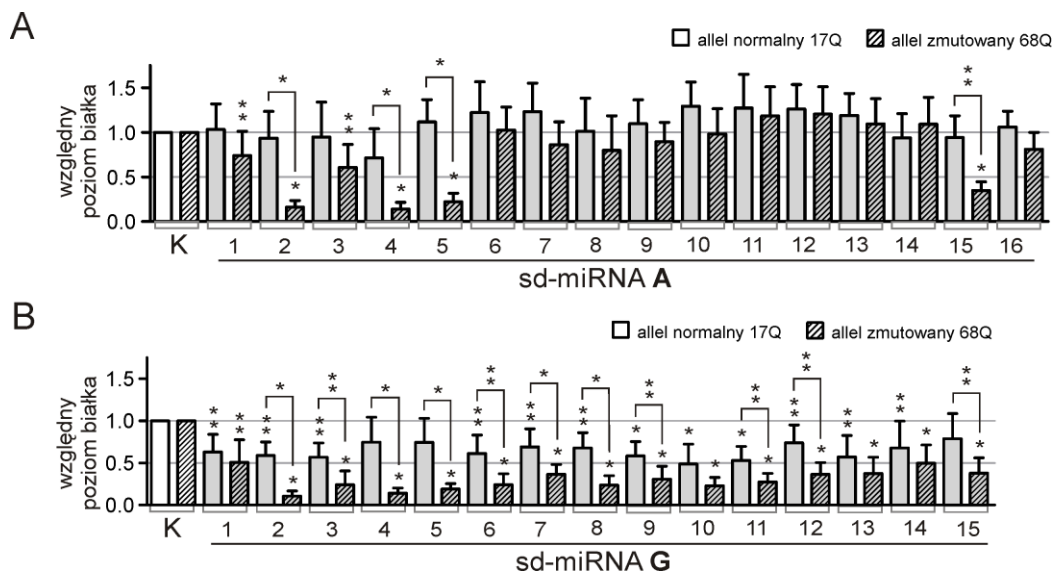
Obliczono również ΔG dla oddziaływań poszczególnych sd-miRNA z sekwencją docelową ciągu CAG, co odpowiada przewidywanej interakcji reagenta z ciągami CAG w transkryptach komórkowych. W tym przypadku wartości obliczonych ΔG (ΔG z sekwencją docelową (CAG)_n) są zależne głównie od liczby wprowadzonych substytucji w reagentcie, tzn. sd-miRNA z 3 lub 4 substytucjami charakteryzują się najmniejszą stabilnością w oddziaływaniu z sekwencją docelową. Pomimo eksperymentalnie określonych różnic w destabilizacji dupleksów przez niesparowania A-A i A-G (Kierzek i wsp. 1999; Davis i Znosko 2010) obliczone wartości ΔG dla oddziaływania z sekwencją docelową nie różniły się dla poszczególnych par reagentów z serii A i serii G, za wyjątkiem A15 i G15 (Ryc. 40).

Przeprowadzone analizy *in silico* i *in vitro* struktur drugorzędowych tworzonych przez sd-miRNA mogą nie odzwierciedlać występowania poszczególnych struktur w warunkach komórkowych, ale ogólnie charakteryzują termodynamikę strukturalną tych reagentów.

4.3.2 Testowanie reagentów w liniach HD

4.3.2.1 Wstępne testowanie 31 sd-miRNA

Wprowadzane substytucje U→A lub U→G w nici złożonej z powtórzeń CUG skutkują obecnością silnych niesparowań purynowych A-A lub G-A, przy oddziaływaniu sd-miRNA z ciągiem powtórzeń CAG. Tworzenie takich niesparowań może powodować całkowity brak aktywności zaprojektowanych RNA na transkrypty zawierające ciągi CAG, lub może być obserwowana analogiczna aktywność jak dla opisanego wcześniej dupleksu W13/16, tj. obniżenie poziomu zmutowanego białka przy braku zmian poziomu zmutowanego transkrypty *HTT*. Z drugiej strony dla aktywności sd-miRNA istotne jest tworzenie stabilnego dupleksu. Dla większości z 31 sd-miRNA wykazano stosunkowo wysoką tendencję do tworzenia dupleksu (Ryc. 40). Wszystkie reagenty zostały przetestowane w linii komórkowej HD (GM04281, 17/68 CAG w genie *HTT*) (Ryc. 41). We wstępnych eksperymentach transfekowano RNA w stężeniu 200 nM, aby stężenie reagenta, w preferowanej formie strukturalnej dupleksu, było możliwie najwyższe.



Rycina 41. Analiza efektów działania samodupleksujących reagentów serii A (A) i serii G (B), dla białka huntingtyny w linii komórkowej HD (GM04281). RNA transfekowano w stężeniu 200 nM, po 72 h izolowano białko i analizowano poziom huntingtyny, względem plektyny, metodą *western blot*. K- komórki traktowane kontrolnym siRNA BlockIT. ** 0,001 < p < 0,05; * p < 0,001

Cztery sd-miRNA z serii A (A2, A4, A5 i A15) efektywnie hamują powstawanie zmutowanej huntingtyny. Obserwowano obniżenie poziomu tego białka do 15-35% poziomu kontrolnego, przy zachowaniu poziomu białka normalnego (Ryc. 41A). Pozostałe RNA z serii A nie wykazywały aktywności względem *HTT*, lub wykazywały bardzo niską aktywność względem allelu zmutowanego. Znacząco różny profil aktywności obserwowano dla sd-miRNA z serii G (Ryc. 41B). Reagenty z serii G są bardziej efektywne w wyciszaniu ekspresji *HTT*, porównaniu do serii A, ale wykazują także mniejszą allelo-selektywność działania. Sd-miRNA serii G powodowały obniżenie poziomu zmutowanej huntingtyny do 10-50% poziomu kontrolnego i normalnej huntingtyny do 50-80% poziomu kontrolnego (Ryc.41B).

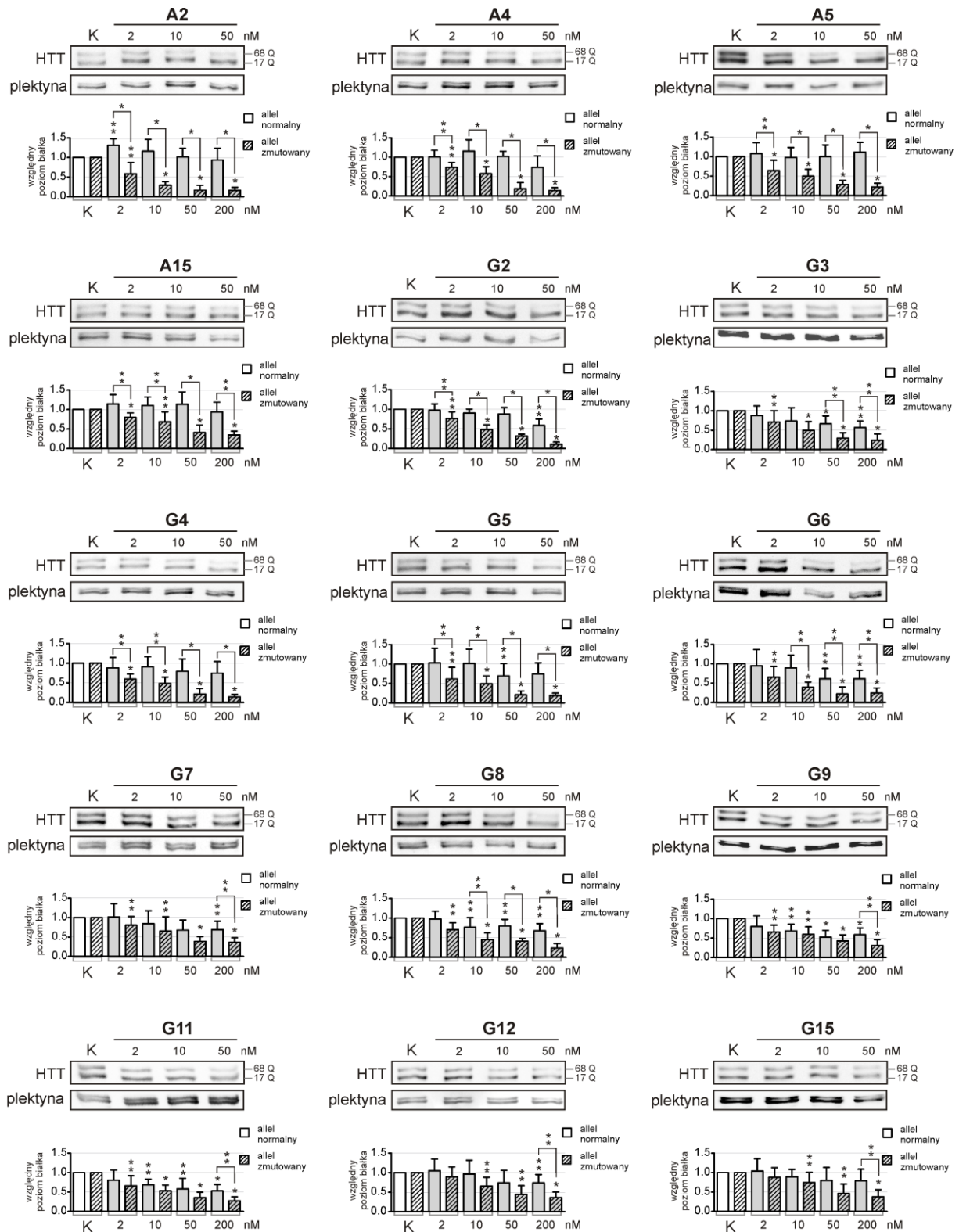
4.3.2.2 Zależności stężeniowe dla 15 sd-miRNA

Do dalszych badań wybrano sd-miRNA, które hamowały syntezę zmutowanej huntingtyny oraz wykazywały jednocześnie allelo-selektywność w działaniu. 15 sd-miRNA, 4 z serii A i 11 z serii G, podano do komórek HD (GM04281, 17/68 CAG w genie *HTT*) w stężeniu 2, 10 lub 50 nM i w całkowitym białku, izolowanym po 72 h, określano poziom huntingtyny (Ryc. 42). Większość sd-miRNA powodowała znaczące obniżenie poziomu zmutowanego białka *HTT*, o maksymalnie 50%, już przy stężeniu 2 nM. Wraz ze wzrastającym stężeniem reagenta, obserwowano pogłębianie efektu wyciszania huntingtyny. Jednak już przy 50 nM stężeniu osiągnął podobny efekt jak dla 200 nM stężenia. Dla 15 testowanych sd-miRNA poziom normalnej huntingtyny był zachowany lub obniżony maksymalnie o 50%.

Na podstawie wykonanych eksperymentów zależności stężeniowych, obliczono wartości IC_{25} , IC_{50} i IC_{75} , tj. wartości stężeń reagenta wymaganych do obniżenia poziomu ekspresji do odpowiednio, 25%, 50% lub 75%. Dla najbardziej efektywnych reagentów w wyciszaniu zmutowanej huntingtyny uzyskano wartość IC_{25} mieszczące się w zakresie 16-38 nM. Natomiast dla sd-miRNA charakteryzujących się największą dyskryminacją alleli, określono stosunek $IC_{75} N/IC_{75} M > 50$.

Do dalszych analiz wybrano 6 sd-miRNA (A2, A4, A5, G2, G4 i G5), które spełniały następujące kryteria:

- (I) wykazywały dużą aktywność względem zmutowanej huntingtyny (wartości $IC_{50} M < 150$ nM), oraz
- (II) charakteryzowały się wysoką allelo-selektywnością działania ($IC_{75} N/IC_{75} M > 20$).



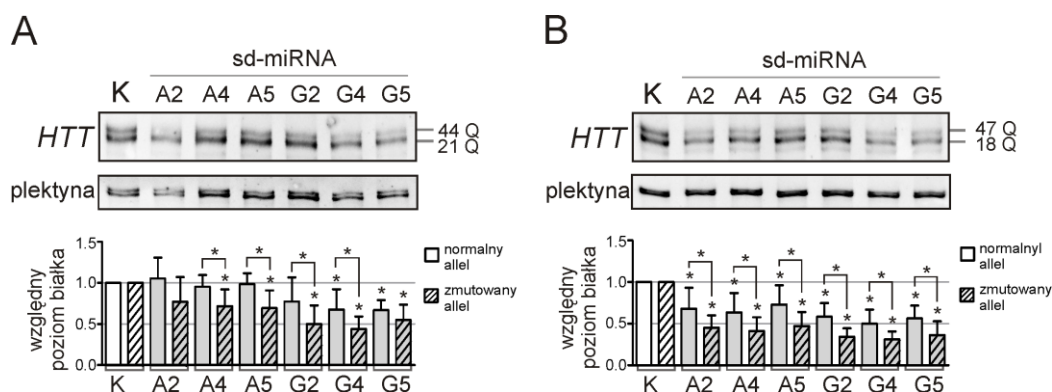
Rycina 42. Analiza efektów działania wybranych samodupleksujących reagentów przeprowadzona dla białka huntingtyny w linii komórkowej HD (GM04281). RNA transfekowano w stężeniach 2, 10 lub 50 nM (wyniki dla stężenia 200 nM pochodzą z Ryc. 41), po 72 h izolowano białko i analizowano poziom huntingtyny względem plektyny metodą *western blot*. K- komórki traktowane kontrolnym siRNA. ** 0,001<p<0,05; * p<0,001

Tabela 6. Wartości parametrów wyciszania ekspresji alleli *HTT* przez 15 wybranych sd-miRNA, na podstawie eksperymentów przedstawionych na Ryc. 42.

sd-siRNA	pozycje niesparowań z targetem (CAG) _n	parametry wyciszania alleli huntingtyny [nM]						
		IC ₅₀ M	IC ₅₀ N	IC ₅₀ N/M	IC ₇₅ M	IC ₇₅ N	IC ₇₅ N/M	IC ₂₅ M
A 2	8	3	>200	>67	<2	>200	>100	16
A 4	9, 15	15	>200	>13	2	195	97,5	36
A 5	12, 15	10	>200	>20	<2	>200	>100	100
A 15	10, 11, 12, 15	30	>200	>7	5	>200	>40	>200
G 2	8	9	>200	>22	3	120	40	95
G 3	8, 17	10	>200	>20	<2	8	<4	170
G 4	9, 15	8	>200	>25	<2	185	>92	38
G 5	12, 15	9	>200	>22	<2	40	>20	37
G 6	13, 16	4	>200	>50	<2	23	>11	34
G 7	8, 11, 17	25	>200	>8	4	25	6	>200
G 8	9, 15, 18	5	>200	>40	<2	115	>58	190
G 9	10, 13, 16	27	>200	>7	<2	4	>2	>200
G 11	13, 16, 19	15	>200	>13	<2	4	>2	>200
G 12	14, 17, 20	32	>200	>6	5	45	9	>200
G 15	10, 11, 12, 15	40	>200	>5	10	>200	>20	>200

4.3.2.3 Aktywność sd-miRNA w innych liniach HD

Zestaw 6 sd-miRNA, wybranych na podstawie eksperymentów zaprezentowanych na Ryc. 42, przetestowano w liniach komórkowych HD, zawierających ciągi powtórzeń 44 i 47 w allelach zmutowanych *HTT*. Poziom wyciszenia huntingtyny analizowano 72 h po transfekcji 50 nM sd-miRNA (Ryc. 43).

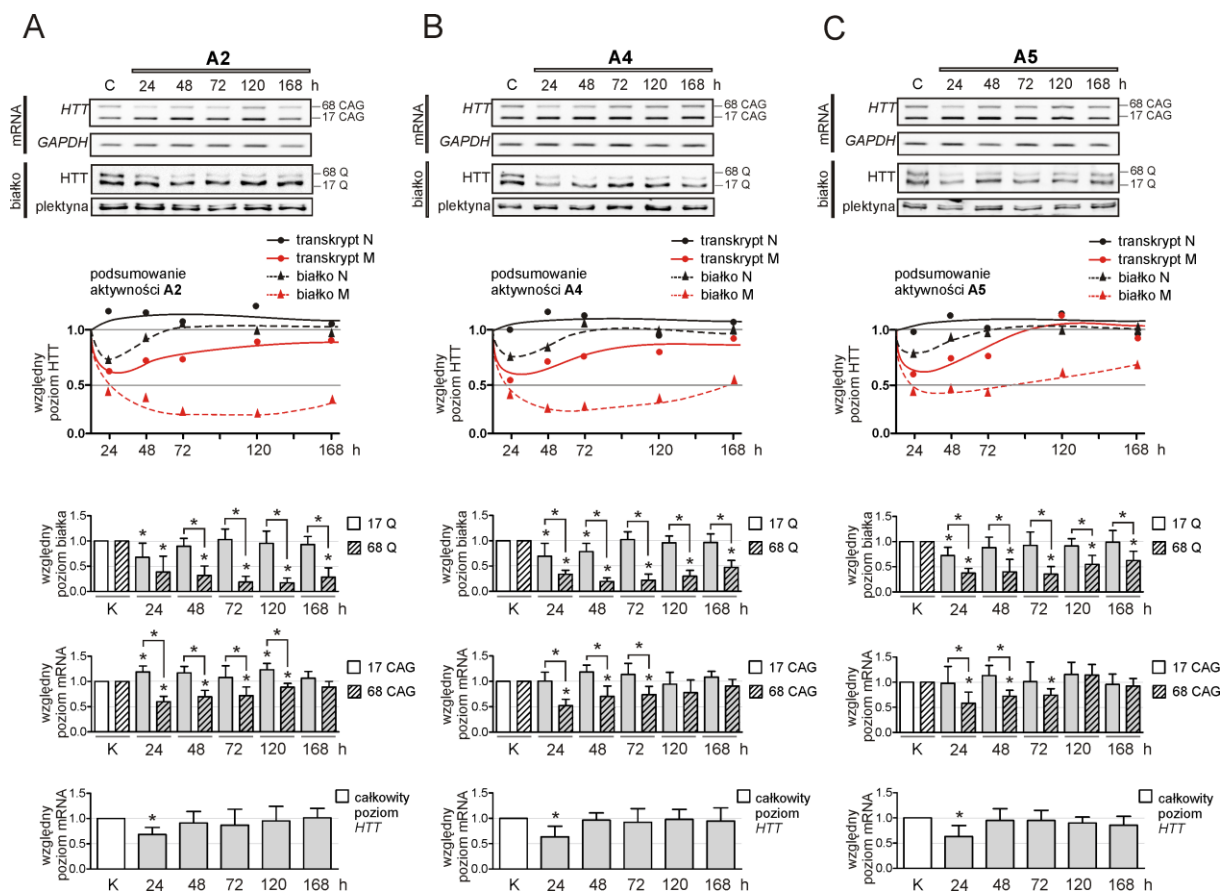


Rycina 43. Analiza efektów działania wybranych samodupleksujących reagentów przeprowadzona dla białka huntingtyny w liniach komórkowych HD: **(A)** GM04208 (21/44 CAG w *HTT*) i **(B)** GM01187 (18/47 CAG w *HTT*) 72 h po transfekcji 50 nM reagentami A2, A4, A5, G2, G4 i G5. K- komórki traktowane kontrolnym siRNA, * $p < 0,05$.

Większość z testowanych sd-miRNA wykazywała allelo-selektywność działania, przy czym była ona niższa niż w przypadku dyskryminacji alleli z ciągami 17/68 CAG, we wcześniej testowanej linii HD (Ryc. 42). Najefektywniejsze reagenty powodowały obniżenie ekspresji zmutowanej huntingtyny do około 50% poziomu kontrolnego w linii GM04208 (21/44 CAG w *HTT*) i do około 30% poziomu kontrolnego w linii GM01187 (18/47 CAG w *HTT*) (Ryc. 43).

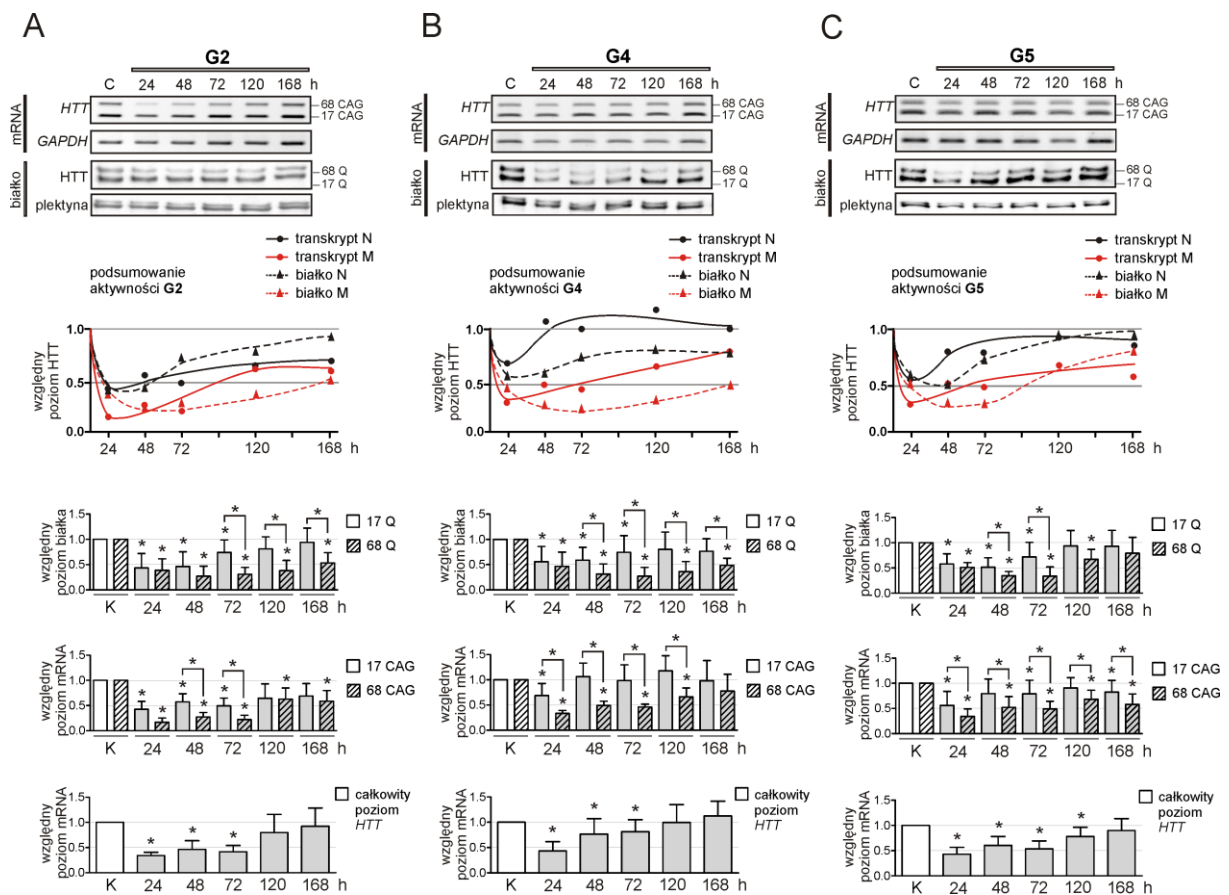
4.3.2.4 Analiza wyciszenia transkryptu i białka *HTT* w zależności od czasu

W celu dokładnej charakterystyki działania wybranych sd-miRNA, przeprowadzono analizę poziomu transkryptu i białka *HTT* dla materiału izolowanego z komórek GM04281 w 5 punktach czasowych przez 7 dni, od transfekcji wybranymi reagentami z serii A (Ryc. 44) i serii G (Ryc. 45) w stężeniu 50 nM.



Rycina 44. Analiza wyciszenia transkryptu i białka *HTT* przez 7 dni po transfekcji 50 nM sd-miRNA z serii A: A2 (A), A4 (B) i A5 (C) do linii komórkowej HD GM04281. Wyniki na wykresach „podsumowanie aktywności” uwzględniają średnią uzyskanych wyników analiz RT-PCR i *western blot* poziomu ekspresji *HTT* dla obu alleli, normalnego (N) i zmutowanego (M). Te dane, z analizą statystyczną, są szczegółowo przedstawione na dwóch wykresach poniżej. Najniżej umieszczone wykresy przedstawiają wyniki analizy całkowitego poziomu mRNA *HTT*. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA, * $p < 0,05$.

Dla wybranych do analiz sd-miRNA z serii A, tj. A2 (Ryc. 44A), A4 (Ryc. 44B) i A5 (Ryc. 44C) obserwowano znaczące obniżenie poziomu zmutowanego transkryptu *HTT* po 24 h od transfekcji, do około 60%, po czym w przeciągu 7 dni ten poziom wzrastał do blisko 100% w ostatnim analizowanym punkcie czasowym. Obniżenie poziomu zmutowanej huntingtyny było bardziej znaczące, do 20-40% poziomu kontrolnego, przy czym maksimum wyciszenia było osiągane zwykle w przedziale czasowym 48-120 h od transfekcji. Ekspresja allelu normalnego *HTT* była nieznacznie zmieniona, obserwowano jedynie obniżenie poziomu normalnego białka w punktach czasowych 24 h i 48 h, o maksymalnie 25%, po podaniu do komórek reagentów A2, A4 lub A5 (Ryc. 44).

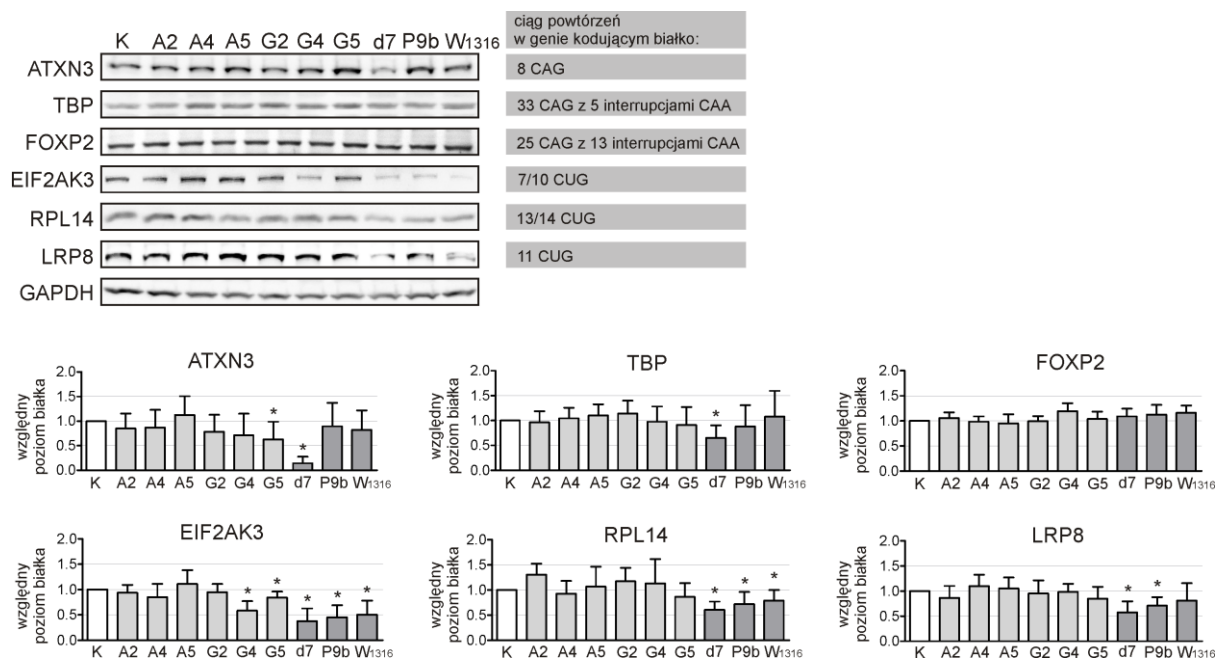


Rycina 45. Analiza wyciszenia ekspresji *HTT* przez 7 dni po transfekcji 50 nM sd-miRNA z serii G: G2 (A), G4 (B) i G5 (C) do linii komórkowej HD GM04281. Wyniki na wykresach „podsumowanie aktywności” przedstawiają średnią uzyskanych wyników analiz RT-PCR i *western blot* poziomu ekspresji *HTT* dla obu alleli, normalnego (N) i zmutowanego (M). Te dane, z analizą statystyczną, są szczegółowo przedstawione na dwóch wykresach poniżej. Najniżej umieszczone wykresy przedstawiają wyniki analizy całkowitego poziomu mRNA *HTT*. K- poziom odniesienia, komórki traktowane kontrolnym siRNA, * p < 0,05.

Wybrane do analiz sd-miRNA z serii G, tj. G2 (Ryc. 45A), G4 (Ryc. 45B) i G5 (Ryc. 45C) wykazywały, w porównaniu do serii A, mniejszą allelo-selektywność działania. Dla tych sd-miRNA obserwowano znaczące obniżenie poziomu zmutowanego transkryptu *HTT* już po 24 h od transfekcji, do poziomu 15-30%, po czym w przeciągu 7 dni ten poziom wzrastał do około 60-80% w ostatnim analizowanym punkcie czasowym. Obniżenie poziomu białka powstającego ze zmutowanego allelu *HTT* było podobne jak dla sd-miRNA z serii A, tj. sięgało maksymalnie 20-30% poziomu kontrolnego. Sd-miRNA G2, G4 i G5 wykazywały także znaczącą aktywność względem normalnego allelu *HTT*, poziom ekspresji tego allelu był obniżony maksymalnie o 55%, w przypadku transkryptu i białka (Ryc. 45).

4.3.2.5 Analiza wpływu wybranych sd-miRNA na ekspresję genów zawierających normalne ciągi powtórzeń CAG lub CTG

W celu zbadania specyficzności działania wyselekcjonowanych sd-miRNA dla *HTT* analizowano poziom wybranych innych białek, które w linii komórkowej HD (GM04281, 17/68 CAG w *HTT*) są kodowane przez geny zawierające normalnej długości ciągi złożone z co najmniej 7 powtórzeń CAG lub CTG (Ryc. 46).

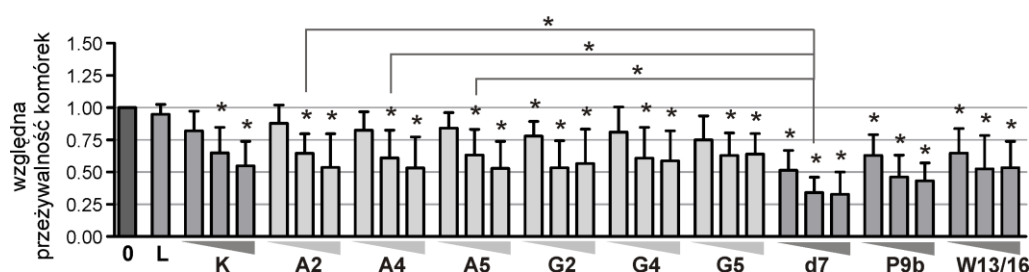


Rycina 46. Analiza efektów działania sd-miRNA A2, A4, A5, G2, G4 i G5 w linii GM04281 (model HD) dla wybranych białek, kodowanych przez geny zawierające ciągi powtórzeń CAG lub CTG. Przedstawiono przykładowe wyniki analizy typu *western* 72 h po transfekcji 50 nM sd-miRNA i analizę statystyczną wyników. Punktem odniesienia była aktywność innych reagentów złożonych z powtórzeń trójnukleotydomych: d7, P9b i W13/16. Ciąg dla *TBP*: (CAG)₃(CAA)₃(CAG)₉(CAA)(CAG)(CAA)(CAG)₂₀; i *FOXP2*: (CAG)₄(CAA)(CAG)₄(CAA)₂(CAG)₂(CAA)₂(CAG)₃(CAA)₅(CAG)₂(CAA)₂(CAG)₅(CAA)(CAG)₅. K- komórki traktowane kontrolnym siRNA, * p < 0,05.

Spośród badanych 6 sd-miRNA, tylko dwa (G4 i G5) powodowały obniżanie poziomu niektórych białek (ATXN3 i EIF2AK3), o maksymalnie 45%. Efekty działania sd-miRNA odniesiono do aktywności, opisanych w tej pracy i przez innych autorów (Hu et al. 2010), dupleksów złożonych z powtórzeń: d7 (siRNA CAG/CUG) oraz P9b i W13/16 (dupleksy CAG/CUG zawierające substytucje zasad).

4.3.2.6 Badania toksyczności sd-miRNA

Dla 6 wybranych sd-miRNA wykonano test przeżywalności komórek po 72 h od transfekcji reagentów w stężeniu 10, 50 lub 200 nM (Ryc. 47). Wyniki odniesiono do toksyczności innych reagentów złożonych z powtórzeń trójnukleotydydowych, dupleksów: d7, P9b i W13/16.



Rycina 47. Analiza przeżywalności komórek fibroblastów HD (GM04281) dla wybranych sd-miRNA. Test przeżywalności wykonano 72 h po transfekcji komórek wskazanymi reagentami w stężeniach: 10, 50 i 200 nM. 0 - komórki nietraktowane, L - komórki traktowane odczynnikami transfekcyjnymi, K – komórki traktowane kontrolnym siRNA BlockIT.

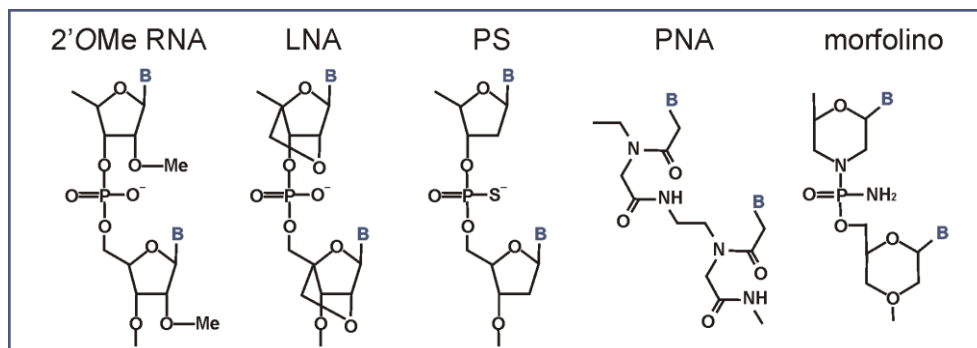
Wybrane sd-miRNA wykazywały znacząco mniejszą toksyczność dla komórek, w porównaniu do dupleksu d7. Nawet dla wysokiego stężenia 200 nM przeżywalność komórek była na poziomie co najmniej 50%, podczas gdy dla d7 wynosiła około 30%. Dla sd-miRNA z serii A obserwowano podobny profil przeżywalności komórek jak dla kontrolnego siRNA (K) (Ryc. 47).

4.4 Modyfikacje chemiczne reagentów złożonych z powtórzeń

4.4.1 Projektowanie reagentów

Region powtórzeń trójnukleotydydowych stanowi potencjalne miejsce celowania nie tylko dla reagentów interferencji RNA, ale także dla oligonukleotydów antysensowych. Przetestowano szereg chemicznie modyfikowanych reagentów, złożonych z powtórzeń CUG lub CTG, zawierających modyfikacje zarówno w reszcie cukrowej: 2'OMe, LNA, jak

i wiązaniu fosfodiestrowym: PS, morfolino (Ryc. 48). Użyto także, jako odniesienie, opisanych przez innych badaczy reagentów z modyfikacjami LNA i PNA (Hu i wsp. 2009; Gagnon i wsp. 2010).



Rycina 48. Modyfikacje chemiczne wprowadzane do oligonukleotydów antysensowych złożonych z powtórzeń CUG lub CTG. B – zasada azotowa, Me – grupa metylowa.

Sekwencje wszystkich reagentów są podane na Ryc. 49A. Część oligonukleotydów posiadała modyfikację chemiczną umiejscowioną w każdej pozycji, aby zapewnić silne wiązanie do transkryptu i działanie na zasadzie hamowania procesu translacji. Dla części oligonukleotydów zachowano środkową część cząsteczki bez modyfikacji chemicznych (DNA/LNA gap i RNA/LNA gap), tak aby mogły one indukować reakcje katalityczne odpowiednich białek, tj. RNazyH w przypadku DNA i kompleksu RISC w przypadku RNA.

4.4.2 Testowanie reagentów w linii HD

Reagenty transfekowano do komórek z mutacją w genie *HTT* (GM04281) w stężeniu 50 nM. PNA i morfolino podawano do komórek w stężeniu odpowiednio 2 μ M i 20 μ M. Dla tych oligomerów stosowano inne metody wprowadzania do komórek, co jest podyktowane brakiem ładunku wiązania fosfodiestrowego w ich przypadku. Oligomer PNA został zsyntezowany z resztami lizyny na końcu C, natomiast do wprowadzania morfolino użyto odczynnika zalecanego przez firmę syntetyzującą te oligomery.

Po 72 h określono poziom wyciszenia białka huntingtyny. Większość oligomerów działa na obydwie allele huntingtyny, część nie wykazywała żadnej aktywności (Ryc. 49B). Jedynie dla oligomerów PNA i morfolino zaobserwowano znaczącą dyskryminację alleli: poziom zmutowanej huntingtyny został obniżony do około 25 %, przy zachowaniu poziomu około 70% normalnej huntingtyny (Ryc. 49B i C).

IV. DYSKUSJA

1. Porównanie strategii wyciszania ekspresji genów odpowiedzialnych za choroby poliglutaminowe

W niniejszej pracy doktorskiej, opisano testowanie różnych strategii terapeutycznych dla chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych. Celem badanych podejść było obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za trzy choroby poliQ: HD, SCA3 i SCA1. We wszystkich testowanych strategiach użyto reagentów w postaci krótkich oligonukleotydów lub ich analogów. Projektowano reagenty o różnej budowie, a ich działanie przebiegało na zasadzie różnych mechanizmów.

Poszczególne podejścia posiadają swoje zalety i wady, których znaczenie dla terapii, przy obecnym stanie wiedzy, trudne jest do przewidzenia. Dlatego istnieje potrzeba rozwijania różnych strategii, które będą weryfikowane w dalszych badaniach i mogą okazać się przydatne w zwalczaniu poszczególnych chorób poliQ lub ich grupy.

Spośród podejść wykorzystujących zjawisko RNAi, w niniejszej pracy testowano efektywność strategii celowania w region specyficzny genu, region zawierający warianty SNP oraz bezpośrednio miejsce występowania mutacji, czyli region powtórzeń trójnukleotydowych. Cechą wspólną jest testowanie wszystkich podejść na liniach komórkowych wyprowadzonych od pacjentów z wybranymi chorobami, tj. z endogenną mutacją w poszczególnych genach. Badania prowadzone na modelach egzogennych, gdzie sekwencja docelowa znajduje się w wektorze wprowadzanym do komórek, mogą generować zafałszowany obraz działania reagentów, m. in. ze względu na wysoki poziom ekspresji egzogenu.

Dla przetestowanych w niniejszej pracy, w strategii celowania w region zawierający SNP, trzech modeli komórkowych (SCA3, HD i SCA1) wyselekcjonowano siRNA o działaniu allelo-selektywnym. Przeprowadzone badania potwierdzają jednak pewne ograniczenia w stosowaniu tego podejścia:

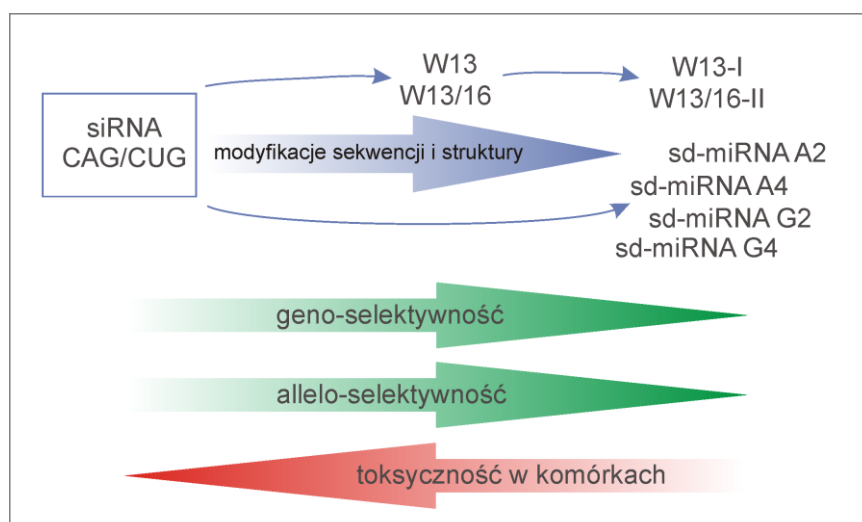
- warianty SNP, występujące w eksonach zmutowanych genów, nie zawsze zapewniają możliwość wprowadzania niesparowań purynowych w oddziaływaniu nici wiodącej siRNA z transkryptem allelu normalnego, co ma wpływ na obniżoną allelo-selektywność reagentów;
- strategia narzuca region sekwencji, w który mogą być kierowane siRNA (region zawierający SNP), co może mieć wpływ na niską efektywność reagentów;

– zasady projektowania siRNA celujących w regiony SNP nie są nadal precyzyjnie określone, np. w kontekście lokalizacji pozycji niesparowania, co narzuca konieczność wstępnego przetestowania co najmniej kilku reagentów.

Ponadto, w strategii celowania w SNP dodatkowe problemy mogą być związane z użyciem reagentów typu shRNA w celu zapewnienia trwalszych efektów wyciszenia. Ulegające ekspresji w komórkach shRNA są docinane przez RNazę Dicer w celu uwolnienia aktywnych cząsteczek siRNA. Jednak, tak jak w przypadku prekursorów miRNA, trudno jest przewidzieć dokładne miejsce cięcia Dicer i często poszczególne cząsteczki są docinane w różnych pozycjach, przesuniętych względem siebie o 1 lub 2 nt (Kościańska i wsp. 2011; Starega-Roślan i wsp. 2011). Dla siRNA celujących w region SNP przesunięcie o 1 lub 2 nt planowanej pozycji niesparowania może skutkować obniżeniem lub zniesieniem allelo-dyskryminujących właściwości. Pokazano taką zależność także w przedstawionych w tej pracy badaniach, przykładowo dla G9, G10 i G11 dla modelu SCA1, wykazujących zróżnicowaną aktywność (Ryc. 15 na stronie 46). Pomimo tych trudności, istnieją doniesienia pokazujące allelo-selektywne działanie shRNA dla strategii celowania w SNP, w modelu SCA3 (Alves i wsp. 2008).

Strategia celowania w region powtórzeń trójnukleotydowych posiada tę zaletę, że potencjalnie mogłaby stanowić uniwersalne podejście terapeutyczne dla grupy chorób wywoływanych ekspansją tego samego typu powtórzeń trójnukleotydowych. W niniejszej pracy przetestowano różnego typu reagenty złożone z sekwencji powtórzonej: duplekisy RNA – siRNA i miRNA-podobne, oraz oligonukleotydy i ich analogi modyfikowane chemicznie. SiRNA skierowany w region powtórzeń CAG, złożony z sekwencji CAG/CUG nie wykazuje znaczącej dyskryminacji alleli. Allelo-selektywnymi właściwościami charakteryzują się wybrane reagenty miRNA-podobne (zawierające niesparowania z sekwencją docelową, m.in. W13/16 i sd-miRNA A2) oraz oligomery morfolino.

Wraz z kolejnymi modyfikacjami sekwencji reagentów RNA złożonych z powtórzeń obserwowano wzrastającą geno-selektywność i jednocześnie allelo-selektywność w wyciszeniu zmutowanego allelu *HTT*. Co istotne, poprawa specyficzności działania reagentów skutkowałą także spadkiem toksyczności, wyraźnie obserwowanej dla „wyjściowego” siRNA CAG/CUG (Ryc. 50).



Rycina 50. Schematyczne podsumowanie aktywności reagentów RNA złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych.

Wszystkie przedstawione strategie terapeutyczne wymagają wysokiej selektywności działania reagentów względem zmutowanego genu (Ryc. 51). Ze względu na fakt, że RISC może oddziaływać również z sekwencjami nie w pełni komplementarnymi do nici, którą jest zaprogramowany, pełna specyficzność jest trudna do osiągnięcia dla reagentów RNAi. Dlatego wskazane jest analizowanie skali efektów *off-target* oraz sprawdzanie toksyczności reagenta w komórkach.

Osobne zagadnienie stanowi potrzeba zapewnienia długotrwałych efektów wyciszenia przez reagenty o działaniu terapeutycznym. Zwiększoną stabilnością charakteryzują się reagenty modyfikowane chemicznie, ze względu na ich mniejszą podatność na degradację przez nukleazy komórkowe. Natomiast w przypadku niemodyfikowanych reagentów RNA, w celu wydłużenia czasu ich działania, istnieje możliwość ich ekspresji w komórkach z odpowiednich wektorów.

W świetle coraz liczniejszych doniesień o możliwości udziału zmutowanego RNA w patogenezie chorób poliQ (Li i wsp. 2008; Hsu i wsp. 2011; Mykowska i wsp. 2011; Shieh i Bonini 2011), istotne staje się postawienie pytania czy w testowanych strategiach wystarczające jest obniżanie poziomu zmutowanego białka, czy też konieczne jest również obniżenie poziomu zmutowanego transkryptu? Spośród testowanych strategii alleloselektywne wyciszenie zarówno transkryptu, jak i białka oferuje podejście celowania w region SNP. Silnie dyskryminujące właściwości, ale tylko w wyciszeniu białka, charakteryzują wybrane miRNA-podobne reagenty i oligomery morfolino.

WŁAŚCIWOŚCI REAGENTÓW	geno-selektywność	allelo-selektywność	uniwersalność dla poliQ	stabilność w komórkach	możliwość dostarczenia w shRNA
STRATEGIE					
Wyciszanie genowo-specyficzne z użyciem RNAi	Żółty	Czerwony	Żółty	Żółty	Zielony
Celowanie w region SNP z użyciem siRNA	Żółty	Zielony	Czerwony	Żółty	Zielony
Celowanie w region sekwencji powtórzonej z użyciem siRNA	Czerwony	Czerwony	Zielony	Żółty	Zielony
Celowanie w region sekwencji powtórzonej z użyciem miRNA	Żółty	Zielony	Zielony	Żółty	Zielony
Celowanie w region sekwencji powtórzonej z użyciem ASO	Żółty	Zielony	Zielony	Zielony	Czerwony

TAK
NIE

Rycina 51. Porównanie przetestowanych strategii terapeutycznych dla chorób poliglutaminowych, wg kryteriów, jakie stanowią wybrane pożądane właściwości reagentów. Opis w tekście.

2. Interferencja sekwencji powtórzonych CAG/CUG

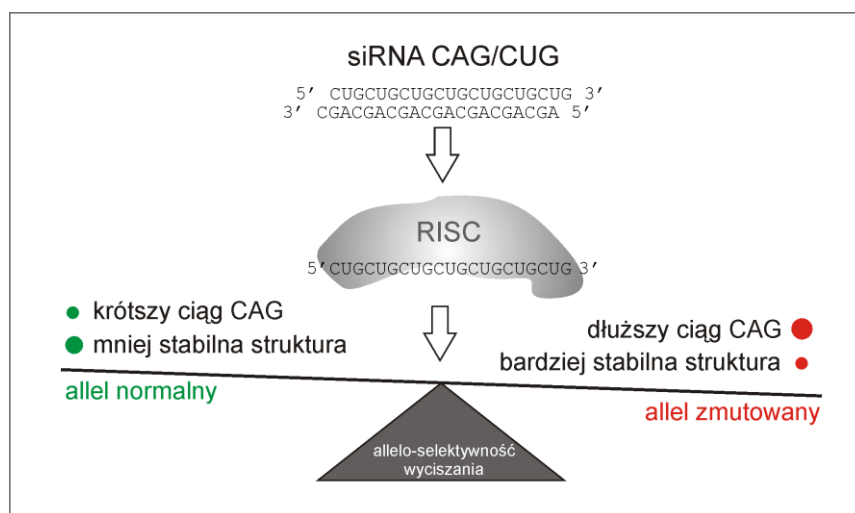
Ciągi powtórzeń CAG i CTG charakteryzują się stosunkowo wysoką częstością występowania w regionach kodujących genów człowieka, na tle wszystkich typów powtórzeń trójnukleotydowych. Blisko 300 ludzkich mRNA zawiera ciągi złożone z co najmniej 6 powtórzeń CAG lub CUG, jednak liczba powtórzonych tripletów w ciągach rzadko przekracza 20 (Kozłowski i wsp. 2010).

W niniejszej pracy wykazano, na przykładzie analizy ekspresji kilku genów, że obie nici siRNA złożonego z powtórzeń CAG/CUG działają na transkrypty zawierające sekwencje komplementarne, czyli mogą być niemi wiodącymi w kompleksie RISC. Specyfika siRNA złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych CAG/CUG polega na tym, że charakteryzują się stosunkowo wysoką zawartością par C/G i symetrią termodynamiczną dupleksu. To mogłoby czynić z nich mało wydajne reagenty RNAi, jednak charakteryzują się one stosunkowo wysoką efektywnością wyciszania ekspresji genów zawierających zarówno ciągi CAG, jak i CTG (Ryc. 16 na stronie 48). Efektywność działania dupleksów CAG/CUG na transkrypt może być zależna m.in. od długości ciągu powtórzeń oraz poziomu ekspresji danego genu. Im dłuższy ciąg powtórzeń, tym efektywność działania siRNA CAG/CUG może być wyższa,

ze względu na większe prawdopodobieństwo związania się RISC do transkryptów zawierających dłuższą sekwencję komplementarną.

W przypadku alleli zmutowanych, które stanowią pożądaną w kontekście terapii sekwencję docelową dla siRNA CAG/CUG, należy także wziąć pod uwagę strukturę tworzoną przez wydłużone ciągi CAG w transkrypcie. Struktura typu spinki, która prawdopodobnie jest tworzona w komórkach przez wydłużone ciągi CAG (Król i wsp. 2007; de Mezer i wsp. 2011; Mykowska i wsp. 2011), mogłaby utrudniać wiązanie RISC załadowanego nicią CUG. Negatywny wpływ stabilnej struktury drugorzędowej w sekwencji docelowej na efektywność działania siRNA wykazano w licznych badaniach, m.in.: (Brown i wsp. 2005; Kertesz i wsp. 2007; Westerhout i Berkhout 2007).

Dla komórkowego modelu HD (17/68 CAG w genie *HTT*), i modelu SCA3 (18/69 CAG w genie *ATXN3*), różnica w liczbie powtórzeń w allelu zmutowanym i normalnym jest około 4-krotna. Dla działania siRNA nakierowanego na sekwencję specyficzną genu określono, że efektywność działania reagenta wzrasta wprost proporcjonalnie z liczbą potencjalnych, w pełni komplementarnych, miejsc wiązania (Doench i wsp. 2003). Z kolei, w przeprowadzonych w ramach tej pracy badaniach dla sekwencji powtórzonych, wykazano tylko nieznaczną preferencję w wyciszaniu ekspresji allelu zmutowanego z użyciem siRNA CAG/CUG w modelach HD i SCA3 (Ryc. 31B, D na stronie 61 i Ryc. 33B, D na stronie 63).



Rycina 52. Schematyczne przedstawienie aktywności siRNA CAG/CUG względem alleli genów zawierających ciągi powtórzeń CAG. Opis w tekście.

Zebrane fakty sugerują, że na obserwowany efekt aktywności siRNA CAG/CUG mogą mieć wpływ różne właściwości sekwencji docelowej w allelu normalnym i zmutowanym (Ryc. 52).

W przypadku wydłużonego ciągu CAG w transkrypcie zmutowanym, korzystnie na jego wyciszenie wpływa zwielokrotniona liczba potencjalnych miejsc wiązania RISC, natomiast niekorzystnie może wpływać struktura tworzona przez sekwencję docelową. W przypadku transkryptu normalnego, sekwencja docelowa tworzy mniej stabilną strukturę, ale ze względu na jej kilkukrotnie mniejszą długość jest ona mniej preferowana, w porównaniu do sekwencji powtórzonej allelu zmutowanego.

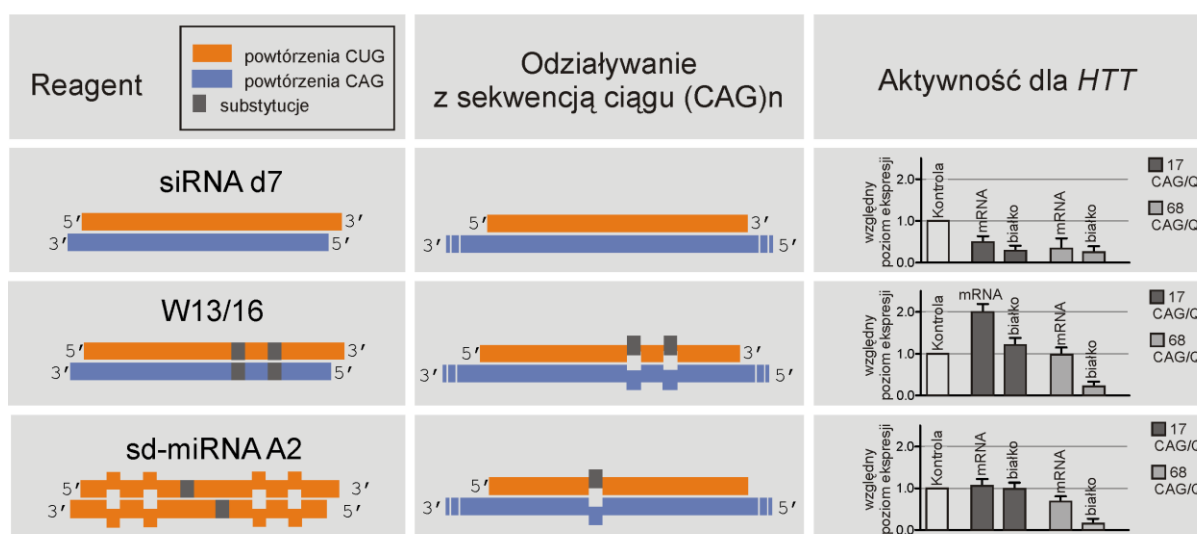
W kontekście przeprowadzonych badań dla siRNA CAG/CUG, bardzo ciekawy wydaje się aspekt możliwego występowania transkryptów antysensowych dla genów zawierających powtórzenia trójnukleotydydowe. Obecność transkryptów niekodujących wykazano dla niektórych genów odpowiedzialnych za choroby poliglutaminowe, m.in. HD, SCA1, SCA3 (He i wsp. 2008; Batra i wsp. 2010). W przypadku, gdy dla genu *HTT*, antysensowy transkrypt pokrywa ciąg powtórzeń (Chung i wsp. 2011), może w komórce dochodzić do tworzenia dsRNA z mRNA genu i generowania krótkich siRNA złożonych z powtórzeń CAG/CUG. Ich działanie zostało opisane szeroko w tej pracy i mogłoby wpływać na deregulację poziomu wielu transkryptów w komórkach HD, przyczyniając się do patogenezy. Znaczącą toksyczność siRNA CAG/CUG wykazano w przedstawionych w tej pracy badaniach, jak i ostatnio na modelu *Drosophila* (Lawlor i wsp. 2011; Yu i wsp. 2011).

3. Mechanizm działania różnych reagentów złożonych z powtórzeń trójnukleotydydowych

Opisane w pierwszej części pracy podejścia wykorzystują zjawisko RNAi, którego mechanizm został już dość dobrze poznany. Dla większości z testowanych reagentów mechanizm działania jest klarowny: siRNA działają na szlaku interferencji, indukując przecinanie transkryptu przez AGO2; oligomery chemicznie modyfikowane tworzą steryczną blokadę dla translacji zmutowanego białka. Mniej poznany jest mechanizm działania dupleksów złożonych z powtórzeń zawierających niesparowania z sekwencją docelową (W13/16, sd-miRNA).

Co interesujące dla dupleksów RNA, kierowanych w region powtórzeń CAG, różniących nie nieznacznie sekwencją, obserwowano bardzo różne profile aktywności dla genu *HTT* (Ryc. 53). Dupleks W13/16, różniący się od siRNA CAG/CUG jedynie dwiema substytucjami, wykazuje mniejszą efektywność działania na transkrypt *HTT* i zwiększoną allelo-selektywność w wyciszeniu białka huntingtyny. Nić CUG dupleksu W13/16 przypomina w oddziaływaniu ze zmutowanym ciągiem powtórzeń CAG cząsteczkę miRNA,

ze względu na wprowadzone substytucje w sekwencji reagenta i możliwość oddziaływania z sekwencją docelową w kilku miejscach. Dla efektywnego działania miRNA wymaganych jest kilka miejsc oddziaływania z transkryptem, przy czym optymalną odległość tych miejsc określono na 13-35 nt (Saetrom i wsp. 2007). W innych badaniach określono długość sekwencji transkryptu chronionej przez białko AGO2 (tzw. *footprint*) na ~50 nt (Chi i wsp. 2009). Ciąg powtórzeń zmutowanych może więc zapewniać 2-3 miejsca docelowe dla wiązania RISC. Wcześniej wykazano, że wraz ze wzrostem liczby miejsc wiązania dla miRNA, ich wpływ na poziom ekspresji danego genu wzrasta bardziej niż proporcjonalnie (Doench i wsp. 2003).



Rycina 53. Schemat podsumowujący działanie reagentów RNA, złożonych z powtórzeń trójnukleotydu CAG/CUG, na ekspresję genu *HTT*. Zebrane wyniki dotyczą tego samego układu eksperymentalnego: analiza 72 h po transfekcji komórek HD (GM04281) reagentami w stężeniu 50 nM.

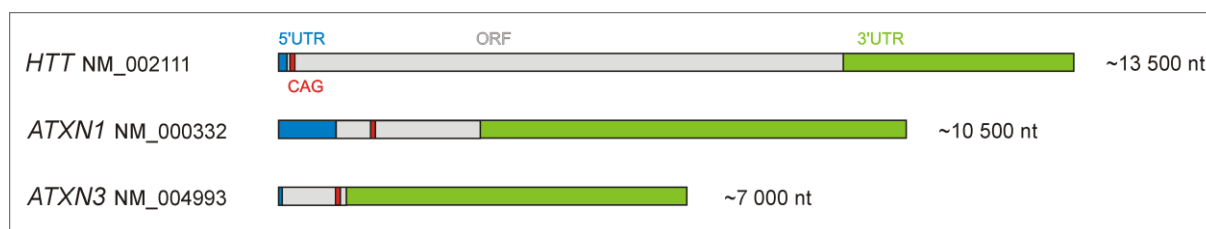
Mechanizm działania stosowanych w pracy dupleksów, zawierających niesparowania z sekwencją docelową w zmutowanym ciągu powtórzeń, mogłyby być więc, przynajmniej w niektórych aspektach, analogiczny do działania miRNA. W przypadku allelu normalnego liczba miejsc wiązania dla reagentów działających jak miRNA może być niewystarczająca i stąd obserwowana niska efektywność wyciszania ekspresji tego allelu.

Ciąg powtórzeń CAG w genie *HTT* występuje w części kodującej białko, natomiast endogenne miRNA z reguły posiadają sekwencje docelowe w regionach 3'UTR. Istnieją jednak doniesienia, które dowodzą, że miRNA mogą także działać na sekwencje ulegające translacji, występujące zarówno w endogennych transkryptach (Forman i wsp. 2008; Tay i wsp. 2008; Forman i Coller 2010), jak i w przypadku egzogennych konstruktów (Easow i

wsp. 2007), Uważa się jednak, że wyciszanie ekspresji genu jest bardziej efektywne w przypadku oddziaływań miRNA z sekwencjami w 3'UTR.

Kiedy badania zawarte w tej pracy znajdowały się na końcowych etapach, ukazały się publikacje innego zespołu badawczego, wykorzystujące, podobne do opisanego tutaj, podejście do projektowania dupleksów złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych, tj. uwzględniające wprowadzanie niesparowań reagenta z sekwencją docelową w ciągu powtórzeń CAG. Badania były prowadzone z użyciem dupleksów RNA na modelach komórkowych HD i SCA3 (Hu i wsp. 2010; Hu i wsp. 2011). Autorzy tych prac wykazali, że najlepszymi właściwościami dyskryminującymi allele charakteryzują się dupleksy zawierające niesparowania zlokalizowane w części centralnej, szczególnie w pozycji 9 lub 10, licząc od końca 5' nici antysensowej. Opisane podejście, łącznie z wynikami przedstawionymi w tej pracy, dowodzi wysokiej skuteczności reagentów, projektowanych jako miRNA, w allelo-selektywnym wyciszaniu ekspresji genów odpowiedzialnych za choroby poliQ.

W niniejszej pracy, dla dupleksu W13/16 wykazano wyraźną różnicę w aktywności wyciszania ekspresji genu huntingtyny i ataksyny-3. Dupleks W13/16 efektywnie działał na allelel zmutowany genu *HTT*, natomiast wykazywał niższą aktywność i allelo-selektywność względem genu *ATXN3* (Ryc. 31A, C na stronie 61 i Ryc. 33A, C na stronie 63). Podobnie jeśli chodzi o efekt podnoszenia poziomu transkryptu normalnego huntingtyny, był on obserwowany tylko dla genu *HTT* spośród kilku badanych. Wskazuje to na zależność mechanizmów zmiany poziomu ekspresji określonego genu od dodatkowych czynników. Niektóre z nich mogą być związane z samą budową transkryptu, którą schematycznie porównano dla trzech wybranych mRNA: *HTT*, *ATXN1* i *ATXN3* (Ryc. 54). Niewykluczony jest wpływ lokalizacji ciągu powtórzeń, gdzie w przypadku transkryptu *HTT* ciąg CAG jest zlokalizowany w eksonie 1, blisko końca 5' mRNA.



Rycina 54. Schemat przedstawiający budowę transkryptów zawierających ciągi powtórzeń CAG, będących przedmiotem badań w niniejszej pracy. Podano numer danego mRNA w bazie NCBI, jego długość oraz zaznaczono poszczególne regiony transkryptu, wraz z lokalizacją ciągu powtórzeń.

Dodatkowo, obecność transkryptu antysensowego, szczególnie zawierającego ciągi powtórzeń komplementarnych, może mieć znaczenie w mechanizmie działania krótkich RNA wprowadzanych do komórek. Niektóre reagenty mogłyby oddziaływać także z transkryptem antysensowym, i w ten sposób wpływać na poziom ekspresji danego genu.

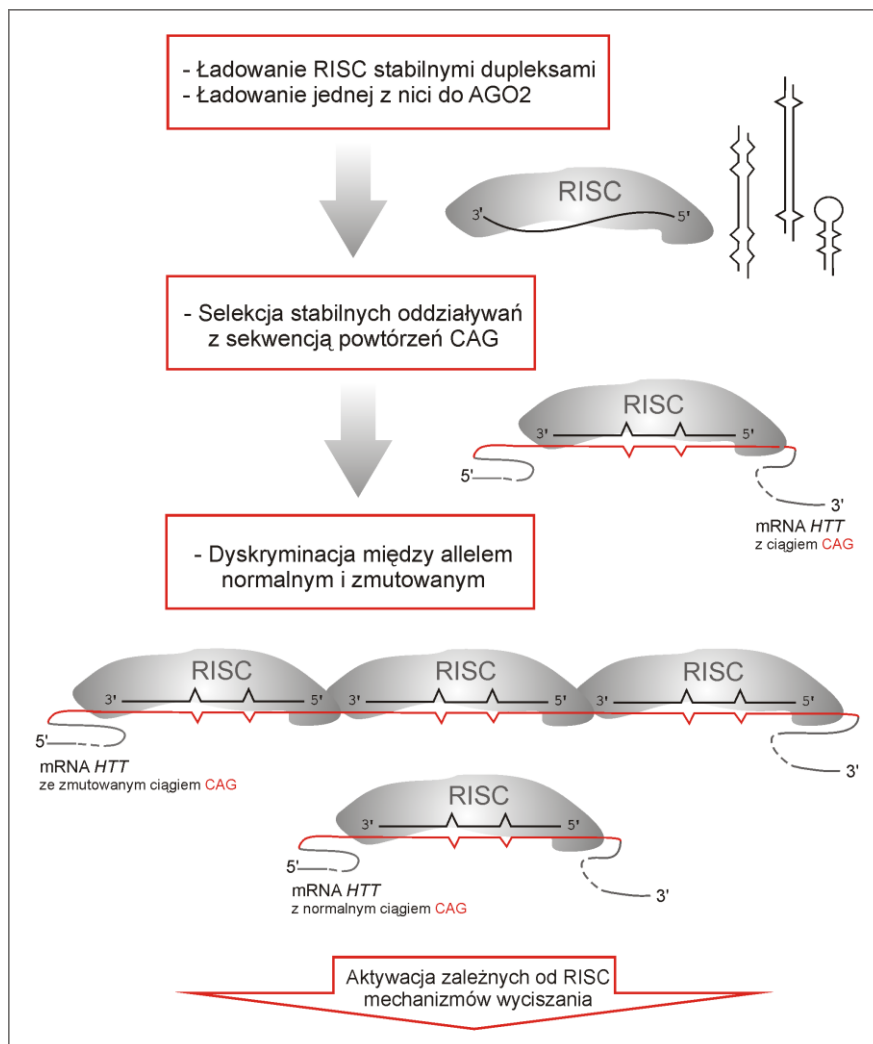
Pojedyncze nici siRNA CAG/CUG mogą tworzyć niestabilne struktury typu spinki, co mogłoby dodatkowo wpływać na spadek efektywności tych reagentów (Patzel i wsp. 2005). Ten problem był szczególnie istotny w projektowaniu dupleksów tworzonych przez jedną nić złożoną z powtórzeń CUG zawierającą substytucje zasad w sekwencji (sd-miRNA). Wprowadzane substytucje zwiększały prawdopodobieństwo tworzenia dupleksu przez dwie identyczne nici, ale jednocześnie zwiększało się prawdopodobieństwo tworzenia stabilnej struktury typu spinki przez pojedynczą nić. Nie znaleziono jednak wyraźnej korelacji między określoną, metodami bioinformatycznymi i testem migracji w żelu niedenaturującym, zdolnością do tworzenia dupleksów przez pojedynczą nić, a jej aktywnością w komórkach.

Wydaje się, że dany reagent może efektywnie uczestniczyć w wyciszaniu ekspresji genów, jeśli występuje w formie dupleksu. Reagenty w formie dupleksu są nie tylko bardziej stabilne w komórkach, lecz także efektywniej rozpoznawane przez maszynę białkową kompleksu RISC, w porównaniu do pojedynczych nici. Tendencja do tworzenia stabilnej struktury dupleksu może w komórkach zależeć od dodatkowych czynników, stąd wyniki przeprowadzonych obliczeń i analiz przeprowadzonych *in vitro*, mogą nie oddawać w pełni właściwości nici sd-miRNA w warunkach komórkowych.

Aktywność sd-miRNA jest determinowana nie tylko na etapie tworzenia dupleksu i jego włączania w RISC, ale też na dalszych etapach szlaku wyciszania (Ryc. 55). Jedna z nici, identycznych w tym przypadku, jest „ładowana” do AGO2 i poszukiwana jest w komórce sekwencja o dużym stopniu komplementarności. Poszczególne sd-miRNA różnią się między sobą układem i liczbą niesparowań w oddziaływaniu z ciągiem powtórzeń CAG. Na tym etapie dochodzi do selekcji aktywnych reagentów, które mogą odpowiednio silnie związać się wraz z RISC do transkryptu, i aktywować dalsze procesy prowadzące do wyciszenia ekspresji genu.

Spośród 31 testowanych sd-miRNA, tylko nieliczne charakteryzowały się bardzo wysoką allelo-selektywnością działania. Co ciekawe, reagenty z serii A bardzo różniły się aktywnością od reagentów z serii G. Odpowiadające sobie RNA z obu serii nie różniły się pozycjami, ale typem wprowadzonej substytucji, i przez to rodzajem powstającego

niesparowania w oddziaływaniu z mRNA. Zatem także rodzaj niesparowania z sekwencją powtórzoną CAG determinuje aktywność sd-miRNA (Ryc. 55).



Rycina 55. Schematyczne przedstawienie etapów kluczowych dla aktywności sd-miRNA w komórkach. Opis w tekście.

Dla charakteryzowanych w tej pracy reagentów złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych zaobserwowano wyraźną zależność allelo-selektywnego działania od indukowanego mechanizmu. Najniższą allelo-selektywnością charakteryzują się dupleksy, które efektywnie degradują transkrypt (siRNA CAG/CUG), natomiast wysoką dyskryminację alleli, na poziomie białka, wykazują reagenty, które nie powodują lub powodują w nieznacznym stopniu degradację transkryptu (W13/16, sd-miRNA A2 i A4). Reagentami o „pośrednich” właściwościach są sd-miRNA z serii G (G2, G4 i G5), które powodują znaczne, ale nie tak wysokie jak siRNA CAG/CUG, obniżenie poziomu transkryptu; natomiast charakteryzują się wyższą niż siRNA CAG/CUG allelo-selektywnością w wyciszaniu zmutowanego białka.

Obserwacje te sugerują, że w kontekście sekwencji powtórzonych, działanie RISC przeprowadzającego degradację transkrypu, wg mechanizmu RNAi, jest mniej zależne od długości/liczby sekwencji docelowych. Z kolei RISC indukujący inhibicję translacji działa dużo efektywniej w przypadku wydłużonego ciągu powtórzeń w allelu zmutowanym. Taka kooperatywność w działaniu RISC zależnego od miRNA, ale nie zależnego od siRNA, została opisana w kilku pracach (Doench i wsp. 2003; Grimson i wsp. 2007; Saetrom i wsp. 2007; Broderick i wsp. 2011) w kontekście sekwencji specyficznych. W badaniach, zawartych w niniejszej pracy, po raz pierwszy pokazano, że podobna zależność istnieje w kontekście sekwencji powtórzonych.

4. Perspektywy

W niniejszej pracy opisano wyniki testowania wielu nowych reagentów, potencjalnych terapeutyków dla chorób poliglutaminowych. Całkowicie oryginalnym podejściem jest strategia z wykorzystaniem sd-miRNA, jako wysoce selektywnych reagentów w wyciszaniu zmutowanej huntingtyny. Opisano również ciekawe mechanizmy regulacji ekspresji genu, odpowiedzialnego za HD, z użyciem dupleksów RNA złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych, polegające na translacyjnej inhibicji zmutowanego genu *HTT* i też w niektórych przypadkach, transkrypcyjnej aktywacji normalnego genu *HTT*. Badania te stanowią punkt wyjścia do szczegółowej analizy mechanizmu działania wybranych reagentów oraz określenia specyficznych cech genu huntingtyny, które wpływają na taką aktywność reagentów.

Przedstawione w tej pracy podejścia terapeutyczne dla chorób poliglutaminowych stanowią główny nurt w badaniach zmierzających do opracowania skutecznych leków w postaci oligonukleotydów i ich analogów. Co istotne, są to podejścia mające z założenia eliminować samą przyczynę choroby przez pozbycie się z komórki zmutowanego transkryptu i/lub białka. W pierwszym etapie różne strategie są weryfikowane na modelach komórkowych, gdzie z reguły stosunkowo łatwo jest dostarczyć reagent i określić czy na poziomie molekularnym ma on działanie terapeutyczne. Wyselekcjonowane w opisanych badaniach reagenty będą dalej testowane dla modeli HD, SCA1 i SCA3, jak również podjęte będą badania z uwzględnieniem modeli komórkowych innych chorób z grupy TREDs. Ponadto, reagenty mogą być poddawane dalszym modyfikacjom, np. konstruowaniu na ich podstawie shRNA lub wprowadzania modyfikacji chemicznych do dupleksów RNA. Wyselekcjonowane reagenty będą także testowane na bardziej złożonych modelach, np. mysich wybranych chorób.

V. STRESZCZENIE

Technologia RNAi jest szeroko wykorzystywana do obniżenia poziomu ekspresji wybranego genu w celu poznania jego funkcji. Podejmowane są również próby wykorzystania tej technologii w medycynie do projektowania nowej generacji leków na podstawie wiedzy o sekwencji genomu. Mimo bardzo licznych przykładów zastosowań, samo zjawisko RNAi nie jest jeszcze w pełni poznane i testowane są różne możliwości zastosowania tej obiecującej technologii. Niniejsza praca doktorska opisuje badania zmierzające do lepszego poznania mechanizmu wyciszania ekspresji genów z użyciem oligonukleotydów, jak również do ich terapeutycznego wykorzystania.

W tej pracy przetestowano różne strategie terapeutyczne dla wybranych chorób poliglutaminowych: choroby Huntingtona oraz ataksji rdzeniowo-mózdkowych typu 1 i 3, ze szczególnym uwzględnieniem podejścia celowania w region powtórzeń trójnukleotydowych CAG w zmutowanych transkryptach. Pomimo, że niektóre strategie są już testowane na modelach mysich, istnieje potrzeba poszukiwania nowych reagentów, bardziej skutecznych i mniej toksycznych.

Badania prowadzono na modelach komórkowych fibroblastów, pochodzących od pacjentów z wybranymi chorobami, do których wprowadzano metodą transfekcji syntetyczne oligonukleotydy i ich analogi. Analizowano efekty działania reagentów na ekspresję zmutowanych alleli i innych wybranych genów, uwzględniając zarówno poziom transkryptu, jak i białka.

Badania doprowadziły do wyselekcjonowania kilku reagentów o potencjalnie terapeutycznym działaniu. Ważnym kryterium oceny działania testowanych oligonukleotydów było rozróżnianie alleli w wyciszaniu ekspresji danego genu oraz specyficzność działania. Do reagentów o najlepszych potencjalnie terapeutycznych właściwościach należą:

- siRNA G9, celujący w region zawierający SNP w genie *ATXN3*, efektywnie indukujący obniżenie poziomu transkryptu i białka zmutowanej ataksyny-3;
- dupleks W13/16, złożony z powtórzeń trójnukleotydowych, indukujący inhibicję translacji zmutowanej huntingtyny;
- dupleksy W13/16-II oraz sd-miRNA A2 i A4, o podobnym do W13/16 działaniu na ekspresję genu *HTT*, ale o zwiększonej geno-selektywności;

- oligomer morfolino CTG-7, blokujący translację zmutowanej huntingtyny.

Dla wybranych reagentów złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych przeprowadzono eksperymenty dostarczające pewnych przesłanek o mechanizmie ich działania. Weryfikowano działanie dupleksów na drodze interferencji RNA poprzez analizę miejsc przecinania transkryptów przez poszczególne reagenty.

Dla strategii celowania w region SNP wyselekcjonowano, dla wszystkich trzech analizowanych modeli chorób poliglutaminowych, siRNA o właściwościach potencjalnie użytecznych w terapii. Potwierdzona została skuteczność tego typu podejścia i wykazana zależność aktywności kompleksu RISC od sekwencji docelowej.

Punktem wyjścia dla wykorzystania strategii celowania w region powtórzeń trójnukleotydowych była szczegółowa analiza działania siRNA CAG/CUG. Dla tego reagenta zaobserwowano efektywne działanie na normalne transkrypty zawierające komplementarne ciągi powtórzeń CUG i CAG, co jest aktywnością niepożądaną. Wprowadzenie następnie do sekwencji tego siRNA substytucji zasad skutkowało zmianą aktywności i prawdopodobnie także mechanizmu działania reagentów. Obserwowano efektywne i specyficzne wyciszenie białka zmutowanej huntingtyny. Podobną aktywność obserwowano dla nici CUG o zmodyfikowanej sekwencji, wykazującej zdolność do samodupleksacji.

Spośród reagentów celujących w region powtórzeń, najwyższą allelo-selektywnością charakteryzowały się te, które wpływały głównie na ekspresję białka (pozostawiając transkrypt na niezmiennym poziomie). W przypadku oligorybonukleotydów nie w pełni sparowanych z wydłużonym ciągiem CAG blokadę dla translacji stanowią najprawdopodobniej związane z nimi kompleksy RISC. Chemicznie modyfikowane oligomery dzięki silnemu wiązaniu do sekwencji komplementarnej mogą same stanowić efektywną blokadę dla maszynerii translacyjnej.

Przeprowadzone badania stanowią punkt wyjściowy do dalszego rozwijania i testowania poszczególnych strategii terapeutycznych. Uzyskane wyniki dostarczają również nowych informacji o możliwościach regulacji ekspresji genów z użyciem krótkich RNA złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych.

VI. MATERIAŁY I METODY

ODCZYNNIKI

Agaroza (Sigma-Aldrich)
Akrylamid (Sigma-Aldrich)
APS (Sigma-Aldrich)
Bisakrylamid (Sigma-Aldrich)
Bromek etydyny (Serva)
Chlorek sodu (Serva)
Chloroform (POCH Gliwice)
DMSO (Sigma-Aldrich)
dNTP (Promega)
EDTA (Serva)
Etanol (Polmos Poznań)
GelRed (Biotium)
Glicerol (Merck)
Heksamery o losowej sekwencji (Promega)
Izopropanol (POCH Gliwice)
Izotop [γ -³²P]ATP (Hartmann Analytics)
Kwas borowy (CHEMPUR)
Kwas octowy (CHEMPUR)
Marker długości DNA – *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen)
Metanol (POCH Gliwice)
PBS (Serva)
PMSF (Fluka)
Roztwór Denhardt'a 10x (Sigma-Aldrich)
SDS (Serva)
SSC bufor 20x (Sigma-Aldrich)
SSPE bufor 20x (Sigma-Aldrich)
TEMED (Sigma-Aldrich)
Tris (Sigma-Aldrich)
TRI Reagent (BioShop)
Tween20 (Sigma-Aldrich)
 β -Merkaptoetanol (Fluka)

REAKCJE ENZYMATYCZNE

GoTaq polimeraza – Promega
SuperScript II odwrotna transkryptaza – Invitrogen
SuperScript III odwrotna transkryptaza – Invitrogen
Kinaza polinukleotydowa (Optikinase) – USB
Ligaza RNA T4 – Ambion
Rybonukleaza Dicer – Ambion

HODOWLE KOMÓRKOWE

Antibiotyk-Antymykotyk (100x stężony) – Sigma-Aldrich
Aminokwasy (100x stężone) – Sigma-Aldrich
Block-IT Reagent – Invitrogen
EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) – Lonza
FBS (płodowa surowica bydlęca, ang. *Fetal Bovine Serum*) – Sigma-Aldrich
PBS (tabletki) – BioShop
Trypsyna-EDTA (10x stężona) – PAA
Lipofectamine 2000 – Invitrogen
Oligofectamine – Invitrogen
Lipofectamine RNAiMAX – Invitrogen
EndoPorter – Gene Tools

ANALIZA TYPU *NORTHERN*

membrana HyBond-N+ (GE Healthcare)
marker długości RNA 10-100 nt (USB)

ANALIZA TYPU *WESTERN*

Membrana nitrocelulozowa 0,45 μm (Sigma)
Streptawidyna skoniugowana z alkaliczną fosfatazą (Millipore)
Substrat dla alkalicznej fosfatazy BCIP/NBT (Sigma)
Substrat dla peroksydazy: *ECL Western Blotting Substrate* (ThermoScientific) i *ChemiFast Chemiluminescent Substrat* (Syngene)

Markery białkowe: PageRuler (Fermentas), HiMark (Invitrogen)

Przeciwciała:

I-rzędowe anty-ataksyna-3 (Millipore, klon 1H9, nr kat. MAB5360)
 anty-huntintyna (Millipore, klon 1HU-4C8, nr kat. MAB2166)
 anty-DMPK (Abcam, nr kat. ab54731)
 anty-GAPDH (Millipore, klon 6C5, nr kat. MAB374)

anty-plektyna (Abcam, nr kat. ab83497)

anty-poliQ (Millipore, nr kat. MAB1574)

II-rzędowe anty-mysie skoniugowane z biotyną (Sigma, nr kat. B7264)

anty-mysie skoniugowane z peroksydazą (Sigma, nr kat. A9917)

anty-królicze skoniugowane z peroksydazą (Jackson ImmunoResearch, nr kat. 711-035-152)

ZESTAWY

Amicon Ultra 30K (Millipore) – kolumnienki do usuwania frakcji krótkich oligonukleotydów

CellTiter Glo (Promega) – zestaw do testu przeżywalności komórek

peqGOLD Gel Extraction Kit (peqlab) – zestaw do oczyszczania produktów PCR w żelu agarozowym

BUFORY

Bufor TBE 10x do elektroforezy kwasów nukleinowych

890 mM Tris-HCl

890 mM kwas borowy

20 mM EDTA

Bufor obciążający 6x do rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym

30% glicerol

10 mM EDTA

0.04% błękit bromofenolowy (BB)

0.04% fiolet ksylenowy (XC)

Bufor obciążający 3x do rozdzielania elektroforetycznego w żelu niedenaturującym poliakrylamidowym

14% sacharoza

0.04% błękit bromofenolowy (BB)

Bufor obciążający 2x do rozdzielania elektroforetycznego w żelu denaturującym poliakrylamidowym

95% formamid

5 mM EDTA

0.04% błękit bromofenolowy (BB)

0.04% fiolet ksylenowy (XC)

Bufor do hybrydyzacji siRNA (Metabion):

30 mM HEPES-KOH pH 7.4

100 mM KCl

2 mM MgCl₂

50 mM NH₄Ac

Bufor do hybrydyzacji typu *northern*:

5x SSPE

5x roztwór Denhardt'a

0,2% SDS

25% formamid

Bufor płuczący do hybrydyzacji typu *northern*:

2x SSC

0,1% SDS

Bufor opłukujący do hybrydyzacji typu *northern*:

0,1x SSC
0,5% SDS

Bufor do hybrydyzacji typu *northern* w roztworze, 10x stężony:

1,5 M NaCl
500 mM Tris-HCl pH 7.4
10 mM EDTA

Bufor PBS

0.1% (w/v) D-glukoza
0.5 mM CaCl₂ x 2H₂O
0.01 mM MgCl₂ x 6H₂O
5 mM KCl
150 mM Tris-HCl

PBS/Tween/NaCl

1x PBS
1% NaCl
0,1% Tween20

Bufor PB do izolacji białek

60 mM Tris
2% SDS
10% sacharoza
2 mM PMSF

RIPA do izolacji białek (Sigma)**Bufor obciążający do elektroforezy białek, 3x stężony**

150 mM Tris-HCl pH 6,8
6% SDS
16% β-Merkaptoetanol
30% glicerol
3% błękit bromofenolowy

Bufor Laemmli do elektroforezy białek

25 mM Tris
192 mM glicyna
0,1% SDS

Bufor XT Tricine do elektroforezy białek (Bio-Rad)**Bufor Tris/Trycyna do elektroforezy białek**

100 mM Tris
100 mM trycyna
0,1% SDS

Bufor Towbin do elektrotransferu białek

25 mM Tris
192 mM glicyna
20% metanol
0,02% SDS

Bufory do barwienia Coomassie białek w żelu

1 50% etanol	2 50% metanol	3 5% metanol	4 7% kwas octowy
10% kwas octowy	10% kwas octowy	12,5% kwas octowy	
	0,05% błękit brylantowy		

Procedura barwienia żelu: 5 min. w buforze **1**, 30 min. w buforze **2**, do uwidocznienia prążków w buforze **3** i przechowywanie żelu w buforze **4**.

Bufor do barwienia Ponceau białek na membranie

0,1% (w/v) Ponceau S
5% kwas octowy

ŻELE**Elektroforeza kwasów nukleinowych****Żel agarozowy do rozdzielania produktów PCR**

1,5% agarozą w buforze 0,5x TBE z bromkiem etydyny (500 µg EtBr/1 l buforu)

Żel agarozowy do sprawdzania dupleksowania siRNA

2,5% agarozą w buforze 0,5x TBE z 1x GelRed

Żel poliakrylamidowy denaturujący

20% (rozdzielanie produktów reakcji Dicer), 12% (analiza *northern*) lub 6% (analiza 5'RACE) poliakrylamid (19:1 – stosunek akrylamid:bisakrylamid)

7,5 M mocznik

bufor 0,5x TBE

katalizatory polimeryzacji: nadsiaroczan amonu 0,1%, TEMED 0,1%

Żel poliakrylamidowy niedenaturujący

20% poliakrylamid (39:1 – stosunek akrylamid:bisakrylamid)

bufor 1x TBE

katalizatory polimeryzacji: nadsiaroczan amonu 0,1%, TEMED 0,1%

kontrolowana temperatura 37°C

Elektroforeza białek

Żele gradientowe 4-20% Novex Tris-Glycine mini gels (Invitrogen) w buforze 1x Novex Tris-Glycine SDS

Żel do rozdzielania białek ataksyna-3/GAPDH:

<u>12% żel rozdzielający</u>	<u>5 ml</u>	<u>5% żel zagęszczający</u>	<u>2 ml</u>
H ₂ O	1,6 ml	H ₂ O	1,38 ml
30% akrylamid/bis (29:1)	2,0 ml	30% akrylamid/bis (29:1)	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8.8)	1,3 ml	1,0 M Tris (pH 6.8)	0,25 ml
10% SDS	50 µl	10% SDS	20 µl
10% APS	50 µl	10% APS	20 µl
TEMED	2 µl	TEMED	2 µl

Warunki: bufor 1x Leammli, 60 V wbijanie, 120 V elektroforeza

Żel do rozdzielania białek huntingtyna/plektyna:

<u>5% żel rozdzielający</u>	<u>5 ml</u>	<u>4% żel zagęszczający</u>	<u>2,5 ml</u>
H ₂ O	0,95 ml	H ₂ O	0,6 ml
20% akrylamid/bis (49:1)	1,25 ml	20% akrylamid/bis (49:1)	0,5 ml
0,9 M Tris-Ac (pH 8.8)	2,5 ml	0,3 M Tris-Ac (pH 6.8)	1,25 ml
10x XT Tricine	0,25 ml	10x XT Tricine	0,125 ml
10% APS	50 µl	10% APS	25 µl
TEMED	5 µl	TEMED	2,5 µl

Warunki: bufor 1x XT Tricine, 60 V wbijanie, 120 V elektroforeza około 7 h, z chłodzeniem do ~15°C.

Żel do rozdzielania białka huntingtyny w przypadku krótszych mutacji:

<u>10% żel rozdzielający</u>	<u>5 ml</u>	<u>8% żel zagęszczający</u>	<u>2,5 ml</u>
H ₂ O	0,95 ml	H ₂ O	0,6 ml
40% akrylamid/bis (250:1)	1,25 ml	40% akrylamid/bis (250:1)	0,5 ml
0,9 M Tris-Ac (pH 8.8)	2,5 ml	0,3 M Tris-Ac (pH 6.8)	1,25 ml
10x Tris/Trycyna	0,25 ml	10x Tris/Trycyna	0,125 ml
10% APS	50 µl	10% APS	25 µl
TEMED	5 µl	TEMED	2,5 µl

Warunki: bufor 1x Tris/Trycyna, 60 V wbijanie, 180 V elektroforeza około 7 h, z chłodzeniem do ~15°C.

OLIGONUKLEOTYDY

Większość sekwencji oligonukleotydów używanych do transfekcji komórek jest podana na poszczególnych Rycinach, obrazujących wyniki eksperymentów, w których poszczególne oligonukleotydy RNA lub chemicznie modyfikowane były użyte. Sekwencje innych siRNA podane są w Tabeli 7.

Tabela 7. Startery do PCR (F- starter *forward*, R- strater *reverse*) oraz oligonukleotydy do 5'RACE i siRNA (ss- nić sensowa, as- nić antysensowa). DNA oznaczono małą literą, RNA dużą literą, 3p - trójforsforan. *startery „HTT 2”, w odróżnieniu od „HTT”, nie uwzględniają ciągu powtórzeń CAG w produkcie PCR.

Nazwa	Sekwencja 5'-3'	Warunki PCR
GAPDH F	gaaggtgaaggtcggagtc	60°C
GAPDH R	gaagatggtgatgggatttc	
HTT F	ccctggaaaagctgatgaag	58°C 10% DMSO
HTT R	cacggtctttcttgtagctg	
HTT 2 F*	cgacagcgagtcagtgaatg	60°C
HTT 2 R*	accactctggcttcacaagg	
ATXN1 F	aggctgaggctacctgtgaa	58°C 10% DMSO
ATXN1 R	gaactggaaatgtggacgta	

ATXN3 F	ggaagagacgagaagcctac	58°C 5% DMSO
ATXN3 R	tcacctagatcactcccaagt	
RPL14 F	ggcagaaggcagacatcaat	60°C
RPL14 R	tttctgggcaggaaccttct	
LRP8 F	aggactcggagggctgag	60°C 10% DMSO
LRP8 R	cgctgtggtctaagcagtca	
EIF2AK F	tagcacgtccttgcccttctt	55°C 10% DMSO
EIF2AK R	catccaaatcccactgcttt	
AGO1 F	gcactgcccattggcaacgaa	55°C
AGO1 R	cattcgccagctcacaatggct	
AGO2 F	cagtgcgtgcagatgaagaa	60°C
AGO2 R	agtgacgtctgctcccagaa	
Ad_ext	gtcgatggcgatgaatgaaca	58°C 5% DMSO
ATXN3_ext	acatggtcacagctgctga	
Ad_int	acactgcgttttgctggctttgatg	58°C 5% DMSO
ATXN3_int	tcacctagatcactcccaagt	
ATXN3 RT	ccaaagtggaccctatgctg	
5'RACE adaptor	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA	
siAGO1 ss	GAGAAGAGGUGUCUCAAGAAUU	
siAGO1 as	UUCUUGAGCACCUCUUCUCUU	
siAGO2 ss	ACAGAUUCCCAAAGGGUAAtt	
siAGO2 as	UUACCCUUUGGAAUCUGUt	
siATXN3 ss	GGGUGAUCUGCCAGAUUGCUU	
siATXN3 as	GCAAUCUGGCAGAUACCCUU	
P9b as	GCUGCUGCAGCUGCUGCUGtt	
P9b ss	CAGCAGCAGCAGCAGCAGCtt	
3pRNA	3p (CAG) x 20	
UAA/AUU 17 as	(UAA) x 17	
UAA/AUU 17 ss	(UUA) x 17	

PRZECIWCIAŁA

Tabela 8. Zestawienie przeciwciał I- i II-rzędowych do analizy typu *western*. Kolorem znaku „*” oznaczono przeciwciało II-rzędowe dopasowane do określonego przeciwciała I-rzędowego.

Nazwa	Klon, numer katalogowy	Dostawca
anty-huntingtyna*	1HU-4C8, MAB2166	Millipore
anty-plektyna*	ab83497	Abcam
anty-ataksyna-3*	1H9, MAB5360	Millipore
anty-FOXP2*	ab16046	Abcam
anty-TBP*	58C9, T1827	Sigma-Aldrich

anty-GAPDH*	6C5, MAB374	Millipore
anty-RPL14*	H00009045-B01	Abnova
anty-LRP8*	A3481	Sigma-Aldrich
anty-EIF2AK3*	ab65142	Abcam
*anty-mysie skoniugowane z peroksydazą	A9917	Sigma-Aldrich
*anty-królicze skoniugowane z peroksydazą	711-035-152	Jackson ImmunoResearch
*anty-mysie skoniugowane z biotyną	B7264	Sigma-Aldrich
*anty-królicze skoniugowane z biotyną	B8895	Sigma-Aldrich

METODY

Hodowla linii komórkowych

Stosowane w badaniach linie komórkowe fibroblastów, pochodzących od pacjentów z wybranymi chorobami, zostały zakupione z firmy *Coriell Cell Repositories*. Ich charakterystyka jest przedstawiona w Tabeli 8. Linie fibroblastów hodowano w warunkach 37°C i 5% CO₂ w pożywce EMEM z 8% płodową surowicą bydlęcą (FBS), aminokwasami i antybiotykami. Komórki utrzymywano w logarytmicznej fazie wzrostu, przesiewano z użyciem trypsyny i hodowano maksymalnie do 15 pasażu. Komórki bankowano w ciekłym azocie w pożywce EMEM z 20% FBS i 10% DMSO.

Tabela 9. Zestawienie stosowanych w pracy linii komórkowych fibroblastów.

Numer linii	Choroba	Płeć pacjenta	Wiek pacjenta	Liczba powtórzeń w zmutowanym genie
GM04281	HD	F	20	17/68 CAG
GM04208	HD	M	35	21/44 CAG
GM03864	HD	F	51	15/46 CAG
GM01187	HD	M	43	18/47 CAG
GM04022	HD	F	28	19/44 CAG
GM01083	HD	F	47	19/44 CAG
GM06153	SCA3	M	44	18/69 CAG
GM06151	SCA3	M	38	18/74 CAG
GM06927	SCA1	M	29	29/43 CAG
GM00024	zdrowy	M	31	-

Wprowadzanie krótkich oligonukleotydów do komórek

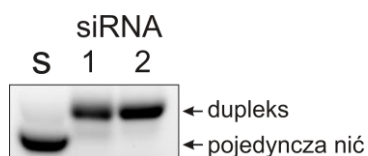
Syntetyczne RNA zakupiono w firmie Metabion. Chemicznie modyfikowane oligomery były syntetyzowane w firmach: Sigma (2'OMe, PS), Gene Tools (morfolino), Ribo Task (LNA), Exiqon (LNA), PANAGENE (PNA).

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

15 μ l z 100 μ M nici antysensowej
 + 15 μ l z 100 μ M nici sensowej
 + 45 μ l buforu do hybrydyzacji siRNA 1 min. w 90°C, 40 min. RT

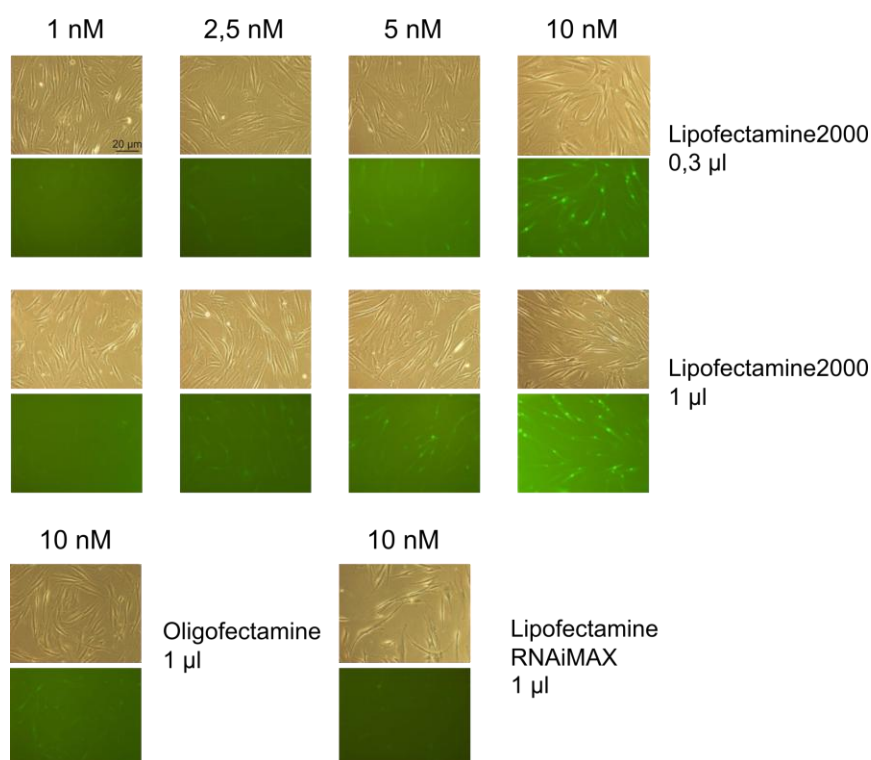
otrzymywano 75 μ l 20 μ M dupleksu siRNA

Tworzenie dupleksu było potwierdzane przez analizę migracji w 2,5% żelu agarozowym (Ryc. 56) lub 20% natywnym żelu poliakrylamidowym (Ryc. 37C).



Rycina 56. Przykład żelu agarozowego, na którym analizowano migrację krótkich RNA po poddaniu 2 komplementarnych nici hybrydyzacji. Na żel nakładano 200 pmoli jednej z nici siRNA (s) i 50 pmoli dupleksu siRNA (1 i 2) i barwiono GelRed.

Transfekcję komórek fibroblastów prowadzono z wykorzystaniem dostępnych komercyjnie lipidów kationowych. 24 h przed transfekcją komórki posiewano do około 60% konfluencji. Wykonano test 3 różnych odczynników do transfekcji (Ryc. 57), na podstawie którego wybrano Lipofectamine2000 do dalszych analiz.



Rycina 57. Wyniki wstępnej optymalizacji transfekcji komórek fibroblastów z użyciem różnych odczynników przy podawaniu siRNA zawierającego znacznik fluorescencyjny w różnych stężeniach, od 1 do 10 nM. Eksperymenty prowadzono na 12-dółkowych płytkach (powierzchnia dołka 3,5 cm²) w objętości 0,5 ml. Przedstawiono obraz komórek, po 24 h od transfekcji, w świetle widzialnym oraz z użyciem filtra fluorescencyjnego.

Na podstawie efektywności dostarczania do komórek siRNA BlockIT, zawierającego znacznik fluorescencyjny FITC i uwzględniając zalecenia producenta Lipofetamine2000, opracowano następujący protokół transfekcji komórek fibroblastów (dla naczynia o powierzchni 25 cm²):

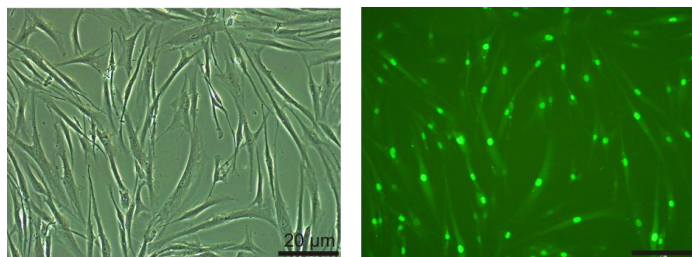
- komórki przepłukane PBS i zalane 1,9 ml EMEM

5 µl Lipofetamine2000 w 300 µl EMEM (inkubacja 5 min. RT)

+ mieszanina siRNA (ilość w zależności od końcowego stężenia) w 300 µl EMEM

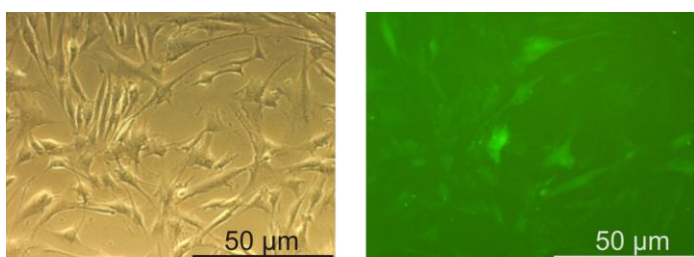
- inkubacja 20 min. RT
- podanie mieszaniny na komórki
- inkubacja 4 h
- wymiana pożywki na kompletną

Tak opracowany protokół zapewniał wydajną transfekcję prawie 100% komórek, oszacowaną na podstawie podawania siRNA BlockIT (Ryc. 58).



Rycina 58. Obraz komórek fibroblastów 24 h po transfekcji 10 nM siRNA BlockIT w zoptymalizowanych warunkach.

Chemicznie modyfikowane oligomery morfolino i PNA, stosowane w tej pracy (Ryc. 48), jest trudniej dostarczyć do komórek, ponieważ nie posiadają one ładunku ze względu na brak wiązania forfodiestrowego. Dostarczanie PNA do komórek było ułatwione przez dodanie reszt lizyny na końcach oligomeru, jednak należało podać go w stężeniu 2 μM . Dostarczanie oligomerów morfolino było prowadzone z użyciem odczynnika EndoPorter. Warunki dostarczania morfolino zoptymalizowano stosując wyznakowany fluorescencyjnie oligomer i ustalono podawane stężenia na 20 μM morfolino i 12 μM EndoPorter (Ryc. 59).



Rycina 59. Obraz komórek fibroblastów w świetle widzialnym oraz z użyciem filtra fluorescencyjnego po podaniu do pożywki odczynnika EndoPorter w stężeniu 12 μM wraz z 20 μM oligomerem morfolino (CTG)₇ ze znacznikiem fluoresceiny na końcu 3'.

Analiza poziomu transkryptów zawierających ciągi sekwencji powtórzonej

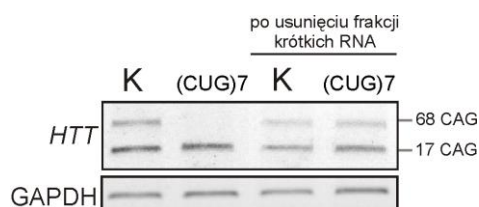
Efektywność wyciszania poszczególnych transkryptów po podaniu do komórek różnych reagentów określano poprzez odniesienie poziomu transkryptów po zadziałaniu reagentów do ich poziomu w komórkach traktowanych kontrolnym siRNA BlockIT oraz uwzględniając poziom transkryptu GAPDH. Metodą użytą do określania poziomu mRNA była RT-PCR.

Całkowity RNA izolowano z komórek z użyciem odczynnika TriReagent (roztwór zawierający fenol i izotiocyanian guanidyny), po określonym czasie od transfekcji, wg zaleceń producenta. Stężenie otrzymanego RNA określano przez pomiar absorbancji przy 260 nM.

500 ng całkowitego RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji, z użyciem zestawu SuperScript II lub SuperScript III oraz losowych heksamerów, według zaleceń producenta. Uzyskany cDNA był rozcieńczany 5-krotnie i stanowił matrycę dla szeregu PCR, w których były powielane produkty odpowiadające fragmentom poszczególnych transkryptów.

Sekwencje używanych starterów do PCR są podane w Tabeli 7. Startery były tak projektowane, aby niemożliwe było namnażanie produktu z DNA, tylko z cDNA, czyli pary starterów lokalizowano w różnych eksonach. Większość produktów PCR obejmowała sekwencję ciągu powtórzeń trójnukleotydowych, co umożliwiało oddzielną analizę poziomu alleli różniących się liczbą powtórzeń. Dla takich produktów PCR istotna była optymalizacja warunków amplifikacji, tak aby, w przypadku materiału z linii komórkowej z mutacyjną ekspansją, uzyskiwać podobnej ilość produktu z allelu normalnego zmutowanego. Zamierzony efekt osiągnięto przez dodatek DMSO do reakcji. Kontrolę ilości całkowitego RNA i odniesienie stanowiła analiza poziomu ekspresji genu metabolizmu podstawowego GAPDH. Produkty PCR analizowano w 1,5% żelu agarozowym w buforze 0,5xTBE z bromkiem etydyny.

W przypadku analizy RT-PCR poziomu zmutowanych transkryptów zawierających powtórzenia CAG, po podaniu do komórek jednociowych reagentów złożonych z powtórzeń trójnukleotydowych, obserwowano fałszywie pozytywne wyniki wskazujące na wyciszenie ekspresji genu. Najprawdopodobniej w takim przypadku dochodzi do inhibicji odwrotnej transkrypcji, w reakcji przeprowadzanej w próbówce, po wiązaniu się do wydłużonego ciągu powtórzeń komplementarnych oligonukleotydów, wyizolowanych z całkowitym RNA. W przypadku podawanych do komórek jednociowych oligonukleotydów RNA ten „efekt” może być „zniesiony” przez usunięcie frakcji krótkich RNA przed odwrotną transkrypcją (Ryc. 60). Procedura usuwania tej frakcji była prowadzona następująco: wyizolowany z komórek całkowity RNA podgrzano przez 3 min. w 90°C, uzupełniono do 100 µl wodą i oczyszczano na kolumnach Amicon Ultra 30K, wg zaleceń producenta.



Rycina 60. Analiza RT-PCR poziomu transkryptu *HTT*, 24 h po podaniu 10 nM RNA (CUG)₇ do komórek HD (GM04281). Dwie pierwsze ścieżki dotyczą standardowej RT-PCR, dwie następne dla RNA z uprzednio usuniętą frakcją krótkich RNA. K – komórki traktowane kontrolnym siRNA.

W przypadku silnie wiążących się chemicznie modyfikowanych jednociowych oligonukleotydów oraz oligomerów, opisany wyżej protokół nie funkcjonował. Nieobarczona wyżej opisanym efektem jest analiza RT-PCR obejmująca region po stronie 3' ciągu powtórzeń, ale nie umożliwia ona niezależnej analizy dla dwóch alleli. Natomiast analiza

wyciszenia białka nie jest obarczona tym błędem i jest w pełni wiarygodna, dlatego przeprowadzono ją dla weryfikacji działania jednoniciowych reagentów złożonych z powtórzeń CUG/CTG.

Analiza poziomu wybranych białek

WYBÓR METODY IZOLACJI BIAŁKA Z KOMÓREK FIBROBLASTÓW

Przetestowano 3 protokoły lizy komórek fibroblastów, aby wybrać metodę zapewniającą dużą efektywność izolacji białek będących przedmiotem badań. W tym celu porównano profil białkowy lizatów uzyskanych 3 metodami oraz przeprowadzono dla nich analizę typu *western* dla wybranych białek.

Metoda 1 – zamrażanie komórek

Komórki po odklejeniu od podłoża były przepłukane i następnie zawieszono w buforze PBS z dodatkiem inhibitorów proteaz (około 50 μ l na 100 tys. komórek). Trzykrotnie wykonano zamrożenie komórek, w łaźni składającej się z suchego lodu i izopropanolu, i rozmrożenie w łaźni wodnej 37°C. Następnie lizat zwirowano 5 min. przy 13000 g i supernatant poddawano dalszym analizom.

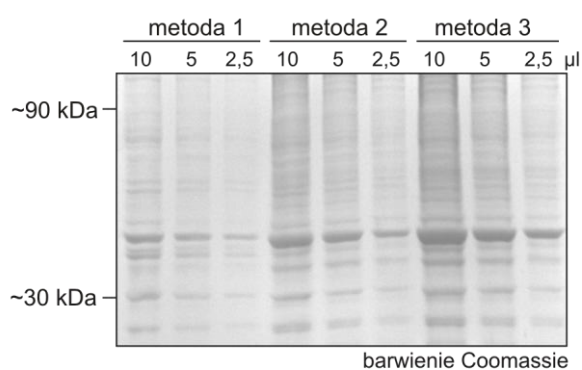
Metoda 2 - RIPA

Odklejone komórki przepłukano buforem PBS i zawieszono w buforze RIPA z dodatkiem inhibitorów proteaz (około 50 μ l na 100 tys. komórek). Następnie lizat inkubowano 0,5 h na lodzie, z okresowym intensywnym mieszaniem (na wortexie).

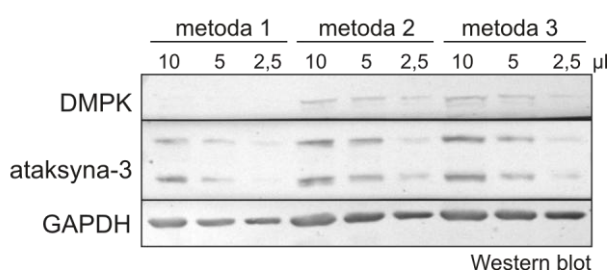
Metoda 3 - PB

Komórki po odklejeniu i przepłukaniu buforem PBS zawieszono w buforze PB (około 50 μ l na 100 tys. komórek) i inkubowano 5 min. w 95°C.

Izolację białka wykonano równolegle różnymi metodami dla tej samej liczby komórek z jednej linii komórkowej (SCA3, GM01653) (Ryc. 61). Na żel nakładano odpowiednio 10, 5 oraz 2,5 μ l każdego z lizatów (uzyskano równe objętości lizatów dla każdej z metod) i po rozdziale wykonano barwienie Coomassie lub detekcję typu *western* białek DMPK, ataksyny-3 oraz GAPDH, wg protokołów opisanych w dalszej części Metod.



Rycina 61. Wyniki testowania metod izolacji białka z komórek fibroblastów.



Na podstawie opisanego powyżej testu wybrano metodę izolacji białka z użyciem buforu PB. Pomiar stężenia całkowitego białka w lizatach komórkowych wykonywano poprzez pomiar absorbancji przy 280 nM.

PROTOKÓŁ ANALIZY TYPU *WESTERN*

Standardowo na żele nakładano 20 µg całkowitego białka. Dla poszczególnych próbek wyrównywano objętość i uzupełniano 3x stężonym buforem obciążającym, denaturowano 5 min. 95°C i nakładano na żel. Rozdział prowadzono w żelach o długości około 6 cm (~1,5 cm żelu zagęszczającego, ~4,5 cm żelu rozdzielającego).

Do analizy poziomu białka ataksyny-3 (~43 kDa) i huntingtyny (~350 kDa) wybrano odpowiednie białka referencyjne: GAPDH (~35 kDa) i plektynę (~500 kDa) (Ryc. 62). Dla detekcji ataksyny-3/GAPDH białka rozdzielano w żelu poliakrylamidowym (SDS/Tris-HCl, 5% żel zagęszczający/12% żel rozdzielający) w buforze Laemmli. Elektroforezę białek dla wykrycia huntingtyny i plektyny prowadzono w żelu poliakrylamidowym (SDS/Tris-octan, 5% żel zagęszczający/4% żel rozdzielający) w buforze XT Tricine. Dla analizy poziomu kilku białek kodowanych przez geny zawierające ciągi powtórzeń CAG lub CTG stosowano rozdzielanie w żelu gradientowym 4-20%, aby możliwe było analizowanie kilku białek z jednego żelu. Masy poszczególnych białek wynoszą: TBP ~ 40 kDa, FOXP2 ~ 80 kDa, EIF2AK3 ~125 kDa, RPL14 ~25 kDa, LRP8 ~ 105 kDa.

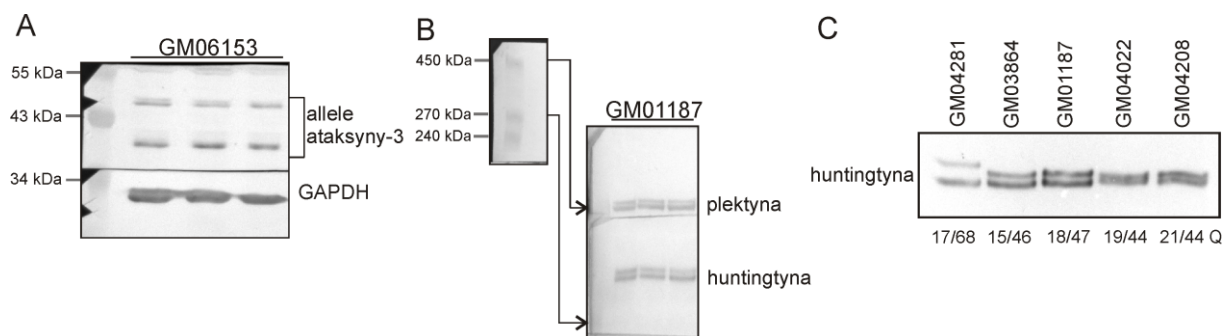
Po rozdziale białka przenoszono na membranę nitrocelulozową metodą mokrego transferu w buforze Towbin. Kontrolnie prowadzono barwienie Ponceau membrany (około 5 min. barwienie w roztworze Ponceau i następnie przepłukanie wodą destylowaną) i w razie potrzeby rozcinano na tym etapie membranę.

Większość etapów immunodetekcji wykonywano na urządzeniu SNAPid w buforze PBS z 0,25% mlekiem odtłuszczonym i 0,1% Tween 20, wg następującego protokołu:

1. Blokowanie: przepuszczenie roztworu mleko/PBS/Tween
2. Inkubacja z I-rzędowym przeciwciałem: 10 min. w mleku z PBS i Tween
3. Płukanie: 3x PBS z Tween
4. Inkubacja z II-rzędowym przeciwciałem: 10 min. w mleku z PBS i Tween
5. Płukanie: 3x PBS z Tween

Do detekcji ataksyny-3/GAPDH użyto I-rzędowych przeciwciał: anty-ataksyna-3 (rozcieńczone 1:1000) i anty-GAPDH (rozc. 1:5000) i następnie skoniugowane z biotyną przeciwciało II-rzędowe (rozc. 1:500); oraz następnie streptawidyną koniugowaną z alkaliczną fosfatazą (rozc. 1:2000). Końcową reakcję barwną przeprowadzano z użyciem substratu BCIP/NBT. Do detekcji huntingtyny/plektyny membrany były inkubowane z przeciwciałami I-rzędowymi: anty-huntingtyna (rozc. 1:1000) i anty-plektyna (rozc. 1:1000) z następnie z przeciwciałami II-rzędowymi koniugowanymi z peroksydazą chrzanową (rozc. 1:500). Reakcja końcowa była prowadzona z użyciem chemiluminescencyjnego substratu dla peroksydazy. Pełna lista używanych przeciwciał jest umieszczona w Tabeli 8.

Do rozdziału alleli białka huntingtyny przy długościach ciągów powtórzeń ~20 Q i ~45 Q konieczny było prowadzenie dłuższego rozdziału, w żelu o długości 12 cm lub przy zmienionych parametrach żelu (mniejsze usieciowanie 1:250, większa procentowość 8%) na standardowym małym żelu (Ryc. 62C).



Rycina 62. Przykładowe obrazy membran otrzymanych przy optymalizacji warunków analizy typu *western* dla detekcji ataksyny-3 (A) i huntingtyny (B). (C) Obraz rozdziału alleli huntingtyny w różnych liniach komórkowych HD.

Reakcja z rybonukleazą Dicer *in vitro*

Reakcje *in vitro* z rekombinowaną Dicer prowadzono w 20 μ l w 37°C, wg następującego protokołu:

syntetyczny RNA	60 pmoli
Dicer	1 u
bufor dla Dicer	1x

Produkty cięcia rozdzielano w 20% żelu poliakrylamidowym z 7,5 M mocznikiem w buforze 1x TBE.

Hybrydyzacja typu *northern*

Całkowity RNA izolowano z komórek z użyciem odczynnika TriReagent, wg zaleceń producenta. Rozdział prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym (19:1) z 7,5 M mocznikiem w buforze 1x TBE. Nakładano 10 μ g całkowitego RNA oraz 0,2 pmola syntetycznych RNA. Po rozdziale przeprowadzano transfer półsuchy przez 1,5 h w buforze 0,5x TBE na membranę HyBond-N+, przy 10 V i wartości mA równej 3-krotnej transferowanej powierzchni. Po transferze przeprowadzano fotozszywanie w świetle UV i suszono 0,5 h w 65°C

Znakowanie sondy prowadzono w objętości 25 μ l, 10 min. w 37°C:

kinaza polinukleotydowa	10 u
bufor do kinazy	1x
RNA (CAG-7 lub CUG-7)	10 pmoli
[γ - ³² P]ATP (5000 Ci/mmol)	5 μ l

Sondy oczyszczano od niezwiązanego izotopu na kolumnach Microcon YM-10, wg zaleceń producenta, wykonywano pomiar radioaktywności i używano do hybrydyzacji około 30 mln cpm. Przed podaniem do buforu sondę denaturowano 5 min. w 90°C.

Przeprowadzano pre-hybrydyzację membrany 2 h w 37°C w buforze hybrydyzacyjnym i następnie hybrydyzację w tym samym buforze z dodaną wyznakowaną sondą przez noc w 37°C. Następnie wykonywano 2-krotne płukanie po 15 min. w 45°C w buforze płuczającym. Membranę zawijano w folię, przykładano do kasety z ekranem wzmacniającym sygnał na dobę i szczytywano sygnały na skanerze. Jeżeli na tej samej membranie wykonywana była kolejna hybrydyzacja, traktowano ją buforem odpłukującym przez 0,5 h w 65°C.

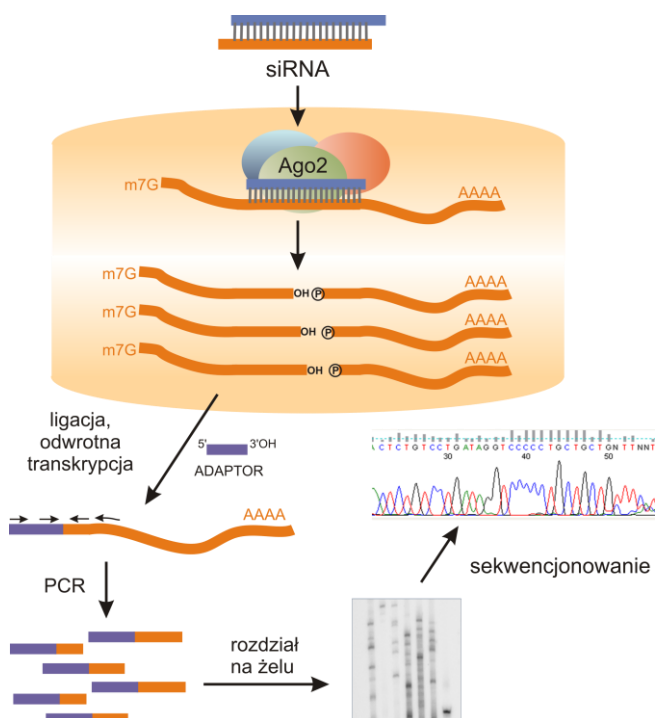
Hybrydyzację typu *northern* w roztworze przeprowadzano wg następującego protokołu:

całkowity RNA 3 µg
sonda RNA 0,6 pmola (~30 tys. cpm)
1x bufor do hybrydyzacji w roztworze

Mieszaninę hybrydyzacyjną rozdzielano w natywnym 20% żelu poliakrylamidowym, w kontrolowanej temperaturze 37°C. Następnie żel suszono i szczytywano sygnały.

Metoda 5'RACE

Do określenia miejsc cięcia transkryptu przez reagenty RNAi w komórkach wykorzystano metodę 5'RACE (ang. *Rapid Amplification of cDNA Ends*) (Ryc. 63).



Rycina 63. Schemat metody 5'RACE użytej w celu określania miejsc cięcia indukowanych przez RISC po podaniu do komórek siRNA.

Całkowity RNA, wyizolowany z komórek po transfekcji poddawano reakcji ligacji z 40 nt adaptorem RNA w 20 μ l, w warunkach 1 h 37°C i następnie 4°C przez noc, wg protokołu:

całkowity RNA	1 μ g
adaptor RNA	0,4 μ g
ligaza RNA	5 u
1x bufor do ligazy (z ATP)	

Następnie z 5 μ l mieszaniny ligacyjnej przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji, z użyciem zestawu SuperScript III (50 min. odwrotnej transkrypcji w 50°C) oraz losowych heksamerów lub starterem specyficznym ATXN3 RT. Następnym etapem było dwukrotne przeprowadzenie PCR typu *nested-PCR* ze starterami specyficznymi dla sekwencji ATXN3 i adaptora (pierwsza ze starterami zewnętrznymi: Ad_ext i ATXN3_ext, druga z wewnętrznymi: Ad_int i ATXN3_int). Mieszaninę po I PCR rozcieńczano 20-krotnie i użyto jako matrycę do II PCR. Przeprowadzenie takich reakcji umożliwiło powielenie produktu zawierającego miejsce ligacji przeciętego w komórce mRNA z adaptorem.

Startery do PCR zostały wyznakowane na końcu 5' w reakcji prowadzonej w 20 μ l w warunkach 37°C przez 1 h, wg przepisu:

kinaza polinukleotydowa	10 u
bufor do kinazy	1x
starter DNA ATXN3_int	200 pmoli
[γ - ³² P]ATP (5000 Ci/mmol)	1 μ l

Otrzymane wyznakowane produkty PCR były rozdzielane w długim 6% żelu poliakrylamidowym z 7,5 M mocznikiem w buforze 1x TBE, wycinane z żelu, namnażane i poddawane sekwencjonowaniu.

Test przeżywalności komórek

Stopień toksyczności transferowanych reagentów określano przez wykonanie testu przeżywalności komórek, po 72 h od transfekcji, z użyciem zestawu CellTiter Glo, wg zaleceń producenta. Metoda ta polega na określaniu ilości ATP w żywych komórkach, na podstawie reakcji dającej sygnał luminescencyjny. Eksperyment transfekcji dla tej analizy wykonywano na 96-dółkowej płytce.

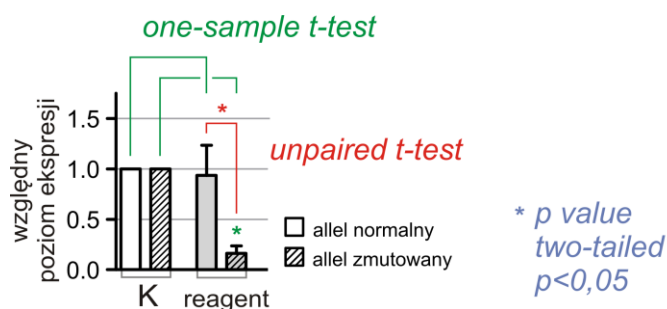
Obliczenia termodynamiczne

W obliczeniach z użyciem programu DINAMelt wykorzystano narzędzie „*Two-state melting (hybridization)*” do obliczania energii swobodnej Gibbsa dupleksów (między dwiema nićmi reagenta – ΔG_d , i oddziaływania reagenta z sekwencją targetową – ΔG z targetem (CAG)_n)

i narzędzie „*Two-state melting (folding)*” dla obliczeń energii swobodnej Gibbsa struktur typu spinki formowanych przez jedną nić reagenta (ΔG_h). Zachowano do obliczeń parametry wyjściowe programu, tj. 37°C, $[Na^+] = 1\text{ M}$, stężenie nici 10 nM.

Analiza statystyczna wyników

Analizowane statystycznie wyniki pochodzą z co najmniej 3 niezależnych eksperymentów. Poziom ekspresji genów odnoszono do zdefiniowanej kontroli (zwykle do poziomu ekspresji w komórkach traktowanych kontrolnym siRNA) oraz do poziomu GAPDH, w przypadku transkryptów, i GAPDH lub plektyny, w przypadku białek. Istotność statystyczną różnicy danego wyniku w stosunku do kontroli określano używając testu *one-sample t-test*, przyjmując wartość kontroli jako 1. Do sprawdzenia istotności statystycznej różnicy pomiędzy dwoma wynikami, np. wyciszaniem allelu normalnego a zmutowanego, używano testu *unpaired t-test*. Dla każdego testu statystycznego wyliczano wartość *p value (two-tailed)*, przyjmując wynik za istotny statystycznie przy $p < 0,05$. Na słupkach wykresów zaznaczono odchylenie standardowe (Ryc. 64).



Rysunek 64. Założenia analizy statystycznej wyników.

APARATURA

Aparat do fotozszywania CL-1000 (UVP)

Aparat do detekcji białek SNAP i.d. (Milipore)

Aparat do elektroforezy w żelu agarozowym MINI-SUB cell GT (Biorad)

Aparat do elektroforezy w żelu agarozowym Horizon 58 (Gibco BRL)

Aparat do elektroforezy białkowej w żelu poliakrylamidowym MINI PROTEAN 3 (Biorad)

Aparat do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym S2 (Life Technologies)

Aparat do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym PROTEAN II xi cell (Biorad)

Aparat do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w kontrolowanej temperaturze DNA Pointer (Kucharczyk)

Aparat do elektrotransferu mokrego (Biorad)

Aparat do elektrotransferu półsuchego (Sigma)

Aparat do czytywania żeli i membran G:BOX, z kamerą do chemiluminescencji (SYNGENE)

Inkubator do komórek eukariotycznych HERACell (Heraeus)

Kaseta do autoradiografii (Amersham Biosciences)

Komora laminarna do pracy z komórkami eukariotycznymi (Heraeus, HERASafe KS 15)

Licznik radioaktywności (HIDEX)

Luminometr Centro LB 960 (Berthold Technologies)

Mikroskop XL-50 (Olympus)

pH-metr (METTLER TOLEDO)

Piec hybrydacyjny ProBlot (LabNet)

Skaner laserowy FLA-5100 (Fuji)

Spektrofotometr UV/VIS NanoDrop

Termocykler 96-Well GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Wirówka MiniSpin (Eppendorf)

Wirówka primoR (Heraeus)

Zasilacz do elektroforezy wysokonapięciowy model E833 (Consort)

Programy bioinformatyczne

Primer3 (program do projektowania starterów do PCR)

BLAST (narzędzie do przewidywania specyficzności starterów i siRNA)

mFOLD (program internetowy do przewidywania struktur drugorzędowych RNA)

DINAMelt (program internetowy do przewidywania właściwości termodynamicznych dupleksów RNA)

GelPro (program do zliczeń densytometrycznych z żeli i membran)

GraphPrism (program do statystycznej obróbki wyników)

VII. WYKAZ WYBRANYCH SKRÓTÓW

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

5'RACE – amplifikacja końców 5' cDNA (ang. *Rapid Amplification of cDNA Ends*)

AGO – białko z rodziny Argonaute

agRNA – antygenowe RNA (ang. *antigene RNA*)

ASO – oligonukleotydy antysensowe (ang. *antisense oligonucleotides*)

DM1 – dystrofia miotoniczna typu I (ang. *myotonic dystrophy type 1*)

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

EtBr – bromek etydyny

FXTAS – zespół drżenia i ataksji związany z łamliwym chromosomem X (ang. *Fragile X Tremor Ataxia Syndrome*)

ΔG – energia swobodna Gibbsa

HD – choroba Huntingtona (ang. *Huntington's Disease*)

LNA – kwas nukleinowy o usztywnionej konformacji rybozy, zawierający mostek metylenowy łączący tlen 2' pierścienia rybozy z węglem 4' (ang. *locked nucleic acid*)

miRNA – mikroRNA,

nt – nukleotyd

PNA – peptydowy kwas nukleinowy (ang. *peptide nucleic acid*)

poliQ – poliglutamina

pre-miRNA – prekursor mikroRNA

pri-miRNA – pierwotny prekursor mikroRNA

PS – tiofosforanowy analog nukleotydu, inaczej: fosfortionian

pz – pary zasad

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

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

RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy poprzedzona odwrotną transkrypcją (ang. *reverse transcription - polymerase chain reaction*)

SBMA – opuszkowo-rdzeniowy zanik mięśni, choroba Kennedy'ego (ang. *Spinal and Bulbar Muscular Atrophy*)

SCA – ataksja rdzeniowo – mózdkowa (ang. *spino-cerebellar ataxia*)

sd-miRNA – samodupleksujące miRNA (ang. *self-duplexing microRNA*)

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

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

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

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

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

TREDS – choroby wywoływane ekspansją powtórzeń trójnukleotydowych (ang. *Triplet Repeat Expansion Diseases*)

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aleman, L. M., J. Doench i P. A. Sharp (2007). "Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects." *RNA* **13**: 385-95.
- Alves, S., I. Nascimento-Ferreira, G. Auregan, R. Hassig, N. Dufour, E. Brouillet, M. C. Pedroso de Lima, P. Hantraye, L. Pereira de Almeida i N. Deglon (2008). "Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease." *PLoS One* **3**: e3341.
- Alves, S., I. Nascimento-Ferreira, N. Dufour, R. Hassig, G. Auregan, C. Nobrega, E. Brouillet, P. Hantraye, M. C. Pedroso de Lima, N. Deglon, i wsp. (2010). "Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3?" *Hum Mol Genet* **19**: 2380-94.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* **431**: 350-5.
- Ameres, S. L., J. Martinez i R. Schroeder (2007). "Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC." *Cell* **130**: 101-12.
- Arambula, J. F., S. R. Ramisetty, A. M. Baranger i S. C. Zimmerman (2009). "A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 16068-73.
- Babiarz, J. E., J. G. Ruby, Y. Wang, D. P. Bartel i R. Blelloch (2008). "Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs." *Genes Dev* **22**: 2773-85.
- Banfi, S., A. Servadio, M. Y. Chung, T. J. Kwiatkowski, Jr., A. E. McCall, L. A. Duvick, Y. Shen, E. J. Roth, H. T. Orr i H. Y. Zoghbi (1994). "Identification and characterization of the gene causing type 1 spinocerebellar ataxia." *Nat Genet* **7**: 513-20.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**: 281-97.
- Batra, R., K. Charizanis i M. S. Swanson (2010). "Partners in crime: bidirectional transcription in unstable microsatellite disease." *Hum Mol Genet* **19**: R77-82.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond i G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**: 363-6.
- Betancur, J. G. i Y. Tomari (2012). "Dicer is dispensable for asymmetric RISC loading in mammals." *RNA* **18**: 24-30.
- Boudreau, R. L., J. L. McBride, I. Martins, S. Shen, Y. Xing, B. J. Carter i B. L. Davidson (2009). "Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice." *Mol Ther* **17**: 1053-63.
- Bramsen, J. B. i J. Kjems (2011). "Chemical modification of small interfering RNA." *Methods Mol Biol* **721**: 77-103.
- Bramsen, J. B., M. B. Laursen, C. K. Damgaard, S. W. Lena, B. R. Babu, J. Wengel i J. Kjems (2007). "Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs." *Nucleic Acids Res* **35**: 5886-97.
- Bramsen, J. B., M. B. Laursen, A. F. Nielsen, T. B. Hansen, C. Bus, N. Langkjaer, B. R. Babu, T. Hojland, M. Abramov, A. Van Aerschot, i wsp. (2009). "A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity." *Nucleic Acids Res* **37**: 2867-81.
- Broderick, J. A., W. E. Salomon, S. P. Ryder, N. Aronin i P. D. Zamore (2011). "Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing." *RNA* **17**: 1858-69.
- Brown, K. M., C. Y. Chu i T. M. Rana (2005). "Target accessibility dictates the potency of human RISC." *Nat Struct Mol Biol* **12**: 469-70.

- Burnett, J. C. i J. J. Rossi (2012). "RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects." *Chem Biol* **19**: 60-71.
- Burright, E. N., J. D. Davidson, L. A. Duvick, B. Koshy, H. Y. Zoghbi i H. T. Orr (1997). "Identification of a self-association region within the SCA1 gene product, ataxin-1." *Hum Mol Genet* **6**: 513-8.
- Caplen, N. J., J. P. Taylor, V. S. Statham, F. Tanaka, A. Fire i R. A. Morgan (2002). "Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference." *Hum Mol Genet* **11**: 175-84.
- Carroll, J. B., S. C. Warby, A. L. Southwell, C. N. Doty, S. Greenlee, N. Skotte, G. Hung, C. F. Bennett, S. M. Freier i M. R. Hayden (2011). "Potent and selective antisense oligonucleotides targeting single-nucleotide polymorphisms in the huntington disease gene / allele-specific silencing of mutant huntingtin." *Mol Ther* **19**: 2178-85.
- Cattaneo, E., C. Zuccato i M. Tartari (2005). "Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease." *Nat Rev Neurosci* **6**: 919-30.
- Chen, Z., R. F. Place, Z. J. Jia, D. Pookot, R. Dahiya i L. C. Li (2008). "Antitumor effect of dsRNA-induced p21(WAF1/CIP1) gene activation in human bladder cancer cells." *Mol Cancer Ther* **7**: 698-703.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura i R. Shiekhattar (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* **436**: 740-4.
- Chi, S. W., J. B. Zang, A. Mele i R. B. Darnell (2009). "Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps." *Nature* **460**: 479-86.
- Chu, Y., X. Yue, S. T. Younger, B. A. Janowski i D. R. Corey (2010). "Involvement of argonaute proteins in gene silencing and activation by RNAs complementary to a non-coding transcript at the progesterone receptor promoter." *Nucleic Acids Res* **38**: 7736-48.
- Chung, D. W., D. D. Rudnicki, L. Yu i R. L. Margolis (2011). "A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression." *Hum Mol Genet* **20**: 3467-77.
- Cogoni, C., J. T. Irelan, M. Schumacher, T. J. Schmidhauser, E. U. Selker i G. Macino (1996). "Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of Neurospora is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation." *EMBO J* **15**: 3153-63.
- Cooper, J. K., G. Schilling, M. F. Peters, W. J. Herring, A. H. Sharp, Z. Kaminsky, J. Masone, F. A. Khan, M. Delanoy, D. R. Borchelt, i wsp. (1998). "Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture." *Hum Mol Genet* **7**: 783-90.
- Corey, D. R. (2007). "Chemical modification: the key to clinical application of RNA interference?" *J Clin Invest* **117**: 3615-22.
- Crooke, S. T. (2004). "Progress in antisense technology." *Annu Rev Med* **55**: 61-95.
- Davis, A. R. i B. M. Znosko (2010). "Positional and neighboring base pair effects on the thermodynamic stability of RNA single mismatches." *Biochemistry* **49**: 8669-79.
- dbSNP www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
- de Mezer, M., M. Wojciechowska, M. Napierała, K. Sobczak i W. J. Krzyżosiak (2011). "Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference." *Nucleic Acids Res* **39**: 3852-63.
- Dias, N. i C. A. Stein (2002). "Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms." *Mol Cancer Ther* **1**: 347-55.
- DiFiglia, M., M. Sena-Esteves, K. Chase, E. Sapp, E. Pfister, M. Sass, J. Yoder, P. Reeves, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, i wsp. (2007). "Therapeutic silencing of mutant huntingtin

- with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 17204-9.
- Disney, M. D., M. M. Lee, A. Pushechnikov i J. L. Childs-Disney (2010). "The role of flexibility in the rational design of modularly assembled ligands targeting the RNAs that cause the myotonic dystrophies." ChemBiochem **11**: 375-82.
- Doench, J. G., C. P. Petersen i P. A. Sharp (2003). "siRNAs can function as miRNAs." Genes Dev **17**: 438-42.
- Doench, J. G. i P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev **18**: 504-11.
- Doi, N., S. Zenno, R. Ueda, H. Ohki-Hamazaki, K. Ui-Tei i K. Saigo (2003). "Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors." Curr Biol **13**: 41-6.
- Doss-Pepe, E. W., E. S. Stenroos, W. G. Johnson i K. Madura (2003). "Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis." Mol Cell Biol **23**: 6469-83.
- Dragatsis, I., M. S. Levine i S. Zeitlin (2000). "Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice." Nat Genet **26**: 300-6.
- Drouet, V., V. Perrin, R. Hassig, N. Dufour, G. Auregan, S. Alves, G. Bonvento, E. Brouillet, R. Luthi-Carter, P. Hantraye, i wsp. (2009). "Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing." Ann Neurol **65**: 276-85.
- Du, Q., H. Thonberg, J. Wang, C. Wahlestedt i Z. Liang (2005). "A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites." Nucleic Acids Res **33**: 1671-7.
- Easow, G., A. A. Teleanu i S. M. Cohen (2007). "Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification." RNA **13**: 1198-204.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber i T. Tuschl (2001a). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**: 494-8.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel i T. Tuschl (2001b). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**: 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel i T. Tuschl (2001c). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." EMBO J **20**: 6877-88.
- Elmen, J., M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, i wsp. (2008). "LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates." Nature **452**: 896-9.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg i W. Filipowicz (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." Annu Rev Biochem **79**: 351-79.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver i C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**: 806-11.
- Forman, J. J. i H. A. Collier (2010). "The code within the code: MicroRNAs target coding regions." Cell Cycle **9**.
- Forman, J. J., A. Legesse-Miller i H. A. Collier (2008). "A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **105**: 14879-84.
- Francois, V., A. F. Klein, C. Beley, A. Jollet, C. Lemerrier, L. Garcia i D. Furling (2011). "Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snrRNAs." Nat Struct Mol Biol **18**: 85-7.

- Frank, F., N. Sonenberg i B. Nagar (2010). "Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2." *Nature* **465**: 818-22.
- Fryer, J. D., P. Yu, H. Kang, C. Mandel-Brehm, A. N. Carter, J. Crespo-Barreto, Y. Gao, A. Flora, C. Shaw, H. T. Orr, i wsp. (2011). "Exercise and genetic rescue of SCA1 via the transcriptional repressor Capicua." *Science* **334**: 690-3.
- Furling, D., G. Doucet, M. A. Langlois, L. Timchenko, E. Belanger, L. Cossette i J. Puymirat (2003). "Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions." *Gene Ther* **10**: 795-802.
- Gagnon, K. T., H. M. Pendergraft, G. F. Deleavey, E. E. Swayze, P. Potier, J. Randolph, E. B. Roesch, J. Chattopadhyaya, M. J. Damha, C. F. Bennett, i wsp. (2010). "Allele-Selective Inhibition of Mutant Huntingtin Expression with Antisense Oligonucleotides Targeting the Expanded CAG Repeat." *Biochemistry*.
- Garcia-Lopez, A., B. Llamusi, M. Orzaez, E. Perez-Paya i R. D. Artero (2011). "In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 11866-71.
- Gaspar, C., I. Lopes-Cendes, S. Hayes, J. Goto, K. Arvidsson, A. Dias, I. Silveira, P. Maciel, P. Coutinho, M. Lima, i wsp. (2001). "Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study." *Am J Hum Genet* **68**: 523-8.
- Gauthier, L. R., B. C. Charrin, M. Borrell-Pages, J. P. Dompierre, H. Rangone, F. P. Cordelieres, J. De Mey, M. E. MacDonald, V. Lessmann, S. Humbert, i wsp. (2004). "Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules." *Cell* **118**: 127-38.
- Goti, D., S. M. Katzen, J. Mez, N. Kurtis, J. Kiluk, L. Ben-Haiem, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, A. Kakizuka, A. H. Sharp, i wsp. (2004). "A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration." *J Neurosci* **24**: 10266-79.
- Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch i R. Shiekhattar (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." *Cell* **123**: 631-40.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch i R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* **432**: 235-40.
- Grimm, D. (2009). "Asymmetry in siRNA design." *Gene Ther* **16**: 827-9.
- Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim i D. P. Bartel (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." *Mol Cell* **27**: 91-105.
- Grondin, R., M. D. Kaytor, Y. Ai, P. T. Nelson, D. R. Thakker, J. Heisel, M. R. Weatherspoon, J. L. Blum, E. N. Burright, Z. Zhang, i wsp. (2012). "Six-month partial suppression of Huntingtin is well tolerated in the adult rhesus striatum." *Brain*.
- Gu, S. i J. J. Rossi (2005). "Uncoupling of RNAi from active translation in mammalian cells." *RNA* **11**: 38-44.
- Guang, S., A. F. Bochner, D. M. Pavelec, K. B. Burkhart, S. Harding, J. Lachowicz i S. Kennedy (2008). "An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus." *Science* **321**: 537-41.
- Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman i D. P. Bartel (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature* **466**: 835-40.
- Haley, B. i P. D. Zamore (2004). "Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex." *Nat Struct Mol Biol* **11**: 599-606.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi i G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." *Science* **293**: 1146-50.

- Han, J., D. Kim i K. V. Morris (2007). "Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 12422-7.
- Harper, S. Q., P. D. Staber, X. He, S. L. Eliason, I. H. Martins, Q. Mao, L. Yang, R. M. Kotin, H. L. Paulson i B. L. Davidson (2005). "RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model." Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 5820-5.
- He, Y., B. Vogelstein, V. E. Velculescu, N. Papadopoulos i K. W. Kinzler (2008). "The antisense transcriptomes of human cells." Science **322**: 1855-7.
- Holen, T., M. Amarzguioui, E. Babaie i H. Prydz (2003). "Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway." Nucleic Acids Res **31**: 2401-7.
- Hossbach, M., J. Gruber, M. Osborn, K. Weber i T. Tuschl (2006). "Gene silencing with siRNA duplexes composed of target-mRNA-complementary and partially palindromic or partially complementary single-stranded siRNAs." RNA Biol **3**: 82-9.
- Hsu, R. J., K. M. Hsiao, M. J. Lin, C. Y. Li, L. C. Wang, L. K. Chen i H. Pan (2011). "Long tract of untranslated CAG repeats is deleterious in transgenic mice." PLoS One **6**: 16417.
- Hu, J., K. T. Gagnon, J. Liu, J. K. Watts, J. Syeda-Nawaz, C. F. Bennett, E. E. Swayze, J. Randolph, J. Chattopadhyaya i D. R. Corey (2011). "Allele-selective inhibition of ataxin-3 (ATX3) expression by antisense oligomers and duplex RNAs." Biol Chem **392**: 315-25.
- Hu, J., J. Liu i D. R. Corey (2010). "Allele-Selective Inhibition of Huntingtin Expression by Switching to an miRNA-like RNAi Mechanism." Chem Biol **17**: 1183-8.
- Hu, J., M. Matsui, K. T. Gagnon, J. C. Schwartz, S. Gabillet, K. Arar, J. Wu, I. Bezprozvanny i D. R. Corey (2009). "Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs." Nat Biotechnol **27**: 478-84.
- Huang, B., J. Schiefer, C. Sass, G. B. Landwehrmeyer, C. M. Kosinski i S. Kochanek (2007). "High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load in vitro and in vivo." Hum Gene Ther **18**: 303-11.
- Huang, H., R. Qiao, D. Zhao, T. Zhang, Y. Li, F. Yi, F. Lai, J. Hong, X. Ding, Z. Yang, i wsp. (2009). "Profiling of mismatch discrimination in RNAi enabled rational design of allele-specific siRNAs." Nucleic Acids Res **37**: 7560-9.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl i P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science **293**: 834-8.
- Ikeda, H., M. Yamaguchi, S. Sugai, Y. Aze, S. Narumiya i A. Kakizuka (1996). "Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo." Nat Genet **13**: 196-202.
- Jackson, A. L., S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet i P. S. Linsley (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." Nat Biotechnol **21**: 635-7.
- Jackson, A. L., J. Burchard, J. Schelter, B. N. Chau, M. Cleary, L. Lim i P. S. Linsley (2006). "Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity." RNA **12**: 1179-87.
- Janowski, B. A., K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, D. Hardy, D. S. Shames, J. D. Minna i D. R. Corey (2005). "Inhibiting gene expression at transcription start sites in chromosomal DNA with antigene RNAs." Nat Chem Biol **1**: 216-22.

- Janowski, B. A., K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, R. Nordsell, D. S. Shames, J. D. Minna i D. R. Corey (2006). "Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing." *Nat Struct Mol Biol* **13**: 787-92.
- Janowski, B. A., S. T. Younger, D. B. Hardy, R. Ram, K. E. Huffman i D. R. Corey (2007). "Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs." *Nat Chem Biol* **3**: 166-73.
- Jasińska, A., G. Michlewski, M. de Mezer, K. Sobczak, P. Kozłowski, M. Napierała i W. J. Krzyżosiak (2003). "Structures of trinucleotide repeats in human transcripts and their functional implications." *Nucleic Acids Res* **31**: 5463-8.
- Jiang, H., A. Mankodi, M. S. Swanson, R. T. Moxley i C. A. Thornton (2004). "Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons." *Hum Mol Genet* **13**: 3079-88.
- Johnston, M., M. C. Geoffroy, A. Sobala, R. Hay i G. Hutvagner (2010). "HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells." *Mol Biol Cell* **21**: 1462-9.
- Juliano, R. L., V. R. Dixit, H. Kang, T. Y. Kim, Y. Miyamoto i D. Xu (2005). "Epigenetic manipulation of gene expression: a toolkit for cell biologists." *J Cell Biol* **169**: 847-57.
- Kawaguchi, Y., T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akiguchi, i wsp. (1994). "CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1." *Nat Genet* **8**: 221-8.
- Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul i E. Segal (2007). "The role of site accessibility in microRNA target recognition." *Nat Genet* **39**: 1278-84.
- Khan, A. A., D. Betel, M. L. Miller, C. Sander, C. S. Leslie i D. S. Marks (2009). "Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs." *Nat Biotechnol* **27**: 549-55.
- Khvorova, A., A. Reynolds i S. D. Jayasena (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell* **115**: 209-16.
- Kierzek, R., M. E. Burkard i D. H. Turner (1999). "Thermodynamics of single mismatches in RNA duplexes." *Biochemistry* **38**: 14214-23.
- Kim, D. H., M. A. Behlke, S. D. Rose, M. S. Chang, S. Choi i J. J. Rossi (2005). "Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy." *Nat Biotechnol* **23**: 222-6.
- Koch, P., P. Breuer, M. Peitz, J. Jungverdorben, J. Kesavan, D. Poppe, J. Doerr, J. Ladewig, J. Mertens, T. Tuting, i wsp. (2011). "Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease." *Nature* **480**: 543-6.
- Kościańska, E., J. Starega-Roslan, L. J. Sznajder, M. Olejniczak, P. Gałka-Marciniak i W. J. Krzyżosiak (2011). "Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers." *BMC Mol Biol* **12**: 14.
- Koziołkiewicz, M., E. Gendaszewska, M. Maszewska, C. A. Stein i W. J. Stec (2001). "The mononucleotide-dependent, nonantisense mechanism of action of phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotides depends upon the activity of an ecto-5'-nucleotidase." *Blood* **98**: 995-1002.
- Kozłowski, P., M. de Mezer i W. J. Krzyżosiak (2010). "Trinucleotide repeats in human genome and exome." *Nucleic Acids Res* **38**: 4027-39.
- Kretschmer-Kazemi Far, R. i G. Sczakiel (2003). "The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides." *Nucleic Acids Res* **31**: 4417-24.

- Król, J., A. Fiszer, A. Mykowska, K. Sobczak, M. de Mezer i W. J. Krzyżosiak (2007). "Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets." *Mol Cell* **25**: 575-86.
- Król, J., K. Sobczak, U. Wilczyńska, M. Drath, A. Jasińska, D. Kaczyńska i W. J. Krzyżosiak (2004). "Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design." *J Biol Chem* **279**: 42230-9.
- Kubodera, T., T. Yokota, K. Ishikawa i H. Mizusawa (2005). "New RNAi strategy for selective suppression of a mutant allele in polyglutamine disease." *Oligonucleotides* **15**: 298-302.
- Kurreck, J. (2003). "Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications." *Eur J Biochem* **270**: 1628-44.
- Lam, Y. C., A. B. Bowman, P. Jafar-Nejad, J. Lim, R. Richman, J. D. Fryer, E. D. Hyun, L. A. Duvick, H. T. Orr, J. Botas, i wsp. (2006). "ATAXIN-1 interacts with the repressor Capicua in its native complex to cause SCA1 neuropathology." *Cell* **127**: 1335-47.
- Lapidot, M. i Y. Pilpel (2006). "Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms." *EMBO Rep* **7**: 1216-22.
- Lawlor, K. T., L. V. O'Keefe, S. E. Samaraweera, C. L. van Eyk, C. J. McLeod, C. A. Maloney, T. H. Dang, C. M. Suter i R. I. Richards (2011). "Double-stranded RNA is pathogenic in Drosophila models of expanded repeat neurodegenerative diseases." *Hum Mol Genet* **20**: 3757-68.
- Lee, M. M., J. L. Childs-Disney, A. Pushechnikov, J. M. French, K. Sobczak, C. A. Thornton i M. D. Disney (2009). "Controlling the specificity of modularly assembled small molecules for RNA via ligand module spacing: targeting the RNAs that cause myotonic muscular dystrophy." *J Am Chem Soc* **131**: 17464-72.
- Lee, Y., I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh i V. N. Kim (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." *EMBO J* **25**: 522-32.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel i C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* **115**: 787-98.
- Li, F., T. Macfarlan, R. N. Pittman i D. Chakravarti (2002). "Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities." *J Biol Chem* **277**: 45004-12.
- Li, L. B. i N. M. Bonini (2010). "Roles of trinucleotide-repeat RNA in neurological disease and degeneration." *Trends Neurosci* **33**: 292-8.
- Li, L. B., Z. Yu, X. Teng i N. M. Bonini (2008). "RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in Drosophila." *Nature* **453**: 1107-11.
- Li, L. C., S. T. Okino, H. Zhao, D. Pookot, R. F. Place, S. Urakami, H. Enokida i R. Dahiya (2006). "Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17337-42.
- Li, S. H. i X. J. Li (2004). "Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease." *Trends Genet* **20**: 146-54.
- Li, Y., T. Yokota, R. Matsumura, K. Taira i H. Mizusawa (2004). "Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA." *Ann Neurol* **56**: 124-9.
- Lim, J., J. Crespo-Barreto, P. Jafar-Nejad, A. B. Bowman, R. Richman, D. E. Hill, H. T. Orr i H. Y. Zoghbi (2008). "Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1." *Nature* **452**: 713-8.
- Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor i G. J. Hannon (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* **305**: 1437-41.

- Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon i R. Parker (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* **7**: 719-23.
- Liu, Y., H. Tan, H. Tian, C. Liang, S. Chen i Q. Liu (2011). "Autoantigen La promotes efficient RNAi, antiviral response, and transposon silencing by facilitating multiple-turnover RISC catalysis." *Mol Cell* **44**: 502-8.
- Lombardi, M. S., L. Jaspers, C. Spronkmans, C. Gellera, F. Taroni, E. Di Maria, S. D. Donato i W. F. Kaemmerer (2009). "A majority of Huntington's disease patients may be treatable by individualized allele-specific RNA interference." *Exp Neurol* **217**: 312-9.
- Luo, K. Q. i D. C. Chang (2004). "The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region." *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 303-10.
- Ma, J. B., K. Ye i D. J. Patel (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." *Nature* **429**: 318-22.
- MacDonald, M. E., C. M. Ambrose i M. P. Duyao (1993). "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group." *Cell* **72**: 971-83.
- MacRae, I. J., E. Ma, M. Zhou, C. V. Robinson i J. A. Doudna (2008). "In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 512-7.
- Markham, N. R. i M. Zuker (2005). "DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction." *Nucleic Acids Res* **33**: W577-81.
- Marsh, J. L., H. Walker, H. Theisen, Y. Z. Zhu, T. Fielder, J. Purcell i L. M. Thompson (2000). "Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in *Drosophila*." *Hum Mol Genet* **9**: 13-25.
- Martindale, D., A. Hackam, A. Wiczorek, L. Ellerby, C. Wellington, K. McCutcheon, R. Singaraja, P. Kazemi-Esfarjani, R. Devon, S. U. Kim, i wsp. (1998). "Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates." *Nat Genet* **18**: 150-4.
- Martinez, J., A. Patkaniowska, H. Urlaub, R. Luhrmann i T. Tuschl (2002). "Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi." *Cell* **110**: 563-74.
- Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel i P. D. Zamore (2005). "Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes." *Cell* **123**: 607-20.
- Matsumura, R., T. Takayanagi, K. Murata, N. Futamura, M. Hirano i S. Ueno (1996). "Relationship of (CAG)_nC configuration to repeat instability of the Machado-Joseph disease gene." *Hum Genet* **98**: 643-5.
- McBride, J. L., R. L. Boudreau, S. Q. Harper, P. D. Staber, A. M. Monteys, I. Martins, B. L. Gilmore, H. Burstein, R. W. Peluso, B. Polisky, i wsp. (2008). "Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5868-73.
- McManus, M. T., C. P. Petersen, B. B. Haines, J. Chen i P. A. Sharp (2002). "Gene silencing using micro-RNA designed hairpins." *RNA* **8**: 842-50.
- McMurray, C. T. (2010). "Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development." *Nat Rev Genet* **11**: 786-99.
- Meister, G., M. Landthaler, L. Peters, P. Y. Chen, H. Urlaub, R. Luhrmann i T. Tuschl (2005). "Identification of novel argonaute-associated proteins." *Curr Biol* **15**: 2149-55.
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, P. Teng-Ummuay, M. G. Stenberg, B. J. Byrne, C. A. Thornton i M. S. Swanson (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy." *EMBO J* **19**: 4439-48.

- Miller, V. M., H. Xia, G. L. Marrs, C. M. Gouvion, G. Lee, B. L. Davidson i H. L. Paulson (2003). "Allele-specific silencing of dominant disease genes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 7195-200.
- Mirkin, S. M. (2007). "Expandable DNA repeats and human disease." Nature **447**: 932-40.
- Monteleone, G., M. C. Fantini, S. Onali, F. Zorzi, G. Sancesario, S. Bernardini, E. Calabrese, F. Viti, I. Monteleone, L. Biancone, i wsp. (2012). "Phase I Clinical Trial of Smad7 Knockdown Using Antisense Oligonucleotide in Patients With Active Crohn's Disease." Mol Ther.
- Morris, K. V. (2005). "siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code." Cell Mol Life Sci **62**: 3057-66.
- Morris, K. V., S. Santoso, A. M. Turner, C. Pastori i P. G. Hawkins (2008). "Bidirectional transcription directs both transcriptional gene activation and suppression in human cells." PLoS Genet **4**: e1000258.
- Mulders, S. A., W. J. van den Broek, T. M. Wheeler, H. J. Croes, P. van Kuik-Romeijn, S. J. de Kimpe, D. Furling, G. J. Platenburg, G. Gourdon, C. A. Thornton, i wsp. (2009). "Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**: 13915-20.
- Murchison, E. P., J. F. Partridge, O. H. Tam, S. Cheloufi i G. J. Hannon (2005). "Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 12135-40.
- Mykowska, A., K. Sobczak, M. Wojciechowska, P. Kozłowski i W. J. Krzyżosiak (2011). "CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing." Nucleic Acids Res.
- Noland, C. L., E. Ma i J. A. Doudna (2011). "siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes." Mol Cell **43**: 110-21.
- OMIM www.ncbi.nlm.nih.gov/omim.
- Orr, H. T., M. Y. Chung, S. Banfi, T. J. Kwiatkowski, Jr., A. Servadio, A. L. Beaudet, A. E. McCall, L. A. Duvick, L. P. Ranum i H. Y. Zoghbi (1993). "Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1." Nat Genet **4**: 221-6.
- Orr, H. T. i H. Y. Zoghbi (2001). "SCA1 molecular genetics: a history of a 13 year collaboration against glutamines." Hum Mol Genet **10**: 2307-11.
- Orr, H. T. i H. Y. Zoghbi (2007). "Trinucleotide repeat disorders." Annu Rev Neurosci **30**: 575-621.
- Orr, R. M. (2001). "Technology evaluation: fomivirsen, Isis Pharmaceuticals Inc/CIBA vision." Curr Opin Mol Ther **3**: 288-94.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon i D. S. Conklin (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." Genes Dev **16**: 948-58.
- Parker, J. S., S. M. Roe i D. Barford (2005). "Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex." Nature **434**: 663-6.
- Patrick Walton, S., M. Wu, J. A. Gredell i C. Chan (2010). "Designing highly active siRNAs for therapeutic applications." FEBS J **277**: 4806-13.
- Patzel, V., S. Rutz, I. Dietrich, C. Koberle, A. Scheffold i S. H. Kaufmann (2005). "Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency." Nat Biotechnol **23**: 1440-4.
- Pfister, E. L., L. Kennington, J. Straubhaar, S. Wagh, W. Liu, M. DiFiglia, B. Landwehrmeyer, J. P. Vonsattel, P. D. Zamore i N. Aronin (2009). "Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients." Curr Biol **19**: 774-8.

- Ratcliff, F. G., S. A. MacFarlane i D. C. Baulcombe (1999). "Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses." Plant Cell **11**: 1207-16.
- Rayburn, E. R. i R. Zhang (2008). "Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible?" Drug Discov Today **13**: 513-21.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall i A. Khvorova (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." Nat Biotechnol **22**: 326-30.
- Rivas, F. V., N. H. Tolia, J. J. Song, J. P. Aragon, J. Liu, G. J. Hannon i L. Joshua-Tor (2005). "Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC." Nat Struct Mol Biol **12**: 340-9.
- Robb, G. B., K. M. Brown, J. Khurana i T. M. Rana (2005). "Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells." Nat Struct Mol Biol **12**: 133-7.
- Robb, G. B. i T. M. Rana (2007). "RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading." Mol Cell **26**: 523-37.
- Rodrigues, A. J., M. do Carmo Costa, T. L. Silva, D. Ferreira, F. Bajanca, E. Logarinho i P. Maciel (2010). "Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death." Biochim Biophys Acta **1803**: 1154-63.
- Rodriguez-Lebron, E., E. M. Denovan-Wright, K. Nash, A. S. Lewin i R. J. Mandel (2005). "Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice." Mol Ther **12**: 618-33.
- Rozanska, M., K. Sobczak, A. Jasińska, M. Napierała, D. Kaczyńska, A. Czerny, M. Kozieł, P. Kozłowski, M. Olejniczak i W. J. Krzyżosiak (2007). "CAG and CTG repeat polymorphism in exons of human genes shows distinct features at the expandable loci." Hum Mutat **28**: 451-8.
- Saetrom, P., B. S. Heale, O. Snove, Jr., L. Aagaard, J. Alluin i J. J. Rossi (2007). "Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity." Nucleic Acids Res **35**: 2333-42.
- Sakurai, K., M. Amarzguoui, D. H. Kim, J. Alluin, B. Heale, M. S. Song, A. Gatignol, M. A. Behlke i J. J. Rossi (2010). "A role for human Dicer in pre-RISC loading of siRNAs." Nucleic Acids Res.
- Savas, J. N., A. Makusky, S. Ottosen, D. Baillat, F. Then, D. Krainc, R. Shiekhattar, S. P. Markey i N. Tanese (2008). "Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies." Proc Natl Acad Sci U S A **105**: 10820-5.
- Sazani, P. i R. Kole (2003). "Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing." J Clin Invest **112**: 481-6.
- Scherzinger, E., R. Lurz, M. Turmaine, L. Mangiarini, B. Hollenbach, R. Hasenbank, G. P. Bates, S. W. Davies, H. Lehrach i E. E. Wanker (1997). "Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo." Cell **90**: 549-58.
- Scholefield, J., L. J. Greenberg, M. S. Weinberg, P. B. Arbuthnot, A. Abdelgany i M. J. Wood (2009). "Design of RNAi hairpins for mutation-specific silencing of ataxin-7 and correction of a SCA7 phenotype." PLoS One **4**: e7232.
- Schubert, S., A. Grunweller, V. A. Erdmann i J. Kurreck (2005). "Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions." J Mol Biol **348**: 883-93.
- Schwartz, J. C., S. T. Younger, N. B. Nguyen, D. B. Hardy, B. P. Monia, D. R. Corey i B. A. Janowski (2008). "Antisense transcripts are targets for activating small RNAs." Nat Struct Mol Biol **15**: 842-8.

- Schwarz, D. S., H. Ding, L. Kennington, J. T. Moore, J. Schelter, J. Burchard, P. S. Linsley, N. Aronin, Z. Xu i P. D. Zamore (2006). "Designing siRNA that distinguish between genes that differ by a single nucleotide." *PLoS Genet* **2**: e140.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin i P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell* **115**: 199-208.
- Shao, Y., C. Y. Chan, A. Maliyekkel, C. E. Lawrence, I. B. Roninson i Y. Ding (2007). "Effect of target secondary structure on RNAi efficiency." *RNA* **13**: 1631-40.
- Shieh, S. Y. i N. M. Bonini (2011). "Genes and pathways affected by CAG-repeat RNA-based toxicity in *Drosophila*." *Hum Mol Genet* **20**: 4810-21.
- Shin, K. J., E. A. Wall, J. R. Zavzavadjian, L. A. Santat, J. Liu, J. I. Hwang, R. Rebres, T. Roach, W. Seaman, M. I. Simon, i wsp. (2006). "A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13759-64.
- Shukla, S., C. S. Sumaria i P. I. Pradeepkumar (2010). "Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook." *ChemMedChem* **5**: 328-49.
- Siolas, D., C. Lerner, J. Burchard, W. Ge, P. S. Linsley, P. J. Paddison, G. J. Hannon i M. A. Cleary (2005). "Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers." *Nat Biotechnol* **23**: 227-31.
- Sobczak, K., M. de Mezer, G. Michlewski, J. Król i W. J. Krzyżosiak (2003). "RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases." *Nucleic Acids Res* **31**: 5469-82.
- Sobczak, K., G. Michlewski, M. de Mezer, E. Kierzek, J. Król, M. Olejniczak, R. Kierzek i W. J. Krzyżosiak (2010). "Structural diversity of triplet repeat RNAs." *J Biol Chem* **285**: 12755-64.
- Sofola, O. A., P. Jin, J. Botas i D. L. Nelson (2007). "Argonaute-2-dependent rescue of a *Drosophila* model of FXTAS by FRAXE premutation repeat." *Hum Mol Genet* **16**: 2326-32.
- Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon i L. Joshua-Tor (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." *Science* **305**: 1434-7.
- Starega-Roslan, J., J. Król, E. Kościńska, P. Kozłowski, W. J. Szlachcic, K. Sobczak i W. J. Krzyżosiak (2011). "Structural basis of microRNA length variety." *Nucleic Acids Res* **39**: 257-68.
- Stiles, D., Z. Zhang, P. Ge, B. Nelson, R. Grondin, Y. Ai, P. Hardy, P. T. Nelson, A. P. Guzaev, M. T. Butt, i wsp. (2011). "Widespread suppression of huntingtin with convection-enhanced delivery of siRNA." *Exp Neurol*.
- Su, H., M. I. Trombly, J. Chen i X. Wang (2009). "Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing." *Genes Dev* **23**: 304-17.
- Sun, X., H. A. Rogoff i C. J. Li (2008). "Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells." *Nat Biotechnol* **26**: 1379-82.
- Tabara, H., M. Sarkissian, W. G. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire i C. C. Mello (1999). "The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." *Cell* **99**: 123-32.
- Tafer, H., S. L. Ameres, G. Obernosterer, C. A. Gebeshuber, R. Schroeder, J. Martinez i I. L. Hofacker (2008). "The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs." *Nat Biotechnol* **26**: 578-83.
- Tahbaz, N., F. A. Kolb, H. Zhang, K. Jaroczyk, W. Filipowicz i T. C. Hobman (2004). "Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer." *EMBO Rep* **5**: 189-94.

- Takahashi, M., S. Watanabe, M. Murata, H. Furuya, I. Kanazawa, K. Wada i H. Hohjoh (2010). "Tailor-made RNAi knockdown against triplet repeat disease-causing alleles." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Tam, O. H., A. A. Aravin, P. Stein, A. Girard, E. P. Murchison, S. Cheloufi, E. Hodges, M. Anger, R. Sachidanandam, R. M. Schultz, i wsp. (2008). "Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes." Nature **453**: 534-8.
- Tay, Y., J. Zhang, A. M. Thomson, B. Lim i I. Rigoutsos (2008). "MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation." Nature **455**: 1124-8.
- Timchenko, L. T., N. A. Timchenko, C. T. Caskey i R. Roberts (1996). "Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **5**: 115-21.
- Tomari, Y., C. Matranga, B. Haley, N. Martinez i P. D. Zamore (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." Science **306**: 1377-80.
- Trottier, Y., Y. Lutz, G. Stevanin, G. Imbert, D. Devys, G. Cancel, F. Saudou, C. Weber, G. David, L. Tora, i wsp. (1995). "Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias." Nature **378**: 403-6.
- Truant, R., R. S. Atwal, C. Desmond, L. Munsie i T. Tran (2008). "Huntington's disease: revisiting the aggregation hypothesis in polyglutamine neurodegenerative diseases." FEBS J **275**: 4252-62.
- Tsuda, H., H. Jafar-Nejad, A. J. Patel, Y. Sun, H. K. Chen, M. F. Rose, K. J. Venken, J. Botas, H. T. Orr, H. J. Bellen, i wsp. (2005). "The AXH domain of Ataxin-1 mediates neurodegeneration through its interaction with Gfi-1/Senseless proteins." Cell **122**: 633-44.
- van Bilsen, P. H., L. Jaspers, M. S. Lombardi, J. C. Odekerken, E. N. Burright i W. F. Kaemmerer (2008). "Identification and allele-specific silencing of the mutant huntingtin allele in Huntington's disease patient-derived fibroblasts." Hum Gene Ther **19**: 710-9.
- Vaucheret, H., C. Beclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J. B. Morel, P. Mourrain, J. C. Palauqui i S. Vernhettes (1998). "Transgene-induced gene silencing in plants." Plant J **16**: 651-9.
- Vickers, T. A., S. Koo, C. F. Bennett, S. T. Crooke, N. M. Dean i B. F. Baker (2003). "Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis." J Biol Chem **278**: 7108-18.
- Walker, F. O. (2007). "Huntington's disease." Lancet **369**: 218-28.
- Wang, Y., S. Juranek, H. Li, G. Sheng, G. S. Wardle, T. Tuschl i D. J. Patel (2009). "Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes." Nature **461**: 754-61.
- Wang, Y., G. Sheng, S. Juranek, T. Tuschl i D. J. Patel (2008). "Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex." Nature **456**: 209-13.
- Wang, Y. L., W. Liu, E. Wada, M. Murata, K. Wada i I. Kanazawa (2005). "Clinicopathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA." Neurosci Res **53**: 241-9.
- Warby, S. C., A. Montpetit, A. R. Hayden, J. B. Carroll, S. L. Butland, H. Visscher, J. A. Collins, A. Semaka, T. J. Hudson i M. R. Hayden (2009). "CAG expansion in the Huntington disease gene is associated with a specific and targetable predisposing haplogroup." Am J Hum Genet **84**: 351-66.
- Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, i wsp. (2008). "Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes." Nature **453**: 539-43.

- Waterhouse, P. M., M. W. Graham i M. B. Wang (1998). "Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA." Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 13959-64.
- Watts, J. K. i D. R. Corey (2012). "Silencing disease genes in the laboratory and the clinic." J Pathol **226**: 365-79.
- Watts, J. K., G. F. Deleavey i M. J. Damha (2008). "Chemically modified siRNA: tools and applications." Drug Discov Today **13**: 842-55.
- Wellington, C. L., R. Singaraja, L. Ellerby, J. Savill, S. Roy, B. Leavitt, E. Cattaneo, A. Hackam, A. Sharp, N. Thornberry, i wsp. (2000). "Inhibiting caspase cleavage of huntingtin reduces toxicity and aggregate formation in neuronal and nonneuronal cells." J Biol Chem **275**: 19831-8.
- Westerhout, E. M. i B. Berkhout (2007). "A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference." Nucleic Acids Res **35**: 4322-30.
- Wheeler, T. M., K. Sobczak, J. D. Lueck, R. J. Osborne, X. Lin, R. T. Dirksen i C. A. Thornton (2009). "Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA." Science **325**: 336-9.
- White, J. K., W. Auerbach, M. P. Duyao, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, A. L. Joyner i M. E. MacDonald (1997). "Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion." Nat Genet **17**: 404-10.
- Williams, A. J. i H. L. Paulson (2008). "Polyglutamine neurodegeneration: protein misfolding revisited." Trends Neurosci **31**: 521-8.
- Wu, H., W. F. Lima i S. T. Crooke (1999). "Properties of cloned and expressed human RNase H1." J Biol Chem **274**: 28270-8.
- Wu, L., J. Fan i J. G. Belasco (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **103**: 4034-9.
- Xia, H., Q. Mao, S. L. Eliason, S. Q. Harper, I. H. Martins, H. T. Orr, H. L. Paulson, L. Yang, R. M. Kotin i B. L. Davidson (2004). "RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia." Nat Med **10**: 816-20.
- Ye, X., N. Huang, Y. Liu, Z. Paroo, C. Huerta, P. Li, S. Chen, Q. Liu i H. Zhang (2011). "Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation." Nat Struct Mol Biol **18**: 650-7.
- Yoda, M., T. Kawamata, Z. Paroo, X. Ye, S. Iwasaki, Q. Liu i Y. Tomari (2010). "ATP-dependent human RISC assembly pathways." Nat Struct Mol Biol **17**: 17-23.
- Yu, Z., X. Teng i N. M. Bonini (2011). "Triplet repeat-derived siRNAs enhance RNA-mediated toxicity in a Drosophila model for myotonic dystrophy." PLoS Genet **7**: e1001340.
- Zhang, H., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof i W. Filipowicz (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell **118**: 57-68.
- Zhong, X. i R. N. Pittman (2006). "Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates." Hum Mol Genet **15**: 2409-20.
- Zuccato, C., M. Tartari, A. Crotti, D. Goffredo, M. Valenza, L. Conti, T. Cataudella, B. R. Leavitt, M. R. Hayden, T. Timmusk, i wsp. (2003). "Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes." Nat Genet **35**: 76-83.
- Zuccato, C., M. Valenza i E. Cattaneo (2010). "Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease." Physiol Rev **90**: 905-81.

IX. WYKAZ PUBLIKACJI BĘDĄCYCH WYNIKIEM PRACY DOKTORSKIEJ

Publikacje eksperymentalne:

Fiszer A., Olejniczak M., Świtoński P.M., Wróblewska J.P., Wiśniewska-Kruk J., Mykowska A., Krzyżosiak W.J. „An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases” BMC Molecular Biology, 2012, przyjęta

Fiszer A., Mykowska A., Krzyżosiak W.J. "Inhibition of mutant huntingtin expression by RNA duplex targeting expanded CAG repeats" Nucleic Acids Research, 2011, 39(13):5578-85

Publikacja na etapie recenzji w czasopiśmie z „listy filadelfijskiej”:

Fiszer A., Mykowska A., Olejniczak M., Gałka-Marciniak P., Krzyżosiak W.J. „Self-Duplexing MicroRNAs Selectively Target Mutant CAG Repeats in the Huntingtin Transcript”

Publikacja przeglądowa:

Krzyżosiak W.J., Sobczak K., Wojciechowska M., **Fiszer A.**, Mykowska A., Kozłowski P. „Triplet repeat RNA structure and its role as pathogenic agent and therapeutic target” Nucleic Acids Research, 2012, 40(1):11-26

Inne publikacje Autorki:

Świtoński P.M., **Fiszer A.**, Kaźmierska K., Kurpisz M., Krzyżosiak W.J., Figiel M. „Mouse Ataxin-3 Functional Knock-Out Model” Neuromolecular Medicine, 2011, 13(1):54-65

Król J., **Fiszer A.**, Mykowska A., Sobczak K., de Mezer M., Krzyżosiak W.J. „Ribonuclease Dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets” Molecular Cell, 2007, 25(4): 575-86

X. ŹRÓDŁA FINANSOWANIA BADAŃ

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu



6 Ramowy Projekt Unii Europejskiej - RIGHT

„RNA Interference Technology as Human Therapeutic Tool”

(LSHB-CT-2004-005276)



Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

„Regulacja ekspresji genu huntingtyny przez dupleksy RNA”

(N301 569340)

Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w ramach programu Innowacyjna Gospodarka

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

(POIG.01.03.01-00-098/08)



**INNOWACYJNA
GOSPODARKA**
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Europejski Fundusz Społeczny

„Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”

Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

