

Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej

**Krótkie cząsteczki kwasów nukleinowych jako regulatory  
procesu uwalniania mikroRNA z ich prekursorów**

Short nucleic acid molecules as regulators of  
the processing of microRNA precursors

mgr Natalia Koralewska

promotor  
prof. dr hab. Marek Figlerowicz

promotor pomocniczy  
dr Anna Kurzyńska-Kokorniak

Poznań 2017

*Pragnę wyrazić wdzięczność wszystkim osobom,  
które przyczyniły się do powstania tej pracy:*

*Prof. dr. hab. Markowi Figlerowiczowi,  
za kierownictwo naukowe, cenne wskazówki i ogromną życzliwość;*

*Dr Annie Kurzyńskiej-Kokorniak,  
za opiekę naukową, zaangażowanie i wszelką pomoc;*

*Pracownikom Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej,  
za współpracę i serdeczną atmosferę;*

*Bliskim, Rodzinie i Przyjaciołom,  
za nieustanne wsparcie i wiarę we mnie.*

*Dziękuję!*

## SPIS TREŚCI

<b>I WSTĘP</b> .....	<b>6</b>
I-1. Wprowadzenie.....	6
I-2. Historia odkrycia miRNA.....	7
I-3. Znaczenie i funkcje biologiczne miRNA .....	8
I-4. Biogeneza miRNA .....	11
I-4-1. Organizacja i transkrypcja genów miRNA .....	17
I-4-2. Mechanizm powstawania prekursorów miRNA przy udziale rybonukleazy Drosha .....	20
I-4-3. Eksport prekursora miRNA z jądra do cytoplazmy .....	25
I-4-4. Etap cytoplazmatyczny biogenezy miRNA – cięcie pre-miRNA przez rybonukleazę Dicer .....	27
I-4-4-1. Rybonukleaza Dicer.....	27
I-4-4-1-1. Budowa i model funkcjonowania Dicer .....	29
I-4-4-1-2. Regulacja ekspresji genu kodującego ludzką Dicer.....	31
I-4-4-1-3. Regulacja aktywności Dicer .....	35
I-4-4-2. Prekursory miRNA.....	41
I-4-5. Przekazanie dupleksu miRNA/miRNA* do kompleksu białka Argonaute .....	47
I-5. Zastosowanie aptamerów w badaniach regulacji powstawania i funkcjonowania miRNA.....	52
<b>II CEL PRACY</b> .....	<b>55</b>
<b>III MATERIAŁY I METODY</b> .....	<b>56</b>
III-1. Materiały .....	56
III-1-1. Bufory i roztwory barwiące.....	56
III-1-2. Materiał biologiczny.....	58
III-1-3. Oligorybonukleotydy.....	58
III-1-4. Rybonukleaza Dicer.....	59
III-1-5. Żele poliakrylamidowe .....	59
III-1-6. Enzymy i odczynniki wykorzystane podczas badań.....	60
III-2. Metody .....	62
III-2-1. Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących .....	62
III-2-2. Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych .....	62
III-2-3. Znakowanie radioizotopowe końca 5' oligomerów RNA .....	63
III-2-4. Oczyszczanie kwasów nukleinowych w żelach PAA .....	64
III-2-5. Przygotowanie lizatów komórkowych .....	64
III-2-6. Produkcja ludzkiej rekombinowanej rybonukleazy Dicer w systemie bakulowirusowym .....	65
III-2-7. Cięcie RNA przez Dicer .....	66
III-2-8. Ocena potencjału inhibitorowego oligomerów .....	66

III-2-9. Badanie oddziaływań RNA•RNA .....	67
III-2-10. Badanie oddziaływań białko•RNA z wykorzystaniem techniki dot blot.....	68
III-2-11. Badanie oddziaływań białko•RNA w teście spowolnienia migracji RNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych .....	69
III-2-12. Hydroliza RNA przez rybonukleazę T1 .....	69
III-2-13. Analiza bioinformatyczna struktury RNA .....	70
III-2-14. Analiza bioinformatyczna transkryptomu człowieka .....	70
<b>IV WYNIKI.....</b>	<b>72</b>
IV-1. Charakterystyka preparatu ludzkiej rekombinowanej rybonukleazy Dicer otrzymywanej w systemie bakulowirusowym.....	72
IV-2. Badanie mechanizmów inhibicji Dicer przez oligomery RNA .....	77
IV-2-1. Badanie mechanizmu inhibicji powstawania miR-210 w reakcjach z ATD_13.6 .....	77
IV-2-2. Badanie mechanizmu inhibicji powstawania miR-210 w reakcjach z ATD_15.52 .....	83
IV-2-3. Analiza transkryptomu człowieka pod kątem występowania sekwencji identycznych lub wysoce podobnych do sekwencji wyselekcjonowanych aptamerów .....	87
IV-2-4. Badanie wpływu 12-nt oligomerów RNA komplementarnych do rejonu apikalnego prekursorów na proces ich cięcia przez Dicer w warunkach <i>in vitro</i> .....	90
IV-2-4-1. Badania potencjału inhibitorowego 12-merów prowadzone z wykorzystaniem ludzkiej rekombinowanej Dicer .....	90
IV-2-4-2. Badania potencjału inhibitorowego 12-merów prowadzone z wykorzystaniem lizatów komórkowych.....	98
IV-2-4-3. Badanie selektywności działania 12-merów hamujących powstawanie miRNA w reakcjach z ludzką rybonukleazą Dicer .....	100
IV-2-4-4. Badanie mechanizmu działania AL-210 .....	102
IV-2-5. Badanie wpływu oligomerów RNA zawierających sekwencje bodate w ciągu guanozyn na proces powstawania miRNA w reakcjach z ludzką rybonukleazą Dicer .....	106
<b>V Dyskusja.....</b>	<b>112</b>
<b>VI Podsumowanie.....</b>	<b>135</b>
<b>VII Streszczenie/Abstract.....</b>	<b>137</b>
<b>VIII Bibliografia .....</b>	<b>139</b>
<b>IX Załączniki.....</b>	<b>164</b>
<b>X Dorołek naukowy .....</b>	<b>172</b>
<b>XI Finansowanie.....</b>	<b>174</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AGO** – białko Argonaute (ang. *Argonaute protein*)
- cDNA** – DNA komplementarny do RNA (ang. *complementary DNA*)
- CLIP** – immunoprecypitacja usieciowanych kompleksów (ang. *cross-linking immunoprecipitation*)
- dsRBP** – białko wiążące dsRNA (ang. *dsRNA binding protein*)
- dsRBD** – domena wiążąca dsRNA (ang. *dsRNA binding domain*)
- dsRNA** – dwuniciowy RNA (ang. *double-stranded RNA*)
- DUF 283** – domena o nieznannej funkcji (ang. *domain of unknown function 283*)
- EXP5** – eksportyna 5 (ang. *exportin 5*)
- lncRNA** – długi niekodujący RNA (ang. *long non-coding RNA*)
- mRNA** – RNA informacyjny (ang. *messenger RNA*)
- miRNA** – mikroRNA (ang. *microRNA*)
- ncRNA** – niekodujący RNA (ang. *non-coding RNA*)
- NLS** – sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localisation signal*)
- PAZ** – domena Piwi/Argonaute/Zwill (ang. *Piwi/Argonaute/Zwill*)
- piRNA** – RNA oddziałujący z białkami Piwi (ang. *PIWI-interactin RNA*)
- Pol II** – polimeraza RNA II (ang. *RNA polymerase II*)
- pre-miRNA** – prekursor miRNA (ang. *precursor miRNA*)
- pri-miRNA** – pierwotny transkrypt miRNA (ang. *primary miRNA*)
- RIII** – domena RNazy III
- RISC** – kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. *RNA induced silencing complex*)
- RNAi** – interferencja RNA (ang. *RNA interference*)
- siRNA** – mały interferujący RNA (ang. *small interfering RNA*)
- snRNA** – mały niekodujący RNA (ang. *small non-coding RNA*)
- srRNA** – mały regulatorowy RNA (ang. *small regulatory RNA*)
- ssRNA** – jednoniciowy RNA (ang. *single-stranded RNA*)

---

## I WSTĘP

### I-1. Wprowadzenie

Centralny dogmat biologii molekularnej sformułowany na początku drugiej połowy XX wieku głosił, że przepływ informacji genetycznej następuje jednokierunkowo: z DNA, poprzez RNA do białka [1, 2]. W tym kontekście przez długi czas marginalizowano znaczenie niekodującego RNA (ncRNA, ang. *non-coding RNA*), mimo że stanowi on ponad 90% całkowitego RNA eukariotycznego [3, 4]. Dopiero odkrycia dokonane na przestrzeni ostatnich 25 lat ujawniły strukturalne i funkcjonalne bogactwo transkryptomu eukariontów, doprowadzając do całkowitego zwrotu w postrzeganiu roli RNA w organizmach żywych. Szczególne zainteresowanie wzbudziło opisanie molekularnych podstaw zjawiska interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) – zachowawczego ewolucyjnie, niezwykle efektywnego mechanizmu wyciszania ekspresji genów inicjowanego przez dwuniciowy RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*) [5]. Uważa się, że pierwotnie system ten służył do obrony gospodarza i jego genomu przed wirusami i ruchomymi elementami genetycznymi. Obecnie odgrywa on rolę w wielu istotnych procesach biologicznych, np. we wzroście i różnicowaniu komórek [6-11] oraz w apoptozie [12-16]. Kluczowym elementem tego systemu są małe regulatorowe RNA (srRNA, ang. *small regulatory RNA*), które funkcjonują jako specyficzne sondy umożliwiające odpowiednim kompleksom białkowym rozpoznanie docelowych transkryptów lub genów i regulację ich ekspresji. srRNA mogą być kodowane w genomie lub mieć pochodzenie egzogenne. Cechami wyróżniającymi srRNA spośród pozostałych ncRNA są: długość ~20-30 nt oraz zdolność do oddziaływania z białkami z rodziny Argonaute (Ago). Różnice w biogenezie oraz wielkości stanowią podstawę dalszego podziału srRNA na szereg grup, z których w organizmach zwierzęcych najpowszechniej występują: mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*), RNA oddziałujące z białkami Piwi (piRNA, ang. *PIWI-interacting RNA*) oraz małe interferencyjne RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*). Spośród tych trzech klas, w większości komórek somatycznych dominują miRNA. Są to jednoniciowe cząsteczki RNA o długości ~21-23 nukleotydów (nt) powstające z kodowanych w genomie prekursorów przyjmujących charakterystyczną strukturę typu spinki.

Odkrycia wskazujące na potencjał miRNA do regulacji różnorodnych procesów fizjologicznych stały się bodźcem do podjęcia intensywnych badań poświęconych powstawaniu i funkcjonowaniu tych cząsteczek oraz praktycznym aspektom ich wykorzystania w diagnostyce i terapii chorób. W tym rozdziale omówione zostaną podstawowe zagadnienia dotyczące biogenezy miRNA u zwierząt oraz u człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem ostatniego etapu – cięcia prekursorów miRNA przez rybonukleazę Dicer.

## 1-2. Historia odkrycia miRNA

Pierwszy gen kodujący miRNA (miRNA *lin-4*) opisano już w 1993 roku [17, 18]. Grupy Ambrosa i Ruvkuna, badając geny kontrolujące przejście *Caenorhabditis elegans* przez kolejne stadia larwalne, ustaliły, że ekspresja *lin-14*, jednego z najważniejszych regulatorów wczesnych etapów rozwojowych nicienia, podlega inhibicji przez krótkie transkrypty *lin-4* (22 i 61 nt). Stwierdzono, że cząsteczki te nie kodują białka, ale zawierają sekwencje komplementarne do fragmentów 3'UTR (rejon niepodlegający translacji, ang. *untranslated region*) mRNA *lin-14* i mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji tego genu poprzez nieznanego wówczas mechanizm. Ponieważ jednak *lin-4* nie ma homologów w innych organizmach, biologiczne znaczenie odkrycia dokonanego w laboratoriach Ambrosa i Ruvkuna przez długi czas pozostawało niedostrzeżone. Mimo że wyciszanie genów w roślinach zaobserwowano już w 1990 roku [19], a w następnych latach podobne efekty opisywano także u grzybów z rodzaju *Neurospora* [20] oraz u *Drosophila melanogaster* [21], zjawisk tych nie wiązano z małymi cząsteczkami RNA. Przełom nadszedł w 1998 roku, kiedy zespół Fire'a i Mello opublikował wyniki tłumaczące podstawy mechanizmu nazwanego przez badaczy interferencją RNA. Dowiedziono wówczas, że jednoczesne podanie do komórek *C. elegans* sensownego i antysensownego RNA prowadzi do 10-krotnie wydajniejszego wyciszenia genu niż w przypadku użycia pojedynczej nici, a do wywołania tego efektu wystarczy zaledwie kilka cząsteczek RNA w przeliczeniu na komórkę [5]. Znaczenie tego odkrycia zostało docenione przyznaniem Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 2006 roku. W kolejnych latach ustalono, że RNA inicjujący proces interferencji jest w komórce cięty na krótkie fragmenty o długości 21-23 nt [22]. W tym samym czasie w komórkach *C. elegans* zidentyfikowano kolejny

krótki, niekodujący transkrypt, 21-nt *let-7*, który hamował ekspresję genów *lin* [23]. Wykazanie, że homologi *let-7* występują powszechnie w organizmach żywych [24] i stanowią element odrębnego mechanizmu regulacji ekspresji genów, jakim jest RNAi [25] zapoczątkowało prawdziwą rewolucję miRNA. Od tamtej pory poczyniono ogromny postęp w zrozumieniu roli jaką te cząsteczki odgrywają w organizmach żywych: zidentyfikowano tysiące kodujących je genów oraz opisano szlaki biogenezy i mechanizmy funkcjonowania miRNA [26].

### 1-3. Znaczenie i funkcje biologiczne miRNA

miRNA występują powszechnie w wielu gatunkach zwierząt i roślin, zidentyfikowano je także u grzybów, protistów i wirusów. Najnowsza wersja miRBase – największego depozytorium sekwencji miRNA – zawiera informacje na temat 28645 prekursorów, z których powstaje 35828 dojrzałych miRNA w 223 gatunkach (miRBase 21, <http://www.mirbase.org/>).

Wiele wskazuje na to, że miRNA były obecne już na wczesnych etapach ewolucji zwierząt, np. miR-100 występuje we wszystkich przebadanych do tej pory tkankowcach [27]. Analizując drzewo filogenetyczne zwierząt, widać bezpośredni związek pomiędzy liczbą miRNA a stopniem złożoności organizmów [28-32]. Co więcej, łatwo zaobserwować, że w historii kilkakrotnie doszło do ekspansji miRNA: po raz pierwszy, gdy wyodrębniały się zwierzęta z symetrią dwuboczną, następnie u podstawy gałęzi prowadzącej do kręgowców, a ostatni raz – w linii ssaków łożyskowych [27, 28, 32-34]. Taka dystrybucja sugeruje, że cząsteczki te odegrały istotną rolę w ewolucji gatunków, a obecność miRNA w sieciach regulujących ekspresję genów może stanowić częściową odpowiedź na tzw. paradoksy wartości C i G (ang. *C-value paradox*, *G-value paradox*), czyli brak korelacji pomiędzy stopniem złożoności organizmów a odpowiednio: wielkością genomu i liczbą genów.

Dojrzałe miRNA występują w komórce jako element złożonych kompleksów rybonukleoproteinowych, wśród których szczególną rolę odgrywa centralny kompleks efektorowy procesu RNAi nazywany RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) [35-37]. W rzeczywistości termin RISC odnosi się do heterogennej grupy kompleksów, których cechą wspólną jest funkcjonalny rdzeń tworzony przez jedno z białek rodziny



Argonaute (Ago) oraz jednoniciowy miRNA lub siRNA [38, 39]. Komponent RNA działa jak sonda umożliwiająca przyłączenie RISC do komplementarnego transkryptu lub fragmentu DNA, który ma podlegać regulacji [37]. W większości przypadków kluczowe dla oddziaływania pomiędzy miRNA a docelową cząsteczką kwasu nukleinowego są nukleotydy 2-7 miRNA (tzw. region „seed”) [40-45]. Dodatkowo w skład RISC wchodzi białka, które wspierają tworzenie kompleksu i inkorporowanie regulatorowego RNA [46-49] oraz działają na etapie efektorowym [50-52]. Pomimo wielu lat badań, zarówno budowa jak i sposób funkcjonowania RISC pozostają tematem dyskusji. Najczęściej obserwuje się potranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów wywołane degradacją mRNA, jego sekwestracją lub zaburzeniem procesu translacji. Do degradacji transkryptów dochodzi w następstwie modyfikacji ich struktury, np. poprzez deadenylację czy usunięcie struktury kap z końca 5', a także, co rzadkie u zwierząt, a częste u roślin, poprzez bezpośrednie cięcie przez białko Ago [36, 53-59]. Ten ostatni mechanizm obserwowany jest w sytuacji pełnej (lub prawie pełnej) komplementarności pomiędzy miRNA a docelowym transkryptem, a hydroliza dotyczy wiązania fosfodiesterowego pomiędzy nukleotydami mRNA, które zaangażowane są w oddziaływanie z 10. i 11. nt miRNA [53, 60]. Wpływ RISC na proces translacji polega na: blokowaniu inicjacji [55-57, 61-67] lub elongacji [68-75], wymuszaniu przedwczesnego oddysocjowania rybosomu od mRNA [55, 75, 76], a także, prawdopodobnie, na indukowaniu degradacji powstającego polipeptydu [77]. Dodatkowo, miRNA mogą uczestniczyć w reorganizacji chromatyny i wyciszaniu genów na poziomie transkrypcyjnym [45, 78-83], choć przyjmuje się, że jądrowa regulacja ekspresji genów jest raczej domeną srRNA dwóch innych klas: piRNA w komórkach germinalnych i siRNA w komórkach somatycznych [84]. W ostatnich latach pojawiają się też doniesienia o zależnej od miRNA transkrypcyjnej [85-89] i translacyjnej [90-92] aktywacji ekspresji genów (RNAa, ang. *RNA activation*). Szczegóły mechanizmów RNAa, w tym skład kompleksów rybonukleoproteinowych, w ramach których funkcjonują miRNA, nie są jeszcze w pełni poznane.

Pojedynczy miRNA może oddziaływać nawet z kilkoma setkami docelowych mRNA, często w kooperacji z innymi miRNA, tworząc niezwykle złożoną sieć regulatorową [93, 94]. Ponad 60% ludzkich genów kodujących białka posiada przynajmniej jedno konserwatywne miejsce wiązania miRNA [94]. Biorąc pod uwagę

istnienie wielu niekonserwatywnych miejsc oddziaływania [94], można przypuszczać, że zasięg regulacji przez miRNA jest jeszcze szerszy.

Mnogość sposobów działania oraz złożoność sieci oddziaływań sprawiają, że miRNA zaangażowane są w kontrolę różnorodnych procesów biologicznych, włączając w to te najbardziej podstawowe dla funkcjonowania organizmu: proliferację i różnicowanie komórek, ich metabolizm i apoptozę [7, 8, 95-97]. W związku z tym, niekontrolowane zmiany ilościowe i jakościowe dotyczące dojrzałych miRNA mogą przyczyniać się do rozwoju stanów patologicznych, np. nowotworów [98], chorób układu krążenia [99] czy chorób neurodegeneracyjnych [100]. W tym miejscu należy jednak odnotować, że utrata określonych miRNA nie zawsze prowadzi do zauważalnych zmian fenotypu [101, 102]. Brak pojedynczego regulatora może być kompensowany przez inne cząsteczki miRNA komplementarne do tych samych docelowych transkryptów. Ponadto miRNA bardzo rzadko powodują całkowite zahamowanie ekspresji regulowanego genu. W wielu przypadkach efekt przez nie wywoływany polega na obniżeniu poziomu danego białka jedynie około dwukrotnie [93, 103], co mieści się w zakresie zmienności naturalnie występującej w populacjach [104]. W świetle tych obserwacji postuluje się, że podstawową rolą wielu miRNA może być przede wszystkim buforowanie losowych zmian na poziomie transkrypcji i translacji, czyli tłumienie szumu powstającego w układach biologicznych [105, 106].

#### 1-4. Biogeneza miRNA

Kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA obejmuje: transkrypcję przy udziale polimerazy II RNA (Pol II) [107] oraz następujące po sobie cięcia prekursorów przez dwie rybonukleazy (RNazy) z rodziny RNaz III: Drosha i Dicer (Rys. 1.1.). Powstające w jądrze pierwotne transkrypty miRNA (pri-miRNA, ang. *primary miRNA*) są rozpoznawane przez kompleks Mikroprocesora, w skład którego wchodzi Drosha. Rybonukleaza ta wycina struktury typu spinki występujące w pri-miRNA, uwalniając ~60-nt prekursor miRNA (pre-miRNA, ang. *precursor miRNA*) [108, 109], które następnie transportowane są do cytoplazmy przez Eksportynę 5 i czynnik Ran w procesie zależnym od GTP [110, 111]. W cytoplazmie pre-miRNA podlega cięciu przez rybonukleazę Dicer [6, 36], a generowany dupleks miRNA/miRNA\* o długości ~21 par zasad (pz) przekazywany jest do RISC, gdzie jedna z nici (tzw. nić pasażerska, miRNA\*) jest usuwana, podczas gdy druga pozostaje związana z białkami kompleksu [112, 113]. Niekiedy nić pasażerska nie podlega degradacji, ale również staje się funkcjonalnym miRNA pełniącym rolę regulatorową [114-117]. Jak wykazano, poziom akumulacji określonych miRNA\* oraz stosunek miRNA/miRNA\* podlegają zmianom w zależności od etapu rozwoju komórki czy typu tkanki [114, 118], a także w przebiegu różnorodnych procesów patologicznych [118-122]. Ponadto w przypadku niektórych pre-miRNA cząsteczką włączaną do RISC może być również fragment apikalny, będący produktem ubocznym cięcia przez Dicer [123, 124]; miRNA tego typu nazwano loop-miRami (ang. *loop* – pętla).

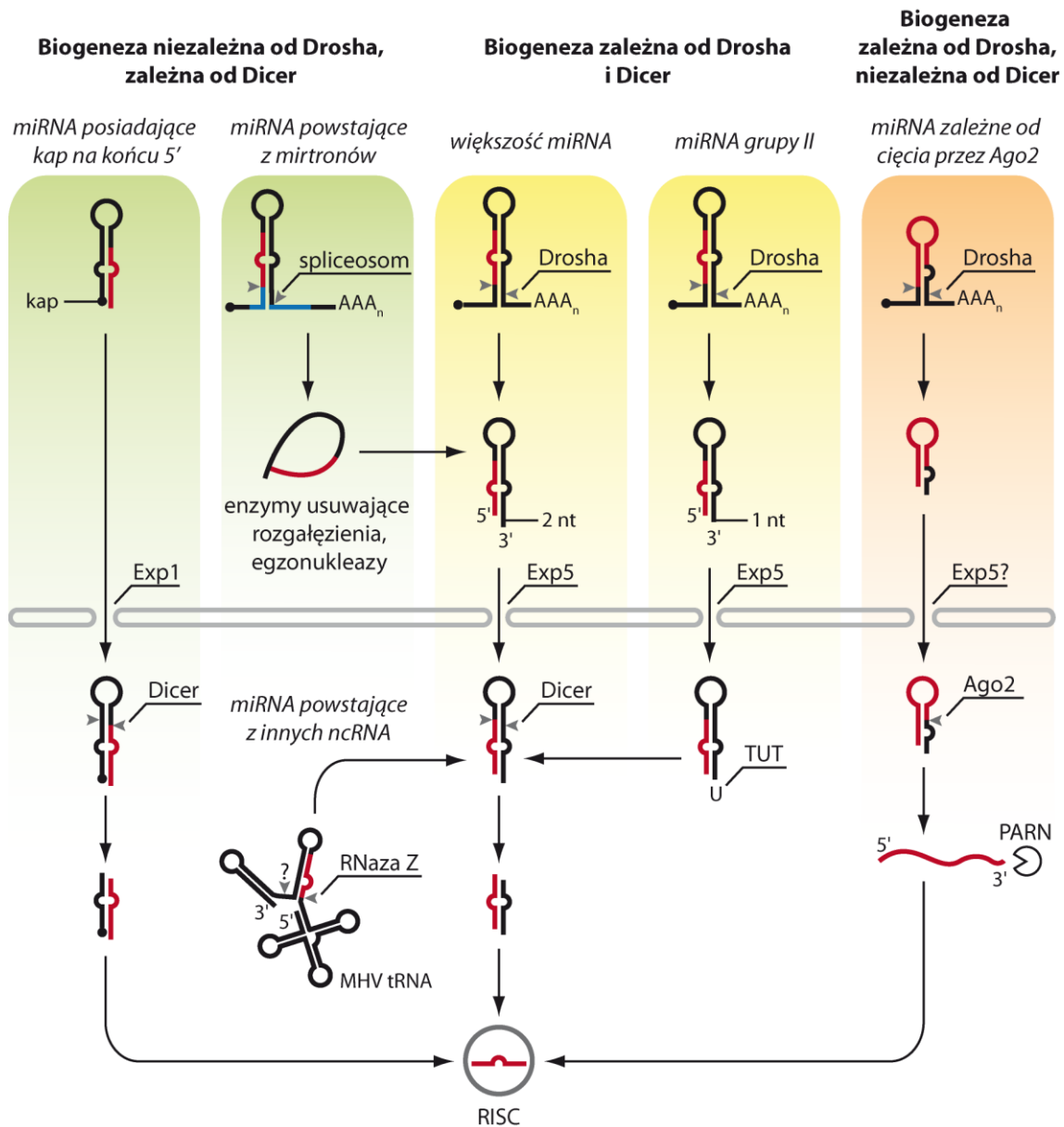
Znane są także alternatywne ścieżki biogenezy miRNA. Dotyczą one niewielkiej puli cząsteczek, obejmującej miRNA, których prekursorzy wymagają dodatkowej modyfikacji oraz miRNA powstające bez udziału Drosha lub Dicer (Rys. 1.1.).

W przypadku miRNA, których prekursor generowany przez rybonukleazę Drosha posiada 1-nt wystający koniec 3' (tzw. miRNA grupy II), po eksporcie pre-miRNA do cytoplazmy następuje dodatkowy etap 3' monourydylacji, który jest niezbędny dla utworzenia kanonicznego, 2-nt końca 3' zapewniającego stabilne oddziaływanie z Dicer [125, 126]. Reakcja ta w komórkach ludzkich katalizowana jest przez białka o aktywności UTP-transferazy: Zcchc6 (ang. *zinc finger, CCH domain containing 6*), Zcchc11 oraz PAPD4 (ang. *PAP associated domain containing 4*)

nazywane też TUT7, TUT4, TUT2 (ang. *terminal uridylyltransferase 7/4/2*, odpowiednio) [125].

Najlepiej scharakteryzowaną grupą cząsteczek generowanych bez udziału Drosha są miRNA powstające z mirtonów, czyli krótkich intronów, które po uwolnieniu z pre-mRNA przez kompleks splicingowy stanowią substrat dla Dicer [127-132]. W przypadku mirtronów, typowa dla intronów struktura lassa jest liniowana dzięki aktywności enzymów usuwających rozgałęzienia [131, 132]. Niekiedy też końce mirtronów są dodatkowo docinane przez egzonukleazy [133]. Etap cięcia przez Drosha omijany jest także w przypadku miRNA generowanych z krótkich transkryptów przyjmujących strukturę typu spinki [127, 134, 135]. Przykładem jest pre-mir-320, który powstaje w wyniku transkrypcji prowadzonej przez Pol II, następnie jest transportowany do cytoplazmy przez Eksportynę 1, by tam ulec cięciu przez Dicer [135]. Co ciekawe, cząsteczką włączaną do kompleksu RISC jest zawsze miR-320 generowany z ramienia 3' (miR-320-3p), a selektywność wyboru nici najprawdopodobniej podyktowana jest obecnością na końcu 5' miR-320-5p 7-metyloguanozyny, która może stanowić przeszkodę w prawidłowym oddziaływaniu RNA z białkiem Ago. Mechanizmy biogenezy niezależnej od Drosha opisano również w przypadku miRNA lub cząsteczek typu miRNA uwalnianych przez Dicer z prekursorów powstających podczas dojrzewania lub degradacji: tRNA [127, 136, 137], małych jąderkowych RNA (snoRNAs, ang. *small nucleolar RNAs*) [138] oraz pewnych wirusowych RNA [139].

Do tej pory zidentyfikowano tylko jeden przypadek miRNA (miR-451) powstającego bez udziału Dicer [140-142]. Pre-mir-451 przyjmuje strukturę typu spinki, w której trzon ma długość jedynie ~18 pz i jest zbyt krótki, by ulec cięciu przez Dicer. Prekursor ten jest wiązany bezpośrednio przez białko Ago2, które przecina RNA w obrębie ramienia 3' i generuje ~30-nt produkt pośredni. Następnie rybonukleaza PARN (rybonukleaza specyficzna względem łańcucha poli(A), ang. *poly(A)-specific ribonuclease*) docina koniec 3' RNA, w efekcie czego powstaje funkcjonalny miR-451 o długości ~23 nt [143].



**Rysunek 1.1. Szlaki biogenezy miRNA u zwierząt**

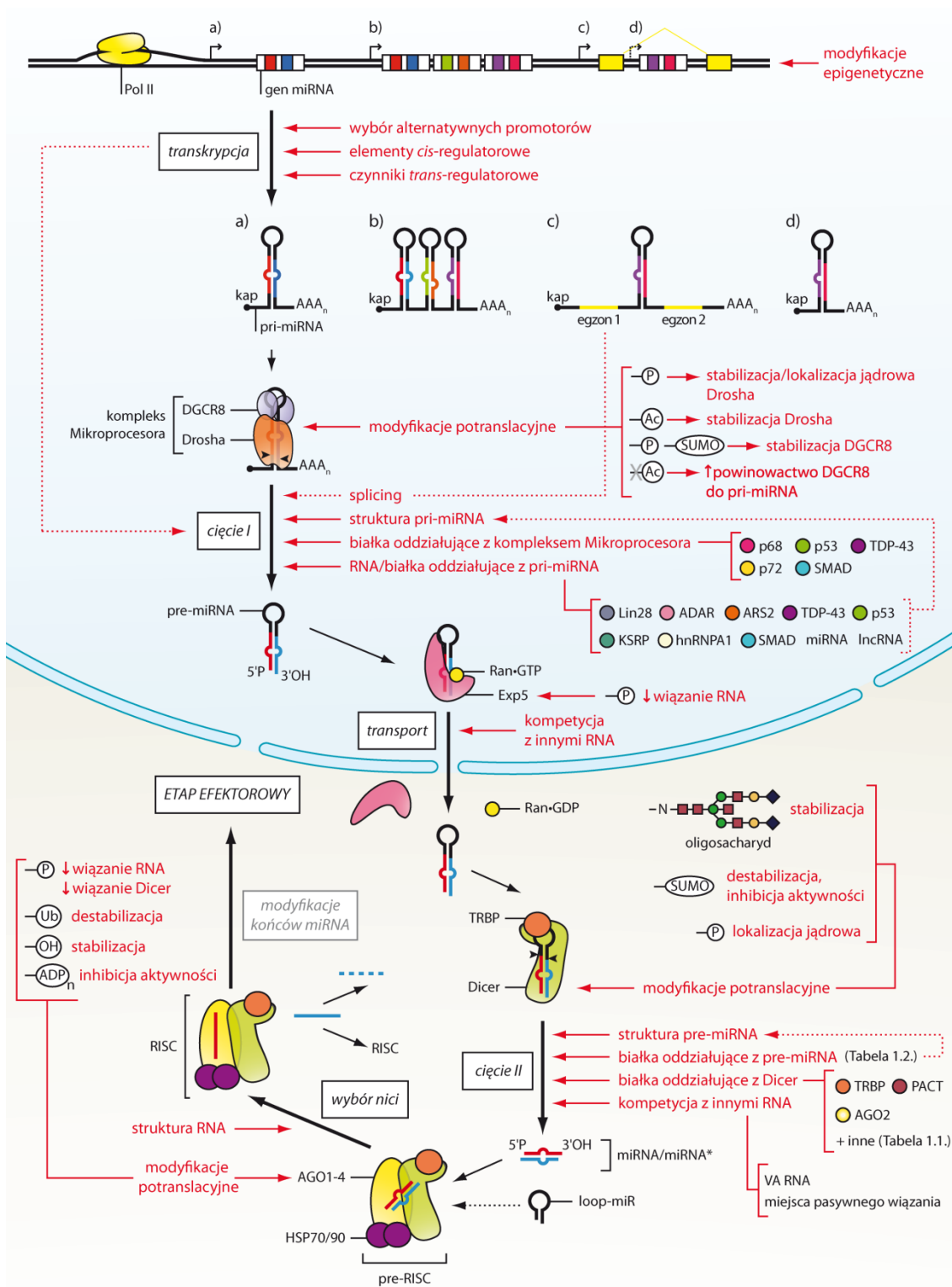
Kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA obejmuje cięcie prekursorów przez Drosha i Dicer (większość miRNA). W przypadku pre-miRNA posiadających 1-nt wystający koniec 3' przed cięciem przez Dicer dochodzi do 3' monourydylacji RNA przez UTP-transferazy (TUT), (miRNA grupy II). miRNA generowane niezależnie od Drosha powstają przy udziale Dicer z krótkich transkryptów Pol II (miRNA ze strukturą kap na końcu 5'), z mirtronów oraz innych ncRNA. Szlak niezależny od Dicer wymaga cięcia pre-miRNA przez Ago2 oraz egzonukleazę PARN. MHV tRNA – tRNA mysiego wirusa zapalenia wątroby; RISC – aktywny kompleks RISC.

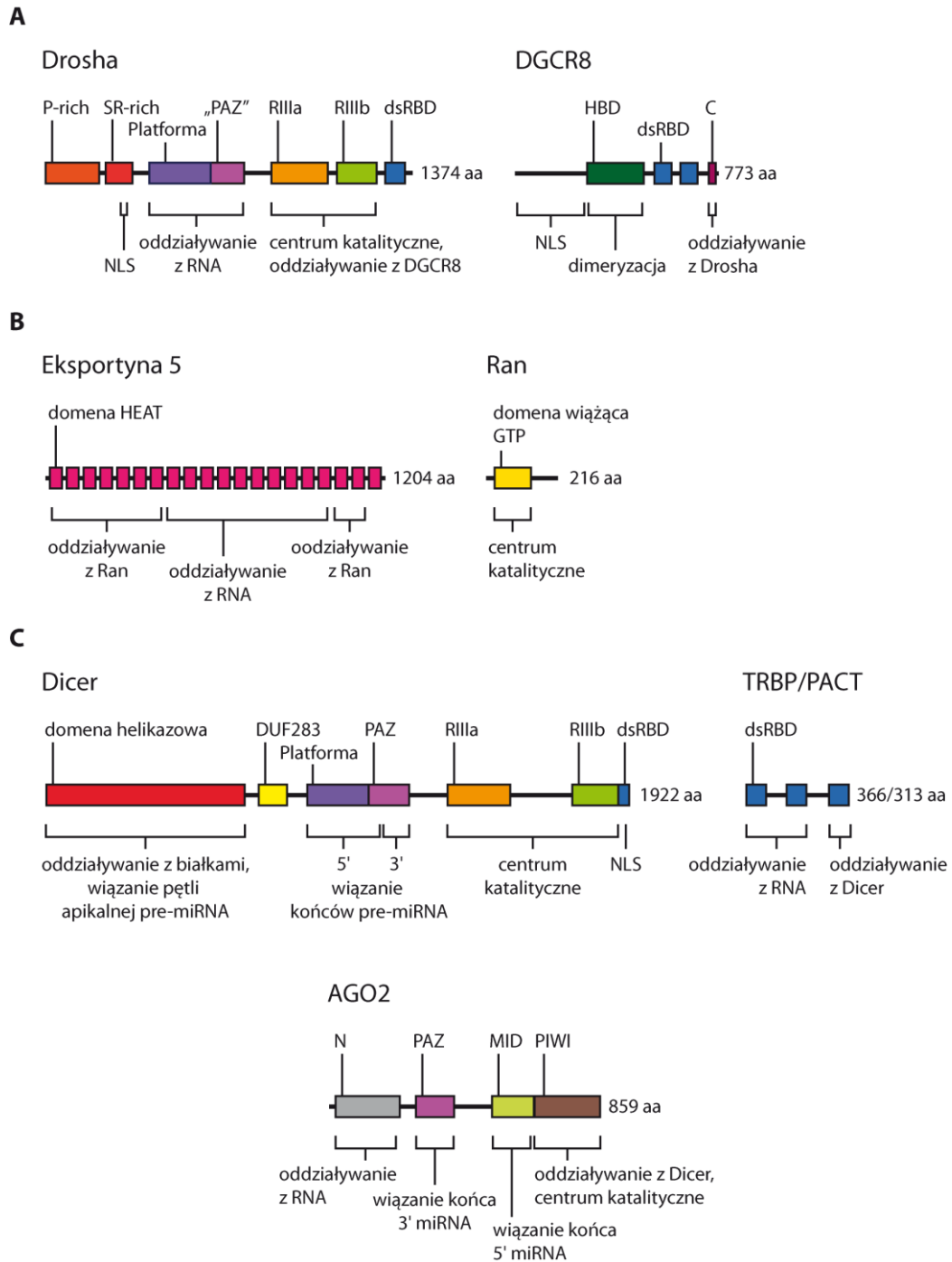
W warunkach fizjologicznych każdy z etapów biogenezy miRNA podlega precyzyjnej kontroli i regulacji przez różnorodne czynniki (Rys. 1.2.), co pozwala na dostosowanie poziomu miRNA do aktualnego stanu komórki czy etapu rozwoju tkanki/organu [26]. Z jednej strony, na wydajność powstawania miRNA wpływa struktura przyjmowana przez cząsteczki kwasów nukleinowych na poszczególnych etapach biogenezy (reiony genomu kodujące miRNA, prekursorzy miRNA), determinująca oddziaływanie z odpowiednimi białkami, między innymi: Pol II, Drosha czy Dicer. Odrębną płaszczyznę regulacji stanowią mechanizmy związane z biosyntezą i funkcjonowaniem kluczowych enzymów zaangażowanych w ten szlak (Rys. 1.3.). W zależności od mechanizmu regulatorowego, wywołana zmiana może dotyczyć puli wszystkich miRNA powstających w komórce (np. globalne zahamowanie biogenezy miRNA w komórkach nowotworowych w stanie hipoksji w następstwie obniżenia poziomu Drosha [144] i Dicer [145, 146]) lub pojedynczych cząsteczek (np. hamowanie transkrypcji miR-29 przez czynnik NF- $\kappa$ B w aktywowanych komórkach NK i limfocytach T [147]). Wiele miRNA wykazuje tkankowo-specyficzny wzór ekspresji skoordynowany w czasie i przestrzeni z procesami rozwojowymi organizmu, np.: miR-1 jest obecny przede wszystkim w ssaczych kardiomiocytach [148, 149], podczas gdy miR-122 jest charakterystyczny dla hepatocytów [149]. Co więcej, bardzo często zmiany profili miRNA są na tyle charakterystyczne, że postuluje się wykorzystanie określonych miRNA jako biomarkerów w diagnostyce i prognozowaniu przebiegu różnorodnych stanów patologicznych, przede wszystkim nowotworów [150], ale również ostrego zawału mięśnia sercowego [151, 152] czy nieprawidłowości w rozwoju płodu [153, 154].

---

### Rysunek 1.2. Regulacja kanonicznej biogenezy miRNA w komórkach ludzkich

Sekwencje kodujące miRNA mogą stanowić samodzielne jednostki transkrypcyjne ulegające transkrypcji do mono- (a) lub policistronowego RNA (b) lub być osadzone w obrębie innych genów i podlegać transkrypcji z wykorzystaniem promotorów tych genów (c) lub własnych promotorów niezależnych (d). Etapy biogenezy miRNA zaznaczono czarnymi strzałkami, czynniki i mechanizmy regulatorowe – czerwonymi. Kolorem szarym wyróżniono dodatkowy etap modyfikacji miRNA. Szczegółowe informacje dotyczące białek oddziałujących z Dicer i pre-miRNA zamieszczono w Tabeli 1.1. i Tabeli 1.2. ADP<sub>n</sub> – poliADP-rybozylacja; N-oligosacharyd – N-glikozylacja; OH – hydroksylacja; P – fosforylacja; SUMO – sumoilacja; Ub – ubikwitynacja; VA RNA – RNA wirusowe. Wyjaśnienie skrótów nazw białek w tekście.





**Rysunek 1.3. Schematyczna reprezentacja budowy podstawowych białek zaangażowanych w dojrzewanie miRNA w komórce człowieka**

**A** – Białka etapu jądrowego. **B** – Białka zaangażowane w transport. **C** – Białka etapu cytoplazmatycznego. dsRBD – domena wiążąca dsRNA (ang. *dsRNA binding domain*). HBD – domena wiążąca hem (ang. *hem binding domain*); HEAT – domena obecna w białkach: huntingtynie, czynnika elongacyjnym EF3, fosfatazie białek 2A oraz kinazie TOR1; MID – domena środkowa (ang. *middle*); N/C – domena N-, C-końcowa; NLS – sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localisation signal*); PAZ – domena obecna w białkach: Piwi, Argonaute, Zwilli; RIII – domena RNazy III.



#### I-4-1. Organizacja i transkrypcja genów miRNA

Geny kodujące prekursory miRNA są zlokalizowane na wszystkich chromosomach, ale ich rozmieszczenie nie jest równomierne [155-157], jak również nie koreluje z długością chromosomów [155], np. u człowieka aż 28% zidentyfikowanych genów miRNA (*MIR*) znajduje się jedynie na czterech chromosomach: Chr. 1., Chr. 19., Chr. X i Chr. 2. Akumulację genów miRNA zaobserwowano, np. w tzw. kruchych miejscach chromosomów, czyli w regionach podatnych na pęknięcia i rearanżacje [158, 159]. Wzbogacenie określonych rejonów w sekwencje kodujące miRNA związane jest ze zjawiskiem występowania zgrupowań genów miRNA [160, 161]. Owe zgrupowania mogą obejmować *loci* nawet kilkudziesięciu różnych *MIR*, które zazwyczaj tworzą policistronową jednostkę transkrypcyjną (Rys. 1.2. *b*). Bardzo często struktura tych grup jest zachowawcza ewolucyjnie, a kodowane w nich miRNA są powiązane funkcjonalnie lub należą do tej samej rodziny (gdzie rodziną nazywa się miRNA o takiej samej sekwencji regionu „seed”) [161]. *MIR* znajdują się w różnorodnych kontekstach genomowych (Rys. 1.2. *a-d*); stanowią samodzielne jednostki transkrypcyjne (miRNA międzygenowe) lub są osadzone w obrębie innych genów (miRNA wewnątrzgenowe). Aż 50% ludzkich miRNA kodowanych jest wewnątrz intronów [155]. Geny niektórych miRNA występują w kilku *loci* genomowych, czego przykładem jest miRNA *let-7a*, który u człowiek kodowany jest na trzech chromosomach: Chr. 9., Chr. 11., Chr. 22.

Rearanżacje genomowe i mutacje prowadzące do zmiany liczby kopii lub sekwencji *MIR* mogą w znaczący sposób wpływać na poziom i funkcjonowanie powstających miRNA. Wyniki licznych badań pozwalają połączyć zmiany w strukturze rejonów kodujących miRNA z rozwojem różnorodnych stanów patologicznych, np. u chorych na przewlekłą białaczkę limfocytową B-komórkową obserwuje się delecję *MIR-15a/16-1* [162] oraz translokację *MIR-125b-1* [163], a u osób cierpiących na glejaka wielopostaciowego – amplifikację *MIR-26a* [164]. Mutacje punktowe, poza zmianami profili ekspresji, mogą wpływać na funkcjonowanie dojrzałych miRNA [165]. Efekt ten obserwowany jest w przypadku zmiany sekwencji tych fragmentów miRNA, które są istotne dla oddziaływania z docelowymi transkryptami lub wpływają na parametry termodynamiczne dupleksu miRNA/miRNA\* decydujące o wyborze nici włączanej do RISC [165-167].

Ponieważ większość pri-miRNA jest szybko i efektywnie przekształcana przez kompleksy białkowe zaangażowane w biogenezę miRNA, badania struktury genów miRNA oraz ich pierwotnych transkryptów są utrudnione. W przypadku miRNA wewnątrzgenowych, szczególnie w sytuacji, gdy sekwencje *MIR* leżą stosunkowo blisko (<10 kb) promotora genu gospodarza, zazwyczaj dochodzi do kotranskrypcji obu genów [168]. Możliwa jest także autonomiczna transkrypcja z wykorzystaniem odrębnych rejonów promotorowych [169-172], a ostatnie przewidywania bioinformatyczne sugerują, że u ludzi taki mechanizm może dotyczyć ponad 26% miRNA wewnątrzgenowych [169]. Sekwencjonowanie RNA oraz immunoprecypitacja chromatyny pozwoliły ustalić, że geny miRNA stanowiące niezależne jednostki transkrypcyjne mają zazwyczaj długość kilkudziesięciu tysięcy par zasad [173], a promotory tych genów posiadają charakterystyczne elementy struktury występujące w promotorach genów kodujących białka, tzn.: kasetę TATA (ang. *TATA box*), element inicjatorowy (Inr), dolny element rdzenia promotora (DPE, ang. *downstream core promotor element*), rejon rozpoznawany przez TFIIB (BRE, ang. *TFIIB recognition element*) [168, 169, 173, 174]. Zidentyfikowano również, działające w układzie *cis*, dystalne elementy regulatorowe, obejmujące zarówno sekwencje wzmacniające (ang. *enhancers*), jak i wyciszające (ang. *silencers*) [168, 169, 175].

Większość pri-miRNA powstaje w wyniku reakcji katalizowanej przez Pol II i posiada cechy charakterystyczne dla produktów tego enzymu: 7-metyloguanozynę (kap) na końcu 5' i ogon poliadenylowy na końcu 3' [107, 176]. Wykazano również, że pewne miRNA wirusowe [177] oraz miRNA zlokalizowane w bliskim sąsiedztwie retrotranspozonów Alu [178, 179] powstają w procesie transkrypcji zależnej od Pol III.

System kontroli ekspresji genów miRNA na poziomie transkrypcji obejmuje szereg mechanizmów znanych dla genów eukariotycznych, tj.: regulację poprzez elementy działające w układzie *cis*, czynniki transkrypcyjne, koaktywatory i korepresory białkowe, a także modyfikacje epigenetyczne prowadzące między innymi do zmiany struktury chromatyny [168, 175, 180-183]. Ponadto transkrypcja przez Pol II jest fizycznie i funkcjonalnie powiązana z procesami dojrzewania transkryptów, np. modyfikacjami końców RNA (poliadenylacja, dodawanie struktury kap) czy składaniem mRNA [184-190].

Bardzo często ekspresja genów utrzymywana jest na odpowiednim poziomie dzięki działaniu mechanizmów sprzężeń, które pozwalają transkryptom danych genów zwrotnie wpływać na proces swojej biosyntezy. Ponieważ miRNA są bezpośrednio zaangażowane w regulację ekspresji genów, czyni je to szczególnie dobrze dostosowanymi do udziału w tego typu układach. Znane są liczne przykłady miRNA, które tworzą pętle regulatorowe z czynnikami transkrypcyjnymi, np. proces dojrzewania granulocytów w czerwonym szpiku kostnym człowieka kontrolowany jest między innymi poprzez szereg sprzężeń występujących pomiędzy genami kodującymi miR-223 i dwa czynniki transkrypcyjne: NFIA (ang. *nuclear factor I A*) i C/EBP $\alpha$  (ang. *CCAAT-enhancer-binding protein  $\alpha$* ) oraz produktami ekspresji tych genów [191]. NFIA i C/EBP $\alpha$  rywalizują o wiązanie w obrębie promotora genu kodującego miR-223, przy czym wywierają odmienny wpływ na jego transkrypcję: NFIA jest represorem, natomiast C/EBP $\alpha$  aktywatorem procesu. Podczas różnicowania granulocytów pod wpływem stymulacji kwasem retinowym, miR-223 prowadzi do obniżenia poziomu NFIA poprzez wyciszenie ekspresji kodującego go genu na poziomie transkrypcyjnym [45] i potranskrypcyjnym [191, 192]. W konsekwencji, inhibicja transkrypcji *MIR-233* przez NFIA zostaje zniesiona, a poziom dojrzałego miRNA w ludzkich komórkach macierzystych hemopoezy ulega podwyższeniu. To z kolei przekłada się na zahamowanie dojrzewania komórek prekursorowych w kierunku erytrocytów i monocytów, natomiast promuje granulocytopoezę [45, 192].

Ekspresja genów miRNA może również podlegać kontroli przez same miRNA [86, 89]. Interesujący mechanizm autoregulacji opisano w przypadku *lin-4*, który w komórkach nabłonkowych *C. elegans* funkcjonuje jako aktywator transkrypcji własnego genu [86]. Sekwencja *lin-4* znajduje się w obrębie dziewiątego intronu genu *f59g1.4* (funkcja tego genu nie jest do tej pory poznana). W początkowych etapach rozwoju nicienia, poziom komórkowy *lin-4* pozostaje niski, ponieważ ekspresja zachodzi jedynie z wykorzystaniem promotora *f59g1.4*, podczas gdy autonomiczna transkrypcja *lin-4*, możliwa dzięki drugiemu, alternatywnemu promotorowi, podlega represji przez dwa czynniki transkrypcyjne: FLH-1 and FLH-2 [193, 194]. Pod koniec pierwszej fazy larwalnej (L1) stężenie *lin-4* w komórce przekracza poziom krytyczny niezbędny do zainicjowania pozytywnego sprzężenia zwrotnego polegającego na tym, że *lin-4*, oddziałując z autonomicznym promotorem *lin-4*, promuje rekrutację Pol II

[86]. Wysokie stężenie lin-4 utrzymuje się przez kolejne stadia larwalne oraz w postaci dorosłej, zapewniając prawidłowy rozwój nicienia.

#### *I-4-2. Mechanizm powstawania prekursorów miRNA przy udziale rybonukleazy Drosha*

Większość pri-miRNA jest rozpoznawana i trawiona przez duży jądrowy kompleks białkowy zwany Mikroprocesorem [109, 195-197], który u człowieka ma masę ~650 kDa [195]. Podstawowymi białkami tego kompleksu są: Drosha oraz DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region gene 8*) oddziałujące ze sobą w stosunku 1:2 [195, 197, 198] (Rys. 1.3. A). Homologiem ludzkiego DGCR8 u *D. melanogaster* i *C. elegans* jest białko Pasha (ang. *partner of Drosha*) [196]. Drosha (~160 kDa) należy do rodziny RNaz III i wykazuje strukturalną oraz funkcjonalną zachowawczość ewolucyjną [199, 200]. Fragment aminowy białka zawiera sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signal*) [201], nie jest natomiast niezbędny do aktywności katalitycznej w warunkach *in vitro* [197]. Domena centralna (CED, ang. *central domain*) obejmuje domenę Platformy oraz domenę typu PAZ (ang. *Piwi-Argonaute-Zwille*) i odgrywa rolę w rozpoznawaniu substratów [202]. Centrum katalityczne enzymu tworzone jest przez wewnątrzcząsteczkowy dimer domen RNazy III (RIIIa i RIIIb) [197]. Na końcu karboksylowym białka znajduje się domena wiążąca dwuniciowy RNA (dsRBD, ang. *double-stranded RNA-binding domain*), która jest niezbędna, ale niewystarczająca dla zapewnienia stabilnego wiązania pri-miRNA [197]. Aktywność Drosha wspierana jest przez dwie cząsteczki DGCR8 (~90 kDa). Oddziałują one zarówno z Drosha, jak i z RNA, i w ten sposób stabilizują enzym, zwiększają jego procesywność oraz pozytywnie wpływają na precyzję i efektywność cięcia pri-miRNA [197, 198, 203, 204].

Poznanie struktury krystalicznej kompleksu Drosha z C-końcowymi helisami DGCR8 oraz wyniki badań biochemicznych pozwoliły zaproponować model funkcjonowania kompleksu Mikroprocesora [197, 198, 202, 205]. Zakłada on, że w pri-miRNA występuje jedna lub kilka struktur drugorzędowych typu spinki oraz jednoniciowe rejony oskrzydłające [205, 206]. Kompleks Mikroprocesora oddziałuje z pojedynczą strukturą typu spinki na całej jej długości, przy czym Drosha wiąże trzon i podstawę, a DGCR8 – część apikalną. Cięcie przez Drosha następuje ~11 nt powyżej

miejsca łączenia podstawy spinki i jednoniciowych rejonów oskrzydających. Domena RIIIa tnie po stronie 3', a domena RIIIb – po stronie 5' nici RNA, generując ~60-nt produkt z charakterystycznymi, asymetrycznymi końcami, tj. dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcu 3'.

Immunoprecypitacja chromatyny oraz badania kolokalizacji kompleksów białkowych wykazały, że kompleks Mikroprocesora pozostaje związany z DNA w pobliżu *loci* genów miRNA, a wycinanie pre-miRNA zachodzi kontrtranskrypcyjnie [190]. Stwierdzono również, że transkrypty, które pozostają związane z matrycą DNA podlegają efektywniejszemu dojrzewaniu niż pri-miRNA, których synteza już się zakończyła [207]. Co więcej, w rejonach, w których zlokalizowane są aktywne transkrypcyjnie geny miRNA, obserwuje się zagęszczenie nukleosomów, które mogą stanowić element spowalniający Pol II, a tym samym wydłużający czas retencji syntetyzowanego RNA w miejscu transkrypcji [208].

Wycinanie pre-miRNA przez kompleks Mikroprocesora jest fizycznie i funkcjonalnie powiązane z procesami dojrzewania typowymi dla transkryptów Pol II, tj. modyfikacjami końców oraz składaniem RNA (Rys. 1.2.). Wykazano, że podczas dodawania struktury kap na końcu 5' transkryptów, białko Ars2 (ang. *arsenite-resistance protein 2*) oddziałuje z jądrowym kompleksem wiążącym kap (CBC, ang. *cap-binding complex*) oraz z Drosha i pozytywnie wpływa na stabilność oraz cięcie wybranych pri-miRNA u *D. melanogaster* [184] oraz w proliferujących komórkach ssaczych [185]. Mechanizm działania Ars2 nie jest jeszcze w pełni poznany. Według zaproponowanych modeli, CBC i Ars2 mogą wspierać rekrutowanie pri-miRNA do kompleksu Mikroprocesora lub zwiększać efektywność i precyzję cięcia substratów. Takie mechanizmy działania opisano dla białka SERRATE, będącego roślinnym homologiem Ars2 [209, 210].

W sytuacji, gdy pri-miRNA stanowi fragment pierwotnego transkryptu genu kodującego białko, cięcie przez kompleks Mikroprocesora jest powiązane z dojrzewaniem pre-mRNA (Rys. 1.2. c) Kompetycja pomiędzy kompleksem Mikroprocesora a spliceosomem oraz tkankowo-specyficzne alternatywne składanie mRNA regulują powstawanie miRNA kodowanych w egzonach lub na granicy intron/egzon [186-188]. W przypadku miRNA intronowych, do cięcia przez Drosha

dochodzi przed rozpoczęciem składania mRNA [189, 190], a obecność oskrzydlających egzonów zwiększa efektywność wycinania pre-miRNA [207].

Struktura pri-miRNA jest kluczowa dla swoistego oddziaływania z kompleksem Mikroprocesora [198, 205, 206, 211-215], stąd jej zmiany, indukowane hybrydyzacją komplementarnej nici kwasu nukleinowego i/lub przyłączeniem cząsteczki białka, stanowią podstawę mechanizmów regulujących ten etap biogenezy miRNA [216-225].

Około 79% ludzkich pri-miRNA zawiera przynajmniej jeden z trzech motywów sekwencyjnych: UG u podstawy spinki, UGU w pętli apikalnej, CNNC w jednoniciowym rejonie flankującym (16-18 nt poniżej miejsca cięcia przez Drosha) [213]. Zapewniają one prawidłową orientację substratów, co przekłada się na precyzję i efektywność cięcia [198, 212, 213]. W pri-miRNA stwierdzono również nadreprezentację motywu GGAC, w obrębie którego może dochodzić do metylacji atomu azotu w pozycji 6. pierścienia purynowego adeniny (m6A). Modyfikacja ta promuje wiązanie DGCR8 *in vitro* [226]. Wyniki analiz metylomu RNA sugerują, że m6A może stanowić znacznik umożliwiający kompleksowi Mikroprocesora odróżnienie pri-miRNA od innych RNA przyjmujących strukturę typu spinki obecnych w jądrze [226].

Systematyczne badania modelowych pri-miRNA oraz ich mutantów ze zmienioną strukturą drugorzędową wykazały, że dla prawidłowego dojrzewania miRNA kluczowe znaczenie mają: długość trzonu spinki (33-35 pz) oraz wielkość i labilność konformacyjna pętli apikalnej ( $\geq 10$  nt) [206, 212, 227]. Ponadto rozgałęzienie pomiędzy podstawą trzonu spinki a rejonami oskrzydlającymi stanowi główny punkt odniesienia determinujący lokalizację miejsca cięcia przez Drosha [205, 206, 211].

Struktura trzeciorzędowa pierwotnych transkryptów wydaje się szczególnie istotna w przypadku zgrupowań genów miRNA kotranskrybowanych w postaci długich, policistronowych RNA [214, 215]. Badania pri-mir-17~92 wykazały, że przyjmuje on zwartą, globularną strukturę, która determinuje tempo dojrzewania poszczególnych miRNA [214]. Prekursory wyeksponowane na zewnątrz transkryptu są wycinane o wiele szybciej i efektywniej, a ich poziom w komórce jest wyższy niż prekursorów zinternalizowanych, które najprawdopodobniej są degradowane przez kompleks egzozomu lub egzozukleazę Xrn2.

Analiza filogenetyczna 533 ludzkich pri-miRNA wykazała, że ~14% z nich charakteryzuje się wysoce konserwatywną strukturą pierwszorzędową pętli apikalnej, co sugeruje, że rejon ten może stanowić istotną platformę dla oddziaływania z różnorodnymi regulatorami [216]. Do tej pory zidentyfikowano szereg białek, które, oddziałując z pętlą apikalną pri-miRNA, pozytywnie [216-218, 221, 228] lub negatywnie [219, 220, 222] wpływają na wiązanie i cięcie transkryptów przez kompleks Mikroprocesora. Przykładem takiego białka jest heterogenna jądrowa rybonukleoproteina A1 (hnRNP A1, ang. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1*), która promuje dojrzewanie np. miR-18 [221]. Szczegółowe badania funkcjonalne i strukturalne wykazały, że oddziaływanie hnRNP A1 z rejonem apikalnym prekursora miR-18a prowadzi do relaksacji trzonu spinki i umożliwia efektywniejsze cięcie przez Drosha [216, 229]. Co więcej, pre-mir-18 jest jedynym spośród sześciu pre-miRNA wycinanych z pri-mir-17~92, który podlega regulacji przez hnRNP A1 [221]. To samo białko może również hamować dojrzewanie innych miRNA, np. w ludzkich komórkach somatycznych istnieje negatywna korelacja pomiędzy poziomem hnRNP A1 i let-7a-1 [222]. Badania *in vitro* wykazały, że hnRNP A1 wiąże się do pętli apikalnej pri-mir-let-7a-1 i hamuje jego cięcie przez Drosha [222]. *In vivo*, obserwowany efekt inhibitorowy może wynikać nie tylko z niekorzystnej zmiany struktury RNA indukowanej wiązaniem hnRNP A1, ale także z kompetycji pomiędzy hnRNP A1 a czynnikami stymulującymi aktywność kompleksu Mikroprocesora, między innymi z KSRP (ang. *KH-type splicing regulatory protein*).

Obok czynników białkowych istotną rolę regulatorową odgrywają również cząsteczki RNA, które, hybrydując do komplementarnych rejonów w obrębie pri-miRNA, indukują zmiany struktury tych transkryptów i/lub rekrutują dodatkowe białka, uniemożliwiając w ten sposób oddziaływanie pri-miRNA z kompleksem Mikroprocesora. Taki mechanizm kontroli potranskrypcyjnej opisano dla mysiego pri-mir-15a/16-1 oraz ludzkiego pri-mir-195, które podlegają regulacji przez, odpowiednio, miR-709 [223] oraz lncRNA Uc.283+A [224]. Zależność pomiędzy miR-15a/16-1 oraz miR-709 może ponadto wskazywać na istnienie w obrębie miRNA hierarchicznej kontroli, podobnej do tej, jaka reguluje aktywność kinaz tworzących kaskady fosforylacji w szlakach sygnałowych [230] lub do hierarchii czynników transkrypcyjnych tworzących rozbudowane sieci oparte na wzajemnych sprzężeniach [231]. Dodatkowo, w komórkach *C. elegans* zidentyfikowano zjawisko pozytywnej

autoregulacji, której podlega *let-7* [225]. Dojrzały miRNA w kompleksie z białkiem z rodziny Argonaute, ALG-1 (ang. *Argonaute like gene 1*) wiąże się do komplementarnego fragmentu w obrębie rejonu oskrzydłającego po stronie 3' pri-*let-7* i stymuluje dojrzewanie transkryptu według nieznanego jeszcze mechanizmu.

Oprócz struktury pierwotnych transkryptów, istotne znaczenie dla przebiegu jądrowego etapu dojrzewania miRNA mają mechanizmy związane z działaniem czynników wpływających na biosyntezę, lokalizację komórkową oraz aktywność Drosha i DGCR8. Stężenia Drosha i DGCR8 utrzymywane są na stałym poziomie między innymi dzięki mechanizmowi regulatorowemu, który polega na tym, że DGCR8, oddziałując z Drosha, stabilizuje enzym, natomiast Drosha destabilizuje pre-mRNA *DGCR8*, tnąc transkrypt w obrębie egzonu 2 [232]. Wydaje się, że to sprzężenie zwrotne jest kluczowe dla utrzymania takiego stężenia kompleksu Mikroprocesora, które zapewnia efektywne cięcie pri-miRNA, a jednocześnie minimalizuje efekty uboczne w postaci niespecyficznego cięcia innych RNA o strukturze typu spinki [233].

Formowanie się i aktywność kompleksu Mikroprocesora zależą również od modyfikacji potranslacyjnych tworzących go białek [201, 234-236]. Fosforylacja Drosha w pozycjach S300/S302 jest niezbędna dla zapewnienia lokalizacji jądrowej białka [201], natomiast acetylacja lizyn na końcu aminowym Drosha, chroni białko przed ubikwitynacją i degradacją [235]. Z kolei deacetylacja DGCR8 przez deacetylazę histonów 1 (HDAC1, ang. *histone deacetylase 1*) zwiększa jego powinowactwo do pri-miRNA [236].

Liczba znanych czynników, które pośrednio lub bezpośrednio wpływają na aktywność kompleksu Mikroprocesora wciąż rośnie. Do białek, które wiążą się do kompleksu i stymulują cięcie pewnych pri-miRNA należą między innymi helikazy: p68 i p72 [237]. Ich rola w procesie dojrzewania miRNA nie jest do końca wyjaśniona. Być może aktywność helikazowa obu enzymów indukuje korzystne zmiany struktury pri-miRNA lub prowadzi do wyparcia białek inhibitorowych związanych z RNA. Udowodniono natomiast, że p68 i p72 pośredniczą w wiązaniu do kompleksu Mikroprocesora innych białek regulatorowych, w tym p53 [238] oraz białek z rodziny SMAD [239, 240].



#### *1-4-3. Eksport prekursora miRNA z jądra do cytoplazmy*

Jednym z etapów biogenezy RNA w komórkach eukariotycznych jest na ogół eksport RNA z jądra do cytoplazmy. Cząsteczki RNA, podobnie jak inne biomolekuły i kompleksy o masie >40 kDa, transportowane są przez pory jądrowe dzięki specyficznym receptorom, karioferynom [241]. Głównym białkiem odpowiedzialnym za translokację pre-miRNA jest Eksporyna 5 (Exp5), która działa we współpracy z guanozynotrifosfatazą Ran (ang. *Ras-related nuclear protein*) [110, 111, 242-245] (Rys. 1.3. B). Gradient Ran•GTP/Ran•GDP, tworzony po obu stronach błony jądrowej, zapewnia właściwy kierunek transportu. W jądrze, gdzie stężenie Ran•GTP jest wyższe, Exp5 wiąże pre-miRNA. Tetrameryczny kompleks Exp5•Ran•GTP•pre-miRNA przechodzi do cytoplazmy, gdzie, w następstwie hydrolizy GTP do GDP, pre-miRNA jest uwalniany, a białka oddysocjują od siebie [243]. Związanie pre-miRNA przez Exp5 nie tylko warunkuje transfer RNA z jądra, ale prawdopodobnie również chroni pre-miRNA przed degradacją przez nukleazy [111].

Badania krystalograficzne kompleksu Exp5•Ran•GTP•pre-miR-30a wykazały, że Exp5 przyjmuje kształt dłoni, wewnątrz której wiązany jest RNA [242]. Koniec karboksylowy białka odpowiada kciukowi, natomiast koniec aminowy – pozostałym palcom. Wewnętrzna, wklęsła strona białka ma charakter silnie zasadowy i oddziałuje z resztami fosforanowymi w trzonie spinki RNA. Dodatkowo, pre-miRNA zakotwiczone jest w strukturze białka dzięki wiązaniom wodorowym i oddziaływaniom jonowym pomiędzy wystającym końcem 3' RNA a resztami aminokwasów tworzących dodatnio naładowany tunel u podstawy kciuka [242]. Ponieważ w większość (siedem na dziewięć) oddziaływań pomiędzy białkiem a końcem 3' RNA zaangażowane są atomy szkieletu cukrowcowo-fosforanowego RNA, a nie atomy zasad azotowych, wiązanie RNA przez Exp5 zachodzi w sposób niezależny od sekwencji kwasu nukleinowego [242]. Model ten jest spójny z wynikami wcześniejszych analiz biochemicznych, które wskazywały, że Exp5 wiąże całe spektrum RNA (oprócz pre-miRNA, także mRNA *DICER1*, RNA wirusowe, tRNA) rozpoznając ich strukturę drugorzędową niezależnie od sekwencji nukleotydów [244, 246]. Wykazano, że RNA transportowanymi przez Exp5 są cząsteczki posiadające motyw minihelisy o długości >14 pz oraz wystający, wolny koniec 3' (1-8 nt) [244, 246]. Obecność wystającego końca 5' wyklucza wiązanie RNA przez ten receptor [244].

Mimo że eksport jądrowy jest etapem ograniczającym szybkość powstawania miRNA w komórce [247], niewiele wiadomo na temat jego regulacji. Jak wspomniano wcześniej, transport RNA przez Exp5 jest bezwzględnie zależny od Ran•GTP [110, 111, 242-244]. Symulacje dynamiki molekularnej wolnej Exp5 oraz jej kompleksów z Ran•GTP i/lub RNA wykazały, że struktura apo-Exp5 jest niezwykle labilna (szczególnie na końcach), i usztywnia się dopiero po związaniu kofaktora [243]. Zmiany konformacji Exp5, indukowane przyłączeniem Ran•GTP, promują późniejsze związanie RNA. Ran•GTP oddziałuje również bezpośrednio z pre-miRNA, co na etapie załadunku w jądrze stabilizuje kompleks, natomiast w cytoplazmie ułatwia uwolnienie RNA [248]. W komórkach jedwabnika morwowego, *Bombyx mori*, w trakcie infekcji wirusem BmNPV (ang. *Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus*) poziom ekspresji *Ran* podlega potranskrypcyjnej represji przez wirusowy *bmnpv-miR-1* [249]. Obniżenie poziomu *Ran* w komórce, powoduje zahamowanie biogenezy miRNA, w tym tych zaangażowanych w odpowiedź przeciwwirusową, np. *miR-8*, co w konsekwencji umożliwia namnażanie BmNPV.

Wykorzystując model myszy wykazano, że w komórkach aktywnych proliferacyjnie oraz aktywowanych limfocytach T, ekspresja genu kodującego Exp5 (*Xpo5*) podlega indukcji podczas przejścia z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego, a gwałtowne podwyższenie poziomu Exp5 wynika z regulacji potranskrypcyjnej zależnej od kinazy fosfatydyloinozytolu, PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*) [250]. Opisano również transkrypcyjną aktywację ekspresji *Xpo5* w odpowiedzi na działanie steroidowych hormonów płciowych na komórki macicy myszy [251]. W obu przypadkach, konsekwencją jest globalne podwyższenie poziomu miRNA. Ponadto, w ludzkich komórkach nowotworów charakteryzujących się niestabilnością mikrosatelitarną, zidentyfikowano mutacje inaktywujące *XPO5* i zaburzające eksport pre-miRNA do cytoplazmy [252]. Exp5 powstająca w tych komórkach ma skrócony koniec karboksylowy; zachowuje zdolność oddziaływania z Ran•GTP, ale nie jest w stanie rozpoznać i trwale wiązać pre-miRNA. W ostatnim czasie dowiedziono również, że fosforylacja Exp5 przez kinazę ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) prowadzi do reorganizacji struktury białka i obniża jego zdolność do wiązania pre-miRNA w komórkach raka wątrobowokomórkowego (HCC, ang. *hepatocellular carcinoma*) [253]. Dodatkowo, w komórkach zainfekowanych adenowirusem typu 5 odkryto mechanizm regulatorowy polegający na kompetycji pomiędzy pre-miRNA,

wirusowym RNA VA1 oraz mRNA *DICER1* [254]. W następstwie wysycenia Exp5 wirusowym RNA dochodzi do zaburzenia transportu pre-miRNA i transkryptu *DICER1* do cytoplazmy, a w konsekwencji, do zahamowania dojrzewania większości miRNA [254, 255].

#### *I-4-4. Etap cytoplazmatyczny biogenezy miRNA – cięcie pre-miRNA przez rybonukleazę Dicer*

Końcowy etap biogenezy miRNA zachodzi w cytoplazmie, gdzie cząsteczki pre-miRNA są rozpoznawane i cięte do formy dojrzałego miRNA przez rybonukleazę Dicer [256]. Rozpatrując interakcje Dicer z pre-miRNA, należy wyraźnie rozgraniczyć dwa etapy: wiązanie i cięcie [257]. Zarówno wyniki badań biochemicznych prowadzonych *in vitro* [258], jak i obrazownia z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej [259] wskazują, że efektywność cięcia nie jest wprost zależna od powinowactwa enzymu do substratu. Na oba parametry wpływają: sekwencja i struktura drugorzędowa pre-miRNA [257, 258, 260-263] oraz aktywność kofaktorów i innych czynników oddziałujących z RNA i/lub z Dicer [264]. W porównaniu do jądrowego etapu dojrzewania miRNA, podczas którego funkcjonowanie Drosha jest pozytywnie stymulowane przez różnorodne białka, regulacja na etapie cytoplazmatycznym wydaje się bazować przede wszystkim na inhibicji aktywności Dicer. Odrębny poziom regulacji biogenezy miRNA tworzą mechanizmy wpływające na ekspresję genu Dicer oraz lokalizację funkcjonalnego białka w komórce.

##### *I-4-4-1. Rybonukleaza Dicer*

Rybonukleaza Dicer, podobnie jak Drosha, należy do rodziny RNaz III i katalizuje cięcie dwuniciowych cząsteczek RNA do 5'-fosfomonoesterów, pozostawiając dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3'. Dicer występuje przede wszystkim w cytoplazmie, w strefie okołojądrowej [257, 265], gdzie odpowiada za dojrzewanie siRNA oraz miRNA, trawiąc ich prekursorów do ~19-27-nt dsRNA [256, 257], które następnie przekazuje do kompleksu RISC [37, 46, 266-268]. Dodatkowo substratami enzymu mogą być także snoRNA [138, 269], tRNA [270] oraz transkrypty

powtórzeń Alu [271-273]. Jak wykazano w komórkach mysich, akumulacja transkryptów powórzeń Alu, do której dochodzi w wyniku mutacji zaburzających funkcjonowanie enzymu, jest cytotoksyczna i prowadzi do degradacji siatkówki [271, 272]. Obecność Dicer stwierdzono również w jądrze komórkowym, gdzie enzym ten zaangażowany jest w transkrypcyjną regulację ekspresji genów [80, 274-276] oraz degradację potencjalnie niebezpiecznych transkryptów ruchomych elementów genetycznych [271] i dsRNA powstającego z nachodzących na siebie jednostek transkrypcyjnych [277]. Podstawy molekularne transportu Dicer pomiędzy jądrem a cytoplazmą nie są w pełni poznane. Badania w liniach komórek HeLa wykazały, że dsRBD Dicer może funkcjonować jako atypowy NLS rozpoznawany przez importyny  $\beta$  [278]. W pełnej długości białku, NLS dsRBD jest najprawdopodobniej maskowany przez inne domeny lub nieznaną jeszcze czynnik białkowy. Wyniki badań w systemie heterokarionowym wykazały, że Dicer może być transportowana pomiędzy kompartmentami komórkowymi, co wskazuje na istnienie w obrębie białka również sygnału eksportu jądrowego [278]. Translokację Dicer do jądra stwierdzono także w ludzkich i mysich liniach komórkowych oraz w *C. elegans* w następstwie odwracalnej fosforylacji Dicer po aktywacji ścieżki sygnałowej Ras [279, 280].

Wykazano również, że podczas apoptozy w komórkach ludzkich hodowanych *in vitro* [281, 282] i w komórkach *C. elegans* [283] Dicer podlega proteolitycznemu cięciu w wyniku aktywności specyficznych kaspaz. Powstający w tym procesie fragment białka, obejmujący u *C. elegans* część domeny RIIIa i domenę RIIIb, pełni w komórkach nicienia funkcję deoksyrybonukleazy, która inicjuje degradację DNA, przyczyniając się do propagowania apoptozy [283]. Do tej pory brak jednak dowodów na to, że fragment uwalniany z ludzkiej Dicer może pełnić podobną rolę i również uczestniczyć we fragmentacji chromosomów.

Homologi Dicer występują powszechnie wśród eukariontów, nie są natomiast obecne u bakterii i archeonów. Analizy filogenetyczne wskazują, że gen Dicer uległ duplikacji na wczesnych etapach ewolucji eukariontów, a następnie podlegał niezależnej dywersyfikacji u roślin, zwierząt i grzybów. Procesy te zbiegły się w czasie z pojawieniem się potrzeby bardziej złożonej kontroli ekspresji genów w związku z rozwojem w tych królestwach organizmów wielokomórkowych [284, 285]. Proces dywergencji doprowadził do wykształcenia się u roślin czterech rodzajów białek typu

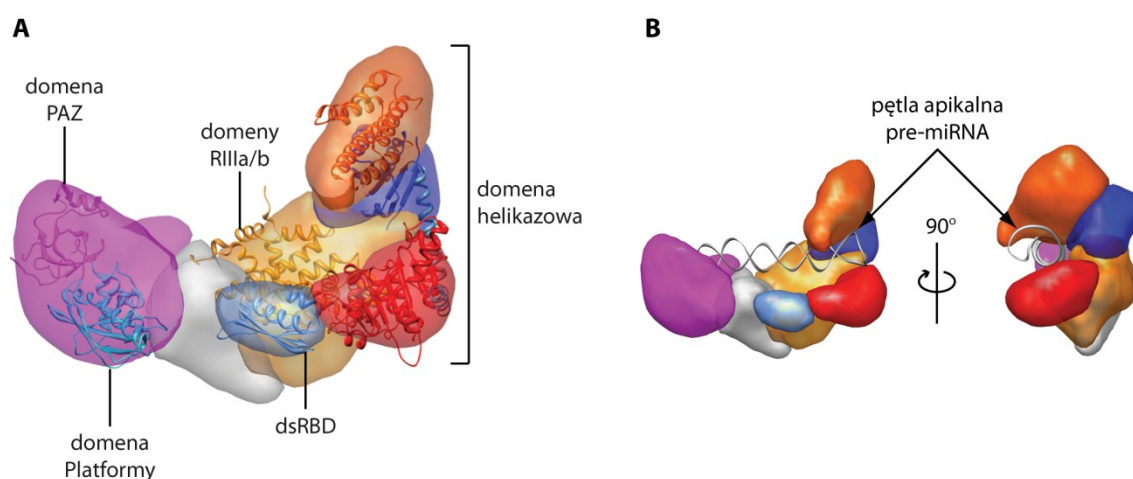
Dicer (DCL, ang. *Dicer-like proteins*): DCL-1, DCL-2, DCL-3 i DCL-4, natomiast u zwierząt – Dicer-1 i Dicer-2. Co więcej, gen kodujący Dicer-2, czyli białko zaangażowane w odpowiedź przeciwwirusową m.in u owadów, nie został zidentyfikowany w tych liniach ewolucyjnych zwierząt, w których rozwinęły się alternatywne mechanizmy obronne (np. u kręgowców) lub nie występuje presja środowiskowa w związku z ograniczoną liczbą naturalnych patogenów (np. u nicieni) [285].

#### 1-4-4-1-1. Budowa i model funkcjonowania Dicer

Dicer jest wielodomenowym białkiem o wysoce konserwatywnej budowie. Z powodu dużych trudności w jego krystalizacji, obecnie znana jest pełna struktura jedynie białka pochodzącego z wiciowca *Giardia intestinalis* [286]. Przyjmuje się, że Dicer z *G.intestinalis* reprezentuje najprawdopodobniej minimalny, konieczny do funkcjonowania trzon wspólny dla wszystkich enzymów tego typu. Jest to stosunkowo małe białko (~82 kDa), posiadające domenę PAZ oraz dwie domeny RNazy III (RIIIa i RIIIb). Cząsteczka białka o długości ~100 Å i szerokości ~30-50 Å przypomina swoim kształtem topór, gdzie dwie domeny RNazowe tworzą ostrze, a domena PAZ – podstawę uchwytu. Pomiedzy nimi biegnie długa helisa  $\alpha$ , zwana helisą łączącą (ang. *connector helix*), która, jak się przypuszcza, determinuje długość generowanego przez enzym produktu. Helisę łączącą otacza N-końcowa część białka składająca się z arkuszy  $\beta$  i trzech helis  $\alpha$ , razem tworzących dodatnio naładowaną domenę Platformy (ang. *platform domain*). Tylną część ostrza stanowi domena mostkująca (ang. *bridging domain*), będąca helisą łączącą obie domeny RNazowe [287].

W porównaniu do rybonukleazy z *G. intestinalis*, ortologi Dicer zidentyfikowane u wyższych eukariontów charakteryzują się bardziej złożoną budową. U człowieka występuje jedna izoforma Dicer o masie ~220 kDa zbudowana z: N-końcowej domeny helikazowej (homologicznej do helikaz DExD/H-box), domeny o nieznanym funkcji – DUF283 (ang. *domain of unknown function 283*), domeny Platformy i PAZ, dwóch domen RNazy III (RIIIa i RIIIb) oraz C-końcowej dsRBD [256, 286-289] (Rys. 1.3. C). Do tej pory poznano jedynie struktury krystaliczne wyizolowanych fragmentów białka: domeny RIIIb [290], polipeptydu o długości 300

aminokwasów, obejmującego Platformę i PAZ wraz z rejonami oskrzydłującymi [291] oraz zaangażowanej w oddziaływanie z partnerami białkowymi, środkowej części domeny helikazowej (132 aminokwasy) [292]. Dodatkowo, wykorzystując mikroskopię elektronową, uzyskano informacje na temat ułożenia poszczególnych domen względem siebie [259, 266, 293-295]. W połączeniu z wynikami badań biochemicznych, pozwoliło to zaproponować model budowy i funkcjonowania ludzkiej Dicer (Rys. 1.4.). Zgodnie z nim cząsteczka enzymu o długości  $\sim 160$  Å i szerokości  $\sim 115$  Å przypomina kształtem literę „L”, z tandemem domen RNazy III u podstawy oraz domeną PAZ na przeciwnym końcu. Badania strukturalne wskazują na dynamizm konformacyjny Dicer podczas interakcji z substratem [259, 295]. Jest to zjawisko analogiczne do indukowanego dopasowania opisywanego dla miejsc aktywnych niektórych enzymów. Ze względu na rozmiar substratów ( $>80$  Å), zmiana konformacji obejmuje całą cząsteczkę białka, a znaczna elastyczność enzymu umożliwia wiązanie RNA o zróżnicowanej strukturze. Wiodącą rolę w oddziaływaniu z substratem odgrywa domena PAZ, która rozpoznaje i wiąże 2-nt wystający koniec 3' [289, 296, 297]. Grupa fosforanowa na końcu 5' RNA dokowana jest w kieszeni tworzonej w obrębie



**Rysunek 1.4. Struktura ludzkiej rybonukleazy Dicer**

**A** – Topologia ludzkiej Dicer określona za pomocą mikroskopii elektronowej. W strukturze białka wskazano lokalizację poszczególnych domen: PAZ i Platformy (obszar fioletowy), obu RNazy III (żółty), dsRBD (jasnoniebieski) oraz trzech subdomen składających się na domenę helikazową (pomarańczowy, ciemnoniebieski, czerwony). W obrębie domen dokonano dokowania znanych struktur homologów (model wstęgowy). **B** – Reprezentacja modelu kompleksu Dicer i pre-miRNA. Reprodukacja za zgodą © Macmillan Publishers Ltd.) [293]

Platformy i PAZ [291]. Wiązanie prekursora wspierane jest także przez dsRBD [289, 298, 299]. Ponadto domena helikazowa zaangażowana jest w oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA, co umożliwia dopasowanie substratu do centrum katalitycznego oraz pozwala na dyskryminację pomiędzy substratami [259, 263, 298, 300]. Domena helikazowa odgrywa również rolę regulatorową, służąc jako platforma kontaktu z białkami modulującymi aktywność Dicer [265, 301]. Badania *in vitro* wykazały, że usunięcie tej domeny zwiększa procesywność enzymu, co wskazuje na jej zdolność do autoinhibicji funkcjonowania Dicer [302]. Dicer posiada pojedyncze centrum katalityczne tworzone przez wewnątrzcząsteczkowy heterodimer domen RNazowych [289], które jednak działają niezależnie od siebie [303]. Domena RIIIa jest większa od RIIIb i hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w obrębie ramienia 3' prekursora [289], odpowiednio – RIIIb tnie ramię 5' prekursora. Produktem hydrolizy jest dupleks RNA z dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcu 3' i grupą fosforanową na końcu 5' [289, 304]. Długość generowanego produktu (~21 pz) determinowana jest przez odległość pomiędzy domeną PAZ a centrum katalitycznym enzymu. Funkcja domeny DUF283 nie została jeszcze jednoznacznie wyjaśniona. Badania *in vitro* izolowanej domeny wykazały jej zdolność do wiązania ssRNA oraz wspierania hybrydyzacji komplementarnych nici kwasów nukleinowych, co mogłoby wskazywać na funkcje opiekuńcze Dicer [305]. Ponadto sugeruje się zaangażowanie DUF283 w oddziaływanie z białkami regulującymi aktywność Dicer [306].

#### *1-4-4-1-2. Regulacja ekspresji genu kodującego ludzką Dicer*

Lokalizacja chromosomowa i struktura genów Dicer różnią się w zależności od gatunku. U człowieka, *DICER1* (ENSG00000100697) znajduje się na długim ramieniu chromosomu 14, w rejonie subtelomerowym (14q32.13). *DICER1* uznawany jest za gen metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gen*), choć w porównaniu do innych genów tego typu charakteryzuje się znacznie dłuższym rejonem 3'UTR (>4000 bp) [307]. Ekspresja *DICER1* podlega dynamicznej regulacji poprzez mechanizmy wpływające na: transkrypcję genu [145, 146, 308-312], dojrzewanie mRNA [313-315] i jego transport do cytoplazmy [254], translację [307, 313, 314, 316, 317] i stabilność białka [318, 319].

### Transkrypcja *DICER1*

Transkrypcyjna kontrola ekspresji *DICER1* obejmuje: modyfikacje epigenetyczne [145, 146], wybór alternatywnych miejsc promotorowych [311, 312] i sygnałów poliadenylacji [320, 321], a także regulację przez czynniki działające w układzie *trans* [308-310]. Na poziomie epigenomu, o tempie transkrypcji decyduje kompetycja pomiędzy demetylazami histonów: KDM6A i KDM6B a metyltransferazą histonów, EZH2 rezydującymi w obrębie locus *DICER1* [145, 146]. KDM6A/B są dioksygenazami zależnymi od Fe (II) i kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego [322, 323]. W stanie hipoksji, w komórkach nowotworowych ich aktywność podlega inhibicji, co skutkuje hipermetylacją promotora *DICER1* i wyciszeniem ekspresji genu [145, 146]. Prowadzi to do globalnej redukcji poziomu miRNA i promuje tranzycję nabłonkowo-mezenchymalną warunkującą powstawanie przerzutów [145, 146].

Niewiele wiadomo na temat specyficznych czynników transkrypcyjnych koordynujących ekspresję *DICER1*. Znane są jedynie nieliczne przykłady tego typu regulacji, np. podczas różnicowania komórek grzebienia nerwowego w melanocyty, białko MITF (ang. *microphthalmia-associated transcription factor*), czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią, stymuluje transkrypcję *DICER1* [309]. Analizy bioinformatyczne w połączeniu z immunoprecypitacją chromatyny wykazały, że MITF oddziałuje z DNA ~2 kb powyżej miejsca startu transkrypcji *DICER1* [309]. Ekspresja *DICER1* podlega również pozytywnej regulacji przez SOX4 (ang. *Sry-related high mobility group box 4*), białko należące do rodziny czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w koordynację embriogenezy [308]. Badania *in vitro* sugerują, że zależna od SOX4 ekspresja *DICER1* jest jednym z mechanizmów ograniczających inwazyjność komórek czerniaka skóry [308]. W obrębie rejonu promotorowego *DICER1* zidentyfikowano również sekwencje rozpoznawane przez p53, p63 i p73, znane czynniki transkrypcyjne o własnościach supresorów nowotworowych, które potencjalnie mogą hamować transkrypcję *DICER1* [310].

Znane są cztery warianty mRNA kodujące Dicer pełnej długości (1922 aminokwasów) [311, 312]. Zostały one wyizolowane z szeregu zdrowych tkanek ludzkich. Szczegółowe badania tych transkryptów wykazały znaczne zróżnicowanie strukturalne rejonu 5'UTR, wynikające zarówno z wyboru odmiennych miejsc startu transkrypcji, jak i z alternatywnego składania pre-mRNA [311, 312]. Ponieważ rejon



5'UTR zawiera sekwencje *cis*-regulatorowe, jego organizacja wpływa w istotny sposób na efektywność procesu translacji oraz tkankowo-specyficzny wzór ekspresji Dicer [311, 312]. Ponadto w pełni zróżnicowanych komórkach nabłonkowych oraz w szeregu linii komórek nowotworowych zidentyfikowano skrócone transkrypty *DICER1* powstające w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA [313-315]. Część z nich koduje polipeptydy obejmujące jedynie N- lub C-końcowy fragment Dicer, a niektóre z nich są transkryptami niekodującymi białko. Oprócz tego znane są cztery antysensowne transkrypty *DICER1* o długości od ~720 do ~2300 nt (ENST00000439819, ENST00000435343, ENST00000439999, ENST00000554631). Ich funkcja nie została jeszcze wyjaśniona. Niewykluczone, że pełnią one rolę regulatorową podobną do tej, jaką zaproponowano dla innych lncRNA tego typu [324].

#### *Regulacja potranskrypcyjna ekspresji DICER1*

Poziom mRNA *DICER1* nie koreluje z poziomem dojrzałego białka, co wskazuje na istotny udział mechanizmów potranskrypcyjnych w regulacji ekspresji tego genu [325]. Transport mRNA *DICER1* do cytoplazmy, przynajmniej częściowo, jest zależny od Exp5. Badania *in vitro* oraz immunoprecypitacja usieciowanych kompleksów RNA•białko potwierdziły bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy Exp5 i mRNA *DICER1* [254], a zahamowanie ekspresji *XPO5* powoduje akumulację transkryptów *DICER1* w jądrze komórkowym [254].

Ekspresja *DICER1* może podlegać wyciszaniu indukowanemu przez produkty generowane przez Dicer. W obrębie rejonu 3'UTR transkryptów *DICER1* zidentyfikowano miejsca oddziaływania dla szeregu miRNA, w tym: miR-103/107 [307, 313, 314], miR-192 [316] oraz miRNA z rodziny let-7 [314, 317]. Te ostatnie wiążą się do transkryptu również w części kodującej sekwencję białka [317]. Co więcej, w wielu typach komórek nowotworowych wykorzystywane są alternatywne sygnały poliadenylacji, co prowadzi do powstania transkryptów ze skróconym rejonem 3'UTR, pozbawionym części miejsc rozpoznawanych przez miRNA [320, 321]. W efekcie, synteza białka na tych matrycach zachodzi kilkukrotnie wydajniej niż w przypadku mRNA pełnej długości [320].

### Modyfikacje potranslacyjne Dicer

Modyfikacje potranslacyjne wpływają na właściwości fizyko-chemiczne białka, determinując jego stabilność i aktywność. Jak wspomniano wcześniej, w ludzkich i mysich liniach komórkowych oraz w *C. elegans* wykazano, że Dicer podlega fosforylacji w obrębie domen: RIIIb i dsRBD, co hamuje aktywność enzymu i powoduje jego translokację do jądra komórkowego [279, 326]. Za tę modyfikację odpowiadają kinazy serynowo-treoninowe aktywowane mitogenami [279, 280]. Co więcej, badania *in vivo* wykazały, że zależna od fosforylacji inhibicja Dicer jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu oogenezy u *C. elegans* [279]. Z kolei defosforylacja enzymu zachodzi tuż przed zapłodnieniem oocytu i jest konieczna dla prawidłowego przebiegu embriogenezy [279]. Znaczenie fosforylacji w przypadku ludzkiej Dicer nie zostało jeszcze wyjaśnione. Ponadto stwierdzono, że w makrofagach pęcherzyków płucnych, w wyniku ekspozycji na dym tytoniowy, dochodzi do sumoilacji Dicer, co zaburza aktywność enzymu i prowadzi do deregulacji poziomów miRNA [327]. Badania *in vitro* w ludzkich komórkach HEK293 wykazały również, że Dicer przechodzi przez siateczkę śródplazmatyczną, gdzie podlega *N*-glikozylacji [318]. Modyfikacja ta może mieć znaczenie dla prawidłowego fałdowania oraz stabilności białka.

Homeostaza Dicer wymaga również obecności w komórce mechanizmów degradacji białka. Wykazano, że w komórkach ludzkich Dicer oraz AGO2, w stanie wolnym, tj., gdy nie wiążą RNA, podlegają selektywnej makroautofagii. W proces ten zaangażowane jest białko NDP52 (ang. *nuclear dot 52 kDa protein*), które oddziałuje z cząsteczkami przeznaczonymi do degradacji oraz z receptorem Atg8 (ang. *autophagy-related protein 8*) obecnym w błonie pęcherzyka autofagosomalnego. Nie jest jednak jasne, jaki mechanizm prowadzi do mikroautofagii Dicer [319], NDP52 może bowiem oddziaływać zarówno z białkami niemodyfikowanymi, jak również poddanymi ubikwitynacji (co jest częstym znacznikiem kierującym białka do proteasomu) [328]. Degradacja Dicer w sposób zależny od kompleksu ligazy ubikwityny CRL4 (ang. *cullin-ring finger ligase-4*) obserwowana jest za to w makrofagach w trakcie infekcji wirusem HIV-1 [329]. W proces ten zaangażowane jest wirusowe białko R, które oddziałuje z Dicer i rekrutuje kompleks modyfikujący rybonukleazę.

#### I-4-4-1-3. Regulacja aktywności Dicer

Mimo że Dicer jest zdolna samodzielnie ciąć pre-miRNA *in vitro*, w warunkach komórkowych funkcjonuje ona w formie kompleksów białkowych, w których jej aktywność wspierana jest przez inne białka wiążące dsRNA (dsRBP, ang. *dsRNA-binding protein*). U człowieka podstawowymi partnerami Dicer są dwa strukturalnie podobne białka: TRBP (ang. *HIV-1 transactivating response RNA-binding protein*) i PACT (ang. *protein activator of protein kinase R*) [47, 330, 331]. TRBP pierwotnie zidentyfikowano jako endogenny czynnik wspierający replikację wirusa HIV-1, między innymi poprzez inhibicję indukowanej przez interfeferon białkowej kinazy R (PKR, ang. *protein kinase R*) [332, 333]. Z kolei PACT jest aktywatorem działania tej kinazy w odpowiedzi na różnorodne czynniki stresowe pochodzenia zewnątrzkomórkowego [334]. Zarówno TRBP, jak i PACT posiadają trzy domeny dsRBD; jedna z nich (C-końcowa) jest zaangażowana w oddziaływanie z domeną helikazową Dicer, natomiast dwie pozostałe wiążą RNA [262, 265, 330, 331, 335]. TRBP i PACT nie tylko rekrutują RNA do Dicer, ale także wpływają na strukturę rybonukleazy i jej substratu oraz dopasowanie RNA do centrum aktywnego enzymu. Wykazano, że PACT faworyzuje wiązanie i cięcie pre-miRNA [336]. TRBP nie przyczynia się do dyskryminacji pomiędzy prekursorami dla siRNA i miRNA [336], stwierdzono natomiast, że ułatwia selekcję pre-miRNA w środowisku, w którym występują inne RNA o strukturze typu spinki [337]. Ponadto oddziaływanie TRBP z Dicer zmienia kinetykę reakcji katalizowanej przez enzym, zwiększając prędkość maksymalną ~4-5-krotnie [262]. Oddziaływanie z TRBP lub PACT może także wpływać na wzór cięcia pre-miRNA przez Dicer, przyczyniając się do powstawania izoform miRNA nieznacznie różniących się długością [292, 336, 338, 339]. Dodatkowo, TRBP stabilizuje Dicer [47, 340] oraz wspiera tworzenie kompleksu RISC i przekazywanie dupleksu miRNA do białka Argonaute [46, 47, 266, 330, 339]. Podobne funkcje zaproponowano również dla PACT, choć jego rola w tym aspekcie funkcjonowania Dicer jest słabiej poznana [292, 331].

Badania interaktomu ludzkiej Dicer doprowadziły do identyfikacji szeregu białek oddziałujących z nią bezpośrednio. Wpływają one na aktywność Dicer między innymi poprzez zmiany struktury białka, jego sekwestrację i translokację w obrębie komórki [264]. Regulatory te obejmują zarówno czynniki endogenne, jak i białka

pochodzenia wirusowego. Informacje na temat natury oraz znaczenia poszczególnych oddziaływań przedstawiono w Tabeli 1.1. W ostatnim czasie pojawiają się również doniesienia o zaangażowaniu cząsteczek kwasów nukleinowych w regulację aktywności Dicer. Wykazano, że w komórkach ludzkich oraz *C. elegans* w obrębie cząsteczek mRNA i lncRNA obecne są tzw. miejsca pasywnego wiązania Dicer [341]. Są to lokalne struktury typu spinki rozpoznawane przez Dicer, ale – ze względu na kontekst, w którym się znajdują (długie rejony oskrzydłające trzon spinki) – niecięte przez enzym. Postuluje się, że miejsca pasywne mogą zakotwiczać Dicer na transkryptach genów kodujących białka oddziałujące z rybonukleazą (np. TRBP) i w ten sposób ułatwiać tworzenie się funkcjonalnych kompleksów Dicer z syntetyzowanymi *in situ* białkami. Ponadto miejsca te mogą stanowić element regulacji aktywności Dicer poprzez sekwestrację rybonukleazy. Mechanizm oparty na współzawodniczeniu o wiązanie z Dicer jest wykorzystywana także przez wirusy [255, 342]. W trakcie infekcji komórek ludzkich adenowirusem typu 5 produkowane są znaczne ilości wirusowego RNA działającego jak inhibitor kompetycyjny Dicer [255, 342]. W wyniku wysycenia enzymu wirusowym RNA, dochodzi do deregulacji poziomu miRNA i osłabienia potencjału komórki do prawidłowej odpowiedzi odpornościowej.

**Tabela 1.1.** Białka oddziałujące z ludzką rybonukleazą Dicer

GRUPA	BIAŁKO	FUNKCJE BIOLOGICZNE	CHARAKTER ODDZIAŁYWANIA Z DICER	ZNACZENIE ODDZIAŁYWANIA Z DICER	REF.
<b>PODSTAWOWI PARTNERZY DICER</b>	AGO2 (ang. <i>Argonaute protein 2</i> )	Podstawowy komponent białkowy RISC, odpowiedzialny za cięcie mRNA w procesie RNAi.	Bezpośrednie oddziaływanie poprzez domeny PIWI i RNazy III; wspierane przez białko opiekuńcze HSP90.	Przejmuje produkty Dicer.	[47, 343]
	PACT (ang. <i>protein activator of protein kinase R</i> )	Udział w odpowiedzi przeciwvirusowej; aktywator indukowanej przez interferon kinazy białkowej R; partner Dicer i komponent RISC.	Bezpośrednie oddziaływanie C-końcowej dsRBD PACT i N-końcowy rejonu Dicer.	Wpływa na dyskryminację substratów oraz wybór miejsca cięcia; wspomaga formowanie RISC.	[292, 331, 336, 338]
	TRBP (ang. <i>HIV-1 transactivating response RNA-binding protein</i> )	Pierwotnie zidentyfikowany jako czynnik ułatwiający replikację wirusa HIV poprzez stymulację translacji wirusowego mRNA oraz inhibicję aktywności indukowanej przez interferon kinazy białkowej R; partner Dicer i komponent RISC.	Bezpośrednie oddziaływanie C-końcowej dsRBD TRBP i domeny helikazowej Dicer.	Wspiera rekrutację substratów oraz zwiększa procesywność enzymu; wpływa na długość powstających produktów; stabilizuje Dicer i wspiera tworzenie się RISC.	[46, 47, 265, 266, 292, 330, 336, 337, 339, 344, 345]

**BIAŁKA PRZEJŚCIOWO ODDZIAŁUJĄCE Z DICER**

GRUPA	BIAŁKO	FUNKCJE BIOLOGICZNE	CHARAKTER ODDZIAŁYWANIA Z DICER	ZNACZENIE ODDZIAŁYWANIA Z DICER	REF.
	ADAR1 (ang. <i>adenosine deaminase acting on RNA 1</i> )	Jądrowa deaminaza działająca na dsRNA, katalizuje konwersję A→I.	Bezpośrednie oddziaływanie angażujące domeny: DUF238 i helikazową Dicer.	Zwiększa efektywność cięcia pre-miRNA przez Dicer i wspiera przekazywanie produktu do RISC.	[306]
	RHA (ang. <i>RNA helicase A</i> )	Zależna od ATP helikaza rozwijająca dsRNA i duplekсы RNA-DNA.	Bezpośrednie oddziaływanie z Dicer oraz TRBP, AGO2 i miRNA.	Sugerowana rola w rozwijaniu dupletu miRNA/miRNA*.	[346]
	FMRP (ang. <i>fragile X mental retardation protein</i> )	Białko wiążące RNA, zaangażowane w transport i translację mRNA; czynnik etiologiczny zespołu łamliwego chromosomu X.	Bezpośrednie oddziaływanie hamowane przez fosforylację FMRP.	Przyjmuje produkty Dicer.	[347]
	polimeraza II RNA	Kluczowy enzym zaangażowany w transkrypcję DNA, prowadzi syntezę pre-mRNA, większości małych jądrowych i jąderkowych RNA oraz pri-miRNA.	Oddziaływanie poprzez RNA.	Rekrutuje Dicer do loci, w których powstają nachodzące na siebie transkrypty cięte przez rybonukleazę do siRNA.	[277]
	5-lipooksygenaza	Kluczowy enzym szlaku biosyntezy leukotrien, katalizuje utlenianie kwasu arachidonowego do kwasu 5-hydroperoksyekoizatetraenowy (5-HpETE) oraz konwersję 5-HpETE to leukotrieny A4.	Bezpośrednie oddziaływanie z C-końcowym fragmentem Dicer.	Wpływa na wzór cięcia pre-miRNA przez Dicer, prowadząc do powstawania RNA o długości ~55 nt i ~10-12 nt.	[348, 349]

**BIĄŁKA WPLYWAJĄCE NA STABILNOŚĆ  
I LOKALIZACJĘ KOMÓRKOWĄ DICER**

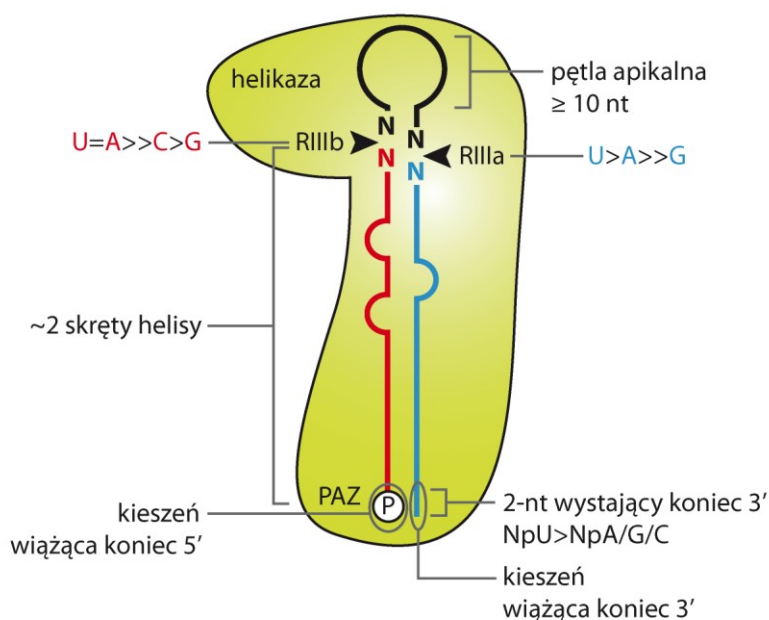
GRUPA	BIĄŁKO	FUNKCJE BIOLOGICZNE	CHARAKTER ODDZIAŁYWANIA Z DICER	ZNACZENIE ODDZIAŁYWANIA Z DICER	REF.
	CLIMP-63 (ang. <i>cytoskeleton-linking membrane protein 63 kDa</i> )	Białko transbłonowe siateczki śródplazmatycznej; pełni rolę strukturalną oraz odpowiada za interakcję z cytoszkieletem.	Bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy N-końcowym fragmentem Dicer (242-430 aa) a domeną CLIMP-63 skierowaną do światła siateczki śródplazmatycznej.	Stabilizuje Dicer podczas przechodzenia przez siateczkę śródplazmatyczną, wpływa na lokalizację komórkową Dicer, np. poprzez kotwiczenie RNazy w bliskim sąsiedztwie rybosomów na szorstkiej siateczce śródplazmatycznej.	[318]
	ERK (ang. <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )	Kinaza serynowo-treoninowa należąca do kinaz aktywowanych mitogenami.	Brak danych.	Fosforylacja Dicer prowadzi do relokalizacji białka do jądra komórkowego i prawdopodobnie hamuje aktywność enzymu.	[279]
	Kaspaza-3	Proteaza zaangażowana w proces apoptozy.	Bezpośrednie oddziaływanie prowadzące do cięcia proteolitycznego Dicer.	Cięcie Dicer prowadzi do powstania fragmentu Dicer o właściwościach DNAzy.	[281-283]
	NDP52 (ang. <i>nuclear dot protein 52 kDa</i> )	Receptor autofagii.	Brak danych.	Pośredniczy w degradacji Dicer na drodze makroautofagii.	[319]
	Nukleoproteina 153	Białko jądrowego kompleksu porowego.	Bezpośrednie oddziaływanie.	Wspiera transport Dicer do jądra komórkowego.	[350]

GRUPA	BIAŁKO	FUNKCJE BIOLOGICZNE	CHARAKTER ODDZIAŁYWANIA Z DICER	ZNACZENIE ODDZIAŁYWANIA Z DICER	REF.
SUPRESORY POCHODZENIA WIRUSOWEGO	Białko rdzeniowe wirusa HCV	Białko strukturalne kapsydu.	Bezpośrednie oddziaływanie, najprawdopodobniej angażujące domenę helikazową Dicer oraz fragment N-końcowy białka wirusowego.	Inhibuje aktywności Dicer.	[351, 352]
	HIV-1 Tat (ang. <i>HIV-1 transactivator of transcription</i> )	Białko kluczowe dla replikacji HIV-1; aktywuje transkrypcję długich powtórzeń końcowych (LTRs, ang. <i>long terminal repeats</i> ).	Oddziaływanie za pośrednictwem RNA, angażujące domenę helikazową Dicer.	Inhibuje aktywności Dicer, efekt ten dodatkowo wzmacniany jest przez sekwestrację TRBP.	[301, 353]
	Białko R wirusa HIV-1 (Vpr)	Odgrywa kluczową rolę w replikacji HIV-1 w komórkach nieulegających podziałowi; w komórkach proliferujących indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2 oraz wejście na drogę apoptozy.	Bezpośrednie oddziaływanie.	Indukuje kierowanie Dicer do proteasomu przez kompleks ligazy ubikwityny.	[329]



#### I-4-4-2. Prekursory miRNA

Obecnie znanych jest ponad 28600 pre-miRNA, z czego 1881 to prekursorzy zidentyfikowane w komórkach ludzkich [miRBase 21, <http://www.mirbase.org/>]. Ogólny plan budowy pre-miRNA jest podobny: są to ~60-nt cząsteczki przyjmujące strukturę typu spinki zazwyczaj z dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcu 3' (Rys. 1.5.). Przewidywane struktury drugorzędowe pre-miRNA różnią się jednak znacząco, co do natury końców, stabilności i długości dwuniciowego trzonu spinek, a także rozmiaru pętli apikalnej [354]. Silne zróżnicowanie architektury cząsteczek istotnie wpływa na proces ich dojrzewania [258, 300, 355-357].



**Rysunek 1.5. Schemat budowy kompleksu pre-miRNA i ludzkiej Dicer**

Zaznaczono elementy pierwszo- i drugorzędowej struktury RNA, które są kluczowe dla oddziaływania substratu z enzymem oraz główne domeny Dicer odpowiedzialne za wiązanie i cięcie pre-miRNA.

Analiza porównawcza 161 ludzkich pre-miRNA wykazała, że cechy takie jak: dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3', obecność elementów rozluźniających strukturę dwuniciową w obrębie trzonu spinek i duża pętla apikalna (≥10 nt) znacząco podwyższają efektywność cięcia pre-miRNA przez Dicer, natomiast ich wpływ na tworzenie kompleksu enzym•substrat jest dużo słabszy [258] (Rys. 1.5.). Wnioski te są

spójne z wynikami innych badań wskazujących na to, że Dicer może wiązać RNA o zróżnicowanej budowie, natomiast jedynie cząsteczki posiadające specyficzne elementy strukturalne (Rys. 1.5.) są przez nią cięte [260, 288, 295, 341]. Jak wspomniano wcześniej, Dicer posiada dwie kieszenie (wiązącą 2-nt wystający koniec 3' i wiążącą fosforylowany koniec 5'), które umożliwiają zakotwiczenie pre-miRNA [291, 357]. W związku z powyższym struktura końców substratu, w szczególności długość i sekwencja końca 3', determinuje specyficzność oddziaływania z Dicer i efektywność wycinania miRNA. Wykazano, że skrócenie końca 3' (0-1 nt) przekłada się na znaczną mikroheterogenność powstających produktów, natomiast jego wydłużenie (3-5 nt) obniża efektywność cięcia pre-miRNA [260]. W porównaniu do innych ncRNA o podobnej długości, przyjmujących strukturę typu spinki, pre-miRNA charakteryzują się stosunkowo małą liczbą niesparowań i pętli wewnętrznych [358]. Elementy destabilizujące helikalną strukturę trzonu prekursora do pewnego stopnia zwiększają efektywność cięcia przez ludzką Dicer [258], co jest spójne z wynikami otrzymanymi dla Dicer-1 z *D.melanogaster* [263], ale przyczyniają się również do mikroheterogenności uwalnianych produktów [354, 355]. Zróżnicowanie długości miRNA może wynikać nie tylko ze struktury drugorzędowej prekursorów, ale także z sekwencji nukleotydowej trzonu spinki [354, 356]. Badania *in vitro* wykazały preferencję domen RNazowych ludzkiej Dicer do hydrolizy wiązań fosfodiestrowych w układach: UpN, ApN i NpU [354, 356], przy czym efekt ten jest bardziej wyraźny w przypadku domeny RIIIA [356]. Prawidłowe ułożenie substratu w obrębie centrum katalitycznego enzymu zapewnione jest także przez oddziaływanie domeny helikazowej z rejonem jednoniciowym w części apikalnej pre-miRNA, 2 nt powyżej miejsca cięcia [300]. Zbyt mała pętla apikalna może zatem nie gwarantować efektywnego oddziaływania z domeną helikazową i/lub wprowadzać naprężenia steryczne w obrębie trzonu pre-miRNA, uniemożliwiając dopasowanie substratu do centrum aktywnego.

Zmiany struktury RNA, w tym pre-miRNA, stanowią podstawę mechanizmów regulujących biogenezę miRNA. RNA jest ujemnie naładowanym polimerem, stąd wiązanie kationów zmniejszających odpychanie elektrostatyczne występujące pomiędzy rybonukleotydami, jest niezwykle ważne dla zwijania się łańcucha oraz stabilizacji jego struktury. Dwa najpowszechniej występujące w ludzkich komórkach kationy nieorganiczne to:  $K^+$  (spośród kationów jednowartościowych) i  $Mg^{2+}$  (spośród kationów dwuwartościowych). Badania dotyczące miR-92b (miRNA zaangażowany między

innymi w rozwój lekooporności niedrobnokomórkowego raka płuc [359]) wykazały, że pre-mir-92b w warunkach panujących w cytoplazmie występuje w dwóch formach – jako struktura typu spinki lub G-kwadrupleks [360]. Dowiedziono, że zależne od stężenia jonów  $K^+$  przyjęcie przez prekursor struktury G-kwadrupleksu zapobiega jego przecięciu przez Dicer *in vitro*. Ponadto analizy bioinformatyczne wykazały, że ~16% ludzkich pre-miRNA posiada sekwencję bogatą w G, która umożliwia im tworzenie alternatywnej struktury G-kwadrupleksu. Obserwacja ta pozwala sądzić, że stężenie jonów i/lub aktywności czynników faworyzujących przyjmowanie przez pre-miRNA struktur innych niż kanoniczna może być jednym z czynników regulujących biogenezę części miRNA [360].

W Tabeli 1.2. przedstawiono charakterystykę białek, które oddziałują z pre-miRNA i wpływają na dojrzewanie miRNA w komórkach ludzkich. Efekty regulatorowe wywierane przez te białka wynikają między innymi ze zmiany sekwencji [125, 361-366] i struktury drugorzędowej RNA [367], rekrutacji lub wyparcie innych czynników regulatorowych i/lub enzymów [217, 219, 220, 228, 362, 363, 368-378], sekwestracji prekursorów [219, 220, 374-376]. Zmiany sekwencji pre-miRNA obejmują mono- i poliurydynylację końca 3' [125, 361-364], przyłączenie grupy metylowej do fosforanu na końcu 5' [365] oraz edytowanie pre-miRNA [366]. Jak wspomniano wcześniej, grupa monofosforanowa, zapewniająca negatywny ładunek elektrostatyczny na końcu 5' pre-miRNA, jest niezbędna dla zakotwiczenia substratu w dodatnio naładowanej kieszeni wiążącej RNA w obrębie domeny Platformy/PAZ Dicer [357]. Wykazano, że zarówno *in vitro* jak i *in vivo* białko BCDIN3D (ang. *BCDIN3 domain containing*), będące metylotransferazą RNA, katalizuje reakcję dimetylacji grupy fosforanowej na końcu 5' pre-mir-145 i pre-mir-23b [365]. Modyfikacja ta prowadzi do neutralizacji ładunku ujemnego na końcu 5' i zaburza wiązanie pre-miRNA przez Dicer. Również koniec 3' pre-miRNA może podlegać modyfikacjom, np. przez terminalne transferazy urydyłowe. Monourydynylacja pre-miRNA grupy II, prowadzi do utworzenia kanonicznej struktury końca 3' prekursorów i zapewnia ich wydajne wiązanie przez Dicer [125, 361], podczas gdy poliurydynylacja pre-miRNA inicjowana przez Lin28A blokuje oddziaływanie z Dicer i przyczynia się do degradacji pre-miRNA przez egzonukleazy [125, 361-364].

Spośród białek przedstawionych w Tabeli 1.2. najliczniejszą grupę stanowią te wiążące się do rejonu apikalnego prekursorów. Jak wspomiano wcześniej, oddziaływanie pomiędzy pętlą apikalną a domeną helikazową Dicer jest istotne dla przyjęcia przez rybonukleazę konformacji warunkującej aktywność katalityczną [295]. W związku z tym, zmiany struktury rejonu apikalnego pre-miRNA najprawdopodobniej wywierają efekt allosteryczny na aktywność Dicer. Jednym z czynników indukujących rearanzację struktury prekursorów jest ADAR1p110, białko należące do rodziny deaminaz adenozyne dwuniciowego RNA (ADAR, ang. *double-stranded RNA adenosine deaminase*), które odpowiada za edytowanie pre-mir-151 w komórkach ludzkich, prowadząc do powstania, obok formy niezmodyfikowanej, trzech wariantów sekwencyjnych: pre-mir-151A1I, pre-mir-151A3I i pre-mir-151A13I [366] różniących się istotnie pod względem struktury rejonu apikalnego [295]. *In vitro* wykazano, że pre-mir-151A1I oraz pre-mir-151A13I, tj. te prekursorzy, których rozmiar pętli apikalnej odbiega znacząco od struktury pre-mir-151, są cięte przez Dicer mniej efektywnie [295]. Co więcej, rekonstrukcje kompleksów rybonukleinowych wykonane na podstawie obrazów z mikroskopu elektronowego wykazały, że obserwowana inhibicja aktywności enzymu wynika z niekorzystnych zmian konformacyjnych, którym podlega Dicer po związaniu edytowanego RNA [295]. ADAR1 wykazuje aktywność deaminazy jedynie, gdy występuje w formie homodimeru [379]. Co ciekawe, białko to tworzy również heterodimery z Dicer (z powinowactwem podobnym do obserwowanego dla TRBP) i wywiera wtedy pozytywny wpływ na dojrzewanie miRNA, zwiększając prędkość maksymalną reakcji katalizowanej przez Dicer oraz wspierając tworzenie się kompleksu RISC [306] (Tabela 1.1.).

**Tabela 1.2.** Białka wpływające na dojrzewanie ludzkich miRNA poprzez modyfikację struktury pre-miRNA

REJON PREKURSORA	BIĄŁKO	FUNKCJE BIOLOGICZNE	WPLYW NA DOJRZEWANIE miRNA	REF.
<b>KONIEC 5'</b>	BCDIN3D (ang. <i>BCDIN3 domain containing</i> )	Metylotranferaza zależna od S-adenozylometioniny, odpowiada za tworzenie $\gamma$ -metylofosforanowej struktury typu kap na końcu 5' RNA 7SK oraz dimetylację 5' monofosforanu pre-miRNA.	Metylacja fosforanu na końcu 5' pre-miRNA zaburza wiązanie substratu przez Dicer, prowadząc do obniżenia poziomu dojrzałego miRNA.	[365]
<b>REJON APIKALNY</b>	ADAR1 (ang. <i>adenosine deaminase acting on RNA 1</i> )	Jądrowa deaminaza działająca na dsRNA, katalizuje konwersję A→I.	Edytowanie pre-miRNA zmienia strukturę prekursorów, co decyduje o ich powinowactwie do Dicer i efektywności cięcia przez enzym.	[295, 366]
	KSRP (ang. <i>KH-type splicing regulatory protein</i> )	Białko wiążące RNA, zaangażowane w transkrypcję, alternatywne składanie pre-mRNA, degradację niestabilnych cząsteczek mRNA; wiąże pri- i pre-miRNA, rozpoznając bogate w G motywy strukturalne w obrębie pętli apikalnych.	Promuje dojrzewanie miRNA prawdopodobnie poprzez rekrutowanie Dicer i/lub wspieranie prawidłowego wiązania pre-miRNA z rybonukleazą.	[217, 368-371]
	Lin28A	Białko wiążące RNA, zwiększa efektywność translacji poprzez stabilizowanie mRNA oraz rekrutowanie rybosomów; selektywny supresor dojrzewania określonych miRNA; oddziałuje z pri- i pre-miRNA.	Antagonista Dicer; wiąże pre-miRNA posiadające motywy GNGAY i GGAG w rejonie apikalnym i rekrutuje UTP-transferazy, prowadząc do poliurydylacji i degradacji pre-miRNA.	[219, 220, 362, 363, 372-377]

REJON PREKURSORA	BIAŁKO	FUNKCJE BIOLOGICZNE	WPLYW NA DOJRZEWANIE miRNA	REF.
REJON APIKALNY	MCPIP-1 (ang. <i>monocyte chemoattractant protein-induced protein 1</i> )	RNaza regulująca stabilność mRNA kodującego IL-1 $\beta$ ; zaangażowana w rozwój stanu zapalnego, migrację makrofagów; indukuje apoptozę i angiogenezę.	Antagonista Dicer; przecina pre-miRNA w obrębie pętli apikalnej, indukując ich degradację.	[367]
	RBM3 (ang. <i>RNA binding motif protein 3</i> )	Białko wiążące RNA, indukowane niskimi temperaturami, zwiększa ogólny poziom translacji w warunkach umiarkowanej hipotermii.	Promuje dojrzewanie miRNA; wiąże pre-miRNA i ułatwia ich oddziaływanie z Dicer.	[378]
	TDP-43 (ang. <i>TAR DNA-binding protein-43</i> )	Białko wiążące DNA i RNA, zaangażowane w regulację transkrypcji oraz składania pre-mRNA; hamuje transkrypcję DNA HIV-1; komponent kompleksów Drosha i Dicer.	Promuje dojrzewanie miRNA; ułatwia wiązanie i cięcie pre-miRNA przez Dicer.	[228]
KONIEC 3'	GLD2, też: TUT2	Niekanoniczna polimeraza poli(A) o aktywności UTP-transferazy działająca w cytoplazmie.	Monourydylacja końca 3' prekursorów miRNA grupy II promuje ich dojrzewanie.	[125]
	ZCCHC6/11 (ang. <i>zinc finger CCHC domain-containing protein 6/11</i> ), też: TUT7/4 (odpowiednio)	Terminalne transferazy urydylowe działające w cytoplazmie.	Monourydylacja końca 3' prekursorów miRNA grupy II promuje ich dojrzewanie. Zależna od Lin28A, poliurydylacja końca 3' prekursorów, w tym pre-let-7a indukuje ich degradację.	[125, 362-364]

#### *1-4-5. Przekazanie dupleksu miRNA/miRNA\* do kompleksu białka Argonaute*

Biogeneza miRNA nie kończy się na etapie cięcia pre-miRNA przez Dicer. Generowany przez Dicer dupleks miRNA/miRNA\* przekazywany jest do białka Argonaute, gdzie następuje selekcja nici. Niekiedy też końce miRNA poddawane są modyfikacjom chemicznym lub skracaniu, co wpływa na stabilność i funkcjonowanie miRNA.

Białka z rodziny Argonaute są podstawowymi partnerami srRNA. U eukariontów wyróżnia się podrodzinę białek Ago, której przedstawiciele oddziałują z miRNA i siRNA [380, 381], oraz podrodzinę białek Piwi wiążących piRNA [382]. Białka Argonaute charakteryzują się obecnością domeny N, domeny PAZ, domeny MID (ang. *middle*) oraz domeny PIWI (Rys. 1.3. C). Badania strukturalne pozwoliły ustalić, że RNA związany przez Argonaute kotwiczony jest w obrębie domen: PAZ (kieszonka wiążąca koniec 3' RNA) i MID (kieszonka wiążąca koniec 5' RNA) [383-385]. Domena N jest niezbędna w procesie załadunku i rozplatania dupleksu RNA [386], natomiast domena PIWI jest strukturalnie podobna do RNazy H i odpowiada za aktywność endonukleazową niektórych Argonaute. Spośród paralogów AGO zidentyfikowanych u człowieka (AGO1-4), jedynie AGO2 jest aktywne katalitycznie [387-389]. Wszystkie cztery białka tworzą funkcjonalne kompleksy RISC, a wyniki głębokiego sekwencjonowania wskazują na istnienie mechanizmów selektywnie sortujących miRNA do poszczególnych białek [390, 391].

Przyjmuje się, że transfer dwuniciowego produktu generowanego przez ludzką Dicer następuje w obrębie kompleksu ładującego RISC (RLC, ang. *RISC-loading complex*), w skład którego, oprócz Dicer, wchodzi również AGO i TRBP [37, 46, 266]. Rekonstrukcja budowy RLC wykonana na podstawie wyników obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazała, że domena helikazowa Dicer zaangażowana jest w oddziaływanie z TRBP, podczas gdy centrum katalityczne enzymu znajduje się proksymalnie w stosunku do AGO [266]. Wyniki badań *in vitro* z wykorzystaniem dsRNA wskazują, że produkt generowany przez Dicer jest uwalniany z kompleksu Dicer•TRBP lub Dicer•PACT, a następnie ponownie wiązany w odmiernej orientacji [268]. Według tego modelu, mniej stabilny termodynamicznie koniec dupleksu kotwiczony jest w obrębie domeny helikazowej Dicer, podczas gdy koniec bardziej stabilny wiązany jest przez dsRBP (tj. TRBP lub PACT). W kolejnym

etapie następuje transfer dsRNA do AGO, najpierw części wiązanej przez dsRBP, a następnie końca oddziałującego z Dicer. Proces ten jest wspierany przez białka opiekuńcze: HSP70 i HSP90 [48, 49], które przeprowadzają hydrolizę ATP i utrzymują AGO w konformacji otwartej, tj. faworyzującej przyjmowanie dsRNA. Istnieją sprzeczne doniesienia na temat roli Dicer na dalszych etapach funkcjonowania RISC. Część z nich sugeruje, że Dicer, TRBP i AGO pozostają związane [37, 331], a obecność Dicer i TRBP stymuluje aktywność AGO na etapie efektorowym RNAi [37, 47]. Inne wyniki wskazują na dysocjację kompleksu po związaniu dsRNA przez AGO [267].

Wybór nici miRNA, która zostanie włączona do kompleksu RISC podyktowany jest termodynamiczną asymetrią końców oraz strukturą drugorzędową dupleksu [392, 393]. Zazwyczaj inkorporowana jest nić bogatsza w pirymidyny i posiadająca mniej stabilny termodynamicznie koniec 5'. Ponadto wykazano preferencję poszczególnych białek Argonaute do wiązania miRNA o określonej sekwencji [393]; dzięki rozwiązaniu struktury krystalicznej domeny MID ludzkiego AGO2 ustalono, że pętla tworzona przez aminokwasy w pozycjach 523-527 odpowiada za selektywne oddziaływanie z 5'U i 5'A [394]. Mechanizm rozplatania dupleksu miRNA/miRNA\* nie został jednoznacznie wyjaśniony. Wykazano, że w komórkach ludzkich oraz *D. melanogaster*, w przypadku dupleksów o niezaburzonej strukturze dwuniciowej, Argonaute 2 nacina nić pasażerską, która jest następnie usuwana przez endonukleazę C3PO [395, 396]. Większość miRNA tworzy jednak duplekisy o niepełnej komplementarności, które nie podlegają cięciu. Niezależnie od mechanizmu, postuluje się, że rozplatanie inicjowane jest przez domenę N białka AGO, która działa jak klin, wchodząc pomiędzy nici dupleksu [386].

Pojedynczy miRNA występuje często w postaci izoform, tzw. izomiRów, które są wariantami o odmiennej sekwencji i/lub długości powstającymi z tego samego loci genomowego [397-399]. IzomiRy dzieli się na izomiRy 5' i 3' oraz izomiRy polimorficzne, w zależności od tego, czy zróżnicowanie dotyczy sekwencji końców miRNA czy sekwencji wewnętrznej [400]. Najczęściej obserwuje się izomiRy 3', zarówno pod względem liczby heterogennych miRNA, jak i częstości występowania wariantów [377, 397, 398, 401]. Heterogenność końca 5' jest znacznie mniej powszechna, ponieważ pojedyncza zmiana w tym fragmencie miRNA wpływa radykalnie na sekwencję funkcjonalnego regionu „seed”, a tym samym – na pulę docelowych transkryptów. Porównanie profili izomiRów w różnych liniach



komórkowych oraz typach tkanek wskazuje, że biogeneza poszczególnych wariantów jest specyficzna komórkowo [401, 402] oraz podlega dynamicznej regulacji [377, 398].

Heterogenność obserwowana w przypadku izomiRów jest wynikiem nie tylko alternatywnego/nieprecyzyjnego cięcia przez Drosha i Dicer [338, 344, 403] czy zmian wprowadzanych do sekwencji prekursorów przez inne enzymy [125, 126], ale także modyfikacji miRNA przed i po związaniu z białkiem Argonaute [404-408]. Wyniki analiz krystalograficznych ludzkiego białka AGO2 oraz jego kompleksu z miR-20a wskazują, że, w przeciwieństwie do końca 5' miRNA, który jest zakotwiczony i ukryty wewnątrz domeny MID, koniec 3', choć wiązany przez domenę PAZ, jest dostępny dla oddziaływania z innymi białkami i może być narażony na ataki egzonukleaz [384, 385]. W komórkach *D. melanogaster* zidentyfikowano egzonukleazę Nibbler, która odpowiada za docinanie końca 3' miRNA związanego przez Ago1 [404, 405]. Mutanty delecyjne pozbawione Nibbler wykazują odmienny profil izomiRów 3' oraz charakteryzują się sterylnością. Tożsamość egzonukleaz skracających końce 3' miRNA w komórkach ssaczych nie jest znana, choć preferencja do wytrawiania końca 3'A w porównaniu do 3'U [408] może wskazywać na zaangażowanie w ten proces specyficznych deadenylaz. Podobnie jak w przypadku izomiRów zidentyfikowanych u *D. melanogaster*, docinanie następuje po etapie selekcji nici miRNA i jest uwarunkowane tym, który z paralogów Argonaute wchodzi w skład kompleksu RISC [408]. Białka Argonaute wiążące miRNA charakteryzują się obecnością w domenie PAZ konserwatywnego motywu KY (313-314) zaangażowanego w oddziaływanie z dwoma ostanimi nukleotydami końca 3' miRNA. W białkach Argonaute 2 u czworonogów stwierdzono substytucję KY→RH. Postuluje się, że zmiana ta, ze względu na właściwości fizyko-chemiczne histydyny (mniejszy rozmiar i brak grupy OH w łańcuchu bocznym), wpływa na osłabienie oddziaływania z RNA, czyniąc koniec 3' miRNA związanych z białkami Argonaute 2 bardziej dostępnym dla innych enzymów [408].

Większość znanych transferaz nukleotydów to polimerazy 5'→3' [409], co również sprzyja powstawaniu heterogenności końca 3' miRNA. Najczęściej obserwuje się urydylację oraz adenylację miRNA [401]. Badania *in vivo* w modelu mysim wykazały zaangażowanie transferazy Zcchc11 w urydylację licznej grupy miRNA [407]. Stwierdzono na przykład, że 3'-monourydylacja miR-126-5p i miR-379, do której

dochodzi w komórkach wątroby nowonarodzonych myszy, skutecznie obniża zdolność obu miRNA do wyciszenia ekspresji genu kodującego insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1, ang. *insulin-like growth factor 1*) – białko kluczowe dla różnicowania i dojrzewania tkanek [407]. Z kolei charakterystyczny dla hepatocytów miR-122 podlega 3'-adenylacji przez polimerazę poli(A) GLD2, co zostało potwierdzone zarówno w komórkach ludzkich, jak i mysich [406]. Ponadto w wątrobach myszy GLD2<sup>-/-</sup> stwierdzono drastyczny spadek poziomu miR-122 w porównaniu do prób uzyskanych z myszy heterozygotycznych [406]. GLD2 jest podstawowym enzymem odpowiadającym za adenylację końca 3' szeregu innych miRNA, między innymi w liniach ludzkich monocytów [401] i fibroblastów [410]. We wszystkich przebadanych przypadkach modyfikacja wprowadzana przez GLD2 wydłuża czas półtrwania miRNA w komórce. Znane są również białka zaangażowane w deadenylację i degradację miR-122 [411]. Badania *in vitro* w linii ludzkich hepatocytów wykazały, że miR-122 wiązany jest przez białko CUGBP1 (ang. *CUG-binding protein 1*), które rekrutuje rybonukleazę PARN, prowadząc do degradacji miRNA. CUGBP1 wiąże także inne miRNA bogate w UG, np. miR-93 i miR-652-3p, indukując ich deadenylację, w konsekwencji również degradację [411]. Dalsze analizy biochemiczne wykazały, że związanie miRNA przez AGO2 chroni je przed deadenylacją, co sugeruje, że zależna od CUGBP1 i PARN degradacja miR-122 odbywa się najprawdopodobniej już po zajściu etapu efektorowego RNAi [411]. Co ciekawe, 3'-adenylacja matczynej miRNA w oocytach oraz na wczesnym etapie rozwoju embrionów *D. melanogaster* jest czynnikiem destabilizującym miRNA [412]. Enzymem zaangażowanym w adenylację miRNA u *D. melanogaster* jest homolog GLD2 – polimeraza poli(A) Wispy. Zależny od adenylacji mechanizm usuwania matczynej miRNA podczas przejścia fazowego oocyt→zygota jest obecny także u jeźowców i ssaków [412]. Podobna strategia obniżania poziomu dojrzałych miRNA jest wykorzystywana także przez pokswirusy. Wykazano, że w zainfekowanych komórkach ludzkich i owadziech wirusowa polimeraza poli(A) VP55 przeprowadza poliadenylację miRNA gospodarza, a poliadenylowane cząsteczki kierowane są na drogę degradacji [413].

Przytoczone przykłady pokazują, że w zależności od kontekstu komórkowego pozornie ta sama modyfikacja chemiczna końca 3' miRNA może wywierać zgoła odmienny efekt na stabilność cząsteczki, a różnica jedynie nukleotydu w przypadku

kluczowych miRNA (np. miR-122 w wątrobie) może być czynnikiem determinującym prawidłowy rozwój i funkcjonowanie poszczególnych organów czy całych organizmów. Istnieje zatem potrzeba dalszych badań, które wyjaśniłyby podstawy mechanizmów selekcji miRNA oraz zidentyfikowałyby czynniki zaangażowane w degradację zmodyfikowanych miRNA.

Poziom miRNA w komórce jest wypadkową biogenezy (regulowanej na wielu płaszczyznach, Rys. 1.2.), a także procesów aktywnej degradacji miRNA. Dojrzałe cząsteczki, szczególnie po włączeniu do kompleksu RISC są niezwykle stabilne. Okres półtrwania większości ludzkich miRNA liczony jest w godzinach, a nawet dniach [414, 415] i jest zasadniczo dłuższy niż okres półtrwania mRNA [416, 417]. Badania w różnych systemach modelowych pozwoliły na identyfikację determinant strukturalnych oraz czynników działających w układzie *trans*, które wpływają na różnice w stabilności poszczególnych miRNA. Wspomniano już o kluczowej roli modyfikacji chemicznych końca 3' miRNA. Ponadto zidentyfikowano motywy sekwencyjne, które wpływają na szybkość degradacji poszczególnych miRNA [414, 418, 419], np. analiza porównawcza rodziny miR-29 wykazała, że elementem destabilizującym miR-29b/c są urydyny w pozycji 9-11 [418]. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku innych miRNA posiadających ciąg urydyn w tej pozycji. Z kolei dla miR-308, motyw zaangażowany w jego degradację obejmuje sekwencję GGAUUCG na końcu 3' [414]. Znanych jest również szereg czynników działających w układzie *trans*, które indukują degradację miRNA lub są w nią bezpośrednio zaangażowane. Oprócz wspomnianych już polimeraz poli(A) (np. Wispy, VP55), do grupy tej należą także: cząsteczki RNA pochodzenia wirusowego [420] oraz specyficzne egzonukleazy działające niezależnie [421-424] i w kompleksie egzosomu [414].

### *l-5. Zastosowanie aptamerów w badaniach regulacji powstawania i funkcjonowania miRNA*

Z uwagi na rolę, jaką miRNA odgrywają w układach biologicznych, znaczny wysiłek badawczy został skierowany w stronę opracowania narzędzi pozwalających lepiej zrozumieć powstawanie i funkcjonowanie miRNA. W badaniach tych, oprócz metod inżynierii genetycznej pozwalających wpływać na poziom ekspresji określonych genów (np. *DICER1* czy poszczególne *MIR*), wykorzystuje się również oligomery oddziałujące bezpośrednio z prekursorami bądź z dojrzałymi miRNA, lub też stanowiące ich kompetytory. Główne grupy narzędzi reprezentują: wektory do produkcji długich transkryptów zawierających miejsca komplementarne do miRNA [425, 426], oligomery antysensowe (ASOs, ang. *anti-sense oligonucleotides*) [427-429], analogi miRNA (ang. *miRNA mimics*) [430] oraz aptamery RNA [431, 432].

Aptamery to krótkie, jednoniciowe cząsteczki kwasów nukleinowych przyjmujące ściśle określoną strukturę trzeciorzędową, która odpowiada za selektywność ich interakcji z określonymi ligandami, np.: z kwasami nukleinowymi, peptydami, białkami czy związkami niskocząsteczkowymi. Selekcji aptamerów dokonuje się na drodze ukierunkowanej ewolucji *in vitro*, wykorzystując metodę SELEX (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) [433]. Zastosowanie restrykcyjnych warunków selekcji aptamerów pozwala uzyskiwać cząsteczki wykazujące bardzo wysokie powinowactwo i selektywność wobec wybranych ligandów. W badaniach dotyczących RNAi i miRNA aptamery wykorzystuje się przede wszystkim do precyzyjnego dostarczania innych funkcjonalnych cząsteczek, np. ASO [434] czy siRNA [435] do wybranych typów komórek. Jedynie pojedyncze doniesienia informują o zastosowaniu aptamerów jako samodzielnych narzędzi do interferencji w powstawanie czy funkcjonowanie miRNA.

W nurt badawczy wykorzystujący aptamery RNA do badania biogenezy miRNA wpisują się działania podjęte w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej IChB PAN. Ich celem była selekcja i charakterystyka aptamerów RNA wiążących Dicer. W efekcie przeprowadzonych badań zidentyfikowano 126 aptamerów RNA o długości od 50 do 80 nt będących potencjalnymi substratami i regulatorami Dicer [436]. Wszystkie wyselekcjonowane aptamery wykazują jednakową organizację; centralną ~20-nt część aptameru o zmiennym składzie nukleotydowym oskrzydlaają 18-nt

fragmenty o stałej sekwencji. Przewidywane struktury drugorzędowe tych oligomerów, mimo że zbliżone do typowej struktury pre-miRNA, charakteryzują się licznymi zaburzeniami w trzonie spinki (lub spinek), co potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące silnie zróżnicowanej budowy cząsteczek RNA wiązanych przez Dicer [261]. Wyniki analiz biochemicznych jakim poddano wybrane aptamery pozwoliły zidentyfikować oligomery, które stanowią substrat dla Dicer i w związku z tym mogą być kompetitorami wobec pre-miRNA oraz cząsteczki wiązane i niecięte przez enzym, które najprawdopodobniej działają jak inhibitory allosteryczne rybonukleazy. Potencjał wybranych aptamerów do hamowania powstawania miRNA w reakcjach z Dicer był zależny od rodzaju użytego substratu. Spośród przebadanych oligomerów szczególną uwagę zwróciły dwa aptamery: ATD\_13.6 (niecięty przez Dicer) i ATD\_15.52 (cięty przez Dicer). W ich przypadku obserwowano wyraźnie selektywny wzrost potencjału inhibitorowego w reakcjach z jednym z testowanych pre-miRNA, tj. z pre-mir-210 [436]. Poziom miR-210 powstającego w reakcjach z Dicer ulegał obniżeniu o >80%, gdy w próbie obecny był ATD\_13.6 lub ATD\_15.52 w porównaniu do reakcji kontrolnych bez ich udziału. Natomiast wpływ tych aptamerów na powstawanie innych testowanych miRNA był znacznie mniejszy, np. w reakcjach z pre-mir-33a powodowały one jedynie ~30% spadek wydajności powstawania miR-33a w porównaniu do reakcji kontrolnych. Na podstawie wstępnych ustaleń ATD\_13.6 zaklasyfikowano do grupy inhibitorów allosterycznych Dicer, natomiast ATD\_15.52 do grupy inhibitorów funkcjonujących na zasadzie kompetycji wobec substratów tego enzymu. Uzyskane wyniki nie pozwoliły jednak jednoznacznie wyjaśnić znaczących różnic w efektywności działania obu aptamerów w zależności od rodzaju pre-miRNA użytego w reakcji.

W kolejnych latach pojawiły się pojedyncze doniesienia opisujące selekcję aptamerów oddziałujących z prekursorami miRNA. Lünse i wsp. otrzymali aptamer RNA wiążący policistronowy pri-mir-17~92 i hamujący jego cięcie przez Drosha *in vitro* [431]. Szczegółowe badania strukturalne, obejmujące ukierunkowaną mutagenezę oraz mapowanie chemiczne, wykazały, że aptamer wiązał się do pętli apikalnej pre-mir-18a. Dalsze badania, prowadzone *in vitro* z wykorzystaniem frakcji jądrowej lizatów komórek eukariotycznych (zawiera endogenną Drosha), potwierdziły, że wspomniane oddziaływanie było wystarczające do zahamowania powstawania wszystkich sześciu pre-miRNA kodowanych w obrębie pri-mir-17~92. Liczne

doniesienia wskazują na powiązanie podwyższonego poziomu ekspresji *MIR-17~92* z kancerogenezą, w tym, z rozwojem siatkówczaka [437]. Grupa Krishnakumara wykazała, że aptamer wyselekcjonowany przez Lünse i wsp. efektywnie hamował cięcie pri-mir-17~92 przez kompleks Mikroprocesora w liniach komórkowych siatkówczaka (Y79 i WERI-Rb1), co z kolei skutkowało obniżeniem poziomów dojrzałych miRNA i prowadziło do indukcji apoptozy oraz zahamowania proliferacji komórek rakowych [432].

Podobną strategię regulacji dojrzewania miRNA, jednak na etapie cięcia pre-miRNA przez Dicer, przyjęli Szczepanski i Joyce. Dokonali oni selekcji aptamerów L-RNA wiążących się do rejonu apikalnego szeregu pre-miRNA [438]. L-RNA to enancjomer naturalnie występującego D-RNA, z uwagi na konformację budujących go ryboz jest on odporny na działanie komórkowych nukleaz. Wyniki badań *in vitro* z oczyszczoną rekombinowaną Dicer dowiodły, że utworzenie się kompleksu pre-miRNA•L-aptamer uniemożliwiało oddziaływanie Dicer z pre-miRNA i hamowało powstawanie miRNA. Należy jednak zauważyć, że warunki reakcji (stężenie jonów  $Mg^{2+}$  w buforze oraz temperatura inkubacji) wpływały w istotny sposób na wartość stałej dysocjacji (Kd) odpowiednich kompleksów, jak i potencjał inhibitorowy danego L-aptameru. Największą zmianę odnotowano w przypadku cząsteczki wyselekcjonowanej wobec pre-mir-155; w reakcji z Dicer w warunkach odpowiadających przyjętym podczas selekcji aptamerów (5 mM  $MgCl_2$ , 23°C) wydajnie hamowała ona powstawanie miR-155 ( $IC_{50} = 52 \text{ nM}^1$ ), natomiast w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (0,5 mM  $MgCl_2$ , 37°C) nie wywierała żadnego efektu inhibitorowego. Biorąc pod uwagę, że zarówno stężenie jonów dwuwartościowych, jak i temperatura w istotny sposób wpływają na strukturę przestrzenną RNA, wyniki uzyskane przez Szczepanskiego i Joyce'a potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że za oddziaływanie aptamerów i ich ligandów odpowiada struktura drugo- i trzeciorzędowa tych cząsteczek.

---

<sup>1</sup> ang. *half maximal inhibitor concentration*, czyli stężenie cząsteczki, przy którym obserwowano obniżenie poziomu miRNA o 50% w stosunku do reakcji kontrolnej

---

## II CEL PRACY

Z przedstawionych we Wstępie informacji jasno wynika, że biogeneza miRNA jest wieloetapowym procesem, który podlega złożonej, kilkustopniowej regulacji. Dotychczasowe badania skupiały się przede wszystkim na maszynerii białkowej bezpośrednio lub pośrednio zaangażowanej w powstawanie miRNA. Niewiele natomiast wiadomo na temat udziału czynników niebiałkowych w biogenezie miRNA, szczególnie na etapie cytoplazmatycznym. Tymczasem wydaje się, że oligomery RNA, ze względu na ich potencjał do oddziaływania zarówno z substratami Dicer, jak i z samą rybonukleazą są predestynowane do tego, by brać udział w regulacji uwalniania miRNA z cząsteczek prekursorowych. Stąd, od szeregu już lat, w pracowni Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN prowadzone są badania zmierzające do weryfikacji hipotezy zakładającej, iż cząsteczki RNA są nie tylko substratami, ale i regulatorami białek odpowiedzialnych za wycinanie miRNA z ich prekursorów. W rezultacie zidentyfikowano szereg aptamerów RNA wiążących Dicer i w różnoraki sposób wpływających na aktywność tej rybonukleazy. Wykazano, że krótkie cząsteczki RNA mogą funkcjonować jako selektywne (specyficzne dla danego miRNA) i nieselektywne inhibitory powstawania miRNA. Wyniki wstępnych badań sugerują, iż zidentyfikowane cząsteczki mogą działać na zasadzie kompetycji lub być inhibitorami allosterycznymi.

Biorąc pod uwagę powyższe względy zdecydowałam, by celem mojej pracy było poznanie czynników decydujących o zdolności krótkich RNA do selektywnej inhibicji procesu powstawania wybranych miRNA. Osiągnięcie tak zarysowanego celu wymagało realizacji następujących zadań:

- poznanie mechanizmu działania aptamerów RNA, które wiążą Dicer i selektywnie hamują powstawanie jednego z badanych miRNA;
- zaproponowanie ogólnego modelu selektywnej inhibicji wywieranej przez oligomery RNA na proces wycinania miRNA z pre-miRNA;
- weryfikacja zaproponowanego modelu.

---

### III MATERIAŁY I METODY

#### III-1. Materiały

##### III-1-1. Bufory i roztwory barwiące

###### Bufor 10×PBS, pH 7,4

1370 mM NaCl

27 mM KCl

43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

###### Bufor 10×TBE

890 mM Tris

890 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

20 mM EDTA

###### Bufor do reakcji cięcia RNA przez Dicer

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

250 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

###### Bufor do badania oddziaływań RNA z Dicer

250 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

###### Bufor I do nakładania prób na żel poliakryloamidowy (LB I, ang. *loading buffer I*)

0,05% błękit bromofenolowy

0,05% ksylencyjanol

w 10 M wodnym roztworze mocznika



Bufor II do nakładania prób na żel poliakryloamidowy (LB II)

0,05% błękit bromofenolowy

0,05% ksylencyjanol

w 30% wodnym roztworze glicerolu

Bufor do elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach natywnych

1×TBE

5% glicerol

Bufor do lizy komórek

100 mM KCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

10% glycerol

0,5 mM DTT

0,2% NP40

1×Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

30 mM HEPES, pH 7,4

Roztwór *N*-metylomezoporfiryny IX (NMM) do wybarwiania w żelach PAA kwasów nukleinowych o strukturze G-kwadrupleksów

8,61 mM NMM

w 0,2 M HCl

Roztwór Sybr Gold<sup>®</sup> do wybarwiania kwasów nukleinowych w żelach PAA

1×Sybr Gold<sup>®</sup>

w 1×TBE

*III-1-2. Materiał biologiczny*

W badaniach wykorzystano linię komórek HeLa (American Type Culture Collection); materiał do badań stanowiła izolowana z nich frakcja cytoplazmatyczna (III-2-5).

*III-1-3. Oligorybonukleotydy*

W badaniach wykorzystano jednoniciowe RNA zakupione w firmach: IBA Germany i FutureSynthesis Sp. z o.o. RNA i DNA występujące w formie G-kwadrupeksów zostały zsyntetyzowane w zespole prof. Ryszarda Kierzka z Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych IChB PAN. Sekwencje wszystkich oligomerów przedstawiono w Tabeli 3.1.

**Tabela 3.1. Oligomery wykorzystane w badaniach**

nazwa	sekwencja	długość
2OMeAL-16-1_2*	GAAUCUUAACGC	12 nt
3'-ATD_15.52	GUGAGUCGUUGUGCGCCCAUGUUAACAGUUAGCC	35 nt
5'-ATD_15.52	AGGGAGAAUCAUAAGUGCGCA	21 nt
AL-16-1/2OMeAL-16-1*	AUUUUAGAAUCU	12 nt
AL-21/2OMeAL-21*	AUGAGAUUCAAC	12 nt
AL-210/2OMeAL-210*	GGGGCAGCGCAG	12 nt
AL-33a/2OMeAL-33a*	GGGUACCACCAG	12 nt
ATD_13.6	GGGAGAAUCAUAAGUAGCGGUGUGUGAGUCGUGGUG CCCAUGUUAACAGUUAGCC	56 nt
ATD_15.52	AGGGAGAAUCAUAAGUGCGCAGUGAGUCGUUGUGCU GCCCAUGUUAACAGUUAGCC	56 nt
G <sub>4</sub> U <sub>4</sub> G <sub>4</sub>	GGGGUUUUUGGGG	12 nt
PCDH21_fr	GGAAGAACAGAAGUAGAGGUGUGUGAGUC	29 nt
pre-mir-16-1	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUUAAGAUUCUAAAA UUAUCUCCAGUAUUAACUGUGCUGCUGAA	65 nt
pre-mir-21	AGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUG GCAACACCAGUCGAUGGGCUGU	58 nt
pre-mir-210	GCCCCUGCCCACCGCACACUGCGCUGCCCCAGACCCA CUGUGCGUGUGACAGCGGCUG	58nt
pre-mir-33a	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGGUGGUACC CAUGCAAUGUUUCCACAGUGCAUCA	61nt
QU14	GGAGGUUUUGGAGG	14 nt
RNA12	AGCUUAUCAGAC	12 nt

nazwa	sekwencja	długość
RNA14	GGGUACCACCAGAA	14 nt
RNA22	CAAUGUUUCCACAGUGCAUCAC	22 nt
RNA32	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGGUCA	32 nt
RNA42	GGGAGAAUCAUAAGUAGCCUCCCCCAUGUUAACAG UUAGCC	42 nt
RNA52	GGGAGAAUCAUAAGUAGCCCCUCGUUCACUCCCCC AUGUUAACAGUUAGCC	52 nt
RNA62	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUUAAGAUUCUAAAA UUAUCUCCAGUAUUAACUGUGCUGCU	62 nt
TER10	GGGUUAGGGU	10 nt
TER12	UAGGGUUAGGGU	12 nt
TER18	GGGUUGCGGAGGGUGGGC	18 nt
TER18-2A	AAGGGUUGCGGAGGGUGGGC	20 nt
TER22	AGGGUUAGGGUUAGGGUUAGGG	22 nt
THAP4_fr	GGAGAAGCAGUAGGAGUGCAGUGAGUCGAUGAGCU	35 nt

\*ryboza każdego nukleotydu zawiera grupę metylową przyłączoną kowalencyjnie do atomu tlenu w pozycji 2'

#### III-1-4. Rybonukleaza Dicer

W badaniach wykorzystano: dostępny komercyjnie enzym Turbo Dicer<sup>™</sup> (Genlantis), preparat rekombinowanej ludzkiej Dicer otrzymany w systemie bakulowirusowym (III-2-6) oraz frakcję cytoplazmatyczną lizatów komórek eukariotycznych (w dalszej części pracy nazywaną preparatem komórkowym) zawierającą endogenną Dicer (III-2-5.).

#### III-1-5. Żele poliakrylamidowe (PAA)

##### Żele analityczne do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących

15% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1×TBE. Katalizatory polimeryzacji: 450 µl 10% nadsiarczanu amonu, 30 µl TEMEDu na 80 ml żelu.

Żele preparatywne do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących

8% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1×TBE. Katalizatory polimeryzacji: 200 µl 10% nadsiarczanu amonu, 30 µl TEMEDu na 50 ml żelu.

Żele do badania oddziaływań RNA•RNA w warunkach natywnych

12% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 5% glicerol w buforze 1×TBE. Katalizatory polimeryzacji: 200 µl 10% nadsiarczanu amonu, 30 µl TEMEDu na 50 ml żelu.

Żele do badania oddziaływań RNA•białko w warunkach natywnych

8% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1×TBE. Katalizatory polimeryzacji: 200 µl 10% nadsiarczanu amonu, 30 µl TEMEDu na 50 ml żelu.

*III-1-6. Enzymy i odczynniki wykorzystane podczas badań*

Akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid, 29:1 (Serva)

Albumina wołowa, BSA (Promega)

Antibiotic Antimycotic Solution, 100× (Sigma-Aldrich)

Bio Rad Protein Assay (Bio Rad)

Błękit bromofenolowy (BioShop)

Bydłęca surowica płodowa, FBS (PAA)

Chlorek magnezu, MgCl<sub>2</sub> (BioShop)

Chlorek potasu, KCl (BioShop)

Chlorek sodu, NaCl (BioShop)

cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

Ditiotreitol, DTT (BioShop)

Glicerol (BioShop)

Hepes (BioShop)

Ksylencyjanol (Sigma-Aldrich)

Kwas edetynowy, EDTA (BioShop)

Kwas octowy lodowaty, CH<sub>3</sub>COOH (Chemipur)

Kwas solny, HCl (Chempur)

L-glutamina (Sigma-Aldrich)

Mocznik, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (BioShop)

*N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina, TEMED (Sigma-Aldrich)

Nadsiarczan amonu, APS (BioShop)

*N*-metylomezoporfiryna IX, NMM (Frontier Scientific)

Octan sodu, CH<sub>3</sub>COONa (Serva)

RNA drożdżowe (Ambion)

RNaza T1 (Ambion)

RPMI-1640 (Gibco/Thermo Fisher Scientific)

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific)

Tergitol<sup>®</sup> NP-40 (Sigma-Aldrich)

Trypsyna (Sigma-Aldrich)

Turbo Dicer<sup>™</sup> (Genlantis)

Woda wolna od RNaz (Ambion)

Wodorotlenek sodu, NaOH (Chemipur)

### III-2. Metody

#### III-2-1. Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących

Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych (12-65 nt) w warunkach denaturujących prowadzono w żelach poliakryloamidowych zawierających 7 M mocznik. Do celów preparatywnych stosowano 8% żele PAA o wymiarach 19×18,5 cm, do celów analitycznych stosowano 15% żele PAA o wymiarach 39×33 cm. Składy obu podano w Tabeli 3.2. Analizowane preparaty przed nałożeniem na żel denaturowano, w tym celu mieszano je z równą objętością LB I i inkubowano przez 3 min w 90°C, a następnie przez 5 min na lodzie. Rozdział prowadzono w buforze 1×TBE. Przed nałożeniem prób, żel poddawano preelektroforezie: 1500 V, 50 W, 10 mA, 15 min. Elektroforezę prowadzono w następujących warunkach: 1500 V, 50 W, 40 mA, 2,5-3 h. RNA znakowany radioizotopowo wizualizowano na kliszach rentgenowskich (żele preparatywne) lub przy użyciu skanera FLA-5100 (Fujifilm) (żele analityczne). Do analizy uzyskanych danych wykorzystywano oprogramowanie Multi Gauge (Fujifilm).

**Tabela 3.2. Skład żeli poliakrylamidowych do elektroforezy w warunkach denaturujących**

składnik	8% PAA	15% PAA
bufor TBE	1×	1×
akrylamid/N,N'-bisakrylamid (29:1)	8%	15%
mocznik	7 M	7 M
APS	0,05%	0,05%
TEMED	0,1%	0,1%

preelektroforeza: 1500 V, 50 W, 10 mA, 15 min  
 elektroforeza właściwa: 1500 V, 50 W, 40 mA, 2,5-3 h

#### III-2-2. Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych

Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych oraz kompleksów rybonukleoproteinowych w warunkach natywnych prowadzono w żelach poliakrylamidowych, których skład podano w Tabeli 3.3. Stosowano żele o wymiarach

19×18,5 cm. Analizowane preparaty przed nałożeniem na żel mieszano z równą objętością LB II. Rozdział prowadzono w buforze 1×TBE z dodatkiem 5% glicerolu. Przed nałożeniem prób, żel poddawano 15 min preelektroforezie pod napięciem 120 V. Elektroforezę prowadzono przy takim samym napięciu przepływającego prądu przez 8 h w 4°C. Kwasy nukleinowe znakowane radioizotopowo wizualizowano przy użyciu skanera FLA-5100 (Fujifilm). Materiał niewyznakowany radioizotopowo wizualizowano przy użyciu tego samego skanera po uprzednim wybarwieniu żelu w roztworze barwiącym: SybrGold (wizualizacja całkowitego RNA) lub NMM (wizualizacja RNA przyjmujących strukturę G-kwadrupleksów o topologii równoległej). Do analizy uzyskanych danych wykorzystywano oprogramowanie Multi Gauge (Fujifilm).

**Tabela 3.3. Skład żeli poliakrylamidowych do elektroforezy w warunkach natywnych**

składnik	5% PAA	12% PAA
bufor TBE	1×	1×
akrylamid/ <i>N,N'</i> -bisakrylamid (29:1)	5%	12%
glicerol	5%	5%
APS	0,05%	0,05%
TEMED	0,1%	0,1%

preelektroforeza: 120V, 15 min  
elektroforeza właściwa: 120V, 8 h

### III-2-3. Znakowanie radioizotopowe końca 5' oligomerów RNA

Cząsteczki kwasów nukleinowych znakowano radioizotopowo przez fosforylację końca 5'  $\gamma(^{32}\text{P})\text{ATP}$ . Skład i warunki reakcji podano w Tabeli 3.4. Przed przygotowaniem mieszaniny reakcyjnej RNA denaturowano poprzez podgrzanie do temperatury 90°C i gwałtowne schłodzenie na lodzie. Produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 8% żelu PAA w warunkach denaturujących i oczyszczano zgodnie z procedurą opisaną w III-2-4. (RNA  $\leq$  20 nt) lub na kolumnach NucAway™ (RNA  $\geq$  20 nt) według protokołu dostarczonego przez producenta (Ambion).

Tabela 3.4. Skład mieszaniny i warunki reakcji fosforylacji końca 5' RNA

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
bufor A	10×	1×
RNA	10 μM	1 μM
[γ <sup>32</sup> P] ATP	10 μCi/μl	0,5 μCi/μl
kinaza polinukleotydowa T4	10 U/μl	0,5 U/μl
H <sub>2</sub> O (wolna od RNaz)	do 20 μl	

inkubacja: 37°C, 15 min

inaktywacja kinazy: 90°C, 5 min

#### III-2-4. Oczyszczanie kwasów nukleinowych w żelach PAA

Cząsteczki kwasów nukleinowych poddawano elektroforezie i wizualizowano zgodnie z procedurą opisaną w III-2-1. Wycięte fragmenty żelu zawierające cząsteczki kwasów nukleinowych o pożądanej długości rozdrabniano, przenoszono do 400 μl 0,3 M octanu sodu (pH 5,0) i inkubowano w 4°C przez 16 h, delikatnie mieszając. Następnie próby krótko wirowano (16000×g, 4°C, 1 min), pobierano supernatant, który przenoszono do nowej probówki. Obecne w supernatancie kwasy nukleinowe wytrącano przez dodanie 3 objętości 96% etanolu (-20°C) i wymrażanie w -20°C przez 1 h. Po zakończeniu inubacji preparat wirowano (16000×g, 4°C, 30 min), roztwór dekantowano, a osad zawieszano w 200 μl 70% etanolu (-20°C). Próby powtórnie wirowano (16000×g, 4°C, 30 min), po usunięciu etanolu osad suszono i rozpuszczano w wodzie wolnej od RNaz. Stężenie materiału znakowanego radioizotopowo doprowadzono do 10000cpm/μl. Homogenność materiału po oczyszczaniu z żelu sprawdzano poprzez elektroforezę w 15% PAA w warunkach denaturujących. Analizowane cząsteczki wizualizowano przy użyciu skanera FLA-5100 (Fujifilm).

#### III-2-5. Przygotowanie lizatów komórkowych

Adherentne komórki HeLa hodowano w pożywce RPMI-1640 suplementowanej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS), penicyliną (100 U/mL), streptomycyną (100 μg/mL),



amphoterycyną B (250 ng/mL) i L-glutaminą (2 mM). Przy stanie ~80% konfluencji, komórki odczepiano od podłoża, stosując trypsynę (0,05 %), a następnie poddawano sedimentacji poprzez krótkie wirowanie (100×g, 21°C, 3 min) i przemywano 10 ml 1×PBS. Natychmiast po usunięciu PBS, osad komórek (~8.4×10<sup>6</sup> komórek) zawieszano w 200 µl buforu do lizy i inkubowano w 4°C przez 20 min. Następnie preparat mrożono przez 15 min w -80°C, po czym poddawano go powolnemu rozmrażaniu na lodzie. Zamrażanie/rozmrażanie preparatu powtarzano, worteksując próbki pomiędzy cyklami. Preparat poddawano wirowaniu różnowukrotnieicowemu (700×g, 10 min, 4°C i 13000×g, 30 min, 4°C). Końcowy supernatant stanowił frakcję cytoplazmatyczną, która służyła jako materiał do dalszych badań (tzw. preparat komórkowy). Stężenie całkowitego białka obecnego w preparacie wyznaczano metodą Bradford (zgodnie z protokołem producenta) i doprowadzano do wartości 10 mg/ml, rozcieńczając buforem do lizy.

### *III-2-6. Produkcja ludzkiej rekombinowanej rybonukleazy Dicer w systemie bakulowirusowym*

Otrzymywaniem Dicer w systemie bakulowirusowym i oczyszczaniem białka zajmował się zespół prof. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk z Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów w Katedrze Wirusologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii w Gdańsku. Matrycę do syntezy białka w komórkach owadź (Sf9) skonstruowano metodami inżynierii genetycznej z wykorzystaniem wektora pBlueScript (GeneCopoeia) niosącego sekwencję cDNA kodującą drugi wariant transkrypcyjny *DICER1* (NM\_030621). Przed sekwencją kodującą Dicer wprowadzono sekwencję znacznika histydynowego (His6) umożliwiającego późniejsze oczyszczanie białka. Preparat otrzymany po lizie komórek Sf9 zakażonych rekombinowanym bakulowirusem oczyszczano dwuetapowo: z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na kolumnie ze złożem Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA, Qiagen) oraz chromatografii jonowymiennej (HiTrap Q HP, GE Healthcare). Czystość otrzymanego preparatu sprawdzano, dokonując rozdziału w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących (SDS PAGE).

*III-2-7. Cięcie RNA przez Dicer*

Reakcje hydrolizy znakowanego radioizotopowo substratu RNA prowadzono w standardowym buforze reakcyjnym zawierającym jony  $Mg^{2+}$  (III-1-1.). Stosowano preparat Dicer otrzymany w systemie bakulowirusowym (150 nM), komercyjnie dostępny preparat Turbo Dicer (1 U) lub preparat komórkowy (1  $\mu$ g całkowitego białka). Reakcje kontrolne prowadzono w obecności 5 mM EDTA lub bez dodatku białka (zgodnie z opisem na rysunkach). Skład i warunki reakcji podano w Tabeli 3.5. Produkty reakcji rozdzielano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym zgodnie z procedurą opisaną w III-2-1.

**Tabela 3.5. Skład mieszaniny i warunki reakcji hydrolizy RNA przez Dicer**

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
bufor	5×	1×
RNA	10000 cpm/ $\mu$ l, 1 $\mu$ M	1000 cpm/ $\mu$ l, 0,1 $\mu$ M
Dicer	1 U/ $\mu$ l, 750 nM lub 10 $\mu$ g/ $\mu$ l*	0,1 U/ $\mu$ l, 150 nM lub 1 $\mu$ g/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (wolna od RNaz)	do 10 $\mu$ l	-

inkubacja: 37°C, 30 min

\*w zależności od preparatu, szczegóły w tekście

*III-2-8. Ocena potencjału inhibitorowego oligomerów*

Potencjał inhibitorowy oligomerów oceniano w standardowych reakcjach hydrolizy pre-miRNA przez Dicer (III-2-6.). Stężenie końcowe białka było stałe (0,1 U/ $\mu$ l dla preparatu komercyjnego, 150 nM dla preparatu z systemu bakulowirusowego, 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l całkowitego białka dla preparatów komórkowych), podobnie, jak ilość substratu RNA (10000 cpm). Zmieniało się natomiast stężenie testowanego oligomeru, tak, aby stosunek molowy pre-miRNA:oligomer wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10, 1:100. W pierwszym etapie przeprowadzano pre-inkubację substratu i oligomeru (15 min, 4°C). Reakcje inicjowano przez dodanie enzymu i przeniesienie prób do 37°C. W przypadku eksperymentów, w których stosunek molowy Dicer:oligomer był jak 1:1, 1:10 i 1:100, w pierwszym etapie pre-inkubowano Dicer i oligomer (15 min, 4°C),

a następnie do mieszaniny dodawano pre-miRNA i próby przenoszono do 37°C. Reakcje kontrolne prowadzono bez dodatku białka i testowanego oligomeru (K-) lub jedynie bez dodatku oligomeru (K+). Wszystkie próby inkubowano w 37°C przez 30 min. Po tym czasie reakcje zatrzymywano przez dodanie 1 objętości buforu LB I i denaturację termiczną (3 min, 90°C). Produkty reakcji rozdzielano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym zgodnie z procedurą opisaną w III-2-1. Żele analizowano przy użyciu skanera FLA-5100 (Fujifilm) i oprogramowania Multi Gauge 3.0 (Fujifilm). Dla każdej z prób określano ilość powstającego miRNA, a wartości otrzymane dla reakcji z testowanymi oligomerami normalizowano względem K+ (poziom miRNA uwalnianego przez Dicer pod nieobecność inhibitora przyjmowano za 100%). Słupki błędów na wykresach zależności poziomu generowanego miRNA od stosunku pre-miRNA:oligomer odpowiadają wartościom odchylenia standardowego wyznaczonego na podstawie przynajmniej trzech powtórzeń eksperymentu.

#### III-2-9. Badanie oddziaływań RNA•RNA

Oddziaływanie RNA•RNA badano w teście spowolnienia migracji RNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych (EMSA, ang. *electrophoretic mobility shift assay*). Wyznakowany radioizotopowo oligomer inkubowano ze 100-krotnym\* molowym nadmiarem drugiej cząsteczki w standardowym buforze reakcyjnym zawierającym jony  $Mg^{2+}$  (III-1-1.). Skład i warunki reakcji podano w Tabeli 3.6. Mieszaniny reakcyjne rozdzielano metodą elektroforezy w 10% niedenaturującym żelu poliakrylamidowym zgodnie z procedurą opisaną w III-2-2.

**Tabela 3.6. Skład mieszaniny i warunki reakcji do badania oddziaływań pomiędzy oligomerami**

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
bufor	5×	1×
RNA1	10000 cpm/ $\mu$ l, 1 $\mu$ M	1000 cpm/ $\mu$ l, 0,1 $\mu$ M
RNA2	100 $\mu$ M*	10 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O (wolna od RNaz)	do 10 $\mu$ l	-

inkubacja: 37°C, 15 min

\*chyba, że zaznaczono inaczej

### III-2-10. Badanie oddziaływań białko•RNA z wykorzystaniem techniki dot blot

Wydajność tworzenia się kompleksów rybonukleoproteinowych w układzie trójskładnikowym: testowany RNA, pre-miRNA, Dicer badano, wykorzystując filtrowanie przez membranę nitrocelulozową w aparacie Schleicher and Schuell dot blot [439]. Membranę nitrocelulozową (Protran, Schleicher and Schuell) i nylonową (Hybond-N+, Amersham) oraz bibułę Watman 3 mm (Watman) nasączano w roztworze buforującym (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl). W aparacie do transferu umieszczano kolejno: bibułę, membranę nylonową (wiązącą RNA), membranę nitrocelulozową (wiązącą białka). Mieszaniny reakcyjne zawierały niezmiennie stężenie testowanego oligomeru RNA wyznakowanego radioizotopowo na końcu 5' (1000 cpm, 1  $\mu$ M) i Dicer (0,1 U/ $\mu$ l preparatu komercyjnego). W poszczególnych próbach zmieniano się natomiast stężenie pre-miRNA (0-600 nM), tak, by stosunek molowy pre-miRNA:Dicer wynosił odpowiednio: 1:1, 5:1, 10:1, 50:1, 100:1, 300:1 i 600:1. Po pre-inkubacji testowanego oligomeru z Dicer (10 min) do mieszaniny reakcyjnej dodawano pre-miRNA i prowadzono dalszą inkubację w 37°C. Po 30 min próby nakładano na membranę nitrocelulozową i filtrowano pod ciśnieniem. Ilość związanego na membranie RNA analizowano z wykorzystaniem skanera FLA-5100 (Fujifilm) i oprogramowania Multi Gauge (Fujifilm).

*III-2-11. Badanie oddziaływań białko•RNA w teście spowolnienia migracji RNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych*

Wyznakowany radioizotopowo oligomer (10000 cpm) inkubowano z Dicer (500 nM)\* w standardowym buforze do badania oddziaływań RNA z Dicer (III-1-1.). Skład i warunki reakcji podano w Tabeli 3.7. Mieszaniny reakcyjne rozdzielano metodą elektroforezy w 10% żelu poliakrylamidowym zgodnie z procedurą opisaną w III-2-2.

**Tabela 3.7. Skład mieszaniny i warunki reakcji do badania oddziaływań pomiędzy RNA a Dicer**

<b>składnik</b>	<b>stężenie początkowe</b>	<b>stężenie końcowe</b>
bufor	5×	1×
RNA	10000 cpm/ $\mu$ l	1000 cpm/ $\mu$ l
Dicer	500 nM*	50 nM
H <sub>2</sub> O (wolna od RNaz)	do 10 $\mu$ l	-

inkubacja: 4°C, 30 min

\*chyba, że zaznaczono inaczej

*III-2-12. Hydroliza RNA przez rybonukleazę T1*

Zawieszony w wodzie RNA (znakowany radioizotopowo pre-miRNA oraz aptamer) denaturowano termicznie (3 min, 90°C), po czym poddawano je renaturacji poprzez powolne schładzanie do temperatury pokojowej. Tak przygotowany RNA wykorzystywano do przygotowania mieszanin reakcyjnych. W reakcjach kontrolnych stosowano pre-miRNA przygotowywany jak wyżej, ale bez udziału aptameru. Skład i warunki reakcji podano w Tabeli 3.8. Produkty reakcji rozdzielano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym zgodnie z procedurą opisaną w III-2-1.

Tabela 3.8. Skład mieszaniny i warunki reakcji hydrolizy RNA przez rybonukleazę T1

składnik	stężenie początkowe	stężenie końcowe
bufor*	10×	1×
RNA1	20000 cpm/ $\mu$ l	2000 cpm/ $\mu$ l
RNA2	-/10 $\mu$ M/ 100 $\mu$ M	-/1 $\mu$ M/10 $\mu$ M
RNA drożdżowe	1 $\mu$ g / $\mu$ l	0,1 $\mu$ g / $\mu$ l
T1	0,1 U/ $\mu$ l	0,01 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O (wolna od RNaz)	do 10 $\mu$ l	-

inkubacja: 21°C, 15 min

\*dołączony do enzymu 10× RNA Structure Buffer (Ambion)

### III-2-13. Analiza bioinformatyczna struktury RNA

Strukturę drugorzędową RNA analizowano przy użyciu programów z pakietu RNAstructure: Fold [440] oraz bifold [441-443]. Narzędzia te służą do przewidywania optymalnych i suboptymalnych struktur drugorzędowych pojedynczych cząsteczek oraz dupleksów międzycząsteczkowych tworzonych przez RNA w warunkach 1 M NaCl, obliczają one również energię swobodną ( $\Delta G_0$ ) proponowanych struktur. Modelowanie struktury prowadzono przy wartościach domyślnych parametrów obu programów.

### III-2-14. Analiza bioinformatyczna transkryptomu człowieka

Bazę danych zawierającą ludzkie sekwencje genomowe i sekwencje transkryptów zdeponowanych w RefSeq (ang. *human genomic plus transcript database*) poddano przeszukiwaniu z wykorzystaniem algorytmu BLASTn (ang. *basic local alignment search tool*), wersja 2.2.23+ [444], stosując jako zapytanie (ang. *query*) sekwencje nukleotydowe 120 aptamerów wyselekcjonowanych wobec Dicer (Załącznik 1.). Analizę prowadzono przy domyślnych wartościach parametrów oceniających przyrównania, tj. 2, -3 w przypadku punktów przyznawanych za dopasowanie/niedopasowanie nukleotydów (ang. *match/mismatch*) oraz 5, 2 w przypadku kar za, odpowiednio, otwarcie przerwy (ang. *gap existence*) i jej wydłużanie (ang. *gap extension*). Ponadto, za oczekiwaną wartość progową (ang. *expect*

*threshold*), wskazującą na istotność statystyczną dopasowań, przyjęto 100. Otrzymane wyniki poddano filtrowaniu ograniczającemu zbiór do dopasowań o długości (ang. *alignment length*) przynajmniej 20 nt.

---

## IV WYNIKI

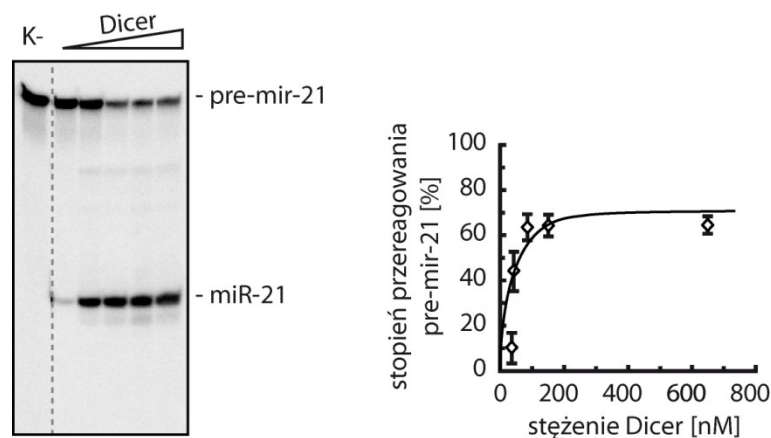
Analizy potencjału inhibitorowego oligomerów RNA, w tym dwóch wspomnianych aptamerów (ATD\_13.6 i ATD\_15.52), prowadzone były z wykorzystaniem enzymu dostępnego komercyjnie (Genlantis). Preparat ten jest powszechnie stosowany w różnego typu eksperymentach *in vitro*, w których wykorzystuje się aktywność rybonukleazową Dicer [325, 445-448]. Szerokie spektrum białek towarzyszących enzymowi komercyjnemu (Załącznik 2.) sprawia jednak, iż nie nadaje się on do badań mechanizmów inhibicji, w tym: analizy oddziaływań RNA • białko. Zaistniała zatem konieczność otrzymania preparatu o wyższej homogenności. W tym celu podjęto współpracę z grupą prof. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk z Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów w Katedrze Wirusologii Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii w Gdańsku. Zespół ten podjął się produkcji i oczyszczania ludzkiej Dicer w systemie bakulowirusowym (III-2-6.). W konsekwencji pierwszy etap prezentowanych badań poświęcony został charakterystyce uzyskanego preparatu pod kątem jego zdolności do wiązania i cięcia RNA.

### *IV-1. Charakterystyka preparatu ludzkiej rekombinowanej rybonukleazy Dicer otrzymywanej w systemie bakulowirusowym*

Do produkcji ludzkiej rekombinowanej Dicer wykorzystano system ekspresji białek heterogenicznych w liniach komórek owadzych Sf9. Otrzymywaną w ten sposób rybonukleazę oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa, wykorzystując znacznik histydynowy na końcu aminowym Dicer, a następnie metodą chromatografii jonowymiennej. Aktywność rybonukleazową Dicer oceniano w standardowych reakcjach hydrolizy wybranych ludzkich pre-miRNA: pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a i pre-mir-210; RNA znakowany radioizotopowo na końcu 5' inkubowano z testowanym preparatem przez 30 min w temperaturze 37°C w buforze zawierającym jony  $Mg^{2+}$ . Następnie mieszaniny reakcyjne poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w denaturujących żelach PAA. Na podstawie analizy autoradiogramów określano ilość miRNA powstałego w poszczególnych próbach. Uzyskane dane pozwoliły wyznaczyć stężenie Dicer (~150 nM), w którym wydajność



hydrolizy pre-miRNA jest najwyższa (Rys. 4.1.). Ponadto, zgodnie ze schematem zaprezentowanym na Rys. 4.2., porównano aktywność katalityczną testowanego białka i enzymu dostępnego komercyjnie. Uzyskane wyniki potwierdziły jednakowy wzór cięcia pre-miRNA generowany przez oba preparaty Dicer.

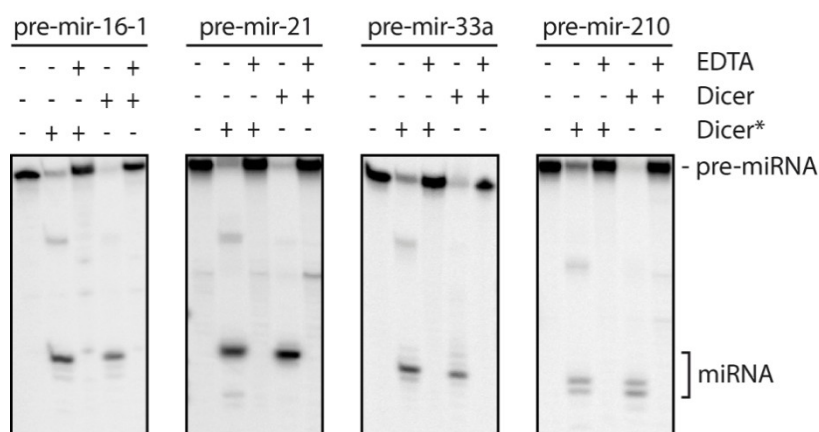


**Rysunek 4.1. Określenie wydajności hydrolizy pre-miRNA przez preparat Dicer otrzymany w systemie bakulowirusowym**

Wynik analizy reakcji cięcia pre-mir-21 przez Dicer. Wyznakowany radioizotopowo pre-mir-21 inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem Dicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu zmieniało się od 20 do 650 nM). Wykres przedstawia zależność wydajności powstawania miRNA (oznaczona jako stopień przereagowania substratu) od stężenia Dicer. Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu wyznaczonemu na podstawie trzech powtórzeń technicznych. Na podstawie [449].

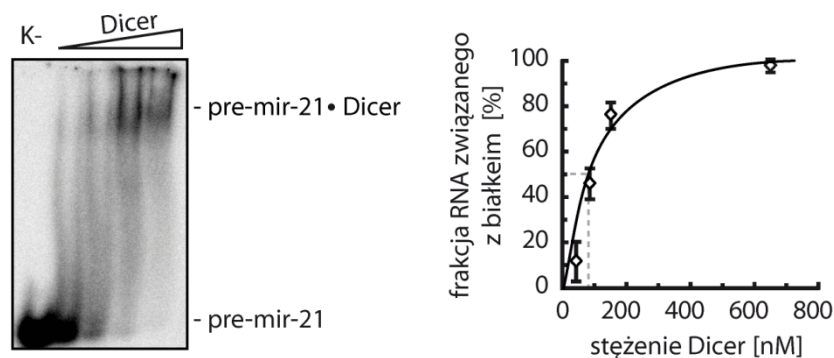
Zdolność Dicer do wiązania RNA badano, wykorzystując test EMSA. Wybrany pre-miRNA (pre-mir-21) wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' inkubowano z Dicer w warunkach inhibujących aktywność katalityczną enzymu, ale pozwalających na tworzenie się kompleksów rybonukleoproteinowych (4°C) [257], a następnie poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelach PAA w warunkach natywnych (Rys. 4.3.). Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie stałej dysocjacji ( $K_d$ ) kompleksu pre-mir-21•Dicer, która wynosi  $80 \pm 5.6$  nM i jest porównywalna do wartości  $K_d$  kompleksów pre-miRNA•Dicer opisywanych w innych pracach [258, 302]. Ze względu na brak danych na temat oddziaływan Dicer z ssRNA o długości innej od typowych substratów (~60-70 nt) lub produktów (~21-24 nt) enzymu, stosując test EMSA zweryfikowano zdolność uzyskanego preparatu do wiązania szeregu ssRNA:

RNA12, RNA14, RNA22, RNA32, RNA42, RNA52, RNA62, o długości wskazanej w nazwie, tj. od 12 nt do 62 nt (Rys. 4.4.). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że Dicer nie tworzy wydajnie kompleksów z oligomerami krótszymi niż ~20nt. W przypadku ssRNA  $\geq$  ~20 nt zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy długością oligomeru a wydajnością wiązania przez Dicer i trwałością tworzonych kompleksów rybonukleoproteinowych.



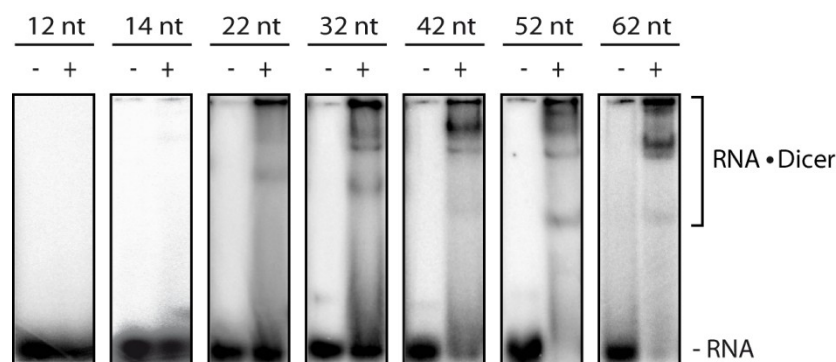
**Rysunek 4.2. Porównanie aktywności rybonukleazowej preparatów rekombinowanej Dicer wykorzystanych w badaniach**

Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których wskazane pre-miRNA (znakowane radioizotopowo) były trawione przez preparat otrzymany w systemie bakulowirusowym (150 nM Dicer) lub preparat komercyjny (1U Dicer\*). Reakcje kontrolne prowadzono w obecności 5 mM EDTA lub bez dodatku enzymu. Wskazano pozycję prążków odpowiadających pre-miRNA i miRNA. Na podstawie [449].



**Rysunek 4.3. Określenie wydajności wiązania pre-miRNA przez preparat Dicer otrzymany w systemie bakulowirusowym**

Wynik testu EMSA z udziałem pre-mir-21 i Dicer. Wyznakowany radioizotopowo pre-mir-21 inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem Dicer (stężenie enzymu zmieniało się od 20 do 650 nM). Wykres przedstawia zależność pomiędzy stężeniem Dicer a ilością pre-miRNA z nią związanego. Przerywaną linią zaznaczono stężenie enzymu, przy którym 50% RNA pozostaje w kompleksie z Dicer (Kd). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu wyznaczonemu w oparciu o wyniki trzech powtórzeń eksperymentu. Na podstawie [449].

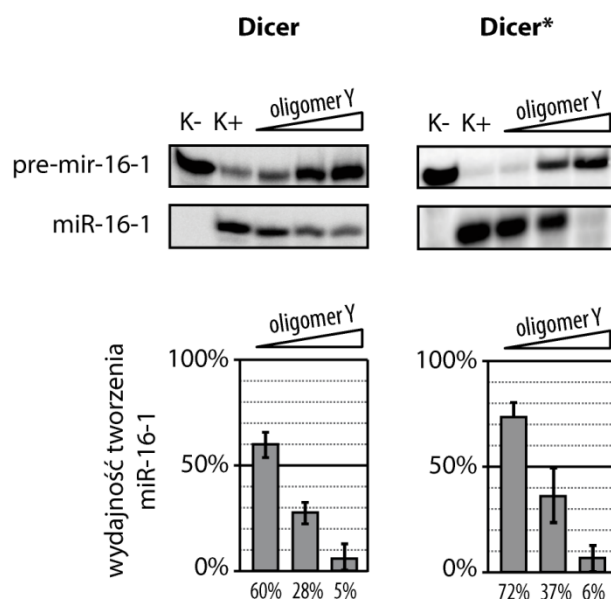


**Rysunek 4.4. Badanie wpływu długości ssRNA na wydajność jego wiązania przez preparat Dicer otrzymany w systemie bakulowirusowym**

Wynik testu EMSA z udziałem Dicer i szeregu ssRNA o długości od 12 do 62 nt. Wyznakowany radioizotopowo oligomer o wskazanej długości inkubowano w samym buforze reakcyjnym (-) lub z dodatkiem Dicer (500 nM), (+). Mieszanki reakcyjne rozdzielano w żelach PAA w warunkach natywnych. Na radiogramie wskazano pozycję prążków odpowiadających niezwiązanemu RNA oraz RNA w kompleksie z Dicer. Na podstawie [449].

Reakcje trawienia pre-miRNA przez Dicer stanowiły układ modelowy, w którym testowany był potencjał inhibitorowy wybranych oligomerów (Załącznik 3.). Jak zaznaczono wcześniej, badania te prowadziło z wykorzystaniem enzymu dostępnego

komercyjnie. Po uzyskaniu bardziej homogennego preparatu Dicer w systemie bakulowirusowym wszystkie uzyskane uprzednio wyniki zostały zweryfikowane. W tym celu przeprowadzono serię eksperymentów, w których każdorazowo przygotowywano trzy mieszaniny reakcyjne zawierające odpowiedni preparat Dicer, pre-miRNA znakowany radioizotopowo na końcu 5' oraz wybrany oligomer w stężeniu zapewniającym stosunek pre-miRNA:oligomer odpowiednio: 1:1, 1:10 lub 1:100. Dodatkowo przygotowywano dwie mieszaniny, w których prowadzono reakcje kontrolne: kontrolę negatywną (K-), pozwalającą na monitorowanie integralności pre-miRNA w trakcie inkubacji w samym buforze reakcyjnym oraz kontrolę pozytywną (K+), na podstawie której szacowano ilość miRNA powstającego w reakcji z Dicer, bez testowanego oligomeru. Próby inkubowano w 37°C przez 30 min, a następnie poddawano rozdzielni w denaturujących żelach PAA. Na podstawie uzyskanych autoradiogramów szacowano ilości miRNA powstającego w reakcjach z danym oligomerem i porównywano je do ilości miRNA powstających w reakcji kontrolnej (K+). Na Rys. 4.5. przedstawiono przykładowe wyniki badań przeprowadzonych dla preparatu bakulowirusowego (Dicer) oraz komercyjnej Dicer (Dicer\*) z udziałem pre-mir-16-1 i oligomeru Y. Wyniki otrzymane dla obu enzymów są spójne, tzn. oligomer Y w reakcjach z preparatem otrzymanym w systemie bakulowirusowym hamował cięcie pre-mir-16-1 z podobną wydajnością, jak w reakcjach z komercyjną Dicer. Na podstawie zgromadzonych danych stwierdzono, że w doświadczeniach, w których badana jest aktywność rybonukleazowa Dicer, oba preparaty rekombinowanego białka, tj. komercyjny oraz uzyskany w systemie owadzi, mogą być stosowane zamiennie.



**Rysunek 4.5. Porównanie potencjału inhibitorowego oligomeru Y w reakcjach z preparatami rekombinowanej Dicer wykorzystywanymi w badaniach**

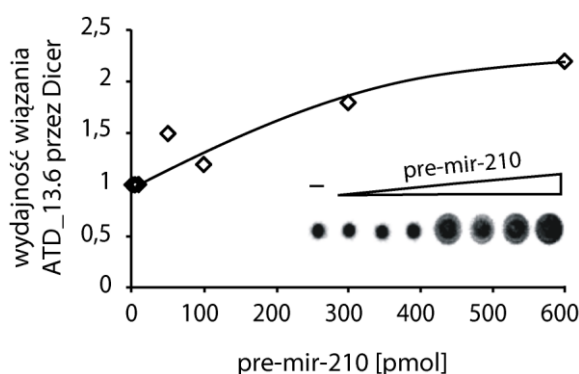
Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których pre-mir-16-1 był trawiony przez preparat otrzymany w systemie bakulowirusowym (Dicer) lub preparat komercyjny (Dicer\*) w obecności oligomeru Y. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia oligomeru Y (0,1 μM, 1 μM, 10 μM). (K-) reakcja kontrolna bez dodatku enzymu i oligomeru Y, (K+) reakcja ze wskazanym preparatem rybonukleazy, bez oligomeru Y. Wykresy przedstawiają wydajność tworzenia miR-16-1 w reakcjach z oligomerem Y znormalizowane względem K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu.

#### IV-2. Badanie mechanizmów inhibicji Dicer przez oligomery RNA

##### IV-2-1. Badanie mechanizmu inhibicji powstawania miR-210 w reakcjach z ATD\_13.6

ATD\_13.6 (56 nt), choć silnie wiązany przez Dicer ( $K_d = 600$  nM), pozostaje niecięty przez ten enzym [436]. Co więcej, badania potencjału inhibitorowego tego aptameru wykazały, że w reakcjach z Dicer ATD\_13.6 wydajnie hamował powstawanie miR-210, natomiast w niewielkim stopniu wpływał na wydajność tworzenia innych badanych miRNA [436]. By lepiej zrozumieć naturę oddziaływań pomiędzy ATD\_13.6 i Dicer oraz wyjaśnić zaobserwowaną selektywność działania aptameru zbadano wpływ pre-mir-210 na wiązanie ATD\_13.6 do enzymu. W tym celu do mieszaniny reakcyjnej zawierającej Dicer (Genlantis) oraz ATD\_13.6 znakowany radioizotopowo na końcu 5'

dodawano pre-mir-210, a następnie próby inkubowano przez 1 h w 4°C. Bufor reakcyjny nie zawierał jonów  $Mg^{2+}$ , przez co enzym mógł oddziaływać z RNA, jednak jego aktywność rybonukleazowa była zahamowana. Następnie mieszaniny reakcyjne nakładano na membranę nitrocelulozową i filtrowano pod ciśnieniem. Ze względu na właściwości fizyko-chemiczne membrany białka oraz cząsteczki z nimi związane ulegały zatrzymaniu na jej powierzchni, podczas gdy była ona przepuszczalna dla wolnych kwasów nukleinowych. Ilość ATD\_13.6 związanego przez Dicer szacowano na podstawie intensywności sygnału pochodzącego od  $^{32}P$  znajdującego się na końcu 5' oligomeru. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zwiększenie ilości pre-miRNA w mieszaninie reakcyjnej powodowało wydajniejsze wiązanie ATD\_13.6 z Dicer (Rys. 4.6.).

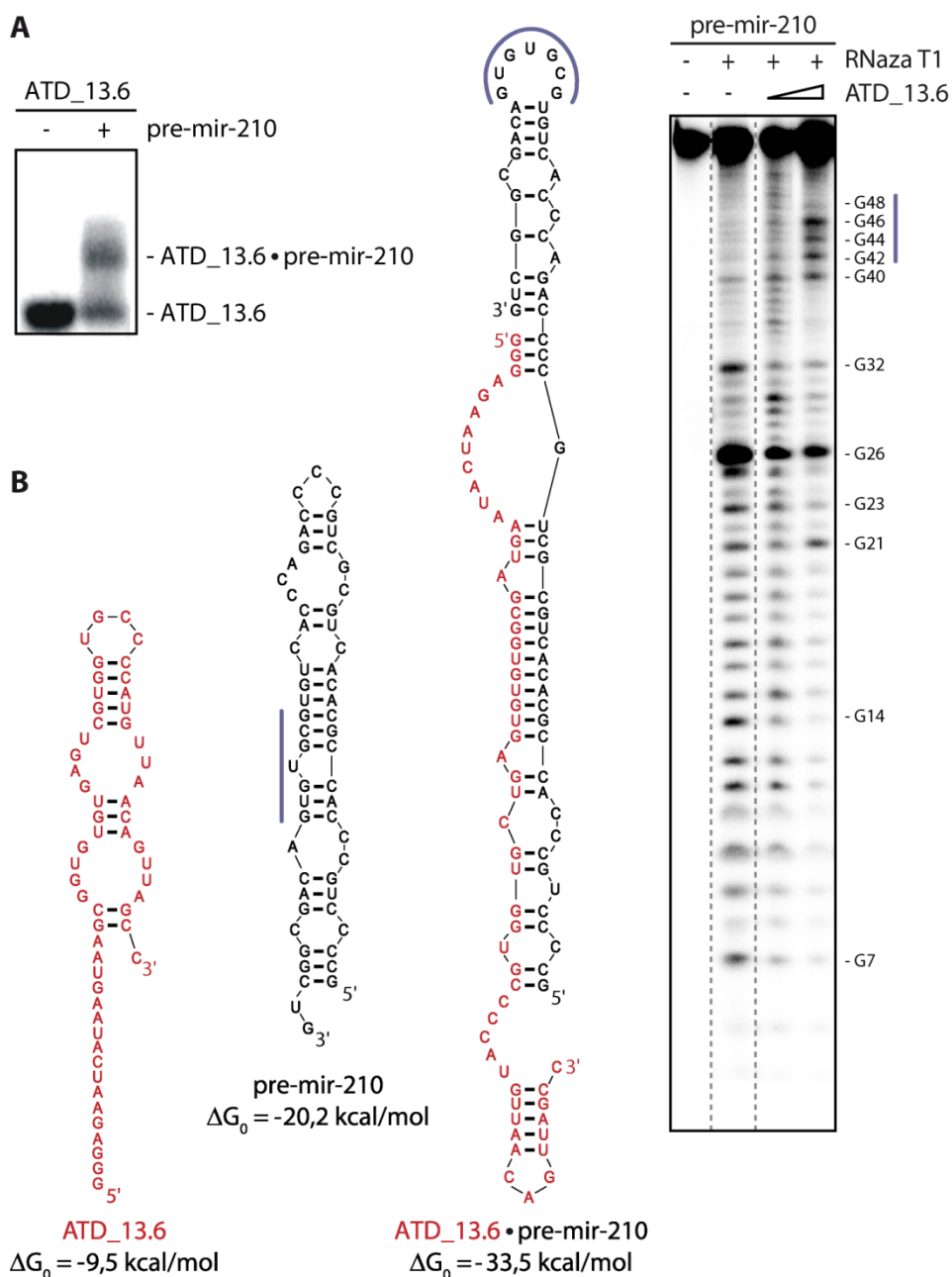


**Rysunek 4.6. Badanie wpływu pre-mir-210 na wiązanie ATD\_13.6 przez Dicer**

Wykres obrazujący korelację pomiędzy stężeniem pre-mir-210 a wydajnością wiązania ATD\_13.6 przez Dicer. Na rysunku umieszczono radiogram błony nitrocelulozowej wiążącej kompleksy Dicer i wyznakowanego radioizotopowo ATD\_13.6; trójkątem oznaczono zmianę stężenia pre-mir-210.

Powyższa obserwacja zrodziła przypuszczenie, że ATD\_13.6 może oddziaływać nie tylko z Dicer, ale także z pre-mir-210, tworząc trójskładnikowy kompleks. By sprawdzić, czy obie cząsteczki RNA mogą ze sobą oddziaływać, przeprowadzono test EMSA, w którym wyznakowany radioizotopowo ATD\_13.6 inkubowano z pre-mir-210 w stosunku molowym 1:100, a następnie mieszaninę reakcyjną rozdzielono w żelu PAA w warunkach natywnych. Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdziły tworzenie się dupleksu ATD\_13.6 • pre-mir-210 (Rys. 4.7. A).

Dodatkowo, analiza bioinformatyczna wykazała, że pomiędzy ATD\_13.6 i pre-mir-210 istnieje komplementarność sekwencji pozwalająca na stabilne wiązanie się obu cząsteczek (Rys. 4.7. B). Przewidywana struktura drugorzędowa tego dupleksu jest znacznie trwalsza pod względem termodynamicznym niż struktury zaproponowane dla ATD\_13.6 i pre-mir-210 osobno. W celu weryfikacji uzyskanych modeli struktury drugorzędowej kompleksu ATD\_13.6 • pre-mir-210 przeprowadzono mapowanie enzymatyczne struktury drugorzędowej pre-mir-210 oraz jego dupleksu z ATD\_13.6. W badaniach wykorzystano RNAzę T1, endorybonukleazę specyficzną wobec ssRNA, która hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe po stronie 3' G. Wyniki rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia enzymatycznego RNA potwierdziły prawdziwość, przewidzianych *in silico*, modeli struktury drugorzędowej pre-mir-210 oraz jego dupleksu z ATD\_13.6 (Rys. 4.7. B-C).

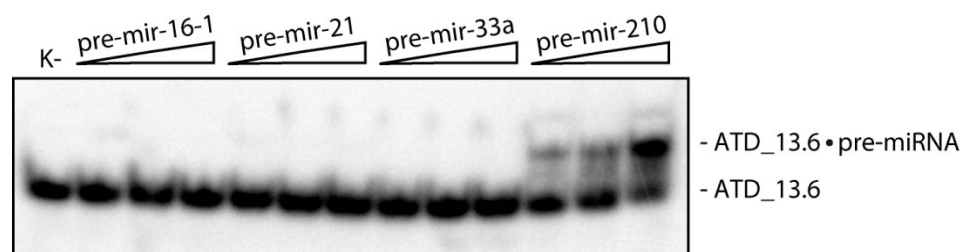


**Rysunek 4.7. Badanie oddziaływania pomiędzy ATD\_13.6 i pre-mir-210**

**A** – Wynik testu EMSA z udziałem ATD\_13.6 i pre-mir-210. Wyznakowany radioizotopowo ATD\_13.6 poddano denaturacji termicznej oraz powolnej renaturacji i inkubowano w samym buforze reakcyjnym (-) lub z dodatkiem pre-mir-210 (+). Wskazano pozycję prążków odpowiadających ATD 13.6 oraz dupleksowi ATD 13.6 • pre-mir-210. Na podstawie [450]; **B** – Struktury o najniższej energii swobodnej ( $\Delta G_0$ ) przewidziane dla ATD\_13.6, pre-mir-210 i duplesu obu cząsteczek. Na niebiesko zaznaczono rejon pre-mir-210, którego rearanżacja po związaniu ATD\_13.6 została potwierdzona w mapowaniu enzymatycznym. Autoradiogram przedstawia wynik rozdzielania elektroforetycznego produktów trawienia przez RNazę T1 znakowanego radioizotopowo pre-mir-210, inkubowanego bez (-) lub z ATD\_13.6 (+). Wskazanym na zdjęciu prążkom przypisano odpowiadające im miejsca hydrolizy w obrębie pre-miRNA (G7-G48). Trójkąt symbolizuje zmianę stężenia ATD\_13.6 (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ).



Aby zweryfikować tezę, że za wykazane wcześniej selektywne hamowanie powstawania mir-210 w reakcjach z ATD\_13.6 odpowiada oddziaływanie tego aptameru z pre-mir-210, wykonano serię dodatkowych eksperymentów z udziałem trzech innych prekursorów, tj.: pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a. Potencjalne oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami RNA badano analogicznie jak poprzednio, tj.: ATD\_13.6 wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' inkubowano z odpowiednim pre-miRNA, a następnie mieszaniny reakcyjne poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu w żelach PAA w warunkach natywnych. Dla każdego pre-miRNA przygotowano trzy mieszaniny reakcyjne, w których stosunek molowy pre-miRNA do ATD\_13.6 wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10, 1:100. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ATD\_13.6 oddziaływał jedynie z pre-mir-210. Nie zaobserwowano tworzenia się dupleksów ATD\_13.6 z pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a, nawet przy najwyższym zastosowanym stężeniu prekursora (10  $\mu$ M), (Rys. 4.8.). Otrzymane wyniki potwierdziły selektywność oddziaływania ATD\_13.6 i pre-mir-210 wynikającą z komplementarności ich sekwencji.



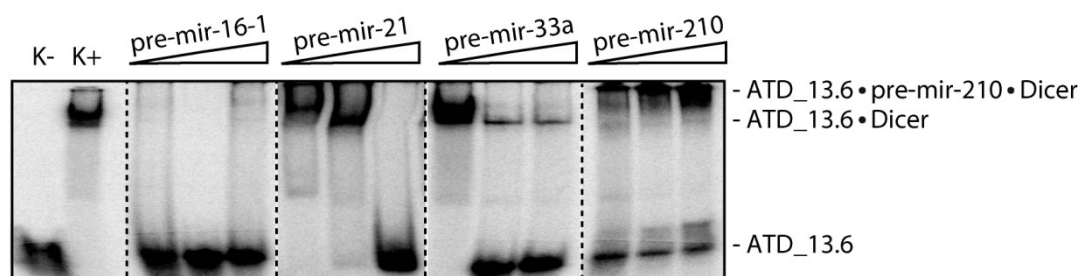
**Rysunek 4.8. Badanie selektywności oddziaływania ATD\_13.6 z pre-mir-210**

Wynik testu EMSA z udziałem ATD\_13.6 i wybranych ludzkich pre-miRNA. Wyznakowany radioizotopowo ATD\_13.6 poddano denaturacji termicznej oraz powolnej renaturacji w samym buforze reakcyjnym (K-) lub ze wskazanym prekursorem. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia pre-miRNA (0,1-10  $\mu$ M). Wskazano pozycję prążków odpowiadających ATD\_13.6 oraz dupleksowi ATD\_13.6 • pre-mir-210. Na podstawie [450].

W kolejnym etapie określono wpływ poszczególnych pre-miRNA na stabilność kompleksu ATD\_13.6 • Dicer. Do badań wykorzystano cztery pre-miRNA (pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a, pre-mir-210), które były obecne w mieszaninach reakcyjnych w stężeniach 1-30  $\mu$ M. W pierwszej fazie reakcji, ATD\_13.6 (wyznakowany radioizotopowo na końcu 5') preinkubowano z Dicer

(preparat otrzymany w systemie baulowirusowym) w 4°C, pozwalając na utworzenie się kompleksu ATD\_13.6 • Dicer. Następnie do mieszaniny dodawano pre-miRNA w stężeniu zapewniającym stosunek molowy ATD\_13.6 do pre-miRNA, odpowiednio, 1:10, 1:100 lub 1:300, po czym prowadzono dalszą inkubację, po zakończeniu której następował rozdział prób w żelu PAA w warunkach natywnych. W przypadku inhibicji kompetycyjnej, tj., gdy dochodzi do współzawodniczenia substratu i inhibitora o miejsce aktywne enzymu, należałoby spodziewać się wypierania inhibitora (ATD\_13.6) z kompleksu z Dicer, szczególnie w warunkach, w których do mieszaniny reakcyjnej dodawany jest nadmiar substratu (pre-miRNA). Natomiast w przypadku inhibicji allosterycznej, gdy obniżenie aktywności katalitycznej enzymu wynika ze zmiany konformacji białka spowodowanej przyłączeniem się inhibitora do innego miejsca niż miejsce aktywne, podanie pre-miRNA nie powinno powodować dysocjacji kompleksu ATD\_13.6 • Dicer. Zaobserwowano, że w przypadku trzech spośród testowanych prekursorów, tj.: pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a wzrostowi stężenia pre-miRNA towarzyszył wzrost ilości ATD\_13.6 niezwiązanego z Dicer (Rys. 4.9.). Innymi słowy, pre-miRNA powodowały wyparcie aptameru z kompleksu z Dicer. Efekt ten był najlepiej widoczny dla pre-mir-16-1, który indukował dysocjację kompleksu ATD\_13.6 • Dicer już w najniższym zastosowanym stężeniu – 1 μM (stosunek molowy ATD\_13.6 do pre-mir-16-1 wynosił 1:10). W przeciwieństwie do wymienionych pre-miRNA, w próbach z pre-mir-210 na radiogramach obserwowano zanik prążka odpowiadającego kompleksowi ATD\_13.6 • Dicer i pojawienie się migrującego wolniej prążka odpowiadającego najprawdopodobniej trójskładnikowemu kompleksowi ATD\_13.6 • pre-mir-210 • Dicer.

Uzyskane dane pozwoliły zaproponować dwa mechanizmy, według których ATD\_13.6 może hamować proces powstawania miRNA. Pierwszy z nich zakłada współzawodniczenie ATD\_13.6 i pre-miRNA o wiązanie z Dicer. Drugi z nich wymaga bezpośredniego oddziaływania ATD\_13.6 z komplementarnym pre-miRNA. Hybrydyzacja ATD\_13.6 do pre-miRNA indukuje zmiany struktury prekursora uniemożliwiające jego cięcie przez Dicer. Ilustracją tego mechanizmu jest przypadek pre-mir-210; ATD\_13.6 tworzy z pre-mir-210 dupleks, który jest wiązany, ale niecięty przez Dicer, najprawdopodobniej ze względu na strukturę końców dsRNA.



**Rysunek 4.9. Badanie wpływu pre-miRNA na trwałość kompleksów ATD\_13.6 • Dicer**

Wynik testu EMSA z udziałem ATD\_13.6, wybranych ludzkich pre-miRNA i Dicer. Kompleksy wyznakowanego radioizotopowo ATD\_13.6 i Dicer inkubowano ze wskazanym pre-miRNA. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia pre-miRNA (1, 10, 30  $\mu$ M). (K-) ATD\_13.6 inkubowany w buforze bez dodatku białka i pre-miRNA, (K+) ATD\_13.6 inkubowany z białkiem, bez dodatku pre-miRNA. Wskazano pozycję prążków odpowiadających ATD\_13.6 oraz jego kompleksom z pre-mir-210 i/lub Dicer. Na podstawie [450].

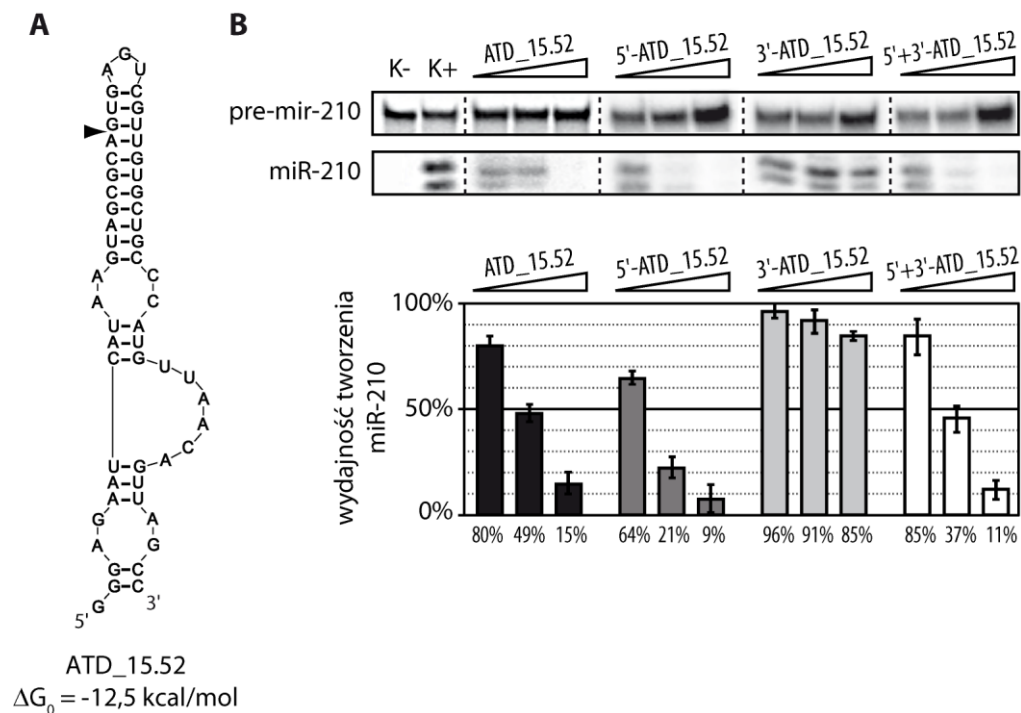
#### *IV-2-2. Badanie mechanizmu inhibicji powstawania miR-210 w reakcjach z ATD\_15.52*

Wcześniejsze badania wykazały, że ATD\_15.52 (56 nt) jest wiązany i wydajnie cięty przez Dicer [436]. Rybonukleaza ta hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe pomiędzy A21 i G22, prowadząc do powstania 21-nt fragmentu 5' (5'-ATD\_15.52) oraz 35-nt fragmentu 3' (3'-ATD\_15.52), (Rys. 4.10. A). Ponieważ ATD\_15.52 najprawdopodobniej współzawodniczył z innymi substratami o miejsce wiązania w centrum aktywnym Dicer, wstępnie zaklasyfikowano go do grona kompetytorów pre-miRNA [436]. Co więcej, stwierdzono, że ATD\_15.52 selektywnie hamował powstawanie miR-210, podczas gdy jedynie w niewielkim stopniu wpływał na proces cięcia przez Dicer prekursorów innych testowanych miRNA. Dodatkowo zabserwowano, że efekt inhibicji w przypadku miR-210 nie ulegał zniesieniu w miarę wydłużania czasu inkubacji, mimo hydrolizy ATD\_15.52 przez Dicer [436].

W świetle powyższych obserwacji postawiono hipotezę, że fragment lub fragmenty ATD\_15.52 uwalniane przez Dicer mogą wpływać na aktywność rybonukleazy i odpowiadać za selektywną inhibicję produkcji miR-210. By zweryfikować te przypuszczenia przeprowadzono ocenę potencjału inhibitorowego fragmentów ATD\_15.52 powstających w wyniku cięcia tego apatameru przez Dicer.

W tym celu sprawdzono, jak preinkubacja z poszczególnymi oligomerami, tj. ATD\_15.52, 5'-ATD\_15.52, 3'-ATD\_15.52, wpływa na zdolność enzymu (Genlantis) do generowania miR-210. Dla każdego z oligomerów oraz mieszaniny 1:1 fragmentów 5' i 3' (5'+3'-ATD\_15.52) przeprowadzono serię trzech reakcji, w których ilość pre-mir-210 znakowanego radioizotopowo na końcu 5' była stała, natomiast zmieniało się stężenie testowanego oligomeru, tak, by stosunek Dicer:oligomer wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10 i 1:100. Dodatkowo przeprowadzono reakcje kontrolne: integralności pre-mir-210 w czasie trwania inkubacji w samym buforze reakcyjnym (K-) oraz cięcia pre-mir-210 przez Dicer pod nieobecność potencjalnego inhibitora (K+). Mieszaniny reakcyjne rozdzielano w żelach PAA w warunkach denaturujących, a następnie wizualizowana przy użyciu skanera materiałów radioaktywnych. Na podstawie otrzymanych radiogramów określano ilość miRNA w każdej z prób. Wydajność powstawania miRNA w reakcjach z testowanymi oligomerami normalizowano względem kontroli pozytywnej; poziom miRNA uwalnianego przez Dicer pod nieobecność inhibitora przyjmowano za 100% (Rys. 4.10. B).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że spadek wydajności produkcji miR-210 miał miejsce w próbach zawierających pełnej długości aptamer, fragment 5' lub mieszaninę fragmentów 5' i 3' (Rys. 4.10. B). Obserwowany efekt inhibitorowy był najbardziej wyraźny w przypadku 5'-ATD\_15.52. W reakcjach z najwyższym stężeniem tego oligomeru powstawało o 80% mniej miR-210 niż w reakcji kontrolnej (K+). Odmienne wyniki otrzymano dla 3'-ATD\_15.52, który zasadniczo nie hamował powstawania miR-210; zaobserwowano jedynie ~15% spadek poziomu miRNA w reakcji z najwyższym stężeniem oligomeru w porównaniu do reakcji kontrolnej (K+), (Rys. 4.10. B).

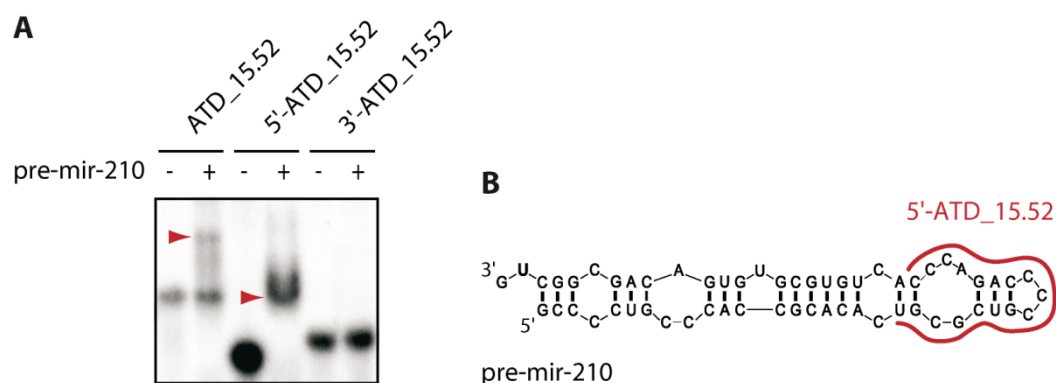


**Rysunek 4.10. Badanie wpływu fragmentów ATD\_15.52 na cięcie pre-mir-210 przez Dicer**

**A** – Model struktury drugorzędowej ATD 15.52; podano energię swobodną ( $\Delta G_0$ ) i zaznaczono miejsce cięcia przez Dicer; **B** – Wynik analizy reakcji cięcia pre-mir-210 (znakowany radioizotopowo) przez Dicer. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia wskazanych oligomerów (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M). (K-) reakcja kontrolna bez enzymu i testowanego inhibitora; (K+) reakcja z Dicer, bez inhibitora. Wykresy przedstawiają wydajność powstawania miRNA w reakcjach z testowanymi inhibitorami po normalizacji względem K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu. Na podstawie [450].

Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje, postawiono hipotezę, że 5'-ATD\_15.52, podobnie jak ATD\_13.6, oddziałuje z pre-mir-210. W celu weryfikacji tego przypuszczenia, przeprowadzono reakcje, w których jeden z trzech oligomerów znakowanych radioizotopowo na końcu 5': ATD\_15.52, 5'-ATD\_15.52 lub 3'-ATD\_15.52 inkubowano ze 100-krotnym molowym nadmiarem pre-mir-210 (10  $\mu$ M). Wyniki rozdziału mieszanin reakcyjnych w żelach PAA w warunkach natywnych wykazały, że 5'-ATD\_15.52 tworzył stabilny dupleks z pre-mir-210 (Rys. 4.11. A). Pełnej długości ATD\_15.52 również oddziaływał, choć mniej efektywnie, z pre-miRNA. Natomiast w przypadku 3'-ATD\_15.52 nie stwierdzono wiązania do prekursora.

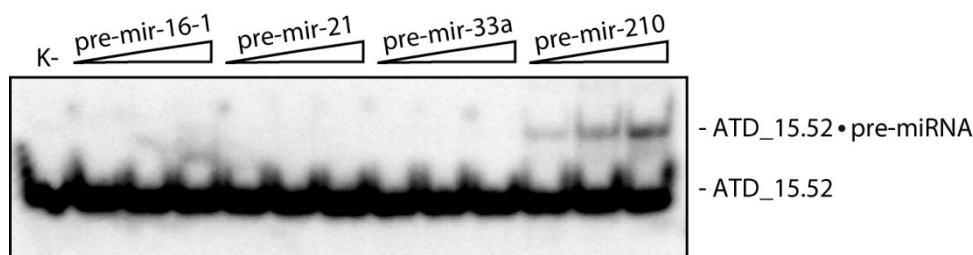
Analizy *in silico* struktury drugorzędowej dupletu 5'-ATD\_15.52 • pre-mir-210 sugerowały, że oddziaływanie pomiędzy obiema cząsteczkami jest możliwe dzięki komplementarności sekwencji 5'-ATD\_15.52 oraz rejonu apikalnego pre-mir-210 (Rys. 4.11. B, Załącznik 5.). Na tej podstawie można było założyć, że wiązanie 5'-ATD\_15.52 do pre-mir-210 zaburza strukturę prekursora w sposób uniemożliwiający jego cięcie przez Dicer.



**Rysunek 4.11. Badanie oddziaływania pomiędzy pełnej długości ATD\_15.52 oraz fragmentami 5' i 3' aptameru a pre-mir-210**

**A** – Wynik testu EMSA z udziałem pre-mir-210 i ATD\_15.52 lub fragmentu 5'/3' aptameru. Wyznakowane radioizotopowo oligomery poddano denaturacji termicznej oraz powolnej renaturacji bez (-) lub z pre-mir-210 (+). Wskazano pozycję prążków odpowiadających dupletom pre-mir-210 z ATD\_15.52 i 5'-ATD\_15.52; **B** – Model struktury drugorzędowej pre-mir-210, na czerwono zaznaczono potencjalny rejon oddziaływania z 5'-ATD\_15.52. Na podstawie [450].

Następnie zbadano, czy ATD\_15.52 może oddziaływać nie tylko z pre-mir-210, ale również z innymi testowanymi pre-miRNA. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że ATD\_15.52 nie wiązał się do: pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a, tj. do tych pre-miRNA, do których nie wykazywał dostatecznie wysokiej komplementarności sekwencji (Rys. 4.12.). Prążki odpowiadające dupletowi ATD\_15.52 • pre-miRNA widoczne były na radiogramie jedynie w próbach z pre-mir-210.



**Rysunek 4.12. Badanie selektywności oddziaływania ATD\_15.52 z pre-mir-210**

Wynik testu EMSA z udziałem ATD\_15.52 i wybranych ludzkich pre-miRNA. Wyznakowany radioizotopowo ATD\_15.52 poddano denaturacji termicznej oraz powolnej renaturacji w samym buforze reakcyjnym (K-) lub ze wskazanym pre-miRNA. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia pre-miRNA (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M). Na rysunku wskazano pozycję prążków odpowiadających: ATD\_15.52 oraz dupleksowi ATD\_15.52 • pre-mir-210. Na podstawie [450].

W rezultacie przeprowadzonych analiz wykazano, że fragment 5' powstający w wyniku cięcia ATD\_15.52 przez Dicer wiąże się do pre-mir-210, a oddziaływanie to indukuje zmiany struktury prekursora, które hamują powstawanie miR-210 *in vitro*.

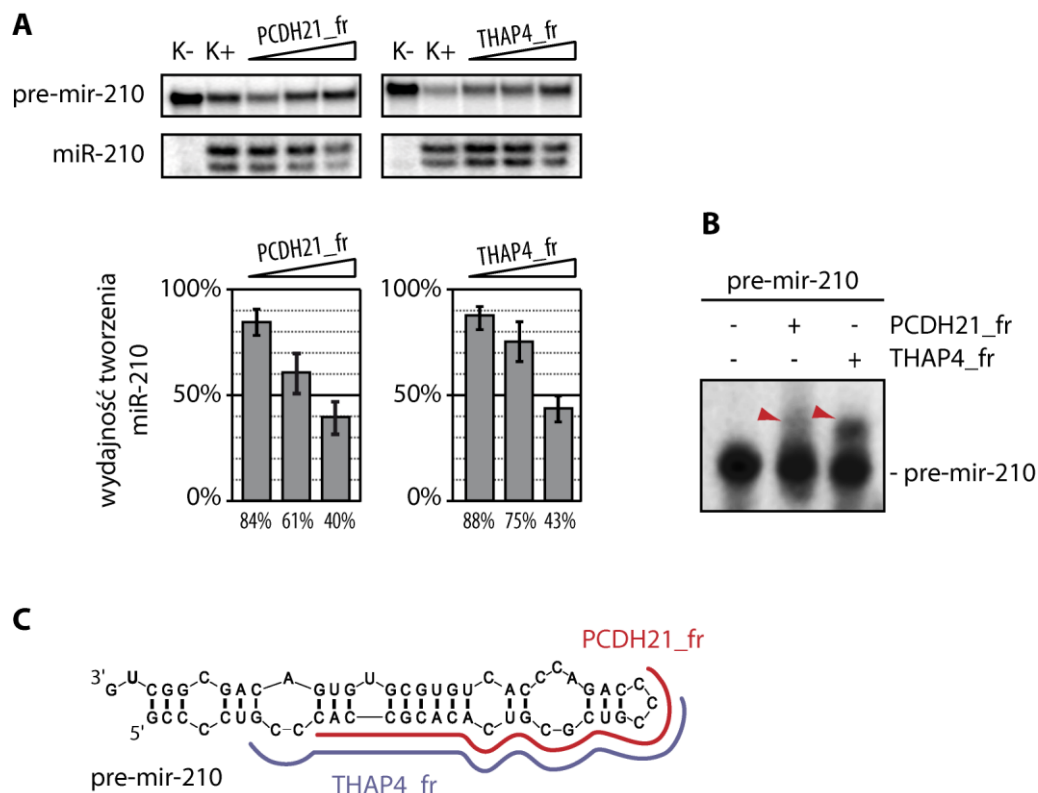
#### *IV-2-3. Analiza transkryptomu człowieka pod kątem występowania sekwencji identycznych lub wysoce podobnych do sekwencji wyselekcjonowanych aptamerów*

Zaprezentowane powyżej dane pozwalają sądzić, że aktywność Dicer i proces powstawania miRNA mogą podlegać regulacji przez oligomery RNA. Postanowiono zatem sprawdzić, czy w transkrybowanej części genomu człowieka można znaleźć sekwencje identyczne lub zbliżone do sekwencji zidentyfikowanych wcześniej aptamerów wiążących Dicer. W tym celu zastosowano algorytm BLASTn (ang. *basic local alignment search tool*), który umożliwił poszukiwanie w bazie danych sekwencji genomowych i transkryptów człowieka (ang. *human genomic plus transcript database*) zadanych sekwencji nukleotydowych. Jako zapytanie (ang. *query*) wykorzystano sekwencje nukleotydowe wyselekcjonowanych wcześniej 120 aptamerów (Załącznik 1.). W efekcie otrzymano 4189 trafień. Uzyskane dane poddano filtrowaniu, które umożliwiło zawężenie otrzymanego zbioru wyników do 68 transkryptów wykazujących najwyższe podobieństwo sekwencyjne (minimum 20 nt identycznych) do zidentyfikowanych aptamerów (Załącznik 4.). W puli wyszukanych transkryptów znalazły się między innymi fragmenty mRNA kodujących: kinazy białkowe, białka

wiążące DNA i RNA, czynniki transkrypcyjne, białka rybosomalne, białka strukturalne kanałów jonowych. Wśród 10 najlepiej ocenionych dopasowań zidentyfikowano sekwencje podobne do ATD\_13.6 i ATD\_15.52. Odpowiadały one wariantom transkryptów kodujących odpowiednio: protokadherynę 21 (PCDH21, ang. *protocadherin 21*, NM\_033100.3) i białko THAP4 (ang. *THAP domain containing 4*, NM\_015963.5). ATD\_13.6 wykazuje podobieństwo do 29-nt fragmentu PCDH21 (26 nt identycznych), natomiast ATD\_15.52 – do 35-nt fragmentu THAP4 (28 nt identycznych), (Załącznik 4.). PCDH21 należy do rodziny transbłonowych białek adhezyjnych, które warunkują, zależne od jonów  $Ca^{2+}$ , przyleganie komórek [451]. Z kolei białko THAP4 wyróżnia obecność domeny THAP, wykazującej sekwencyjne i strukturalne podobieństwo do domeny wiążącej DNA w traspozazie oddziałującej z transpozonomem P *D. melanogaster* [452].

Następnie sprawdzono, czy fragmenty mRNA o sekwencjach zbliżonych do wyselekcjonowanych aptamerów mogą wpływać na proces cięcia przez Dicer komplementarnego do nich pre-miRNA. W tym celu przeprowadzono standardowy test oceny potencjału inhibitorowego oligomerów, które wykazywały podobieństwo sekwencji do ATD\_15.52 i ATD\_13.6, tj. PCDH21\_fr (29 nt) i THAP4\_fr (35 nt). Jako substratu dla enzymu użyto pre-mir-210, ze względu na jego częściową komplementarność do testowanych oligomerów (Rys. 4.13. C). Wyznakowany radioizotopowo pre-miRNA inkubowano w buforze reakcyjnym z Dicer (preparat bakulowirusowy) i PCDH21\_fr lub THAP4\_fr, stosunek pre-miRNA:oligomer wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10, 1:100. Wydajność inhibicji normalizowano względem poziomu miRNA generowanego w reakcjach kontrolnych, w których nie były obecne testowane oligomery (K+). Uzyskane dane wykazały, że oba oligomery były w stanie inhibować cięcie pre-mir-210 przez Dicer (Rys. 4.13. A). W najwyższym stężeniu (10  $\mu$ M), zarówno PCDH21\_fr jak i THAP4\_fr hamowały powstawanie miR-210 o ~60% w porównaniu do reakcji kontrolnej (K+).





**Rysunek 4.13. Badanie potencjału inhibitorowego PCDH21\_fr i THAP4\_fr**

**A** – Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których pre-mir-210 (znakowany radioizotopowo) był trawiony przez Dicer w obecności PCDH21\_fr lub THAP4\_fr. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia wskazanego oligomeru (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M). (K-) reakcja kontrolna bez enzymu i testowanego inhibitora; (K+) reakcja z Dicer, bez inhibitora. Wykresy przedstawiają wartości wydajności powstawania miRNA w reakcjach z testowanym inhibitorem po normalizacji względem K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu. **B** – Wynik testu EMSA z udziałem pre-mir-210 i PCDH21\_fr lub THAP4\_fr. Wyznakowany radioizotopowo pre-mir-210 inkubowano w samym buforze reakcyjnym (-) lub ze wskazanym oligomerem (+). Czerwonymi trójkątami oznaczono pozycję prążków odpowiadających dupleksom pre-mir-210 z PCDH-21\_fr lub THAP4\_fr. **C** – Model struktury drugorzędowej pre-mir-210, na czerwono zaznaczono potencjalny rejon oddziaływania z PCDH21\_fr, na niebiesko – z THAP4\_fr. Na podstawie [449].

By ustalić, czy testowane oligomery działały zgodnie z tym samym mechanizmem, jaki opisano dla ATD\_13.6 i ATD\_15.52 (tj. poprzez hybrydyzację do pre-mir-210), wykorzystując test EMSA, określono ich zdolność do oddziaływania z pre-mir-210. Wyznakowany radioizotopowo pre-mir-210 inkubowano przez 15 min w 37°C ze 100-krotnym molowym nadmiarem PCDH21\_fr lub THAP4\_fr, a następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielano w żelach PAA w warunkach natywnych. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że badane oligomery tworzyły dupleksy z pre-mir-210,

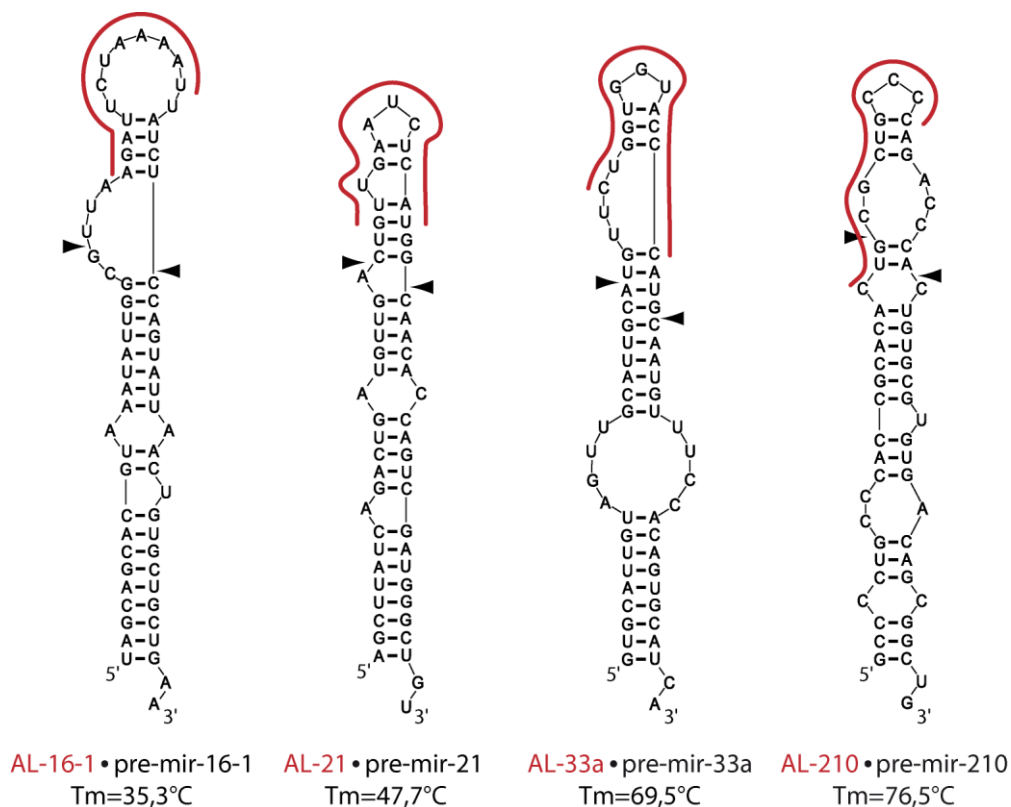
przy czym proces ten zachodził wydajniej w przypadku THAP4 (Rys. 4.13. B). Dla tego oligomeru na radiogramie żelu widoczny był prążek odpowiadający dupleksowi THAP4\_fr • pre-mir-210. Z kolei dla PCDH21\_fr brak wyraźnego prążka i charakterystyczne smużenie materiału wskazują na to, że dupleks PCDH21\_fr • pre-mir-210, choć powstawał, był na tyle nietrwały, że w trakcie inkubacji i/lub elektroforezy ulegał dysocjacji. Przewidywania struktury RNA wykazały, że PCDH21\_fr i THAP4\_fr najprawdopodobniej wiążą się do pre-mir-210 w rejonie obejmującym ramię 5' i część apikalną prekursora (Rys. 4.13. C). Wartości energii swobodnej struktur zaproponowanych dla PCDH21\_fr • pre-mir-210 i THAP4\_fr • pre-mir-210 wynoszą odpowiednio: -24,2 kcal/mol i -32,3 kcal/mol (Załącznik 6.). Różnica pomiędzy teoretycznymi  $\Delta G_0$  wyznaczonymi dla obu dupleksów znalazła swoje odzwierciedlenie we wspomnianych już wynikach badań oddziaływań RNA w teście EMSA (Rys. 4.13. B), które wykazały, że dupleks PCDH21\_fr • pre-mir-210 tworzył się mniej wydajnie i/lub był mniej stabilny niż THAP4\_fr • pre-mir-210.

#### *IV-2-4. Badanie wpływu 12-nt oligomerów RNA komplementarnych do rejonu apikalnego prekursorów na proces ich cięcia przez Dicer w warunkach in vitro*

##### *IV-2-4-1. Badania potencjału inhibitorowego 12-merów prowadzone z wykorzystaniem ludzkiej rekombinowanej Dicer*

Wyniki uzyskane dla ATD\_13.6 i ATD\_15.52 (Rys. 4.7. i 4.10., 4.11.) wykazały, że oddziaływania pomiędzy pre-miRNA a innym RNA mogą wpływać na wydajność cięcia prekursora przez Dicer. Ponadto analizy przeprowadzone dla 5'-ATD\_15.52 (Rys. 4.11. B) sugerują, że już zaledwie 12-nt RNA, w wyniku oddziaływania z cząsteczkami prekursorowymi, mogłyby hamować produkcję miRNA przez Dicer. By zweryfikować słuszność tej tezy, przeprowadzono serię eksperymentów, w których analizowano wpływ 12-nt oligomerów RNA komplementarnych do rejonu apikalnego wybranych pre-miRNA na wydajność cięcia tychże prekursorów przez Dicer. Badania rozpoczęto od analizy bioinformatycznej

struktury czterech ludzkich pre-miRNA: pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a, pre-mir-210. Na podstawie otrzymanych wyników zaprojektowano 12-nt oligomery RNA komplementarne do jednoniciowych rejonów w częściach apikalnych tych prekursorów (Rys. 4.14.). Oligomery te nazwano odpowiednio: AL-16-1, AL-21, AL-33a i AL-210.

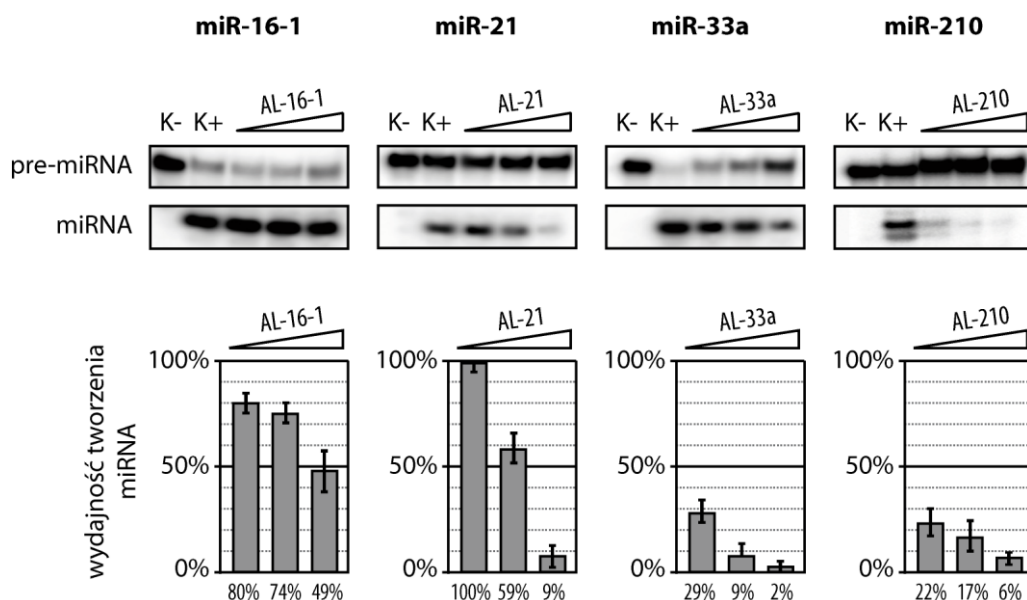


**Rysunek 4.14. Regiony oddziaływania zaprojektowanych 12-nt oligomerów RNA z wybranymi ludzkimi pre-miRNA**

Poniżej przewidzianych struktur pre-miRNA podano temperaturę topnienia ( $T_m$ ) dupleksów odpowiedniego 12-nt oligomeru (AL) z pre-miRNA; na czerwono zaznaczono miejsca komplementarne do AL, wskazano miejsca cięcia przez Dicer. Na podstawie [450].

Potencjał inhibitorowy zaprojektowanych cząsteczek testowano w dwuetapowych reakcjach. Pierwszy etap polegał na inkubacji pre-miRNA z komplementarnym oligomerem, a drugi na trawieniu RNA przez Dicer. Dla każdego pre-miRNA przygotowywano trzy mieszaniny reakcyjne, w których ilość znakowanego radioizotopowo prekursora była stała, natomiast zmieniało się stężenie testowanego oligomeru, tak, by stosunek pre-miRNA:oligomer wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10,

1:100. Dodatkowo przeprowadzono dwie reakcje kontrolne (K-, K+), zgodnie ze schematem postępowania opisanym dla ATD\_15.52 (IV-2-2.).

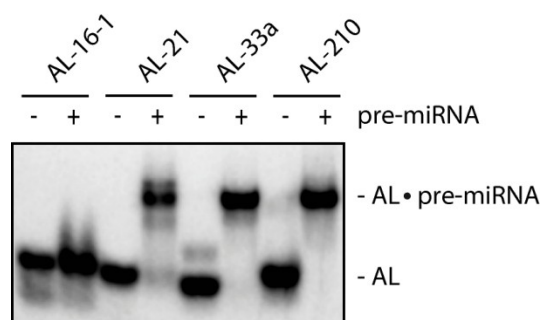


**Rysunek 4.15. Badanie potencjału inhibitorowego 12-nt oligomerów RNA komplementarnych do rejonu apikalnego wybranych pre-miRNA**

Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których pre-miRNA były trawione przez Dicer w obecności 12-nt oligomerów RNA (AL) komplementarnych do rejonu apikalnego prekursorów. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia wskazanego oligomeru (0,1 μM, 1 μM, 10 μM). (K-) reakcja kontrolna bez dodatku enzymu i potencjalnego inhibitora, (K+) reakcja z Dicer, bez potencjalnego inhibitora. Wykresy przedstawiają wydajność tworzenia miRNA w reakcjach z AL w odniesieniu do K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu. Na podstawie [450].

Wyniki trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu wykazały, że AL-33a i AL-210 już w najniższym testowanym stężeniu (0,1 μM) inhibowały powstawanie miR-33a o ~70% i miR-210 o ~80% w porównaniu do reakcji kontrolnej (K+), (Rys. 4.15.). W najwyższym stężeniu (10 μM) oba oligomery prawie całkowicie hamowały powstawanie miRNA. AL-21 okazał się mniej wydajnym inhibitorem i efektywnie, tj. o ~90% obniżał powstawanie miR-21 jedynie, gdy był obecny w mieszaninie reakcyjnej w 100-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do pre-mir-21 (Rys. 4.15.). Najniższą aktywność wykazywał AL-16-1, który w najwyższym testowanym stężeniu (10 μM) hamował uwalnianie miR-16-1 jedynie o ~50% (Rys. 4.15.).

Jak zaznaczono wcześniej, testowane 12-mery zostały zaprojektowane w taki sposób, by ich sekwencje były komplementarne do rejonów apikalnych wybranych pre-miRNA. Różnice w strukturze pierwszo- i drugorzędowej poszczególnych prekursorów, a co za tym idzie zdolność rejonu apikalnego do tworzenia wiązań wodorowych, mogły decydować o tym, że AL-16-1 i AL-21 były gorszymi inhibitorami niż AL-33a i AL-210. By zweryfikować, czy badane 12-mery są w stanie wydajnie oddziaływać z pre-miRNA, przeprowadzono analizę techniką EMSA. Znakowane radioizotopowo 12-mery inkubowano ze 100-krotnym molowym nadmiarem pre-miRNA i rozdzielano w żelach PAA w warunkach natywnych. Na podstawie uzyskanych radiogramów stwierdzono, że AL-33a i AL-210 wydajnie hybrydyzowały do, odpowiednio: pre-mir-33a i pre-mir-210 (Rys. 4.16.). Dupleks AL-21 • pre-mir-21 tworzył się nieznacznie mniej efektywnie, natomiast nie zaobserwowano oddziaływania pomiędzy AL-16-1 i pre-mir-16-1 (Rys. 4.16.).



**Rysunek 4.16. Badanie oddziaływań pomiędzy pre-miRNA i komplementarnymi 12-nt oligomerami RNA**

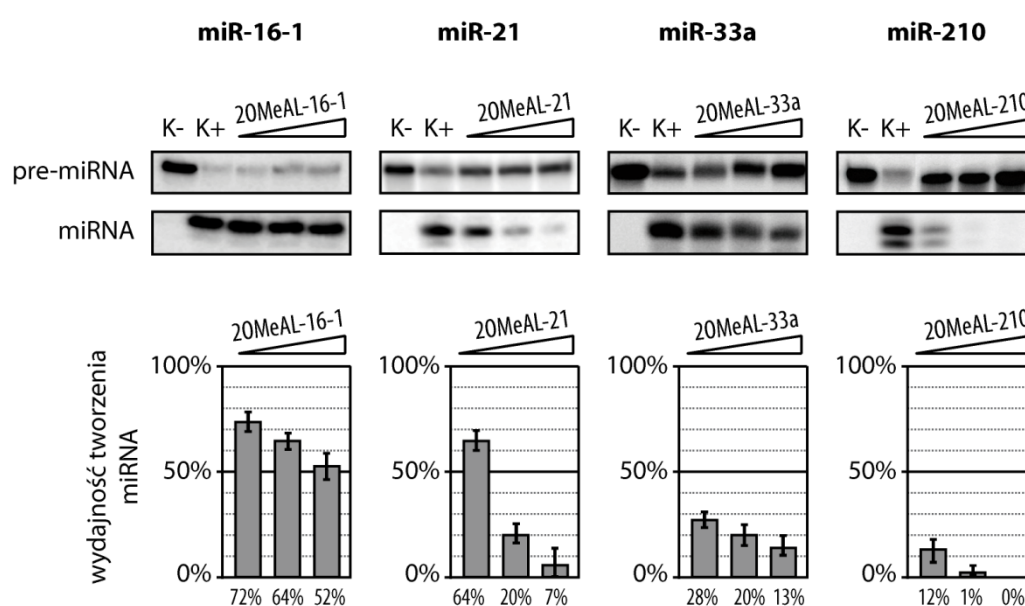
Wynik testu EMSA z udziałem zaprojektowanych 12-merów (AL) i odpowiednich pre-miRNA. Wyznakowane radioizotopowo 12-mery inkubowano w 37°C w samym buforze reakcyjnym (-) lub ze 100-krotnym molowym nadmiarem komplementarnego pre-miRNA (+). Wskazano pozycję prążków odpowiadających wolnym oligomerom oraz ich kompleksom z pre-miRNA. Na podstawie [450].

Uzyskane wyniki korespondują z teoretycznymi temperaturami topnienia ( $T_m$ ) dupleksów AL • pre-miRNA wyznaczonymi w kalkulatorze HyTher (<http://ozone3.chem.wayne.edu>). Wartości  $T_m$  obliczone przy standardowych ustawieniach programu wynosiły odpowiednio: 35,3°C dla AL-16-1, 47,7°C dla AL-21, 69,5°C dla AL-33a i 76,5°C dla AL-210 (Rys. 4.14.). Zestawiając wyniki badań oceniających potencjał inhibitorowy oligomerów oraz wyniki rozdziału RNA w żelach

poliakrylamidowych w warunkach natywnych, a także przewidywane wartości  $T_m$  można zauważyć, że wydajność inhibicji jest w dużej mierze determinowana przez stabilność dupleksu AL • pre-miRNA. W związku z tym przeprowadzono serię analogicznych eksperymentów, wykorzystując w nich oligomery o sekwencjach identycznych jak testowane wcześniej oligomery AL, ale zbudowane w całości z nukleotydów posiadających grupę metylową przyłączoną kowalencyjnie do atomu tlenu w pozycji 2' rybozy (2OMeAL). 2'-O-metylacja wprowadzona do łańcucha polinukleotydowego zmienia właściwości fizyko-chemiczne oligomerów, wpływając między innymi na ich zwiększoną odporność na hydrolizę alkaliczną czy ataki nukleaz, a także podwyższając wartości  $T_m$  dupleksów o  $\sim 1-4^\circ\text{C}$  w przeliczeniu na pojedynczą modyfikację [453-455]. Wartości  $T_m$  obliczone dla poszczególnych dupleksów 2OMeAL • pre-miRNA wynosiły odpowiednio:  $47,4^\circ\text{C}$  dla 2OMeAL-16-1,  $56,1^\circ\text{C}$  dla 2OMeAL-21,  $82,0^\circ\text{C}$  dla 2OMeAL-33a i  $87,1^\circ\text{C}$  dla 2OMeAL-210. Jeżeli parametr  $T_m$  jest istotnym czynnikiem decydującym o potencjale inhibitorowym 12-merów, ich 2'-O-metylowane pochodne powinny wydajniej hamować cięcie badanych pre-miRNA przez Dicer.

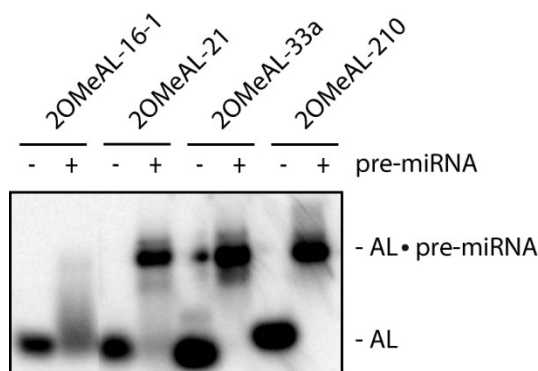
Potencjał inhibitorowy modyfikowanych cząsteczek oceniano w standardowych reakcjach cięcia pre-miRNA przez Dicer, w których stosunek pre-miRNA:2OMeAL wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10 i 1:100 (Rys. 4.17.). Zgodnie z przewidywaniami, wyniki tych badań wykazały zwiększoną inhibicję powstawania miRNA w reakcjach z 2OMeAL w porównaniu do wyników uzyskanych dla ich niemodyfikowanych odpowiedników. Efekt ten był szczególnie widoczny dla 2OMeAL-21. W reakcjach, w których 2OMeAL-21 obecny był w stężeniu  $0,1 \mu\text{M}$  i  $1 \mu\text{M}$  (stosunek molowy 2OMeAL-2 : pre-mir-21 – 1:1 i 1:10, odpowiednio) zanotowano o  $\sim 30-40\%$  wyższy spadek poziomu miR-21 w porównaniu do analogicznych reakcji z AL-21 (por. Rys. 4.15. i Rys. 4.17.). Zwiększenie aktywności inhibitorowej nie dotyczyło jednak wszystkich testowanych cząsteczek. W przypadku oligomeru zaprojektowanego dla pre-mir-16-1, który w zaprezentowanych wcześniej badaniach z niemodyfikowanymi 12-merami okazał się najmniej wydajnym z testowanych inhibitorów, 2'-O-metylacja jedynie nieznacznie ( $\sim 10\%$ ) zwiększyła jego zdolność do hamowania cięcia pre-mir-16-1.

Wpływ 2'-*O*-metylacji inhibitorów na wydajność tworzenia i stabilność dupleksów 2OMeAL • pre-miRNA oceniano w testach EMSA (Rys. 4.18.). Otrzymane wyniki dowiodły, że metylowane oligomery hybridyzowały do pre-miRNA wydajniej niż cząsteczki niemodyfikowane. Obserwacja ta dotyczyła także pary: 2OMeAL-16-1/pre-mir-16-1, dla której na radiogramie uwidoczniło się prążek i charakterystyczne smużenie materiału, świadczące o tworzeniu się nietrwałego dupleksu. Dla porównania, AL-16-1, w zastosowanych warunkach eksperymentalnych, nie tworzył kompleksu z pre-mir-16-1 (Rys. 4.16.).



**Rysunek 4.17. Badanie potencjału inhibitorowego 12-nt oligomerów z serii 2'-*O*-metylo**

Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których pre-miRNA trawione były przez Dicer w obecności 12-nt oligomerów z serii 2'-*O*-metylo (2OMeAL) komplementarnych do rejonu apikalnego prekursorów. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia wskazanego oligomeru (0,1 μM, 1 μM, 10 μM). (K-) reakcja kontrolna bez dodatku enzymu i potencjalnego inhibitora, (K+) reakcja z Dicer, bez potencjalnego inhibitora. Wykresy przedstawiają wydajność tworzenia miRNA w reakcjach z 2OMeAL w odniesieniu do K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu. Na podstawie [450].



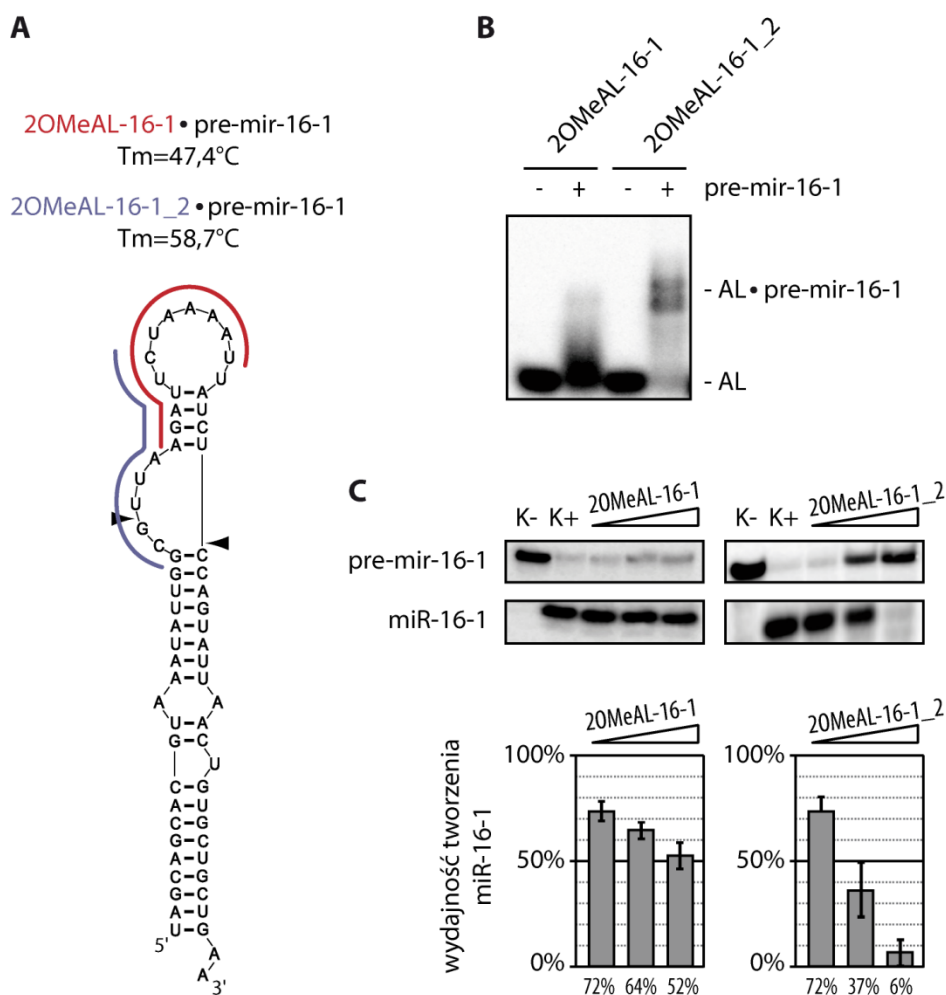
**Rysunek 4.18. Badanie oddziaływania pomiędzy pre-miRNA i komplementarnymi 12-nt oligomerami z serii 2'-O-metylo-RNA**

Wynik testu EMSA, w którym analizowano zdolność 12-merów z serii 2'-O-metylo (2OMeAL) do wiązania odpowiednich pre-miRNA. Wyznakowane radioizotopowo 12-mery inkubowano w 37°C w samym buforze reakcyjnym (-) lub ze 100-krotnym molowym nadmiarem komplementarnego pre-miRNA (+). Na rysunku wskazano pozycję prążków odpowiadających wolnym oligomerom oraz ich kompleksom z pre-miRNA. Na podstawie [450].

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zdolność oligomeru do hamowania cięcia pre-miRNA przez Dicer zależy od wydajności tworzenia się i stabilności dupleksu oligomeru z pre-miRNA. W tym kontekście zastanawiająca była niewielka poprawa inhibicji obserwowana dla 2OMeAL-16-1 (por. Rys. 4.15. i Rys. 4.17.), mimo że wartości  $T_m$  obliczone dla dupleksów AL-16-1•pre-mir-16-1 i 2OMeAL-16-1•pre-mir-16-1 różnią się aż o 12°C. Co więcej, biorąc pod uwagę wartości  $T_m$ , dupleks tworzony przez 2OMe-AL-16-1 i pre-mir-16-1 powinien być teoretycznie tak samo stabilny termodynamicznie, jak dupleks tworzony przez AL-21 i pre-mir-21 ( $T_m = 47.4^\circ\text{C}$  i  $T_m = 47.7^\circ\text{C}$ , odpowiednio). Mimo to, AL-21 inhibował powstawanie miR-21 wydajniej niż czynił to 2OMe-AL-16-1 w przypadku miR-16-1 (por. Rys. 4.15. i Rys. 4.17.). Powyższe obserwacje wskazują na to, że oprócz trwałości termodynamicznej dupleksu inhibitor • pre-miRNA, również inne czynniki mogą decydować o efektywności hamowania powstawania miRNA. Aby zweryfikować słuszność tego twierdzenia zaprojektowano alternatywny 12-mer (2OMeAl-16-1\_2) komplementarny do rejonu należącego do części apikalnej, ale leżącego bliżej ramienia 5' prekursora. Według przewidywań *in silico* fragment ten posiada inną aranżację niż miejsce hybrydyzacji dla AL-16-1; obejmuje bowiem krótki, 4-nt odcinek o strukturze helikalnej oskrzydłony fragmentami jednoniciowymi, podczas gdy w przypadku miejsca hybrydyzacji dla AL-16-1 struktura jednoniciowa występuje jedynie na końcu



3' (Rys. 4. 19. A). Wartość  $T_m$  dupletu 2OMeAL-16-1\_2 i pre-mir-16-1 jest o prawie 12°C wyższa niż w przypadku dupletu 2OMeAL-16-1 i pre-mir-16-1.



**Rysunek 4.19. Porównanie potencjału inhibitorowego dwóch oligomerów z serii 2'-*O*-metylo komplementarnych do odmiennych fragmentów pre-mir-16-1**

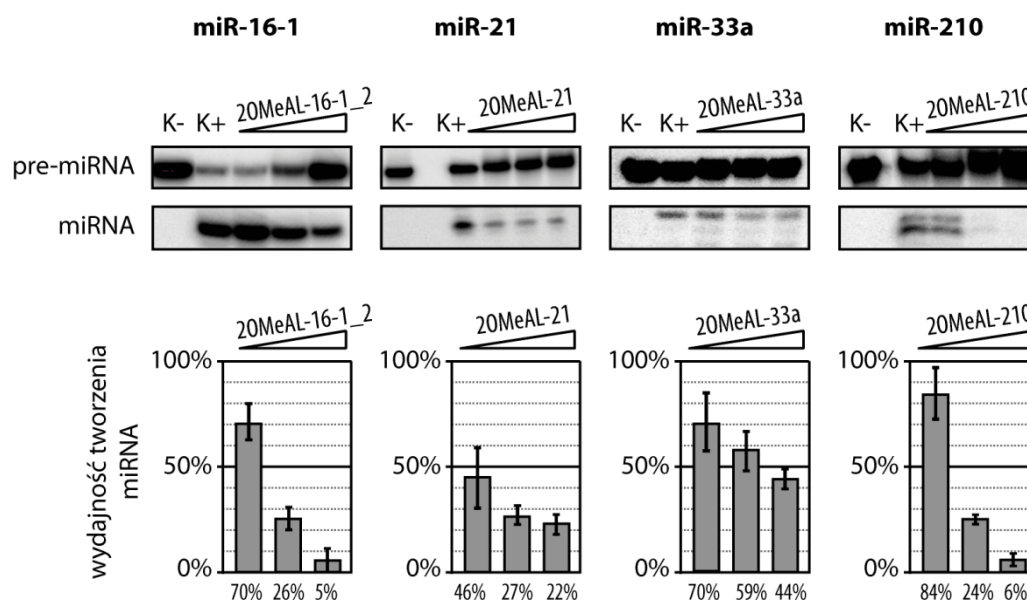
**A** – Region oddziaływania 2OMeAL-16-1 (*czerwony*) i 2OMeAL-16-1\_2 (*niebieski*) z pre-mir-16-1. Zaznaczono miejsce cięcia pre-miRNA przez Dicer. Podano wartość teoretycznej temperatury topnienia ( $T_m$ ) dupletów 2OMeAL • pre-miRNA; **B** – Wyniki testu EMSA uzyskane dla 12-merów i pre-mir-16-1. Wyznakowane radioizotopowo 2OMeAL inkubowano w samym buforze reakcyjnym (-) lub ze 100-krotnym molowym nadmiarem pre-mir-16-1 (+). Wskazano pozycję prążków odpowiadających wolnym oligomerom oraz ich kompleksom z pre-miRNA; **C** – Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których pre-mir-16-1 trawiony był przez Dicer w obecności 2OMeAL-16-1 lub 2OMeAL-16-1\_2. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia wskazanego oligomeru (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ). (K-) reakcja kontrolna bez dodatku enzymu i potencjalnego inhibitora, (K+) reakcja z Dicer, bez potencjalnego inhibitora. Wykresy przedstawiają wydajność tworzenia miRNA po normalizacji względem K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu. Na podstawie [450].

Analiza oddziaływań inhibitor • pre-mir-16-1 przeprowadzona z wykorzystaniem testu EMSA wykazała, że 2OMeAL-16-1\_2 tworzył dupleks z pre-mir-16-1 o wiele wydajniej niż 2OMeAL-16-1 (Rys. 4. 19. B). Zgodnie z oczekiwaniami, znalazło to swoje odzwierciedlenie w ich zdolności do inhibicji procesu wycinania miRNA przez Dicer; 2OMeAL-16-1\_2 okazał się efektywniejszym inhibitorem niż 2OMeAL-16-1 (Rys. 4.19. C). Różnica pomiędzy oboma oligomerami była szczególnie widoczna w reakcjach, w których zastosowano 10- i 100-krotny molowy nadmiar 2OMeAL w stosunku do pre-miRNA; 2OMeAL-16-1\_2 w stężeniu 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M hamował powstawanie miR-16-1 w ~60% i 95% (odpowiednio) w porównaniu do reakcji kontrolnej (K+), podczas gdy w analogicznych warunkach dla 2OMeAL-16-1 spadek poziomu produkcji miRNA wynosił jedynie ~35% i 50%.

#### *IV-2-4-2. Badania potencjału inhibitorowego 12-merów prowadzone z wykorzystaniem lizatów komórkowych*

Przedstawione tej pory wyniki jasno wykazały, że krótkie oligomery komplementarne do rejonu apikalnego pre-miRNA są w stanie hamować powstawanie miRNA w reakcjach z rekombinowaną Dicer *in vitro*. Ten układ eksperymentalny jest jednak niezwykle uproszczony w porównaniu do warunków panujących w żywej komórce. W związku z tym zdecydowano się sprawdzić, czy zaprojektowane inhibitory będą aktywne w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, tj. w lizatach komórkowych, dokładniej – we frakcji cytoplazmatycznej, która zawiera większość obecnej w komórkach Dicer. Do badań wybrano linię komórek HeLa (linia ludzkich komórek nabłonkowych pochodzących z raka szyjki macicy). Komórki hodowane w odpowiednio suplementowanej pożywce, przy stanie ~80% konfluencji zbierano i poddawano lizie. W wyniku wirowania różnicowego uzyskiwano frakcję cytoplazmatyczną, która stanowiła materiał do dalszych badań (tzw. preparat komórkowy). Ocenę aktywności inhibitorowej poszczególnych 2OMeAL przeprowadzono w reakcjach z pre-miRNA wyznakowanymi radioizotopowo oraz komórkowym preparatem Dicer. Analogicznie jak dotychczas, we wszystkich reakcjach ilość podawanego białka (w tym przypadku, całkowitego białka oznaczonego w preparacie) pozostawała taka sama, zmieniał się natomiast stosunek molowy pre-miRNA:2OMeAL (odpowiednio: 1:1, 1:10, 1:100). Mieszanki reakcyjne

rozdzielano w denaturujących żelach PAA, a poziom inhibicji szacowano w odniesieniu do reakcji kontrolnej (K+), w której pre-miRNA inkubowano jedynie w lizacie komórkowym (Rys. 4.20.).



**Rysunek 4.20. Badanie potencjału inhibitorowego zaprojektowanych 12-nt merów z serii 2'-O-metylo we frakcji cytoplazmatycznej lizatów komórkowych**

Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których pre-miRNA trawione były przez Dicer w obecności 12-merów z serii 2'-O-metylo (20MeAL) komplementarnych do rejonu apikalnego prekursorów. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia wskazanego oligomeru (0,1 μM, 1 μM, 10 μM). (K-) reakcja kontrolna bez dodatku enzymu i potencjalnego inhibitora, (K+) reakcja z Dicer, bez potencjalnego inhibitora. Wykresy przedstawiają wydajność tworzenia miRNA w reakcjach z 20MeAL po normalizacji względem K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu. Na podstawie [450].

Wyniki uzyskane w trzech powtórzeniach technicznych potwierdziły, że badane oligomery były w stanie wydajnie hamować proces wyzwalania miRNA przez Dicer. Najlepszymi inhibitorami okazały się 20MeAL-16-1\_2 i 20MeAL-210, które przy najwyższym zastosowanym stężeniu (10 μM) prawie całkowicie (~95%) hamowały powstawanie odpowiedniego miRNA. Zależność poziomu inhibicji cięcia pre-miRNA od stężenia 20MeAL w przypadku tych dwóch oligomerów była niemal identyczna, tj. w reakcjach, w których stężenie oligomeru wynosiło 0,1 μM, 1 μM i 10 μM zanotowano spadek poziomu miRNA o, odpowiednio: ~20-30%, ~75% i ~95%.

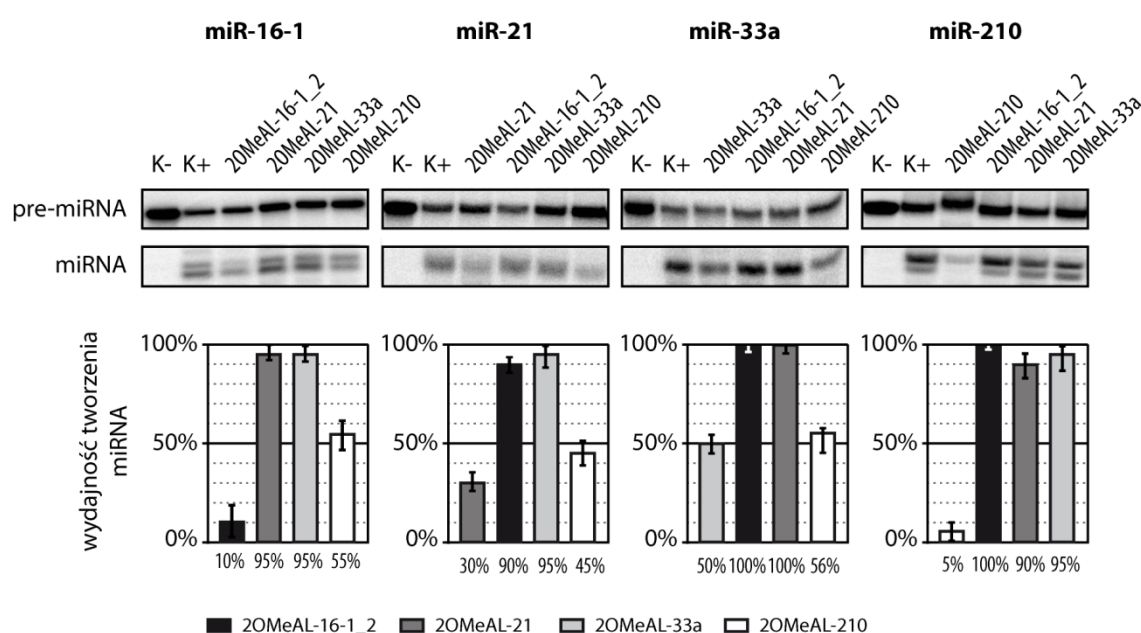
W przypadku 2OMeAL-21 nie zaobserwowano znaczących różnic w wydajności inhibicji w poszczególnych próbach; szczególnie w stężeniach: 1  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  oligomer ten powodował spadek poziomu miR-21 o  $\sim 70\text{-}80\%$  w porównaniu do reakcji kontrolnej bez jego udziału. Najmniej efektywnym inhibitorem okazał się 2OMeAL-33a, który w najwyższym stężeniu hamował powstawanie miR-33a jedynie z  $\sim 55\%$  wydajnością. Analizując otrzymane wyniki należy jednak zwrócić uwagę, że pre-mir-33a był bardzo nieefektywnie hydrolizowany przez Dicer, co może być związane z obecnością w preparacie inhibitorów pochodzenia komórkowego, które interferowały z badanym procesem [456].

#### *IV-2-4-3. Badanie selektywność działania 12-merów hamujących powstawanie miRNA w reakcjach z ludzką rybonukleazą Dicer*

Biorąc pod uwagę fakt, że testowane 12-mery zostały zaprojektowane, by oddziaływać z wybranymi pre-miRNA, a tym samym, w założeniu, selektywnie hamować ich cięcie przez Dicer, cechą, która obok wydajności inhibicji powinna być brana pod uwagę przy ocenie potencjału inhibitorowego jest także zdolność do interferowania w proces powstawania innych miRNA. W związku z powyższym, przeprowadzono serię dodatkowych eksperymentów, w których sprawdzano, czy testowane 12-mery wpływają na cięcie przez Dicer pre-miRNA innych niż te, wobec których zostały zaprojektowane. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano komórkowy preparat Dicer, a stosunek molowy pre-miRNA:oligomer wynosił 1:100. Otrzymane wyniki wykazały, że 2OMeAL-16-1\_2, 2OMeAL-21 i 2OMe-AL-33a działały w sposób selektywny, tj. hamowały cięcie pre-miRNA wobec, którego były zaprojektowane, natomiast nie hamowały cięcia innych badanych prekursorów (Rys. 4. 21.). Jedynie 2OMeAL-210 obniżał o  $\geq 50\%$  powstawanie wszystkich czterech miRNA.

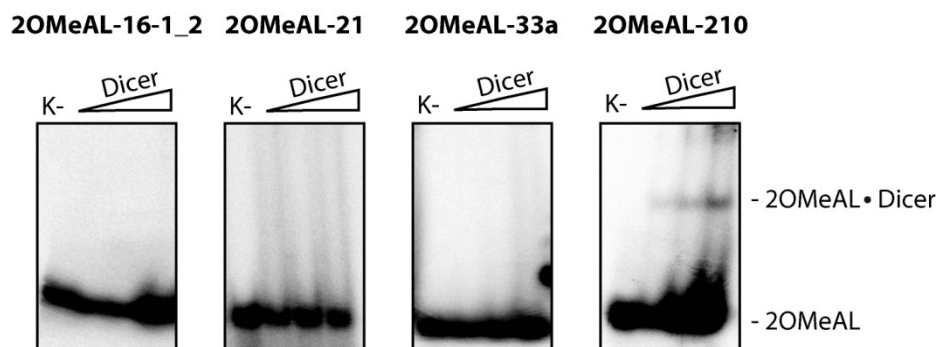
Wyniki wcześniejszych analiz wykazały, że oligomery krótsze niż  $\sim 20$  nt nie są wydajnie wiązane przez Dicer (Rys. 4.4.), zatem zasadnym wydaje się stwierdzenie, że efekty inhibitorowe obserwowane w przypadku testowanych 12-merów wynikają przede wszystkim z ich oddziaływania z pre-miRNA. By dodatkowo zweryfikować słuszność tej hipotezy, zbadano, czy zaprojektowane 12-merów mogą oddziaływać z Dicer.

Mieszanki zawierające wyznakowane radioizotopowo 12-meru z serii 2'-*O*-metylo (2OMeAL) i Dicer (preparat bakulowirusowy) poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelach PAA w warunkach natywnych. Otrzymane wyniki potwierdziły brak oddziaływania pomiędzy rybonukleazą a 2OMeAL-16-1\_2, 2OMeAL-21 i 2OMeAL-33a (Rys. 4.22.). W przypadku 2OMeAL-210 stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia Dicer w mieszaninie reakcyjnej, na radiogramie widoczny jest przyrost intensywności prążków odpowiadających najprawdopodobniej kompleksom 2OMeAL-210 z Dicer (Rys. 4.22.).



**Rysunek 4.21. Badanie selektywności działania 12-nt oligomerów z serii 2'-*O*-metylo w reakcjach z Dicer obecną we frakcji cytoplazmatycznej lizatów komórkowych**

Wynik analizy mieszanin reakcyjnych, w których pre-miRNA były cięte przez Dicer w obecności wskazanych 12-merów serii 2'-*O*-metylo (2OMeAL). Stosunek molowy 2OMeAL:pre-miRNA wynosił 100:1. (K-) reakcja kontrolna bez dodatku enzymu i potencjalnego inhibitora, (K+) reakcja z Dicer, bez potencjalnego inhibitora. Wykresy przedstawiają wydajność tworzenia miRNA w reakcjach z 2OMeAL po normalizacji względem K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu. Na podstawie [450].



**Rysunek 4.22. Badanie oddziaływania 12-nt oligomerów z serii 2'-O-metylo z Dicer**

Wynik rozdziału elektroforetycznego prób, w których znakowane radioizotopowo 12-mery z serii 2'-O-metylo (2OMeAL) inkubowano bez (K-) lub z Dicer (trójkątem oznaczono zmianę stężenia Dicer: 250 nM, 300 nM, 450 nM). Wskazano pozycję prążków odpowiadających poszczególnym oligomerom oraz kompleksom 2OMeAL-210 z Dicer. Na podstawie [450].

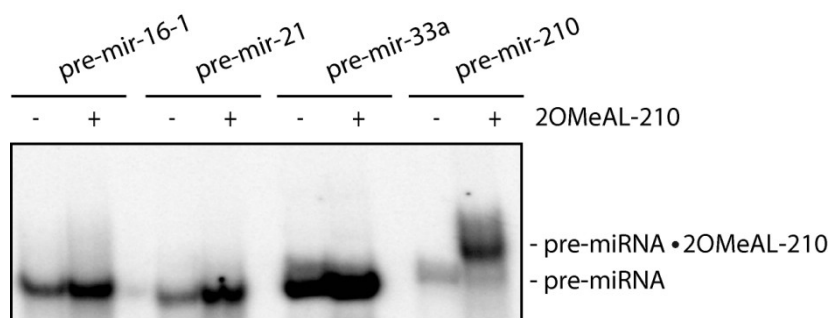
#### IV-2-4-4. Badanie mechanizmu działania AL-210

Zgromadzone wyniki wykazały, że 2OMeAL-210 hamował powstawanie wszystkich testowanych miRNA z co najmniej 50% wydajnością. Wbrew wcześniejszym wynikom wskazującym, że Dicer nie tworzy kompleksów z tak krótkimi cząsteczkami RNA jak 12-mery (Rys. 4.4.), analiza przeprowadzona w żelach PAA w warunkach natywnych wykazała, że 2OMeAL-210 jest wiązany przez Dicer (Rys. 4.22). Zastosowane podejście badawcze nie pozwalało jednak stwierdzić, w jakiej formie 2OMeAL-210 był wiązany przez Dicer.

Oddziaływanie 2OMeAL-210 z Dicer może, przynajmniej częściowo, tłumaczyć hamowanie przez ten 12-mer powstawania wszystkich czterech analizowanych miRNA, szczególnie w eksperymentach z pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a. Nie można jednak wykluczyć, że inhibicja cięcia wymienionych pre-miRNA wynika również, podobnie jak w przypadku pre-mir-210, z oddziaływania tych prekursorów z 2OMeAL-210. W kolejnym etapie sprawdzono zatem, czy 2OMeAL-210 może tworzyć dupleks nie tylko z pre-mir-210, wobec którego był projektowany, ale także z pozostałymi testowanymi pre-miRNA, czyli: pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a. Analizy *in silico* wykazały, że z uwagi na częściową komplementarność sekwencji, AL-210 może oddziaływać z ramieniem 3' zarówno pre-mir-16-1, jak i pre-mir-21 (Załącznik 7.). Aby sprawdzić, czy w przyjętych warunkach reakcyjnych dochodzi do

hybrydyzacji tych cząsteczek, 2OMeAL-210 oraz odpowiedni pre-miRNA wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' inkubowano przez 15 min w 37°C w buforze zawierającym  $Mg^{2+}$ , a następnie rozdzielano w żelach PAA w warunkach natywnych. Wyniki tych analiz wykazały, że 2OMeAL-210 może tworzyć stabilny dupleks jedynie z pre-mir-210 (Rys. 4.23.). Nie stwierdzono natomiast, by w zastosowanych warunkach reakcyjnych oligomer ten oddziaływał z którymkolwiek z pozostałych trzech testowanych pre-miRNA, tj.: pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a (Rys. 4.23.).

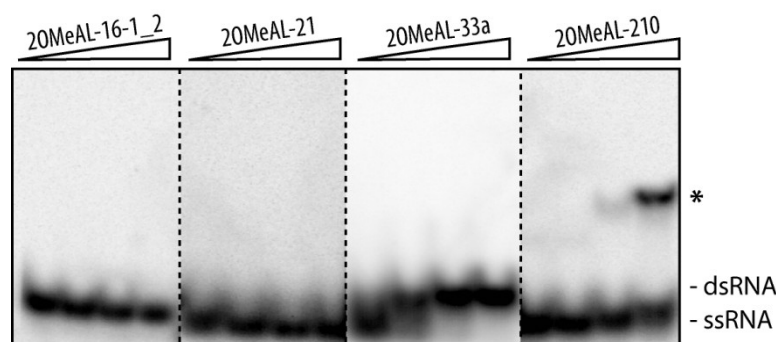
W świetle zebranych wyników (Rys. 4.21.-4.23.) wydaje się, że prawdopodobny mechanizm działania AL-210 w reakcjach z prekursorami: miR-16-1, miR-21 i miR-33a oparty jest na potencjale tego oligomeru do oddziaływania z Dicer, nie wynika natomiast z bezpośredniego oddziaływania tego 12-meru z pre-miRNA. W tym kontekście pojawia się pytanie, w jakiej formie AL-210/2OMeAL-210 jest wiązany przez Dicer. Koncepcja hamowania dojrzewania miRNA przez oligomery oddziałujące z rejonem apikalnym określonych pre-miRNA zakłada, że 12-mery występują w środowisku reakcyjnym w postaci jednoniciowej. Analiza bioinformatyczna wykazała, że testowane 12-mery, z uwagi na częściową samokomplementarność sekwencji, posiadają potencjał do tworzenia dimerów, przy czym najniższą energią swobodną charakteryzują się struktury przewidziane dla AL-33a i AL-210 (Załącznik 8.). Możliwe zatem założyć, że w wyższych stężeniach, wspomniane oligomery występują w formie dimerów i w takiej postaci AL-210 oddziałuje z Dicer.



**Rysunek 4.23. Badanie oddziaływania 2OMeAL-210 z pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a i pre-mir-210**

Wynik testu EMSA dla 2OMeAL-210 i wskazanych pre-miRNA. Wyznakowane radioizotopowo pre-miRNA inkubowano w samym buforze reakcyjnym (-) lub z 100-krotnym molowym nadmiarem 2OMeAL-210 (+). Zaznaczono pozycję prążków odpowiadających wolnym prekursorom oraz kompleksom 12-meru z pre-mir-210.

Aby sprawdzić, czy w warunkach reakcyjnych stosowanych podczas oceny potencjału inhibitorowego 12-mery występują w formie jedno- czy dwuniciowej, oligomery z serii 2'-*O*-metylo-RNA inubowano w 37°C w buforze reakcyjnym dla Dicer, a następnie poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w natywnych żelach PAA. Dla każdego oligomeru przeprowadzono serię reakcji, w których ilość znakowanego RNA była stała (10 000 cpm), natomiast zmieniało się stężenie RNA niewyznakowanego (0,01 μM, 1 μM, 10 μM). Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że 2OMeAL-16-1\_2 i 2OMeAL-21 w zastosowanych warunkach siły jonowej oraz temperatury pozostają w formie jednoniciowej (Rys.4.24.). W przypadku 2OMeAL-33a zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia RNA dochodzi najprawdopodobniej do dimeryzacji oligomeru – na radiogramie widoczne jest stopniowe zanikanie prążka odpowiadającego formie jednoniciowej RNA oraz pojawienie się prążka migrującego wolniej, mogącego odpowiadać dimerom. Dla 2OMeAL-210 na radiogramie stwierdzono obecność prążka ulokowanego znacznie wyżej niż należałoby się spodziewać w sytuacji, gdy dochodzi do dimeryzacji 12-meru (Rys. 4.24., prążki oznaczone (\*)). Pozycja tego prążka pozwala sądzić, że może on odpowiadać strukturom wyższego rzędu tworzonym przez 2OMeAL-210.

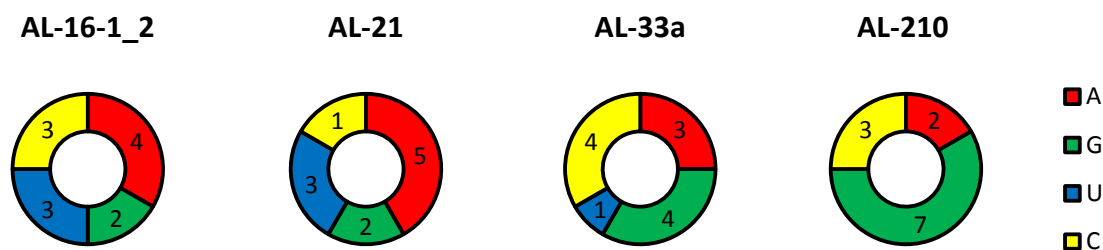


**Rysunek 4.24. Wizualizacja 12-nt oligomerów z serii 2'-*O*-metylo w poddanych elektroforezie w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych**

Rozdzielane mieszaniny zawierały wskazany oligomer wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' oraz jego nieznakowaną formę w stężeniu: 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM, 10 μM (oznaczone trójkątem). Wskazano pozycję prążków odpowiadających formie jednoniciowej (ssRNA) i dwuniciowej (dsRNA) oligomerów oraz strukturze wyższego rzędu tworzonej przez 2OMeAL-210 (\*).



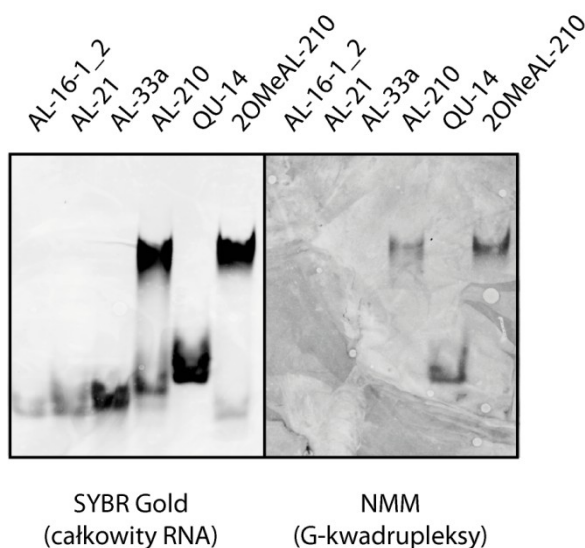
Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, zadano pytanie o to, co wyróżnia AL-210 spośród pozostałych badanych 12-merów. Analiza sekwencji nukleotydowych poszczególnych AL wykazała, że AL-210 cechuje się wysoką zawartością guaniny, która stanowi aż 58% zasad azotowych wchodzących w skład tego oligomeru (7/12 reszt azotowych, Rys. 4.25.). Dla porównania w cząsteczce AL-33a guanina stanowi ~33% zasad azotowych (4/12), natomiast w cząsteczkach AL-16-1\_2 i AL-21 jedynie ~17% (2/12). Co więcej, reszty guanozynowe nie są rozmieszczone równomiernie w sekwencji AL-210 – ponad połowa z nich znajduje się na końcu 5' oligomeru, tworząc ciąg czterech guanozyn (GGGGCAGCCAG).



Rysunek 4.25. Wykresy obrazujące udział poszczególnych zasad azotowych w strukturze wskazanych 12-merów.

Powyższe cechy budowy AL-210 stanowiły przesłankę, by przypuszczać, że oligomer ten może przyjmować strukturę G-kwadrupleksu. W celu weryfikacji tej hipotezy wykorzystano barwnik – *N*-metylomezoporfirynę IX (NMM), tj. anionową pochodną porfiryny selektywnie oddziałującą z G-kwadrupleksami o topologii równoległej [457], charakteryzującej prawie wszystkie G-kwadrupleksy RNA [458]. Analizie poddano cztery 12-mery z serii RNA (AL-16-1\_2, AL-21, AL-33a, AL-210) oraz 2OMe-AL-210. Kontrolę pozytywną stanowił oligomer QU14 – 14-nt cząsteczka RNA, która, zgodnie z danymi literaturowymi, tworzy stabilny G-kwadrupleks o topologii równoległej [459]. 400 pmol każdego z oligomerów inkubowano w buforze reakcyjnym dla Dicer, mieszaninę dzielono na pół i poddawano elektroforezie w osobnych ścieżkach w natywnym żelu PAA. Po zakończonej elektroforezie żel dzielono na dwie części; jedną z nich barwiono w roztworze SybrGold w celu wizualizacji całkowitego RNA, podczas, gdy drugą, zawierającą takie same próby, inkubowano w roztworze NMM w celu wizualizacji prążków odpowiadających

G-kwadrupleksom. Na Rys. 4.26. przedstawiono wyniki analizy przeprowadzonej dla wyżej wymienionych oligomerów. Na zdjęciu żelu barwionego NMM widoczne są prążki odpowiadające G-kwadrupleksom jedynie w ścieżkach, w których rozdzielano AL-210 i 2OMeAL-210 oraz kwadrupleks referencyjny – QU14.



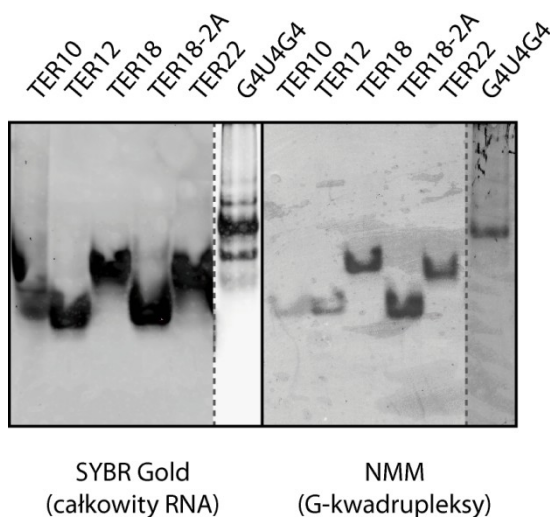
**Rysunek 4.26. Wizualizacja kwasów nukleinowych za pomocą barwnika specyficznego wobec G-kwadrupleksów**

Wskazane oligomery inkubowano 15 min w 37°C w buforze zawierającym  $\text{Na}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , a następnie poddawano elektroforezie w warunkach natywnych. W celu uwidocznienia kwasów nukleinowych, żele barwiono w roztworze SybrGold (całkowity RNA) lub *N*-metylomezoporfiryny IX (NMM, barwnik specyficzny wobec kwadrupleksów o topologii równoległej).

*IV-2-5. Badanie wpływu oligomerów RNA zawierających sekwencje bogate w ciągi guanozyn na proces powstawania miRNA w reakcjach z ludzką rybonukleazą Dicer*

W świetle wyników przedstawionych dla AL-210/2OMe-AL-210 nasuwa się pytanie, czy G-kwadrupleksy RNA mogą interferować w proces powstawania miRNA w reakcjach z Dicer. By odpowiedzieć na to pytanie zdecydowano się sprawdzić wpływ szeregu oligomerów RNA przyjmujących strukturę G-kwadrupleksów na aktywność katalityczną Dicer *in vitro*. Do analiz wykorzystano sześć oligomerów o długości od 10 do 22 nt, odpowiadających fragmentom ludzkiego RNA telomerowego: TER10,

TER12, TER18, TER18-2A, TER22 oraz 12-nt oligomer G4U4G4. Struktura G-kwadrupleksów tworzonych przez wymienione oligomery jest znana i została szczegółowo scharakteryzowana w literaturze (Załącznik 9.). W pierwszym etapie sprawdzono, czy w przyjętych warunkach reakcji, oligomery te przyjmują strukturę G-kwadrupleksów. W tym celu próby zawierające 400 pmol odpowiedniego RNA inkubowano w 37°C w buforze dla Dicer, a następnie rozdzielano w warunkach natywnych w żelach PAA. Wizualizacja kwasów nukleinowych z wykorzystaniem roztworu NMM potwierdziła, że w zastosowanych warunkach, wszystkie oligomery przyjmowały strukturę G-kwadrupleksów (Rys. 4.27.).

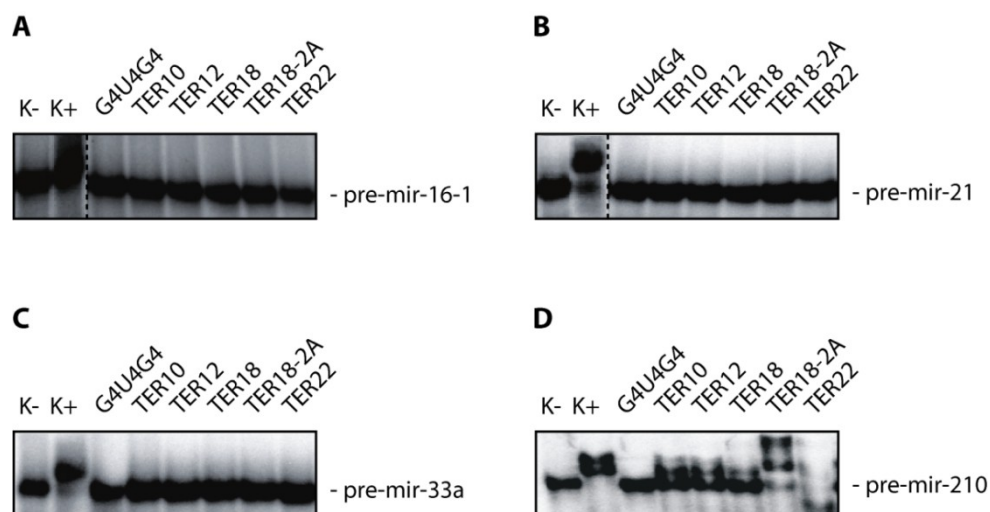


#### Rysunek 4.27. Wizualizacja oligomerów przyjmujących strukturę G-kwadrupleksów

Wskazane oligomery inkubowano 15 min w 37°C w buforze reakcyjnym dla Dicer i poddawano elektroforezie w warunkach natywnych. W celu uwidocznienia kwasów nukleinowych, żele barwiono w roztworze SybrGold (całkowity RNA) lub w roztworze *N*-metylomezopropiryny IX (NMM, barwnik specyficzny wobec kwadrupleksów o topologii równoległej).

Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki wskazujące, że oddziaływania pomiędzy pre-miRNA i oligomerami RNA mogą istotnie wpływać na proces generowania miRNA przez Dicer, przeprowadzono szereg reakcji kontrolnych, sprawdzających, czy testowane oligomery przyjmujące strukturę G-kwadrupleksów mogą hybrydyzować do pre-miRNA wykorzystywanych w badaniach. Prekursory, tj.: pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a, pre-mir-210 znakowane radioizotopowo na

końcu 5' inkubowano w samym buforze reakcyjnym dla Dicer (K-) lub razem z komplementarnym 12-merem (odpowiednio: AL-16-1\_2, AL-21, AL-33a, AL-210) bądź testowanym oligomerem (TER10, TER12, TER18, TER18-2A, TER22 lub G4U4G4) dodanymi w 100-krotnym molowym nadmiarze. Próby poddano elektroforezie w żelach PAA w warunkach natywnych. Uzyskane wyniki wykazały, że w zastosowanych warunkach reakcyjnych oligomery wybrane do badań nie hybridyzowały do pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a (Rys. 4.28. A-C). Jedynie w przypadku pre-mir-210 na radiogramie zaobserwowano prążki wskazujące na tworzenie się kompleksów prekursora z oligomerami odpowiadającymi fragmentom RNA telomerowego (Rys. 4.28. D).

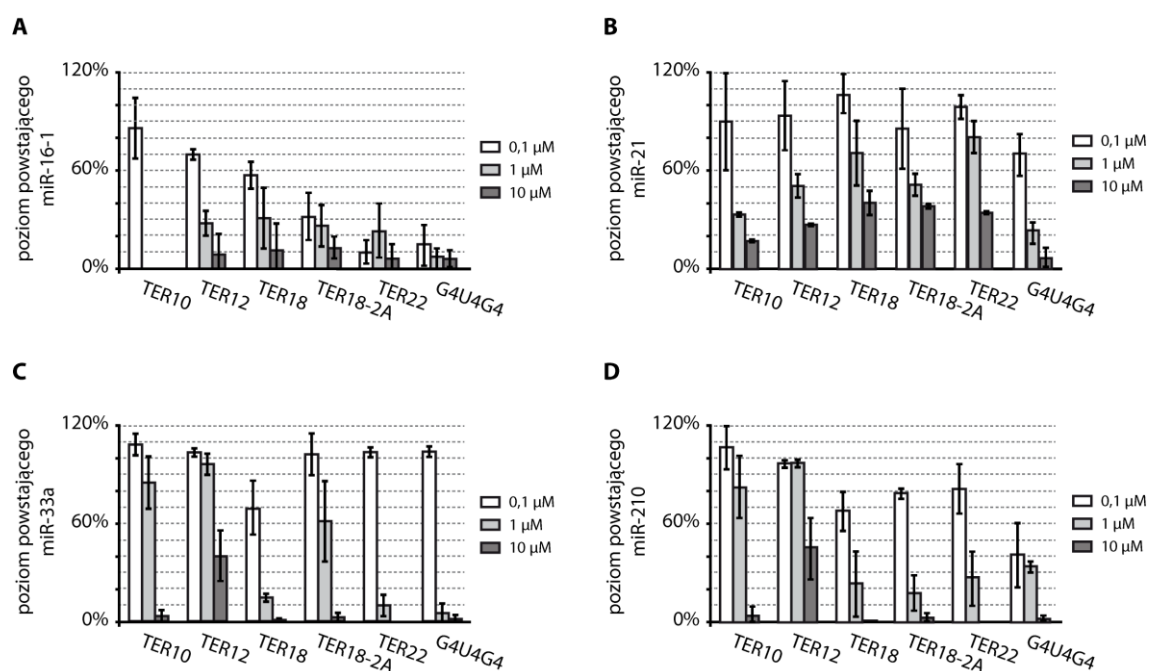


**Rysunek 4.28. Badanie oddziaływań pomiędzy pre-miRNA a oligomerami przyjmującymi strukturę G-kwadrupleksów**

Wyznakowane radioizotopowo pre-miRNA miRNA (A – pre-mir-16-1, B – pre-mir-21, C – pre-mir-33a, D – pre-mir-210) inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub ze 100-krotnym molowym nadmiarem komplementarnego 12-meru (K+), bądź wskazanego oligomeru. Zaznaczono pozycję prążków odpowiadających wolnym pre-miRNA.

W kolejnym etapie przystąpiono do sprawdzenia wpływu wyselekcjonowanych oligomerów na reakcję hydrolizy wybranych ludzkich pre-miRNA przez Dicer. Dla każdego pre-miRNA (pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a, pre-mir-210) przygotowano trzy mieszaniny reakcyjne, w których poziom znakowanego radioizotopowo prekursora był stały, natomiast zmieniało się stężenie testowanego

oligomeru przyjmującego strukturę G-kwadrupleksu, odpowiednio: 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ . Dodatkowo przeprowadzono reakcje kontrolne: kontrolę negatywną (K-) pozwalającą monitorować integralność substratu w trakcie inkubacji RNA w samym buforze reakcyjnym oraz kontrolę pozytywną (K+), na podstawie której ustalano poziom miRNA generowanego przez Dicer (Genlantis) pod nieobecność potencjalnego inhibitora.



**Rysunek 4.29. Badanie wpływu oligomerów o strukturze G-kwadrupleksów na proces cięcia pre-miRNA przez Dicer**

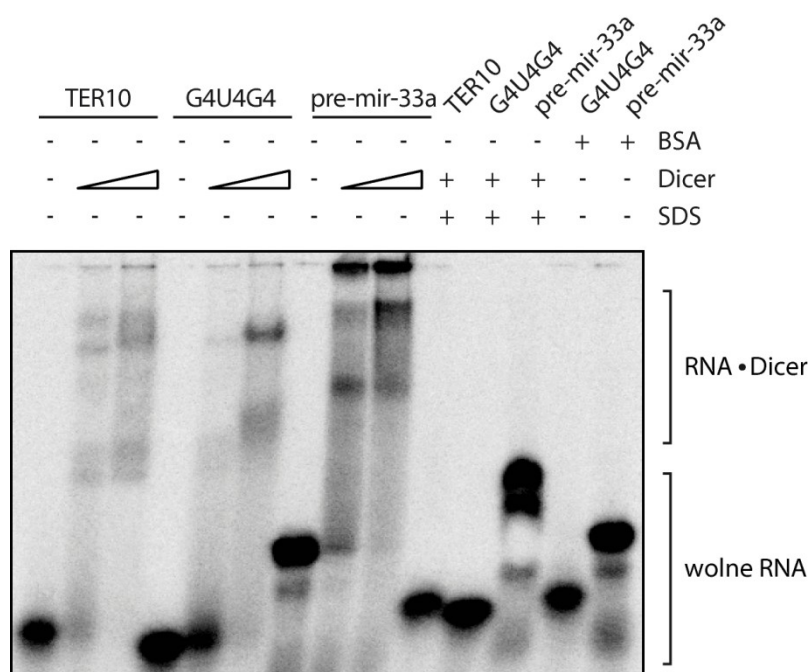
Potencjał inhibitorowy wskazanych oligomerów (TER10, TER12, TER18, TER18-2A, TER22, G4U4G4) oceniano w standarowych reakcjach cięcia pre-miRNA (**A** – pre-mir-16-1, **B** – pre-mir-21, **C** – pre-mir-33a, **D** – pre-mir-210) przez Dicer *in vitro*. Na wykresach przedstawiono wydajność powstawania poszczególnych miRNA obliczoną w odnieniu do reakcji bez dodatku potencjalnego inhibitora. Kolorami oznaczono testowane stężenia wskazanego oligomeru (0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ). Słupki błędów na wykresach odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu.

Otrzymane wyniki wykazały, że wszystkie użyte oligomery wpływały na proces cięcia badanych pre-miRNA przez Dicer (Rys. 4.29.). Najwyższą inhibicję obserwowano w tych próbach, w których stężenia testowanych oligomerów były największe (1  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$ ), co może mieć związek z pozytywną zależnością tworzenia

się struktury G-kwadrupleksów od stężenia cząsteczki [460, 461] (Rys. 4.24, panel 2OMeAL-210). Ta zależność może również odpowiadać za bardzo duże różnice w wydajności powstawania miRNA w reakcjach, w których testowane oligomery były obecne w najniższym stężeniu (0,1  $\mu\text{M}$ ) w porównaniu do reakcji z wyższym stężeniem (1  $\mu\text{M}$  lub 10  $\mu\text{M}$ ), co szczególnie wyraźnie widać na przykładzie pre-mir-33a (Rys. 4.29. C). Ponadto, porównując wyniki otrzymane dla wszystkich czterech pre-miRNA i testowanych oligomerów, widać wyraźnie, że poziom inhibicji wywieranej przez dany oligomer zależy od rodzaju substratu użytego w reakcji. W przypadku pre-mir-16-1 już przy najniższym stężeniu TER 18-2A, TER22 i G4U4G4 zanotowano >50% obniżenie wydajności produkcji miRNA w porównaniu do reakcji kontrolnej (K+), (Rys. 4.29. A), podczas gdy w analogicznych warunkach dla pre-mir-33a i pre-mir-21 nie zaobserwowano inhibicji aktywności Dicer (Rys. 4.29. B-C). W przypadku pre-mir-210, TER 18-2A i TER22 hamowały powstawanie miR-210 jedynie o ~20%, natomiast G4U4G4 – o ~50% (Rys. 4.29. D).

W świetle wyników wskazujących, że Dicer nie oddziałuje wydajnie z oligomerami o długości mniejszej niż ~20 nt (Rys. 4.4.), szczególnie interesujące wydają się wartości inhibicji otrzymane dla najkrótszych z testowanych oligomerów, tj. TER10 (10 nt) i G4U4G4 (12 nt). Oba oligomery w najwyższym testowanym stężeniu (10  $\mu\text{M}$ ) niezwykle wydajnie (>80%) hamowały powstawanie wszystkich badanych miRNA (Rys. 4.29.). Na wcześniejszym etapie badań wykluczono możliwość oddziaływania tych cząsteczek z testowanymi pre-miRNA (Rys. 4.28.), co wskazuje na to, że za obserwowaną inhibicję powstawania miRNA w reakcjach z TER10 i G4U4G4 najprawdopodobniej odpowiada oddziaływanie tych dwóch oligomerów z Dicer. Weryfikacji tej hipotezy dokonano, przeprowadzając test EMSA z udziałem wspomnianych oligomerów i Dicer (preparat bakulowirusowy). TER10 i G4U4G4 znakowane radioizotopowo na końcu 5' inkubowano z białkiem (200 nM, 600 nM) w warunkach uniemożliwiających cięcie RNA (bufor bez  $\text{Mg}^{2+}$ , 4°C) i rozdzielano elektroforetycznie w natywnych żelach PAA. Kontrolę pozytywną stanowił pre-mir-33a traktowany w analogiczny sposób, jak TER10 i G4U4G4. Ponadto dla każdego oligomeru przeprowadzono kontrolę negatywną, w której do mieszaniny reakcyjnej dodawano czynnik denaturujący białko (2% SDS), uniemożliwiając tworzenie się kompleksów rybonukleoproteinowych. Dla dwóch oligomerów (G4U4G4 i pre-mir-33a) przygotowano dodatkowe kontrole negatywne, w których RNA

inkubowano z białkiem niewiążącym kwasów nukleinowych, albuminą wołową (BSA, ang. *bovine serum albumin*) Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono na Rys. 4.30. Na zaprezentowanym radiogramie można zidentyfikować prążki, które obecne są w próbach z Dicer bez czynnika denaturującego białko, natomiast nie występują one w próbach bez Dicer lub oraz w kontrolach z SDS lub BSA, co wskazuje na to, że najprawdopodobniej prążki te odpowiadają kompleksom oligomerów z Dicer. Uzyskane wyniki pozwalają sądzić, że Dicer posiada zdolność do oddziaływania z cząsteczkami kwasów nukleinowych o strukturze G-kwadrupleksów. Przeprowadzone analizy nie dostarczają jednak informacji na temat natury tych oddziaływań.



**Rysunek 4.23. Badanie oddziaływań oligomerów przyjmujących strukturę G-kwadrupleksów z Dicer**

Wyznakowane radioizotopowo oligomery (TER10, G4U4G4, pre-mir-33a) preinkubowano w buforze niezawierającym  $Mg^{2+}$  bez (-) lub z Dicer (200 nM, 600 nM; zmianę stężenia oznaczono trójkątami). W reakcjach kontrolnych obecny był czynnik denaturujący białko (2% SDS, +) lub BSA (10  $\mu$ M). Wskazano pozycję prążków odpowiadających wolnym RNA oraz kompleksom RNA z Dicer.

---

## V DYSKUSJA

Rozwój organizmu, utrzymanie jego homeostazy i prawidłowa odpowiedź na czynniki zewnętrzne warunkowane są przez skoordynowaną, zarówno w czasie, jak i w przestrzeni, ekspresję wielu genów. Tę synchronizację zapewniają sieci regulatorowe, których istotnym elementem są miRNA. Odkrycie miRNA przyniosło falę zainteresowania biogenezą oraz funkcjonowaniem tych cząsteczek, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Większość badań poświęconych regulacji powstawania miRNA skupia się na czynnikach o charakterze białkowym, które wpływają na aktywność podstawowych enzymów tego szlaku. Zdecydowanie mniej wiadomo na temat roli regulatorowej, jaką w procesie powstawania miRNA mogą odgrywać cząsteczki RNA. Poruszając ten problem, przede wszystkim zwraca się uwagę na znaczenie struktur: pri-miRNA i pre-miRNA dla wydajności i specyficzności cięcia przez Drosha [198, 205, 206, 211-225] i Dicer [258, 300, 355-357]. W tym kontekście rozpatrywano zatem poszczególne motywy sekwencyjne i strukturalne, charakteryzujące substraty obu RNaz, pod kątem ich znaczenia jako elementów *cis*-regulatorowych. Jedynie w kilku pracach przedstawiono przykłady cząsteczek RNA działających jako czynniki *trans*-regulatorowe, wpływające na dojrzewanie pojedynczych lub większości miRNA obecnych w komórce. Badania te dotyczyły przede wszystkim etapu jądrowego biogenezy miRNA. Wykazano między innymi, że poziom let-7 w komórkach *C. elegans* podlega regulacji poprzez pozytywne sprzężenie zwrotne pomiędzy dojrzałym miRNA a pri-let-7 [225]. Z kolei dla mysiego pri-mir-15a/16-1 oraz ludzkiego pri-mir-195, wykazano, że proces ich cięcia przez kompleks Mikroprocesora jest hamowany przez, odpowiednio, miR-709 [223] oraz lncRNA Uc.283+A [224], które, hybrydując do pierwotnych transkryptów, inicjują rearanżacje ich struktury i rekrutują inne czynniki regulatorowe. W przypadku etapu cytoplazmatycznego i cięcia pre-miRNA przez Dicer istnieją pojedyncze doniesienia o cząsteczkach RNA pochodzenia wirusowego, które funkcjonują jako inhibitory kompetycyjne rybonukleazy i prowadzą do deregulacji puli komórkowych miRNA [255, 342]. W ostatnim czasie postuluje się również rolę regulatorową tzw. miejsc pasywnego wiązania Dicer zidentyfikowanych w obrębie cząsteczek mRNA i lncRNA [341].



Niewątpliwy potencjał oligonukleotydów do oddziaływania zarówno z Dicer, jak i z jej substratami, skłania do zadania pytania o rolę krótkich cząsteczek RNA w procesie dojrzewania miRNA. W toku badań prowadzonych wcześniej w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej IChB PAN w Poznaniu dokonano selekcji *in vitro* aptamerów RNA wiążących ludzką rybonukleazę Dicer oraz przeprowadzono wstępną charakterystykę wpływu wybranych oligomerów na aktywność tego enzymu (praca doktorska A. Tyczewskiej, IChB PAN, 2008). Uzyskane wyniki pozwoliły zidentyfikować w puli wyselekcjonowanych aptamerów cząsteczki, które stanowiły substrat dla Dicer i w związku z tym odgrywały rolę kompetytorów pre-miRNA oraz cząsteczki wiązane, ale niecięte przez enzym, które najprawdopodobniej funkcjonowały jako inhibitory allosteryczne Dicer. Szczególnie interesujące wyniki otrzymano dla dwóch spośród testowanych oligomerów: ATD\_13.6 i ATD\_15.52, które efektywnie i trwale hamowały powstawanie miR-210, podczas gdy ich wpływ na dojrzewanie innych testowanych miRNA był znacznie mniejszy [436]. Badanie mechanizmów warunkujących selektywność substratową wspomnianych aptamerów stanowiło pierwszy etap badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy.

ATD\_13.6 jest wiązany przez Dicer, ale nie podlega cięciu przez tę rybonukleazę [436]. Testy kompetycyjne wykazały, że pre-miRNA (pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a) mogą wypierać ATD\_13.6 z kompleksu z Dicer (Rys. 4.9.). Można zatem sądzić, że miejsca wiązania tego aptameru i prekursorów w obrębie enzymu są tożsame lub częściowo się pokrywają. Fakt, iż ATD\_13.6 nie jest cięty przez Dicer najprawdopodobniej wynika ze struktury drugorzędowej aptameru, która, według przewidywań *in silico*, charakteryzuje się znacznie wydłużonym końcem 5' (Rys. 4.7. B). Jak wiadomo, struktura końców substratu jest kluczowa dla związania cząsteczki RNA w orientacji umożliwiającej wydajne cięcie przez Dicer [260]. Model inhibicji kompetycyjnej, zakładający różne powinowactwo naturalnych substratów wobec Dicer, mógłby tłumaczyć wyniki wstępnych badań z udziałem ATD\_13.6, tj. odmienny poziom inhibicji powstawania miRNA obserwowany w reakcjach z pre-mir-33a w porównaniu do pre-mir-210 [436]. Dalsze badania dowiodły jednak, że za znaczne zahamowanie cięcia pre-mir-210 przez Dicer w próbach z ATD\_13.6 odpowiada odmienny mechanizm regulatorowy. Szczegółowe analizy oddziaływań ATD\_13.6 z Dicer i pre-mir-210 przeprowadzone techniką dot blot (Rys. 4.6.) oraz metodą elektroforezy w żelach PAA w warunkach natywnych (Rys. 4.9.), w połączeniu

z przewidywaniami *in silico* i mapowaniem enzymatycznym struktury drugorzędowej RNA (Rys. 4.7. B) wykazały, że ATD\_13.6 tworzy dupleks z pre-mir-210 i w takiej formie jest wiązany przez Dicer. Dupleks ATD\_13.6 • pre-mir-210 nie podlega cięciu przez Dicer, co może być podyktowane jego strukturą, która różni się znacząco od struktury typowych dwuniciowych substratów Dicer (Rys. 4.7. B). Brak wolnych końców nie stanowi przeszkody do utworzenia kompleksu z Dicer, natomiast uniemożliwia cięcie RNA przez enzym [288, 341, 462]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zatem, że ATD\_13.6 może współzawodniczyć z pre-miRNA o miejsce wiązania w obrębie enzymu, czyli funkcjonować na zasadzie inhibicji kompetycyjnej Dicer. Alternatywnie, ATD\_13.6 może oddziaływać z substratami Dicer i zmieniać ich strukturę, uniemożliwiając ich cięcie przez enzym. ATD\_13.6 można zatem nazwać inhibitorem dwufunkcyjnym, tj. inhibitorem mogącym wpływać na proces powstawania miRNA zarówno poprzez wiązanie się z Dicer, jak i oddziaływanie z komplementarnymi pre-miRNA.

Wyniki badań poświęconych selekcji *in vitro* i wstępnej charakterystyce aptamerów wiążących Dicer opublikowane w [436] spotkały się z zainteresowaniem ze strony innych zespołów badawczych. Xu i wsp. zdecydowali się wykorzystać sekwencję ATD\_13.6 do zaprojektowania narzędzia oligorybonukleotydowego inspirowanego działaniem systemu CRISPR/Cas9 [463]. Technologia CRISPR/Cas9 to metoda inżynierii genetycznej pozwalająca na wydajną i precyzyjną edycję genomu za pomocą kompleksu rybonukleinowego składającego się z endonukleazy Cas9 i krótkiego RNA komplementarnego do wybranego fragmentu DNA [464-466]. Przez analogię, Xu i wsp. zaproponowali wykorzystanie kompleksu rybonukleoproteinowego tworzonego przez Dicer i cząsteczkę odpowiednio zaprojektowanego oligomeru RNA do degradacji wybranych komórkowych RNA [463]. Wspomniany oligomer zawiera dwa motywy funkcjonalne: motyw wiązany przez Dicer oraz motyw antysensowy, rozpoznający docelowe RNA. Motyw wiązany przez Dicer powinien zapewniać stabilne oddziaływanie oligomeru z białkiem, a jednocześnie nie ulegać cięciu przez ten enzym. Oba wymogi spełnia ATD\_13.6, który, jak wspomniano, charakteryzuje się wysokim powinowactwem do Dicer (~ 600 nM), jednak nie stanowi jej substratu. W przytoczonych badaniach [463], Xu i wsp. wykorzystali oligomer RNA, w którym sekwencja motywu wiązanego przez Dicer jest identyczna z sekwencją ATD\_13.6, natomiast sekwencja antysensowa jest komplementarna do MALAT-1

(ang. *Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) – lncRNA zaangażowanego między innymi w regulację ekspresji genów związanych z proliferacją i migracją komórek nowotworowych [467-469]. Wyniki badań przeprowadzonych *in vitro* w hodowlach komórek HeLa oraz MDA-MB-231 (linia ludzkich komórek raka piersi) wykazały ~40% obniżenie poziomu MALT-1 w komórkach transfekowanych zaprojektowanym oligomerem w porównaniu do kontroli negatywnej, co wiązało się również ze spadkiem tempa proliferacji oraz zahamowaniem migracji tych komórek [463]. Dalsze badania wykazały, że obserwowane efekty były zależne od aktywności Dicer; w komórkach traktowanych testowanym oligomerem i shRNA hamującym powstawanie Dicer nie obserwowano spadku poziomu MALT-1 [463]. W zaprezentowanym przykładzie fragment cząsteczki odpowiadający ATD\_13.6 stanowił swego rodzaju pasywne miejsce związania Dicer umożliwiające zakotwiczenie rybonukleazy w sąsiedztwie transkryptu, który ma podlegać degradacji. Podejście to ilustruje możliwość wykorzystania wyselekcjonowanych aptamerów jako części składowych bardziej rozbudowanych narzędzi wpływających na funkcjonowanie Dicer w komórce i nakierowujących enzym na wybrane RNA.

Drugi z aptamerów poddanych szczegółowym badaniom, ATD\_15.52, na podstawie wyników wstępnych analiz został zaklasyfikowany jako kompetytor pre-miRNA, współzawodniczący z nimi o utworzenie kompleksu z Dicer. W wyniku hydrolizy przez Dicer wiązania fosfodiesterowego pomiędzy A21 i G22 ATD\_15.52 generowane są dwa fragmenty: fragment 5' o długości 21 nt i fragment 3' o długości 35 nt. Mimo cięcia ATD\_15.52 przez Dicer, a więc obniżania poziomu kompetytora w mieszaninie reakcyjnej w miarę upływu czasu inkubacji, w reakcjach z pre-mir-210 nie obserwowano znoszenia inhibicji powstawania miR-210 [436]. Dalsze analizy wykazały, że fragment 5' uwalniany z ATD\_15.52 przez Dicer może wiązać się do pre-mir-210 i hamować cięcie tego prekursora, podtrzymując inhibicję powstawania miR-210, wynikającą początkowo z kompetycji pomiędzy prekursorem a aptamerem (Rys. 4.10., Rys. 4.11. A). Przewidywania *in silico* wskazują, że do oddziaływania pomiędzy 5'-ATD\_15.52 a pre-mir-210 dochodzi w części apikalnej prekursora (Rys. 4.11. B, Załącznik 5.). Przeprowadzone analizy wykazały również, że nie tylko fragment 5' aptameru, ale także pełnej długości ATD\_15.52 jest zdolny do oddziaływania z pre-mir-210 (Rys. 4.11. A, Rys. 4.12.). W tym kontekście ATD\_15.52, podobnie jak ATD\_13.6, może zostać zaklasyfikowany jako dwufunkcyjny inhibitor

procesu powstawania miRNA, tj. inhibitor wiązany przez Dicer oraz inhibitor zaburzający strukturę komplementarnych pre-miRNA.

Przypadek ATD\_15.52 jest przykładem sytuacji, gdy produkt metabolizmu inhibitora, (tu: cięcia aptameru przez rybonukleazę) posiada potencjał funkcjonalny i w określonych warunkach może wpływać na proces powstawania miRNA. W kontekście fizjologicznym, istnienie tego typu oligomerów, pozwalałoby na dwustopniową regulację dojrzewania miRNA, najpierw globalną, później selektywną. W pierwszym etapie, w wyniku związania oligomeru z Dicer, poprzez inhibicję na zasadzie kompetycji, regulacji podlegałaby znaczna część puli miRNA. Następnie, po przecięciu inhibitora przez Dicer możliwe byłoby utrzymywanie niskiego poziomu wybranych miRNA poprzez zahamowanie ich dojrzewania wynikające z oddziaływania pomiędzy uwolnionymi fragmentami inhibitora a odpowiednimi pre-miRNA. Niewykluczone, że tego typu fragmenty mogłyby również wpływać na biogenezę i funkcjonowanie miRNA za pomocą innych mechanizmów wymagających hybrydyzacji komplementarnych nici RNA. Istnienie opisanych powyżej regulatorów pozostaje w sferze domysłów, niemniej znane są przykłady endogennych RNA (mRNA, miRNA, tRNA), które oprócz pełnienia zdefiniowanych dla nich funkcji biologicznych, są również źródłem produktów degradacji określanych jako stabilne i funkcjonalne degradanty RNA [123, 470-472]. Degradanty tego typu powstają w wyniku przemian metabolicznych jakim podlegają wszystkie RNA w komórce, jednak na tle innych produktów degradacji wyróżnia je dłuższy czas półtrwania w komórce oraz, jak wskazują ostatnie badania, również potencjał funkcjonalny [473]. Jak wykazano, w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach stresu hipertonicznego 18-nt fragment pochodzący z mRNA *TRM10* hamuje proces translacji poprzez bezpośrednie oddziaływanie z dużą podjednostką rybosomu [472]. Obniżenie tempa biosyntezy białek prowadzi do spowolnienia metabolizmu drożdży, co pozwala na zmianę profilu ekspresji kluczowych dla przeżycia genów i adaptację do niesprzyjających warunków solnych. U człowieka fragmenty mRNA (szczególnie odpowiadające rejonom 3'UTR), a także fragmenty miRNA czy tRNA identyfikowane są w puli egzosomalnych RNA [474-477]. Postuluje się, że po endocytozie egzosomów niektóre z degradantów mogą odgrywać rolę regulatorową, wpływając na lokalizację, stabilność i funkcjonowanie obecnych w komórce RNA [475-477]. Dodatkowo, głębokie sekwencjonowanie puli krótkich RNA pochodzących z ludzkich neutrofilów i płytek krwi ujawniło obecność

w tych komórkach tzw. semi-miRNA (smiRNA), czyli cząsteczek RNA o długości 12 nt odpowiadających fragmentom 5' miRNA: miR-223 i let-7 [470]. Wyniki analiz funkcjonalnych z udziałem smiR-223 wspierają hipotezę, że degradanty tego typu mogą odgrywać rolę naturalnych antysensowych RNA, wpływających na stabilność i aktywność komplementarnych miRNA [470].

Aktualny stan wiedzy na temat różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej transkryptomu skłania do zadania pytania, czy w puli RNA obecnych w komórkach ludzkich znajdują się cząsteczki o sekwencjach wyselekcjonowanych aptamerów lub do nich podobne. Przeprowadzona pod tym kątem analiza *in silico* transkryptomu człowieka wykazała obecność transkryptów zawierających sekwencje o znacznym stopniu podobieństwa do sekwencji aptamerów regulujących aktywność Dicer, w tym do ATD\_13.6 i ATD\_15.52 (Załącznik 4.). W puli 68 transkryptów o sekwencjach wykazujących największe podobieństwo do wyselekcjonowanych aptamerów znalazły się między innymi wariant transkrypcyjny kodujący protokadherynę 21 (PCDH21) i wariant transkrypcyjny kodujący białko THAP4, przy czym 29-nt fragment PCDH21 wykazuje 90% podobieństwo do ATD\_13.6, natomiast 35-nt fragment THAP4 wykazuje 80% podobieństwo do ATD\_15.52. Badanie potencjału inhibitorowego oligomerów odpowiadających wspomnianym wyżej fragmentom naturalnych transkryptów (PCDH21\_fr i THAP4\_fr) potwierdziło ich zdolność do hamowania powstawania miR-210 w reakcjach z Dicer (Rys. 4.13. A). Ze względu na komplementarność sekwencji pomiędzy testowanymi oligomerami a użytym w reakcjach prekursorem (pre-mir-210), PCDH21\_fr i THAP4\_fr hamowały powstawanie miRNA poprzez bezpośrednie oddziaływanie z pre-miRNA i zaburzenie jego natywnej struktury, uniemożliwiające cięcie przez Dicer. Potencjalnie jednak, ze względu na długość obu oligomerów (~30 nt), mogą one być wiązane przez Dicer (Rys. 4.4.), co stanowi przesłankę, by zaklasyfikować je do grona inhibitorów dwufunkcyjnych.

Do tej pory brak dowodów, by endogenne transkrypty lub fragmenty transkryptów o długości zbliżonej do analizowanych oligomerów (~60-nt aptamerów czy ~30-nt PCDH21\_fr i THAP4\_fr) wpływały na aktywność Dicer *in vivo*. Wiadomo natomiast, że regulacja etapu cytoplazmatycznego biogenezy miRNA poprzez RNA oddziałujące z Dicer jest strategią wykorzystywaną przez niektóre wirusy w celu

obniżenia poziomów miRNA zaangażowanych w regulację odpowiedzi obronnej komórki oraz do ochrony własnych transkryptów niezbędnych w procesie replikacji [255, 342]. Ponadto doniesienia o tzw. miejscach pasywnego wiązania Dicer (zidentyfikowane w obrębie mRNA i lncRNA), sugerują, iż poziom aktywnego enzymu w cytoplazmie może być regulowany poprzez sekwestrację Dicer [341]. Dzięki specyficznej strukturze, RNA będący miejscem pasywnego wiązania przylacza Dicer, nie jest jednak przez nią cięty. Podobnie, jak w przypadku ATD\_13.6 umożliwia to blokowanie aktywności Dicer bez jednoczesnego generowania produktów cięcia (co następuje, gdy kompetytor stanowi substrat enzymu), które mogłyby interferować z innymi procesami biologicznymi i wywoływać niepożądane efekty.

Istnieje wiele przykładów świadczących, iż podstawowym czynnikiem umożliwiającym cząsteczkom RNA pełnienie różnorodnych funkcji biologicznych jest ich niezwykle dynamizm konformacyjny [478]. Zmiany strukturalne (spowodowane: warunkami fizyko-chemicznymi środowiska [479-482], przyłączeniem specyficznych białek [483-485] lub czynników niebiałkowych [486] czy hydrolizą RNA [487, 488]), pozwalają cząsteczkom RNA pełnić funkcję binarnych przełączników sterujących przebiegiem wielu procesów komórkowych. Podobne efekty obserwowane są również w przypadku pre-miRNA. We Wstępie niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę szeregu białek, które wpływają na strukturę pre-miRNA i w ten sposób promują lub hamują oddziaływanie prekursorów z Dicer i/lub ich cięcie przez tę rybonukleazę. Wyniki badań z udziałem ATD\_13.6 i ATD\_15.52 dowiodły, że również RNA może odgrywać rolę czynnika *trans*-regulatorowego i wpływać na proces powstawania miRNA zarówno poprzez sekwestrację Dicer, jak i poprzez bezpośrednie oddziaływanie z pre-miRNA. Wyniki otrzymane dla obu aptamerów, a także dla PCDH21\_fr i THAP4\_fr potwierdziły, że zmiany struktury pre-miRNA indukowane przyłączeniem komplementarnego oligomeru RNA mogą prowadzić do zahamowania cięcia tego prekursora przez Dicer *in vitro*.

Powyższe obserwacje, a w szczególności wnioski płynące z badań z udziałem fragmentu 5' ATD\_15.52, które pokazały, że do wydajnego hamowania powstawania miR-210 wystarczyła zaledwie 12-nt komplementarność pomiędzy regulowanym prekursorem a inhibitorem RNA, pozwalały sądzić, że na podobnej zasadzie można hamować proces powstawania innych miRNA. Aby zweryfikować tę hipotezę,

zaprojektowano cztery 12-nt oligomery RNA komplementarne do jednoniciowych rejonów obecnych w części apikalnej wybranych pre-miRNA: pre-mir-16-1, pre-mir-21, pre-mir-33a i pre-mir-210 (Rys. 4.14.). Oligomery te nazwano odpowiednio: AL-16-1, AL-21, AL-33a, AL-210. W zaprezentowanych badaniach skupiono się na określeniu, czy rearanżacje struktury prekursorów indukowane przyłączeniem 12-merów mogą prowadzić do wydajnej inhibicji wyzwiania miRNA przez Dicer.

Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem rekombinowanego białka, jak również preparatu komórkowego jednoznacznie wykazały, że 12-mery komplementarne do fragmentów apikalnych pre-miRNA wydajnie hamowały cięcie tych prekursorów przez Dicer (por. Rys. 4.15., Rys. 4.17, Rys. 4.19. i Rys. 4.20.). Potwierdzono tym samym, że rejon apikalny pre-miRNA jest istotny dla rozpoznania substratu przez enzym. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi wskazującymi, że pętla apikalna pre-miRNA jest zarówno jednym z kluczowych elementów determinujących interakcję z Dicer [300], jak i potencjalnym miejscem wiązania czynników regulatorowych [217, 228, 368-371, 378].

Należy jednak zauważyć, że jeden spośród testowanych 12-merów, tj. AL-16-1, jedynie w niewielkim stopniu hamował proces cięcia przez Dicer komplementarnego prekursora (pre-mir-16-1), (Rys. 4.15.). Co ciekawe, już wcześniej Michlewski i wsp. wykazali, że oligomery komplementarne do pętli apikalnej pri-mir-16-1 nie hamowały cięcia tego transkryptu przez Drosha (w przeciwieństwie do oligomerów komplementarnych do pętli apikalnych szeregu innych pri-miRNA, między innymi pri-mir-18a i pri-let-7a-1) [216]. Autorzy przytoczonej publikacji postulowali, że obserwowany efekt wynikał z braku w rejonie pętli apikalnej pri-mir-16-1 konserwatywnych elementów strukturalnych rozpoznawanych przez czynniki zaangażowane w dojrzewanie prekursora. W przypadku badań z udziałem Dicer, wyniki uzyskane w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy wskazują, że za niską aktywność inhibitorową AL-16-1 częściowo może odpowiadać skład nukleotydowy rejonu apikalnego pre-mir-16-1, w szczególności, duża zawartość AU w porównaniu do GC. Najprawdopodobniej z uwagi na tę dysproporcję, w zastosowanych warunkach eksperymentalnych (37°C) nie dochodziło do utworzenia stabilnego dupleksu AL-16-1•pre-mir-16-1. W tym kontekście zastanawiające okazały się jednak wyniki

serii eksperymentów z udziałem analogu 2'-*O*-metylo AL-16-1 (2OMeAL-16-1). Mimo że wprowadzone modyfikacje znacząco podwyższyły teoretyczną wartość  $T_m$  dupleksu 2OMeAL-16-1•pre-mir-16-1 (47,4°C) w porównaniu do AL-16-1•pre-mir-16-1 (35,3°C), nie zaobserwowano znaczących różnic w zdolności 12-merów do wiązania pre-mir-16-1 (por. Rys. 4.16. i Rys. 4.18. C) lub hamowania procesu powstawania miRNA (por. Rys. 4.15. i Rys. 4.17.). Otrzymane wyniki sugerują, że projektując 12-mer mający oddziaływać z pre-miRNA, nie można brać pod uwagę jedynie parametrów termodynamicznych poszczególnych cząsteczek i tworzonych przez nie dupleksów. Wniosek ten znalazł swoje potwierdzenie w badaniach z udziałem alternatywnego oligomeru, 2OMeAL-16-1\_2. On również jest komplementarny do części apikalnej pre-mir-16-1, jednak w porównaniu do 2OMeAL-16-1, oddziałuje z rejonem bogatszym w GC. Miejsca hybrydyzacji dla 2OMeAL-16-1 i 2OMeAL-16-1\_2 różniły się nie tylko sekwencją nukleotydową, ale również organizacją przestrzenną łańcucha oligorybonukleotydowego (Rys. 4.19. A). Oba miejsca obejmowały krótki, 4-nt rejon heliakalny oraz fragmenty o strukturze jednoniciowej, które z założenia są łatwiej dostępne do oddziaływania z innymi cząsteczkami kwasów nukleinowych niż fragmenty dwuniciowe. Miejsce hybrydyzacji dla 2OMeAL-16-1 zawierało jeden rejon jednoniciowy (na końcu 3'), podczas gdy w przypadku 2OMeAL-16-1\_2 zarówno koniec 5', jak i 3' oddziaływały z fragmentami jednoniciowych pętli (odpowiednio: bocznej i apikalnej). Badanie oddziaływań RNA•RNA przeprowadzone z wykorzystaniem testu EMSA wykazało, że 2OMeAL-16-1\_2 wiązał się do pre-mir-16-1 znacznie wydajniej niż 2OMeAL-16-1 (Rys. 4.19. B). Co więcej, znalazło to swoje odzwierciedlenie w efektywności działania 12-merów; 2OMeAL-16-1\_2 okazał się lepszym inhibitorem powstawania miR-16-1 niż 2OMeAL-16-1 (Rys. 4.19. C). Wyniki uzyskane dla 2OMeAL-16-1 oraz 2OMeAL-16-1\_2 pozwalają stwierdzić, że oprócz siły oddziaływania inhibitora z pre-miRNA, również dostępność miejsca hybrydyzacji, a więc struktura cząsteczki docelowej, może być czynnikiem decydującym o efektywności inhibitorowej oligomeru.

Powyższe obserwacje są spójne z wnioskami płynącymi z innych badań poświęconych kinetyce tworzenia się heterodupleksów RNA. Wykazano, że w przypadku hybrydyzacji krótkich, antysensowych oligomerów do dłuższych, ustrukturyzowanych RNA powinowactwo komplementarnych cząsteczek nie może być



wytłumaczone jedynie parametrami termodynamicznymi wynikającymi z długości i sekwencji oddziałujących RNA czy różnicami wartości energii swobodnej dupleksu i cząsteczek składowych [445, 489, 490]. Warunkiem koniecznym dla zainicjowania tworzenia się dupleksu jest brak zaważ sterycznych w tzw. miejscu nukleacji, czyli rejonie łańcucha kwasu nukleinowego, gdzie tworzone są pierwsze wiązania wodorowe (tzw. oddziaływania inicjatorowe) pomiędzy zasadami azotowymi oddziałujących cząsteczek [490]. Istotna jest również trwałość termodynamiczna oddziaływań inicjatorowych, która decyduje o tym, czy dojdzie do propagacji dupleksu [490]. W przypadku 2OMeAL-16-1\_2 potencjalnym miejscem nukleacji spełniającym powyższe warunki wydaje się ciąg GCG we wspomnianej wcześniej pętli bocznej pre-mir-16-1. Kinetyka procesu hybrydyzacji komplementarnych lub częściowo komplementarnych nici kwasów nukleinowych wymaga analizy wielu czynników, szczególnie w sytuacji, gdy przynajmniej jedna z oddziałujących cząsteczek jest silnie ustrukturyzowana [491]. Złożoność tego zagadnienia ilustruje fakt występowania znaczących różnic pomiędzy wartościami  $K_d$  wyznaczonymi dla antysensowych oligomerów tej samej długości, których miejsca hybrydyzacji do komplementarnego RNA są przesunięte względem siebie zaledwie o jeden nukleotyd [445, 490, 491]. Postuluje się, że za efekt ten odpowiada drugo- i trzeciorzędowa struktura RNA, w szczególności organizacja przestrzenna miejsca hybrydyzacji i współosiowe oddziaływania warstwowe.

Należy również zauważyć, że w środowisku komórkowym zarówno struktura, jak i proces hybrydyzacji komplementarnych cząsteczek RNA podlegają wpływom różnorodnych białek. Specyficzne helikazy czy białka opiekuńcze (ang. *chaperons*) mogą wspierać proces tworzenia się dupleksów, np.: poprzez reorganizację struktury cząsteczek czy fizyczne zbliżenie dwóch nici kwasów nukleinowych w przestrzeni, tzw. stłoczenie molekularne (ang. *molecular crowding*) [492, 493]. Białka tego typu mogą również utrudniać hybrydyzację kwasów nukleinowych poprzez sekwestrację cząsteczek, ekranowanie rejonów komplementarnych czy stabilizację natywnej struktury prekursorów. Obecnie znanych jest szereg białek wiążących się do części apikalnej pre-miRNA (Tabela 1.2.). Potencjalnie, mogą one konkurować z endogennymi RNA czy egzogennymi oligomerami o miejsce oddziaływania w obrębie prekursora. Co więcej, wśród czynników zaangażowanych w biogenezę miRNA znajdują się białka o aktywnościach opiekuńczych. Należy do nich np.

rybonukleoproteina hnRNP A1, która tworzy kompleksy z heterogennymi jądrowymi RNA i bierze udział w alternatywnym składaniu, metabolizmie oraz transporcie mRNA [494-496]. Wykazano również, że hnRNP A1 może oddziaływać z rejonem apikalnym niektórych pri-miRNA [216, 221, 222, 229] i pre-miRNA [497], wpływać na strukturę tych cząsteczek, a w konsekwencji, na ich cięcie przez kompleks Mikroprocesora i Dicer. W badaniach *in vitro* Roose i wsp. wykazali, że 13- i 14-nt oligomery komplementarne do pętli apikalnej pre-let-7a-2 nie hamowały oddziaływania hnRNP A1 z prekursorem, mimo że wydajnie blokowały wiązanie się w tym rejonie Lin28A, białka wykazującego wyższe niż hnRNP A1 powinowactwo do pre-let-7a-2 [445]. Autorzy przytoczonej pracy postulowali, że brak konkurencji pomiędzy testowanymi oligomerami a hnRNP A1 najprawdopodobniej wynika z faktu, że ich miejsca wiązania nie pokrywały się ze sobą. Zastosowane podejście badawcze nie pozwalało jednak jednoznacznie stwierdzić, czy dochodziło do jednoczesnego wiązania się do pętli apikalnej pre-let-7a-2 obu czynników, tj. testowanego oligomeru i białka. W przytoczonych badaniach, wykorzystując test immunoenzymatyczny (ELISA, ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), oznaczano jedynie poziom hnRNP A1 związanej do pre-let-7a-2 po inkubacji z utworzonymi wcześniej dupleksami oligomer • pre-let-7a-2. Nie monitorowano jednak poziomu wolnego oligomeru, stąd, nie można wykluczyć, że w wyniku przyłączenia hnRNP A1 następowała dysocjacja kompleksu oligomer • pre-let-7a-2 lub też, że dochodziło do aktywnego wypierania testowanego oligomeru przez białko.

W przypadku mechanizmów inhibicji zakładających oddziaływanie dwóch komplementarnych cząsteczek RNA (oligomeru-inhibitora i pre-miRNA), oprócz parametrów charakteryzujących szybkość powstawania i stabilność tworzonych heterodupleksów, kluczowe znaczenie mają również specyficzność i selektywność funkcjonowania inhibitorów. Z uwagi na fakt, że ssRNA krótsze niż ~20 nt nie są wydajnie wiązane przez Dicer (Rys. 4.4., Rys. 4.22.), można przyjąć, że inhibicja cięcia pre-miRNA przez Dicer w reakcjach z udziałem testowanych 12-merów (AL) wynika z oddziaływania tych ostatnich z substratami enzymu, a więc jest podyktowana komplementarnością sekwencji łańcuchów oligorybonukleotydowych. Na tej podstawie można mówić o specyficzności działania badanych 12-merów, rozumianej jako wywieranie efektu poprzez zdefiniowany mechanizm, w tym przypadku: oddziaływanie inhibitora z pre-miRNA. Jedynie dla AL-210 wykazano, że oligomer ten może wpływać

na proces powstawania miRNA nie tylko poprzez hybrydyzację do komplementarnego rejonu pre-miRNA, ale również poprzez wiązanie się do Dicer (Rys. 4.22.). Przyczyny i implikacje tego faktu zostaną przedyskutowane w dalszej części rozdziału.

Selektywność badanych 12-merów, tj. kwestia ich hybrydyzacji nie tylko do komplementarnych pre-miRNA, ale również do częściowo lub całkowicie komplementarnych rejonów innych endogennych RNA, stanowi złożony problem. Nadrzędną kwestią w tym przypadku wydają się: długość i skład nukleotydowy, ponieważ to one warunkują potencjał hybrydyzacji komplementarnych nici kwasów nukleinowych. Zakładając, że w przeciętnej komórce eukariotycznej występuje  $\sim 1,2 \times 10^4$  transkryptów o średniej długości  $2 \times 10^3$  nt, losowa sekwencja o długości 12 nt ma szansę pojawić się w niej dwukrotnie<sup>2</sup> [498]. Co więcej, analizując pulę wszystkich znanych do tej pory ludzkich pre-miRNA (1881 cząsteczek, każda o długości  $\sim 60$  nt) można zauważyć, że (potencjalnie) najkrótsza unikatowa sekwencja w tym zbiorze ma długość zaledwie 9 nt<sup>3</sup>. W oparciu o te szacunki można przypuszczać, że 12-nt oligomery mogą być wystarczająco selektywne, nawet działając w złożonym środowisku komórkowym, by hamować cięcie wybranych pre-miRNA i nie oddziaływać z innymi endogennymi RNA. Ta hipoteza opiera się na założeniu, że do hybrydyzacji dochodzi jedynie w sytuacji pełnej komplementarności, co jest znacznym uproszczeniem, niemniej, dostępne dane literaturowe wskazują, że w komórkach człowieka akumulowane są stabilne i funkcjonalne degradanty długości kilkunastu nukleotydów, w tym, wspomniane już 12-nt semi-miRNA [470]. Dowiedziono również, że *in vivo* możliwe jest wykorzystanie oligomerów o długości  $\leq 15$  nt jako selektywne narzędzia do regulacji biogenezy miRNA [499-501]. Co więcej, niejednokrotnie, krótsze cząsteczki wykazują wyższe powinowactwo i zwiększoną efektywność działania w porównaniu do dłuższych oligomerów, co może wynikać z faktu, że wydłużanie łańcucha oligonukleotydowego zwiększa prawdopodobieństwo

<sup>2</sup> Losowa sekwencja o długości  $N$  nt pojawia się w danej puli określoną liczbę razy ( $x$ ), wyrażoną jako iloraz złożoności danego zbioru sekwencji i  $4^N$ , gdzie złożoność to iloczyn liczby cząsteczek i ich średniej długości. W podanym przykładzie złożoność puli mRNA to  $\sim 2,4 \times 10^7$  nt, chcąc więc obliczyć, ile razy losowa sekwencja o długości 12 nt ma szansę pojawić się w tym zbiorze, należy rozwiązać równanie:  $\frac{2,4 \times 10^7}{4^{12}} = x$ .

<sup>3</sup> Złożoność puli pre-miRNA to  $\sim 11,3 \times 10^4$  nt, aby obliczyć długość sekwencji unikatowej należy rozwiązać równanie:  $\frac{11,3 \times 10^4}{4^N} = 1$ , co sprowadza się do obliczenia logarytmu:  $\log_4 11,3 \times 10^4$ .

tworzenia się w obrębie cząsteczek stabilnych struktur drugorzędowych oraz ułatwia hybrydyzację do częściowo komplementarnych RNA [445, 500, 502].

Najbardziej obiecującym przykładem zastosowania krótkiego antysensowego oligomeru do selektywnej regulacji biogenezy i funkcjonowania miRNA jest miravirsen – eksperymentalny lek wykorzystywany w terapii zakażeń wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*). Miravirsen to 15-mer komplementarny do miR-122-5p, zbudowany z tiofosforanowych analogów nukleotydów DNA i LNA [503]. Specyficzny dla hepatocytów miR-122-5p zaangażowany jest między innymi w regulację metabolizmu cholesterolu [504] czy utrzymanie homeostazy żelaza [505]. Oprócz tego, jest on również niezbędny do replikacji HCV [506, 507]. U pacjentów z chroniczną infekcją HCV, terapia miravirsenem skutecznie obniża poziom RNA wirusa, nawet do wartości niewykrywalnych [499]. Wykazano, że oprócz działania typowego dla oligomerów antysensowych (sekwestracja funkcjonalnego miR-122-5p), miravirsen jest zdolny również do oddziaływania z cząsteczkami prekursorowymi tego miRNA (zarówno pri-mir-122, jak i pre-mir-122), przez co uniemożliwia ich cięcie przez Drosha i Dicer [500]. Co więcej, wykazano, że dwa inne 15-mery LNA komplementarne do trzonu spinki prekursorów były zdolne zaburzyć dwuniciową strukturę tego regionu i efektywnie hamować powstawanie miR-122 [500]. Podobny efekt zaobserwowano dla 10-meru PNA (kwas peptydonukleinowy, ang. *peptide nucleic acid*) komplementarnego do sekwencji miR-210-5p, który poprzez oddziaływanie z pre-mir-210 zaburzał strukturę prekursora, uniemożliwiając jego cięcie przez Dicer *in vitro*, w hodowlach ludzkich komórek erytroleukemicznych K562 [501].

Model podobny do przedstawionego w niniejszej rozprawie został opisany dla dwóch innych układów: pri-miRNA – Drosha [216] oraz pre-miRNA – Lin28 [445]. W kontekście prezentowanych badań, szczególnie interesujący wydaje się ostatni przypadek, ponieważ dotyczy tego samego etapu dojrzewania miRNA – cięcia pre-miRNA przez Dicer. Obie izoformy Lin28 zidentyfikowane u człowieka – Lin28A i Lin28B – wpływają negatywnie na biogenezę miRNA z rodziny let-7 [219, 220, 372, 373, 375], jednak wywierają ten efekt za pomocą odmiennych mechanizmów [374]; Lin28A jest znanym antagonistą Dicer, sekwestruje pre-let-7 w cytoplazmie i przyczynia się do jego poliurydylacji, a w konsekwencji do degradacji przez egz nukleazy, podczas gdy Lin28B występuje w jądrze, gdzie oddziałuje z pri-let-7,

blokując możliwość jego związania przez kompleks Mikroprocesora. W obu przypadkach Lin28 oddziałuje z pętlą apikalną odpowiedniego prekursora [219, 508, 509]. Roos i wsp. wykazali, że 13-nt oligomer 2'O-metylo-RNA komplementarny do sekwencji w rejonie apikalnym pre-let-7a-2 rozpoznawanej przez Lin28A był w stanie hamować oddziaływanie tego białka z prekursorem. W konsekwencji obserwowano zniesienie inhibicji wywieranej przez Lin28A i podwyższenie poziomu funkcjonalnego let-7a-2 w komórkach. Przedstawione w przytoczonej pracy wyniki badań ilościowych przeprowadzonych na materiale uzyskanym z komórek transfekowanych testowanym oligomerem wykazały znaczący przyrost poziomu let-7a-2, co wskazuje nie tylko na inhibicję aktywności Lin28A, ale również na brak inhibicji endogennej Dicer. Niemniej jednak wyniki uzyskane metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej z odwróconym układem faz (RP-HPLC, ang. *Reversed-phase high-performance liquid chromatography*), którą wykorzystano do badania produktów cięcia pre-let-7a-2 przez rekombinowaną Dicer, wskazują na hamowanie aktywności rybonukleazy w reakcjach z testowanym 13-merem *in vitro*. Wyniki tych badań są zatem spójne z wynikami uzyskanymi dla czterech cząsteczek AL (AL-16-1\_2, AL-21, AL-33a, AL-210). Jak wykazano, analogii 2'O-metylo testowanych 12-merów wydajnie hamowały cięcie pre-miRNA zarówno w reakcjach z rekombinowaną Dicer, jak i z preparatem komórkowych. Co więcej, na podstawie danych uzyskanych przez Roos i wsp. nie można stwierdzić, czy w środowisku komórkowym Dicer wiązała i cięła heterodupleks pre-let-7a-2 i testowanego 13-meru, czy być może najpierw dochodziło do wyparcia oligomeru przez Dicer lub inne białka wspierające oddziaływanie Dicer z pre-miRNA, np. TRBP. Ponadto, z uwagi na fakt, że przytoczone badania skupiały się na prekursorze jednego miRNA (let-7a-2), nie można jednoznacznie stwierdzić, czy ilustrują one generalny mechanizm działania tego typu oligomerów w komórce oraz ich relację z Dicer.

Niewątpliwie konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań *in cellulo* z udziałem szerszej grupy oligomerów i pre-miRNA. Zaprezentowane wyniki pokazują jednak potencjał krótkich oligomerów komplementarnych do rejonu apikalnego pre-miRNA do funkcjonowania jako czynniki zaburzające oddziaływanie prekursorów miRNA z białkami zaangażowanymi w ich specyficzne cięcie. Podejście przedstawione na przykładzie czterech 12-merów AL otwiera pole do opracowania nowych narzędzi umożliwiających badanie funkcji poszczególnych miRNA, w tym miRNA należących

do tej samej rodziny, a więc wykazujących wysoki stopień homologii i posiadających identyczną sekwencję „seed”, ale różniących się sekwencją rejonu apikalnego prekursorów. Stosowane obecnie techniki wykorzystujące antysensowe oligomery komplementarne do sekwencji dojrzałych miRNA nie zawsze pozwalają na rozróżnienie miRNA należących do tej samej rodziny, co może prowadzić do błędnych wniosków na temat roli poszczególnych miRNA. Należy również zauważyć, że w przypadku krótkich oligomerów komplementarnych do rejonu apikalnego pre-miRNA, istnieje możliwość ich modyfikacji chemicznej pod kątem optymalizacji parametrów kinetycznych i termodynamicznych. Określone modyfikacje struktury chemicznej oligonukleotydów, wprowadzone w obrębie wiązania internukleotydowego, heterocyklicznej zasady czy jednostki cukrowej, mogą zwiększać selektywność wykazywaną podczas hybrydyzacji oraz trwałość termodynamiczną tworzonych dupleksów [510, 511]. W przypadku innych narzędzi oligorybonukleotydowych, jak siRNA czy dsRNA imitujących dupleks miRNA, z uwagi na mechanizm działania, wymagający ich interakcji z określonymi kompleksami białkowymi, zakres tego typu modyfikacji jest znacznie ograniczony [512]. Co więcej, wykazano, że modyfikowane oligomery o długości  $\leq 16$  nt mogą być dostarczane do wnętrza komórek bez nośników standardowo wykorzystywanych do transfekcji, co znacząco obniża ryzyko wystąpienia cytotoksyczności czy nieswoistych efektów biologicznych [502, 513, 514].

Omawiając problem specyficzności działania zaprojektowanych 12-merów, wspomniano, że wyniki otrzymane dla AL-210 znacząco różniły się od uzyskanych dla pozostałych testowanych inhibitorów. Przeprowadzone badania wykazały, że analog 2'-*O*-metylo AL-210 wydajnie hamował cięcie przez Dicer nie tylko pre-mir-210, ale również trzech pozostałych testowanych prekursorów: pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a (Rys. 4.21.). Wyniki testów EMSA (Rys. 4.23.) sprawdzających możliwość oddziaływania AL-210 z badanymi prekursorami nie wykazały tworzenia się dupleksu AL-210 • pre-mir-33a, nie potwierdziły również, przewidywanych *in silico* (Załącznik 7.), oddziaływań z pre-mir-16-1 i pre-mir-21. Na tej podstawie wykluczono, by za obserwowaną inhibicję odpowiadała, wynikająca z częściowej komplementarności sekwencji, hybrydyzacja AL-210 do wymienionych prekursorów. Co więcej, testy EMSA z udziałem Dicer wykazały, że AL-210 jako jedyny 12-mer tworzył stabilny kompleks z enzymem (Rys. 4.22.), co dodatkowo wspiera hipotezę, że hamowanie przez AL-210 powstawania miR-16-1, miR-21 i miR-33a może wynikać

z interakcji 12-meru z białkiem, nie z prekursorami. W tym kontekście zastanawia jednak fakt, w jakiej formie AL-210 jest rozpoznawany i wiązany przez białko, skoro, jak już podkreślano, RNA krótsze niż ~20 nt nie tworzą wydajnych kompleksów z Dicer.

Przewidywania *in silico* wykazały, że testowane sekwencje 12-merów charakteryzują się częściową samokomplementarnością sekwencji, co może sprzyjać tworzeniu przez nie dimerów (Załącznik 8.). Obserwacje migracji RNA w żelach PAA w warunkach natywnych potwierdziły, że AL-33a w przyjętych warunkach reakcyjnych wykazywał tendencję do dimeryzacji, a efekt ten był zależny od stężenia oligomeru (Rys. 4.24.). Jednocześnie stwierdzono, że AL-210 występuje w formach, które poddane rozdzielowi elektroforetycznemu migrowały znacznie wolniej niż potencjalne dimery tego oligomeru, co wskazuje, że przyjmują one struktury wyższego rzędu. Porównanie sekwencji nukleotydowych testowanych 12-merów wykazało stosunkowo wysoką zawartość guaniny w cząsteczce AL-210 (Rys. 4.25.). Co więcej, nierównomierne rozmieszczenie nukleotydów guanozynowych w strukturze tego oligomeru (ciąg GGGG na końcu 5') zrodziło przypuszczenie, że AL-210 może występować w formie G-kwadrupleksu. Dalsze analizy, w szczególności, barwienie RNA z wykorzystaniem roztworu *N*-metylomezoporfiryny IX potwierdziło, że wspomniane wcześniej struktury wyższego rzędu tworzone przez AL-210 to struktury G-kwadrupleksu. Zastosowane techniki badawcze nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, w jakiej formie – jednoniciowej, dimeru czy G-kwadrupleksu – AL-210 jest wiązany przez Dicer. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, w tym: brak wiązania przez Dicer zarówno 12-merów występujących w formie jednoniciowej, tj. AL-16-1 i AL-21, jak również brak oddziaływania z AL-33a, który wykazuje tendencję do dimeryzacji oraz posiada sekwencję stosunkowo bogatą w G, zasadnym wydaje się stwierdzenie, że formowanie się kompleksów AL-210 z Dicer wynika z faktu, że oligomer ten przyjmuje strukturę G-kwadrupleksu.

G-kwadrupleksy to rodzaj niekanonicznej struktury drugorzędowej tworzonej przez cząsteczki kwasów nukleinowych bogatych w reszty guanozynowe. Charakterystycznym elementem tych struktur są tzw. kwartery G – planarnie zorganizowane cztery reszty guanozynowe połączone wiązaniami Hoogsteena, przy czym każda zasada kwartetu jest jednocześnie biorcą i dawcą dwóch wiązań

wodorowych. Pojedynczy kwartet stabilizowany jest przez centralnie związany jon jednowartościowy (najczęściej  $K^+$ ), który oddziałuje z ujemnie naładowanymi atomami tlenu grup karbonylowych reszt guaninowych. G-kwadrupleksy wykazują zróżnicowaną topologię w zależności od: sekwencji nukleotydowej oraz liczby kwartetów G, rodzaju kationu zaangażowanego w stabilizowanie struktury ( $K^+$  lub  $Na^+$ ), konformacji wiązania glikozydowego (*syn* lub *anty*), liczby nici kwasu nukleinowego zaangażowanych w tworzenie struktury (kwadrupleksy wewnątrzcząsteczkowe, dwucząsteczkowe, czterocząsteczkowe), orientacji nici względem siebie (kwadrupleksy równoległe lub antyrównoległe) [458].

Wyniki badań prowadzonych w ostatniej dekadzie coraz wyraźniej wskazują na rolę regulatorową, jaką G-kwadrupleksy RNA odgrywają w procesie ekspresji genów. Wykazano ich zaangażowanie między innymi w: transkrypcję [515], transportu wewnątrzkomórkowy [516-519] i modyfikacje potranskrypcyjne mRNA (alternatywną poliadenylację [520], modyfikacje końca 3' [521-523], alternatywne składanie mRNA [524-528]), a także w biosyntezę białka [529-538]. Nieliczne doniesienia wskazują również na znaczenie struktury G-kwadrupleksów dla biogenezy [539] i funkcjonowania miRNA [540]. Na podstawie wyników analiz *in silico* genomu człowieka postuluje się, że transkrypcja niektórych genów miRNA może podlegać regulacji przez motywy G-kwadrupleksowe zlokalizowane w promotorach tych genów [539] lub w bliskim sąsiedztwie sekwencji kodującej [541]. Struktury G-kwadrupleksów zidentyfikowano również w obrębie cząsteczek prekursorowych miRNA. Wykazano, że w wysokim stężeniu jonów  $K^+$  [360, 542, 543] lub po przyłączeniu związków niskocząsteczkowych stabilizujących G-kwadrupleksy, np. pochodnych bischinolinowych albo tetraazaporfirynowych [544] może dochodzić do zmiany przestrzennego ułożenia łańcucha oligorybonukleotydowego pre-miRNA bogatych w G i przyjęcia przez te prekursora struktury G-kwadrupleksów. Konsekwencją tych rearanżacji jest zahamowanie cięcia pre-miRNA przez Dicer, co potwierdzono *in vitro* w badaniach prowadzonych w hodowlach komórek eukariotycznych [360, 543, 544]. Wyniki analizy sekwencji znanych pre-miRNA wskazują, że ~16% ludzkich pre-miRNA posiada sekwencje bogate w G, co potencjalnie umożliwia tym cząsteczkom przyjmowanie w komórce alternatywnych struktur drugorzędowych. Co więcej, wykazano, że podanie do komórek TmPyP<sub>3</sub>, pochodnej porfirynowej selektywnie destabilizującej G-kwadrupleksy RNA, skutkuje



podwyższeniem poziomów miRNA, których prekursorzy mają potencjał do przyjmowania struktur G-kwadrupleksów, natomiast pozostaje bez wpływu na poziomy innych miRNA [543]. W tym kontekście postuluje się, że przejścia pomiędzy strukturą typu spinki a strukturą G-kwadrupleksu, wspierane bezpośrednią aktywnością określonych białek czy wywoływane zmianą stężenia jonów, mogą reprezentować kolejny funkcjonujący w komórkach mechanizm regulacji biogenezy miRNA [360].

Autorzy przytoczonych prac monitorowali poziom miRNA, a więc skupiali się jedynie na aktywności rybonukleazowej Dicer, nie analizowali natomiast zdolności enzymu do wiązania G-kwadrupleksów. Wyniki uzyskane dla AL-210/2OMeAL-210 wskazują, że RNA o strukturze G-kwadrupleksu może oddziaływać z Dicer i inhibować jej aktywność, prowadząc do spadku poziomu miRNA generowanych przez enzym. Wnioski płynące z badań z AL-210/2OMeAL-210 zostały następnie potwierdzone w badaniach z udziałem sześciu referencyjnych oligomerów RNA o scharakteryzowanej strukturze G-kwadrupleksów (Załącznik 9.). Wybrane do badań oligomery odpowiadają fragmentom RNA telomerowego (TERRA) człowieka [545-547] i *Oxytricha nova* (słodkowodny pierwotniak należący do orzęsków) [548]. TERRA to długie niekodujące transkrypty DNA telomerowego (o sekwencji UUAGGG<sub>n</sub> u ssaków) odgrywające rolę między innymi w regulacji aktywności telomerazy i formowaniu się heterochromatyny na końcach chromosomów [549]. W toku podjętych badań wykazano, że wszystkie sześć referencyjnych G-kwadrupleksów hamowało powstawanie miRNA w reakcjach z rekombinowaną Dicer, a stopień inhibicji był zależny od stężenia oligomeru (Rys. 4.29.). Zasadniczo wykluczono, by testowane oligomery przyjmujące strukturę G-kwadrupleksów oddziaływały z pre-miRNA użytymi w badaniach; jedynie w przypadku pre-mir-210, którego sekwencja jest bogata w C, na podstawie wyników rozdziału elektroforetycznego stwierdzono możliwość oddziaływania z oligomerami odpowiadającymi fragmentom ludzkiego TERRA. W związku z powyższym można sądzić, że za obserwowany efekt inhibicji powstawania miRNA w reakcjach z testowanymi G-kwadrupleksami odpowiadało bezpośrednie oddziaływanie tych ostatnich z Dicer. Wniosek ten wspierają również wyniki testów EMSA z udziałem dwóch najkrótszych oligomerów (10-nt i 12-nt), potwierdzające zdolność tych RNA do tworzenia kompleksów z Dicer (Rys. 4.30.). Zastosowane metody badawcze nie pozwalają jednak stwierdzić, czy cząsteczki związane przez Dicer pozostają w formie G-kwadrupleksów. Wydaje się to jednak prawdopodobne z uwagi na wyniki

wcześniejszych badań, w których wykazano, że Dicer nie oddziałuje wydajnie z ssRNA o długości  $\leq 20$  nt. Ponadto potwierdzono, że wybrane do analiz oligomery, w stosowanym w reakcjach z Dicer buforze, przyjmują strukturę G-kwadrupleksów. Niemniej, konieczne są dalsze badania, które pozwolą ustalić szczegóły mechanizmu inhibicji aktywności Dicer przez G-kwadrupleksy oraz uzyskać odpowiedź na pytanie, czy zaobserwowana *in vitro* interakcja występuje również w żywych komórkach.

Sekwestracja Dicer przez RNA o strukturze G-kwadrupleksów mogłaby zmniejszać pulę aktywnego białka w cytoplazmie i spowalniać biogenezę miRNA. Ponadto, biorąc pod uwagę funkcje regulatorowe G-kwadrupleksów formowanych w obrębie mRNA, struktury te mogłyby pełnić rolę swego rodzaju znaczników wyróżniających określone transkrypty i/lub ułatwiających tworzenie się kompleksów efektorowych Dicer w zatłoczonym środowisku komórki [550]. Na korzyść tej hipotezy przemawia również fakt, że warunki panujące w cytoplazmie, w szczególności stłoczenie molekularne, sprzyjają tworzeniu się niekanonicznych struktur kwasów nukleinowych, w tym G-kwadrupleksów oraz indukują przejścia strukturalne pomiędzy alternatywnymi typami G-kwadrupleksów czy dupleksami a strukturami wyższego rzędu [551]. Znaczenie potencjalnych oddziaływań Dicer z G-kwadrupleksami *in vivo* pozostaje kwestią spekulacji, niemniej, zaprezentowane powyżej mechanizmy, tj. obniżenie poziomu aktywnego białka, wyróżnianie określonych cząsteczek z puli RNA obecnych w komórce, ułatwianie organizacji w przestrzeni kompleksów rybonukleoproteinowych, opisano już dla innych białek wiążących G-kwadrupleksy, w tym dla czynników zaangażowanych w szlak biogenezy miRNA: FMRP [540, 552-554] i hnRNP A1 [555-558] i TDP-43 [517].

Liczne badania potwierdzają, że struktury G-kwadrupleksów funkcjonują jako znaczniki lokalizacji wewnątrzkomórkowej transkryptów neuronalnych, umożliwiające ich transport przez TDP-43 i FMRP [516, 517, 519, 540, 552, 559]. Z uwagi na silną polaryzację budowy neuronów ich wzrost i różnicowanie, a także prawidłowe funkcjonowanie zależą od długodystansowego transportu i lokalnej translacji szeregu mRNA [560, 561]. Wykazano, że wiązanie przez FMRP i TDP-43 G-kwadrupleksów tworzących się w obrębie mRNA ma istotne znaczenie dla fizjologii mózgu i rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Co więcej, sekwestracja TDP-43 przez RNA

o strukturze G-kwadrupleksów pojawiające się w następstwie ekspansji powtórzeń GGGGCC jest jedną z przyczyn rozwoju między innymi stwardnienia zanikowego bocznego [517]. W tym miejscu warto również zauważyć, że podobny mechanizm sekwestracji opisano dla Drosha i DGCR8 [562]. Wykazano, że wiązanie obu białek przez RNA zawierający wydłużone ciągi trójnukleotydowych powtórzeń CGG, prowadzi do zaburzenia poziomów miRNA i leży u podstaw rozwoju zespołu drżenia i ataksji związanych z kruchym chromosomem X (ang. *fragile X-associated tremor/ataxia syndrome – FXTAS*) [562]. Spinki RNA tworzone przez ciągi powtórzeń CGG są rozpoznawane i cięte przez Dicer *in vitro* [563]. Niemniej, zdolność Dicer do oddziaływania z ciągami powtórzeń przyjmującymi strukturę G-kwadrupleksów nie została do tej pory zbadana.

Inne badania z obszaru neurobiologii, dotyczące molekularnych podstaw długotrwałej plastyczności synaptycznej warunkującej zapamiętywanie i uczenie się, sugerują, że regulacja syntezy białek synaptycznych w odpowiedzi na aktywację receptorów neurotransmiterów może być zależna od wzajemnego oddziaływania RISC, FMRP i G-kwadrupleksów tworzących się w obrębie odpowiednich transkryptów. W szczególności wykazano, że synteza PSD-95 (białko gęstości postsynaptycznej<sup>4</sup>, ang. *postsynaptic density protein*) – jednej z neuronalnych kinaz guanylanowych, podlega regulacji zarówno przez miR-125a jak i FMRP, a fosforylacja FMRP jest warunkiem koniecznym do rekrutacji do 3'UTR mRNA *PSD-95* kompleksu RISC [559]. Wykazano również, że rejon rozpoznawany przez miR-125a przyjmuje alternatywne struktury G-kwadrupleksów, przy czym tylko jedna z nich umożliwia hybrydyzację miRNA. Postuluje się, że FMRP poprzez oddziaływanie z G-kwadrupleksami, które powstają w obrębie wspomnianego transkryptu, stabilizuje struktury pozwalające na przyłączenie miR-125a, a jednocześnie rekrutuje RISC i umożliwia formowanie się kompleksów wyciszających w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji komplementarnej do miRNA [540].

Podsumowując, przedstawione w tym rozdziale informacje ilustrują złożoność zagadnienia funkcjonowania RNA jako czynnika *trans*-regulatorowego wpływającego na aktywność Dicer i powstawanie miRNA. Zebrane dane pozwalają na podział mechanizmów, za pomocą których krótkie RNA regulują proces generowania miRNA

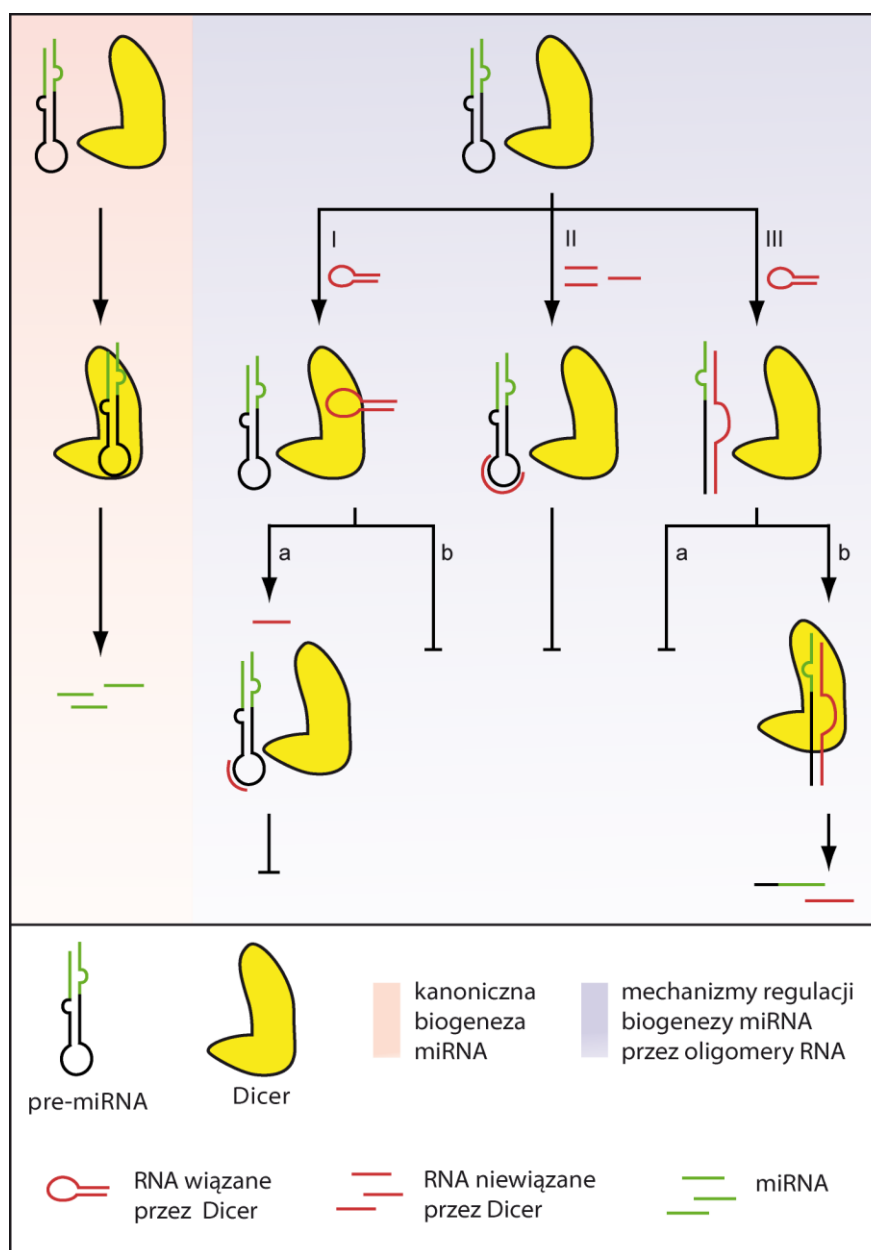
---

<sup>4</sup> Sieć białek przyłączona do membrany synapsy wzbudzającej.

na dwie kategorie: (i) hamowanie aktywności Dicer w wyniku bezpośredniego oddziaływania oligomerów z enzymem (kompetytor pre-miRNA), (ii) inhibicja cięcia pre-miRNA przez Dicer w następstwie hybrydyzacji oligomeru do prekursora (Rys. 5.1.). Do grupy oligomerów funkcjonujących według pierwszego modelu zaliczyć można szereg wyselekcjonowanych wcześniej aptamerów wiążących Dicer [436]. Mimo że pod względem długości i struktury drugorzędowej cząsteczki te stanowiły homogenną grupę oligomerów (~56-nt ssRNA przyjmujące strukturę typu spinki), wykazywały one odmienny potencjał do hamowania aktywności Dicer, przede wszystkim ze względu na zróżnicowane powinowactwo do enzymu. W tej grupie regulatorów można dokonać dalszego podziału na dwa typy kompetytorów: oligomery, które stanowią substrat dla enzymu oraz oligomery, które, choć wiązane przez enzymu, nie podlegają cięciu (Rys. 5.1. *Ia*, *Ib* – odpowiednio). Oddzielną grupę regulatorów stanowią oligomery, które wpływają na powstawanie miRNA poprzez zaburzanie natywnej struktury prekursorów. Model ten zakłada komplementarność sekwencji oligomeru i prekursora zapewniającą ich wzajemne oddziaływanie. Powstający w efekcie dupleks oligomer • pre-miRNA nie jest rozpoznawany i cięty przez Dicer (Rys. 5.1. *II* i *IIIa*) lub, jeśli dochodzi do cięcia, jego wzór jest zmieniony w porównaniu do wzoru cięcia natywnego pre-miRNA (Rys. 5.1. *IIIb*, Załącznik 10.). Należy zauważyć, że mechanizm zaprezentowany na Rys. 5.1. w części *II* zakłada, że oligomery są zbyt krótkie, by były efektywnie wiązane przez Dicer, są jednocześnie wystarczająco długie, by selektywnie i wydajnie oddziaływać z dostępnymi do hybrydyzacji jednoniciowymi rejonami pre-miRNA i uniemożliwiać cięcie tych prekursorów przez Dicer. Przykładem tego typu inhibitorów są zaprezentowane w pracy 12-mery komplementarne do rejonu apikalnego: pre-mir-16-1, pre-mir-21 i pre-mir-33a. Co ciekawe, zidentyfikowano również oligomery, które mogły funkcjonować według jednego lub drugiego modelu. W związku z tym nazwano je inhibitorami dwufunkcyjnymi, zdolnymi do wiązania z Dicer oraz hybrydyzacji do komplementarnych pre-miRNA. W tej grupie znalazły się 56-nt aptamery: ATD\_15.52 oraz ATD\_13.6, a także: 29-nt PCDH21\_fr i 35-nt THAP4\_fr. Do inhibitorów dwufunkcyjnych należy również zaklasyfikować AL-210, który poprzez oddziaływanie z rejonem apikalnym pre-mir-210 blokuje generowanie miR-210 w reakcjach z Dicer, jednocześnie jednak jest zdolny do wiązania się do białka, a oddziaływanie to najprawdopodobniej warunkowane jest przyjęciem przez AL-210 struktury

G-kwadruleksu. Badania przeprowadzone z udziałem szeregu reprezentatywnych G-kwadruleksów RNA wykazały, że testowane oligomery są w stanie wydajnie hamować powstawanie miRNA w reakcjach z Dicer *in vitro*. Na podstawie zgromadzonych wyników zostały one zaklasyfikowane do grona inhibitorów funkcjonujących według scenariusza przedstawionego w części *Ib* na Rys. 5.1., czyli do grupy oligomerów, które hamują powstawanie miRNA poprzez wiązanie się z Dicer. Niezbędne są jednak dalsze badania poświęcone charakterystyce oddziaływania G-kwadruleksów z Dicer, które pozwolą ustalić szczegóły mechanizmów regulacji aktywności tej rybonukleazy i umożliwią stworzenie bardziej precyzyjnej klasyfikacji inhibitorów procesu powstawania miRNA.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pochodzą z badań prowadzonych w warunkach *in vitro*. Kwestią otwartą pozostaje zatem pytanie, czy omówione modele regulacji biogenezy miRNA sprawdzą się w warunkach fizjologicznych. Niemniej, istniejące przykłady RNA działających jako czynniki *trans*-regulatorowe etapu jądrowego biogenezy miRNA [223-225] sugerują, że podobne mechanizmy mogą funkcjonować również na etapie cytoplazmatycznym. Ponadto, biorąc pod uwagę dynamikę i zróżnicowanie transkryptomu, a także coraz liczniejsze doniesienia na temat funkcjonalnego znaczenia degradantów RNA [473], można przypuszczać, że w środowisku komórkowym istnieją cząsteczki RNA zdolne do oddziaływania z pre-miRNA lub z Dicer i interferencji w proces biogenezy miRNA. W kontekście aplikacyjnym, zaprezentowane dane wskazują na możliwość wykorzystania sekwencji zidentyfikowanych aptamerów lub zaprojektowanych 12-merów do opracowania narzędzi oligonukleotydowych regulujących aktywność Dicer i powstawanie miRNA. Ze względu na możliwości optymalizacji, szczególnie interesujące wydaje się rozwijanie technologii wykorzystujących krótkie modyfikowane oligomery. Mając na względzie wciąż rosnącą dysproporcję pomiędzy liczbą zidentyfikowanych miRNA a liczbą miRNA o poznanej roli biologicznej, narzędzia tego typu mogłyby stanowić cenną alternatywę w badaniach podstawowych do analiz funkcjonalnych wybranych cząsteczek. Ponadto, biorąc pod uwagę obecny stan wiedzy na temat powiązania poszczególnych miRNA z rozwojem konkretnych stanów patologicznych, oczywistym kierunkiem badań wydaje się opracowanie podejść terapeutycznych umożliwiających regulację powstawania i funkcjonowania ściśle określonych miRNA.



**Rysunek 5.1. Postulowane mechanizmy regulacji powstawania miRNA przez oligomery RNA**

Kanoniczna ścieżka biogenezy miRNA na etapie cięcia pre-miRNA przez Dicer (*panel lewy*) może podlegać modyfikacji w wyniku działania różnorodnych oligomerów RNA (*panel prawy*). Częsteczki te mogą wpływać na aktywność enzymu poprzez bezpośrednie oddziaływanie z nim (I) lub z jego substratami (II, III), prowadząc do zahamowania uwalniania miRNA (I, II, IIIa) lub powstawania odmiennych produktów cięcia (IIIb). Na podstawie [449].

---

## VI PODSUMOWANIE

Wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN w Poznaniu pozwoliły ustalić, iż krótkie cząsteczki RNA wiążące Dicer mogą kontrolować proces dojrzewania wybranych miRNA zarówno w sposób uniwersalny, jak i wybiórczy. Celem niniejszej pracy była szczegółowa charakterystyka wpływu krótkich RNA na proces uwalniania miRNA z ich prekursorów w warunkach *in vitro*. Postulowane scenariusze przebiegu regulacji dojrzewania miRNA przez oligomery RNA przedstawiono na Rys. 5.1. Poniżej zebrane są najważniejsze wnioski płynące z przeprowadzonych badań.

- Oligomery RNA, które wydajnie hamują cytoplazmatyczny etap procesu powstawania określonych cząsteczek miRNA, mogą, ale nie muszą oddziaływać z rybonukleazą Dicer.
- W genomie człowieka zakodowane są sekwencje cząsteczek, które potencjalnie mogą funkcjonować jako selektywne regulatory dojrzewania miRNA.
- Zaledwie 12-nt oligomery RNA oddziałujące z rejonami jednoniciowymi obecnymi w strukturze pre-miRNA mogą wydajnie i selektywnie hamować proces powstawania określonych miRNA *in vitro* zarówno w reakcjach z rekombinowaną Dicer, jak i Dicer obecną we frakcji cytoplazmatycznej lizatów komórkowych.
- Czynniki decydującymi o efektywności inhibitorowej oligomerów komplementarnych do pre-miRNA są: struktura pre-miRNA warunkująca dostępność miejsca do hybrydyzacji oligomeru oraz trwałość termodynamiczna dupleksu inhibitor • pre-miRNA.
- Oligomery RNA przyjmujące strukturę G-kwadrupeksów są wiązane przez Dicer i mogą funkcjonować jako regulatory aktywności enzymu.

Omówione w niniejszej pracy wyniki zostały przedstawione w następujących publikacjach i zgłoszeniach patentowych:

1. **Koralewska N**, Hoffmann W, Pokornowska M, Milewski M, Lipinska A, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M, Kurzynska-Kokorniak A. *How short*

- RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing.* Acta Biochim Pol. 2016; 63 (4), 773-783. doi: 10.18388/abp.2016\_1339.
2. Kurzyńska-Kokorniak A, **Koralewska N**, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, Figlerowicz M. *The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities.* Nucleic Acids Res. 2015; 43(9):4365-80. doi: 10.1093/nar/gkv328.
  3. Kurzyńska-Kokorniak A, **Koralewska N**, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M. *A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer.* PLoS One. 2013; 8(10):e77703. doi: 10.1371/journal.pone.0077703.
  4. Tyczewska A, Kurzyńska-Kokorniak A, **Koralewska N**, Szopa A, Kietrys AM, Wrzesiński J, Twardowski T, Figlerowicz M. *Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro.* Nucleic Acid Ther. 2011; 21(5):333-46. doi: 10.1089/nat.2011.0304.
  5. Kurzyńska-Kokorniak A., Figlerowicz M., **Koralewska N.**, Tyczewska A., Twardowski T., zgłoszenie w Europejskim Urzędzie Patentowym: „*An RNA oligomer, methods for regulating a microRNA production proces and RNA oligomers used as microRNA production proces regulators*”, 2013, PCT/PL2013/000024.
  6. Kurzyńska-Kokorniak A., Figlerowicz M., **Koralewska N.**, Tyczewska A., Twardowski T., zgłoszenie w Urzędzie Patentowym RP: „*Oligomer RNA, sposób regulowania procesu powstawania miRNA oraz zastosowanie oligomerów RNA jako regulatorów powstawania miRNA*”, 2012, P-398 211.



---

## VII STRESZCZENIE/ABSTRACT

Rybonukleaza Dicer odpowiada za dojrzewanie krótkich regulatorowych RNA – miRNA i siRNA oraz formowanie się kompleksów wyciszających (RISC), odgrywając w ten sposób kluczową rolę w procesie interferencji RNA. Wiedza na temat struktury i funkcjonowania Dicer nieustannie poszerza się, nadal jednak niewiele wiadomo na temat potencjalnego efektu regulatorowego, jaki na aktywność enzymu mogą wywierać obecne w komórce cząsteczki RNA. Biorąc pod uwagę wyniki badań pokazujących, że funkcjonowanie pozostałych białek zaangażowanych w biogenezę miRNA podlega regulacji przez różnorodne RNA, można przypuszczać, że podobne mechanizmy mogą zawiadywać dojrzewaniem miRNA także na etapie cięcia pre-miRNA przez Dicer.

Celem niniejszej pracy była szczegółowa charakterystyka wpływu krótkich RNA na proces uwalniania miRNA z cząsteczek prekursorowych w warunkach *in vitro*. Otrzymane wyniki pozwoliły wyjaśnić mechanizmy warunkujące selektywną inhibicję powstawania miRNA zaobserwowaną dla dwóch wybranych aptamerów wiążących Dicer. Ponadto dowiedziono, że już zaledwie 12-nt oligomery komplementarne do rejonów jednoniciowych pre-miRNA mogą funkcjonować jako wydajne i selektywne inhibitory cięcia tych prekursorów przez Dicer. Wstępne badania wykazały również, że aktywność Dicer może podlegać regulacji przez G-kwadrupleksy RNA.

Uzyskane wyniki pozwalają zaproponować szereg możliwych sposobów, w jaki oligomery miRNA mogą wpływać na etap cytoplazmatyczny biogenezy miRNA. Postulowane modele regulacji obejmują zarówno mechanizmy wymagające bezpośredniego oddziaływania oligomerów z Dicer, jak i mechanizmy wymagające hybrydyzacji oligomerów do pre-miRNA. W szerszej perspektywie, przedstawione wyniki skłaniają do przedyskutowania aktualnego stanu wiedzy na temat regulacji biogenezy miRNA w żywych komórkach i zredefiniowania roli cząsteczek RNA w procesach warunkujących aktywność ludzkiej rybonukleazy Dicer.

Dicer is a ribonuclease III-type enzyme that plays a pivotal role in RNA interference (RNAi), processing long double-stranded and hairpin precursor RNAs to yield short interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs), respectively. The enzyme is also involved in subsequent assembly of RNA-induced silencing complex (RISC). While details of Dicer structure and functioning are being elucidated, less is known about the regulatory aspect of Dicer interaction with RNAs. Recent advances in our knowledge of the transcriptome, as well as growing evidence showing RNA-dependent regulation of other components of RNAi pathways, all point to the possibility that also Dicer activity and therefore miRNA maturation might be subjected to such control mechanisms.

The aim of this study was to investigate the role of short RNA oligomers in pre-miRNA processing by human Dicer *in vitro*. The collected data revealed details of the mechanisms responsible for selective inhibition of miRNA maturation observed in reactions with two previously identified aptamers binding Dicer. Further, it was proved that oligomers as short as 12 nt can interact with single-stranded regions of pre-miRNAs and efficiently inhibit cleavage by Dicer. Finally, preliminary studies indicate that RNA G-quadruplexes can act as inhibitors of Dicer *in vitro*.

Altogether, the obtained results suggest several possible scenarios for regulation of miRNA maturation at the step of Dicer. Presented data clearly show that RNA may affect miRNA production either by binding to Dicer or by interaction with pre-miRNA, which further points to a broad regulatory role of RNA in Dicer functioning, and induces to revisit current view on mechanism governing miRNA maturation.

---

## VIII BIBLIOGRAFIA

1. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-3.
2. Crick, F.H., *On protein synthesis*. Symp Soc Exp Biol, 1958. **12**: p. 138-63.
3. Mattick, J.S., *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. EMBO Rep, 2001. **2**(11): p. 986-91.
4. Pertea, M., *The human transcriptome: an unfinished story*. Genes (Basel), 2012. **3**(3): p. 344-60.
5. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
6. Grishok, A., et al., *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing*. Cell, 2001. **106**(1): p. 23-34.
7. Ivey, K.N. and D. Srivastava, *MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(1): p. 36-41.
8. Jeker, L.T. and J.A. Bluestone, *MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function*. Immunol Rev, 2013. **253**(1): p. 65-81.
9. Le, M.T., et al., *MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(19): p. 5290-305.
10. Navarro, F. and J. Lieberman, *Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 5939-47.
11. Turner, M.L., F.M. Schnorfeil, and T. Brocker, *MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function*. J Immunol, 2011. **187**(8): p. 3911-7.
12. Haemmig, S., et al., *miR-125b controls apoptosis and temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1279.
13. Kouri, F.M., et al., *miR-182 integrates apoptosis, growth, and differentiation programs in glioblastoma*. Genes Dev, 2015. **29**(7): p. 732-45.
14. Meisgen, F., et al., *MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis*. Exp Dermatol, 2012. **21**(4): p. 312-4.
15. Palma, C.A., et al., *MicroRNA-155 as an inducer of apoptosis and cell differentiation in Acute Myeloid Leukaemia*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 79.
16. Wu, X., et al., *miR-122 affects the viability and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(11): p. 1332-9.
17. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14**. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
18. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans**. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
19. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. Plant Cell, 1990. **2**(4): p. 279-289.
20. Romano, N. and G. Macino, *Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences*. Mol Microbiol, 1992. **6**(22): p. 3343-53.
21. Pal-Bhadra, M., U. Bhadra, and J.A. Birchler, *Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-*Adh* transgenes is Polycomb dependent*. Cell, 1997. **90**(3): p. 479-90.
22. Zamore, P.D., et al., *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell, 2000. **101**(1): p. 25-33.

23. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
24. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
25. Ambros, V., *The evolution of our thinking about microRNAs*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1036-40.
26. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
27. Grimson, A., et al., *Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals*. Nature, 2008. **455**(7217): p. 1193-7.
28. Heimberg, A.M., et al., *MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 2946-50.
29. Hornstein, E. and N. Shomron, *Canalization of development by microRNAs*. Nat Genet, 2006. **38** Suppl: p. S20-4.
30. Sempere, L.F., et al., *The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2006. **306**(6): p. 575-88.
31. Prochnik, S.E., D.S. Rokhsar, and A.A. Aboobaker, *Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor*. Dev Genes Evol, 2007. **217**(1): p. 73-7.
32. Peterson, K.J., M.R. Dietrich, and M.A. McPeck, *MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion*. Bioessays, 2009. **31**(7): p. 736-47.
33. Christodoulou, F., et al., *Ancient animal microRNAs and the evolution of tissue identity*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1084-8.
34. Hertel, J., et al., *The expansion of the metazoan microRNA repertoire*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 25.
35. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. Genes Dev, 2002. **16**(6): p. 720-8.
36. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
37. Gregory, R.I., et al., *Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing*. Cell, 2005. **123**(4): p. 631-40.
38. Filipowicz, W., *RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine*. Cell, 2005. **122**(1): p. 17-20.
39. Pratt, A.J. and I.J. MacRae, *The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine*. J Biol Chem, 2009. **284**(27): p. 17897-901.
40. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
41. Brennecke, J., et al., *Principles of microRNA-target recognition*. PLoS Biol, 2005. **3**(3): p. e85.
42. Doench, J.G. and P.A. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression*. Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 504-11.
43. Wang, X., *Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns*. Bioinformatics. **30**(10): p. 1377-83.
44. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
45. Zardo, G., et al., *Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression*. Blood, 2012. **119**(17): p. 4034-46.
46. MacRae, I.J., et al., *In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 512-7.

47. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
48. Iwasaki, S., et al., *Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes*. Mol Cell, 2010. **39**(2): p. 292-9.
49. Johnston, M., et al., *HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(9): p. 1462-9.
50. Yi, T., et al., *eIF1A augments Ago2-mediated Dicer-independent miRNA biogenesis and RNA interference*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7194.
51. Li, S., et al., *Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 24): p. 4134-44.
52. Lian, S.L., et al., *The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing*. RNA, 2009. **15**(5): p. 804-13.
53. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
54. Bagga, S., et al., *Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation*. Cell, 2005. **122**(4): p. 553-63.
55. Hendrickson, D.G., et al., *Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA*. PLoS Biol, 2009. **7**(11): p. e1000238.
56. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
57. Eulalio, A., E. Huntzinger, and E. Izaurralde, *GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(4): p. 346-53.
58. Wakiyama, M., et al., *Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system*. Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1857-62.
59. Guo, H., et al., *Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels*. Nature. **466**(7308): p. 835-40.
60. Shin, C., et al., *Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing*. Mol Cell, 2010. **38**(6): p. 789-802.
61. Chendrimada, T.P., et al., *MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 823-8.
62. Humphreys, D.T., et al., *MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 16961-6.
63. Kiriakidou, M., et al., *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1141-51.
64. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
65. Thermann, R. and M.W. Hentze, *Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 875-8.
66. Wang, B., A. Yanez, and C.D. Novina, *MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5343-8.
67. Zipprich, J.T., et al., *Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression*. RNA, 2009. **15**(5): p. 781-93.
68. Baillat, D. and R. Shiekhattar, *Functional dissection of the human TNRC6 (GW182-related) family of proteins*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(15): p. 4144-55.
69. Gu, S., et al., *Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 144-50.
70. Karaa, Z.S., et al., *The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16*. RNA, 2009. **15**(2): p. 249-54.

71. Landthaler, M., et al., *Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs*. RNA, 2008. **14**(12): p. 2580-96.
72. Lytle, J.R., T.A. Yario, and J.A. Steitz, *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9667-72.
73. Maroney, P.A., et al., *Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1102-7.
74. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
75. Petersen, C.P., et al., *Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 533-42.
76. Wang, B., et al., *Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro*. Mol Cell, 2006. **22**(4): p. 553-60.
77. Nottrott, S., M.J. Simard, and J.D. Richter, *Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1108-14.
78. Kim, D.H., et al., *MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16230-5.
79. Younger, S.T. and D.R. Corey, *Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(13): p. 5682-91.
80. Tan, Y., et al., *Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells*. BMC Mol Biol, 2009. **10**: p. 12.
81. Gonzalez, S., D.G. Pisano, and M. Serrano, *Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs*. Cell Cycle, 2008. **7**(16): p. 2601-8.
82. Benhamed, M., et al., *Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(3): p. 266-75.
83. Adilakshmi, T., I. Sudol, and N. Tapinos, *Combinatorial action of miRNAs regulates transcriptional and post-transcriptional gene silencing following in vivo PNS injury*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e39674.
84. Castel, S.E. and R.A. Martienssen, *RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(2): p. 100-12.
85. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1608-13.
86. Turner, M.J., A.L. Jiao, and F.J. Slack, *Autoregulation of lin-4 microRNA transcription by RNA activation (RNAa) in C. elegans*. Cell Cycle, 2014. **13**(5): p. 772-81.
87. Huang, V., et al., *Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(4): p. 1695-707.
88. Doberstein, K., et al., *miR-21-3p is a positive regulator of L1CAM in several human carcinomas*. Cancer Lett, 2014. **354**(2): p. 455-66.
89. Yin, M., et al., *Transactivation of microrna-320 by microRNA-383 regulates granulosa cell functions by targeting E2F1 and SF-1 proteins*. J Biol Chem, 2014. **289**(26): p. 18239-57.
90. Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Mol Cell, 2008. **30**(4): p. 460-71.
91. Saraiya, A.A., W. Li, and C.C. Wang, *Transition of a microRNA from repressing to activating translation depending on the extent of base pairing with the target*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55672.

92. Truesdell, S.S., et al., *MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 842.
93. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
94. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
95. Su, Z., et al., *MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis*. Oncotarget, 2015. **6**(11): p. 8474-8490.
96. Meza-Sosa, K.F., G. Pedraza-Alva, and L. Perez-Martinez, *microRNAs: key triggers of neuronal cell fate*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 175.
97. Chen, B., et al., *Roles of microRNA on cancer cell metabolism*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 228.
98. Zhang, W., J. Liu, and G. Wang, *The role of microRNAs in human breast cancer progression*. Tumour Biol, 2016. **35**(7): p. 6235-44.
99. Papageorgiou, N., et al., *The role of microRNAs in cardiovascular disease*. Curr Med Chem, 2012. **19**(16): p. 2605-10.
100. Tan, L. and J.T. Yu, *Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation in Neurodegenerative Diseases*. Mol Neurobiol, 2015. **51**(3): p. 1249-62.
101. Alvarez-Saavedra, E. and H.R. Horvitz, *Many families of C. elegans microRNAs are not essential for development or viability*. Curr Biol, 2010. **20**(4): p. 367-73.
102. Miska, E.A., et al., *Most Caenorhabditis elegans microRNAs are individually not essential for development or viability*. PLoS Genet, 2007. **3**(12): p. e215.
103. Baek, D., et al., *The impact of microRNAs on protein output*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 64-71.
104. Cheung, V.G., et al., *Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 422-5.
105. Bartel, D.P. and C.Z. Chen, *Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(5): p. 396-400.
106. Schmiedel, J.M., et al., *Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise*. Science, 2015. **348**(6230): p. 128-32.
107. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
108. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
109. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
110. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
111. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
112. Kawamata, T., H. Seitz, and Y. Tomari, *Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(9): p. 953-60.
113. Yoda, M., et al., *ATP-dependent human RISC assembly pathways*. Nat Struct Mol Biol. **17**(1): p. 17-23.
114. Bang, C., et al., *Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy*. J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2136-46.
115. Okamura, K., et al., *The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(4): p. 354-63.
116. Yang, J.S., et al., *Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species*. RNA, 2011. **17**(2): p. 312-26.

117. Yang, X., et al., *Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(21): p. 9688-704.
118. Kuchenbauer, F., et al., *Comprehensive analysis of mammalian miRNA\* species and their role in myeloid cells*. Blood, 2011. **118**(12): p. 3350-8.
119. Kim, S., et al., *MicroRNA miR-199a\* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 18158-66.
120. Lee, D.Y., et al., *A 3'-untranslated region (3'UTR) induces organ adhesion by regulating miR-199a\* functions*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4527.
121. Musiyenko, A., V. Bitko, and S. Barik, *Ectopic expression of miR-126\*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates prostein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells*. J Mol Med (Berl), 2008. **86**(3): p. 313-22.
122. Tsang, W.P. and T.T. Kwok, *The miR-18a\* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras*. Carcinogenesis, 2009. **30**(6): p. 953-9.
123. Winter, J., et al., *Loop-miRs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(10): p. 5503-12.
124. Okamura, K., et al., *Functional small RNAs are generated from select miRNA hairpin loops in flies and mammals*. Genes Dev, 2013. **27**(7): p. 778-92.
125. Heo, I., et al., *Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs*. Cell, 2012. **151**(3): p. 521-32.
126. Thornton, J.E., et al., *Selective microRNA uridylation by Zcchc6 (TUT7) and Zcchc11 (TUT4)*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(18): p. 11777-91.
127. Babiarz, J.E., et al., *Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs*. Genes Dev, 2008. **22**(20): p. 2773-85.
128. Berezikov, E., et al., *Mammalian mirtron genes*. Mol Cell, 2007. **28**(2): p. 328-36.
129. Chung, W.J., et al., *Computational and experimental identification of mirtrons in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans*. Genome Res, 2011. **21**(2): p. 286-300.
130. Ladewig, E., et al., *Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data*. Genome Res, 2011. **22**(9): p. 1634-45.
131. Okamura, K., et al., *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. Cell, 2007. **130**(1): p. 89-100.
132. Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel, *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. Nature, 2007. **448**(7149): p. 83-6.
133. Flynt, A.S., et al., *MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in Drosophila*. Mol Cell, 2010. **38**(6): p. 900-7.
134. Chong, M.M., et al., *Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery*. Genes Dev, 2010. **24**(17): p. 1951-60.
135. Xie, M., et al., *Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1568-80.
136. Haussecker, D., et al., *Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing*. RNA, 2010. **16**(4): p. 673-95.
137. Bogerd, H.P., et al., *A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs*. Mol Cell, 2010. **37**(1): p. 135-42.
138. Ender, C., et al., *A human snoRNA with microRNA-like functions*. Mol Cell, 2008. **32**(4): p. 519-28.
139. Cazalla, D., M. Xie, and J.A. Steitz, *A primate herpesvirus uses the integrator complex to generate viral microRNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 982-92.



140. Cheloufi, S., et al., *A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis*. Nature, 2010. **465**(7298): p. 584-9.
141. Cifuentes, D., et al., *A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1694-8.
142. Yang, J.S., et al., *Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15163-8.
143. Yoda, M., et al., *Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs*. Cell Rep, 2013. **5**(3): p. 715-26.
144. Rupaimoole, R., et al., *Hypoxia-mediated downregulation of miRNA biogenesis promotes tumour progression*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5202.
145. van den Beucken, T., et al., *Hypoxia promotes stem cell phenotypes and poor prognosis through epigenetic regulation of DICER*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5203.
146. Ho, J.J., et al., *Functional importance of Dicer protein in the adaptive cellular response to hypoxia*. J Biol Chem, 2012. **287**(34): p. 29003-20.
147. Ma, F., et al., *The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma*. Nat Immunol, 2011. **12**(9): p. 861-9.
148. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
149. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
150. Hayes, J., P.P. Peruzzi, and S. Lawler, *MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy*. Trends Mol Med, 2014. **20**(8): p. 460-9.
151. Ai, J., et al., *Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **391**(1): p. 73-7.
152. Xiao, J., et al., *Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction*. Int J Clin Exp Med, 2014. **7**(1): p. 136-41.
153. Gu, H., et al., *Diagnostic role of microRNA expression profile in the serum of pregnant women with fetuses with neural tube defects*. J Neurochem, 2012. **122**(3): p. 641-9.
154. Yu, Z., et al., *Potential role of maternal serum microRNAs as a biomarker for fetal congenital heart defects*. Med Hypotheses, 2010. **76**(3): p. 424-6.
155. Ghorai, A. and U. Ghosh, *miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes*. Front Genet, 2014. **5**: p. 100.
156. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
157. Chan, W.C., et al., *MetaMirClust: discovery of miRNA cluster patterns using a data-mining approach*. Genomics, 2012. **100**(3): p. 141-8.
158. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
159. Lagana, A., et al., *Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG islands in the distribution of genetic material*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11166.
160. Guo, L., et al., *Global analysis of miRNA gene clusters and gene families reveals dynamic and coordinated expression*. Biomed Res Int, 2014. **2014**(2014): p. 782490.
161. Guo, L., et al., *Integrated evolutionary analysis of human miRNA gene clusters and families implicates evolutionary relationships*. Gene, 2014. **534**(1): p. 24-32.

162. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
163. Chapiro, E., et al., *A new recurrent translocation t(11;14)(q24;q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2010. **24**(7): p. 1362-4.
164. Huse, J.T., et al., *The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo*. Genes Dev, 2009. **23**(11): p. 1327-37.
165. Sun, G., et al., *SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function*. RNA, 2009. **15**(9): p. 1640-51.
166. Gong, J., et al., *Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis*. Hum Mutat, 2011. **33**(1): p. 254-63.
167. Lee, H.C., et al., *Single point mutation of microRNA may cause butterfly effect on alteration of global gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **404**(4): p. 1065-9.
168. Ozsolak, F., et al., *Chromatin structure analyses identify miRNA promoters*. Genes Dev, 2008. **22**(22): p. 3172-83.
169. Corcoran, D.L., et al., *Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5279.
170. Wang, G., et al., *RNA polymerase II binding patterns reveal genomic regions involved in microRNA gene regulation*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13798.
171. Wang, J., et al., *TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D119-22.
172. Ramalingam, P., et al., *Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing*. RNA, 2014. **20**(1): p. 76-87.
173. Kirigin, F.F., et al., *Dynamic microRNA gene transcription and processing during T cell development*. J Immunol, 2012. **188**(7): p. 3257-67.
174. Chien, C.H., et al., *Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(21): p. 9345-56.
175. Guo, Z., et al., *Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 5150.
176. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
177. Pfeffer, S., et al., *Identification of microRNAs of the herpesvirus family*. Nat Methods, 2005. **2**(4): p. 269-76.
178. Borchert, G.M., W. Lanier, and B.L. Davidson, *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(12): p. 1097-101.
179. Gu, T.J., et al., *Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 563.
180. Vrba, L., et al., *Epigenetic regulation of normal human mammary cell type-specific miRNAs*. Genome Res, 2011. **21**(12): p. 2026-37.
181. Vrba, L., et al., *Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8697.
182. Vrba, L., et al., *miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54398.
183. Yang, J.H., et al., *ChIPBase: a database for decoding the transcriptional regulation of long non-coding RNA and microRNA genes from ChIP-Seq data*. Nucleic Acids Res, 2012. **41**(Database issue): p. D177-87.
184. Sabin, L.R., et al., *Ars2 regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in Drosophila*. Cell, 2009. **138**(2): p. 340-51.

185. Gruber, J.J., et al., *Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation*. Cell, 2009. **138**(2): p. 328-39.
186. Mattioli, C., G. Pianigiani, and F. Pagani, *A competitive regulatory mechanism discriminates between juxtaposed splice sites and pri-miRNA structures*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(18): p. 8680-91.
187. Melamed, Z., et al., *Alternative splicing regulates biogenesis of miRNAs located across exon-intron junctions*. Mol Cell, 2013. **50**(6): p. 869-81.
188. Sundaram, G.M., et al., *'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing*. Nature, 2013. **495**(7439): p. 103-6.
189. Kim, Y.K. and V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 775-83.
190. Morlando, M., et al., *Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(9): p. 902-9.
191. Fazi, F., et al., *A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis*. Cell, 2005. **123**(5): p. 819-31.
192. Vian, L., et al., *Transcriptional fine-tuning of microRNA-223 levels directs lineage choice of human hematopoietic progenitors*. Cell Death Differ, 2013. **21**(2): p. 290-301.
193. Ow, M.C., et al., *The FLYWCH transcription factors FLH-1, FLH-2, and FLH-3 repress embryonic expression of microRNA genes in C. elegans*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2520-34.
194. Bracht, J.R., et al., *Regulation of lin-4 miRNA expression, organismal growth and development by a conserved RNA binding protein in C. elegans*. Dev Biol, 2010. **348**(2): p. 210-21.
195. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
196. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
197. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
198. Nguyen, T.A., et al., *Functional Anatomy of the Human Microprocessor*. Cell, 2015. **161**(6): p. 1374-87.
199. Filippov, V., et al., *A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes*. Gene, 2000. **245**(1): p. 213-21.
200. Wu, H., et al., *Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36957-65.
201. Tang, X., et al., *Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(19): p. 6610-9.
202. Kwon, S.C., et al., *Structure of Human DROSHA*. Cell, 2016. **164**(1-2): p. 81-90.
203. Quick-Cleveland, J., et al., *The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin*. Cell Rep, 2014. **7**(6): p. 1994-2005.
204. Roth, B.M., D. Ishimaru, and M. Hennig, *The core microprocessor component DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) is a nonspecific RNA-binding protein*. J Biol Chem, 2013. **288**(37): p. 26785-99.
205. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
206. Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen, *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha*. EMBO J, 2005. **24**(1): p. 138-48.
207. Pawlicki, J.M. and J.A. Steitz, *Primary microRNA transcript retention at sites of transcription leads to enhanced microRNA production*. J Cell Biol, 2008. **182**(1): p. 61-76.

208. Zhu, S., et al., *Chromatin structure characteristics of pre-miRNA genomic sequences*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 329.
209. Laubinger, S., et al., *Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(25): p. 8795-800.
210. Dong, Z., M.H. Han, and N. Fedoroff, *The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 9970-5.
211. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27595-603.
212. Fang, W. and D.P. Bartel, *The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes*. Mol Cell, 2015. **60**(1): p. 131-45.
213. Auyeung, V.C., et al., *Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing*. Cell, 2013. **152**(4): p. 844-58.
214. Chaulk, S.G., et al., *Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis*. RNA Biol, 2011. **8**(6): p. 1105-14.
215. Pratt, Z.L., et al., *The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines*. Virology, 2009. **386**(2): p. 387-97.
216. Michlewski, G., et al., *Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 383-93.
217. Trabucchi, M., et al., *The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1010-4.
218. Kawahara, Y. and A. Mieda-Sato, *TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A. **109**(9): p. 3347-52.
219. Newman, M.A., J.M. Thomson, and S.M. Hammond, *Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing*. RNA, 2008. **14**(8): p. 1539-49.
220. Viswanathan, S.R., G.Q. Daley, and R.I. Gregory, *Selective blockade of microRNA processing by Lin28*. Science, 2008. **320**(5872): p. 97-100.
221. Guil, S. and J.F. Caceres, *The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(7): p. 591-6.
222. Michlewski, G. and J.F. Caceres, *Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(8): p. 1011-8.
223. Tang, R., et al., *Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system*. Cell Res, 2011. **22**(3): p. 504-15.
224. Liz, J., et al., *Regulation of pri-miRNA processing by a long noncoding RNA transcribed from an ultraconserved region*. Mol Cell, 2014. **55**(1): p. 138-47.
225. Zisoulis, D.G., et al., *Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 541-4.
226. Alarcon, C.R., et al., *N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing*. Nature, 2015. **519**(7544): p. 482-5.
227. Zhang, X. and Y. Zeng, *The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. 7689-97.
228. Kawahara, Y. and A. Mieda-Sato, *TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3347-52.
229. Michlewski, G., S. Guil, and J.F. Caceres, *Stimulation of pri-miR-18a processing by hnRNP A1*. Adv Exp Med Biol, 2010. **700**: p. 28-35.

230. Shaul, Y.D. and R. Seger, *The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(8): p. 1213-26.
231. Gonda, T.J. and R.G. Ramsay, *Directly targeting transcriptional dysregulation in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(11): p. 686-94.
232. Han, J., et al., *Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8*. *Cell*, 2009. **136**(1): p. 75-84.
233. Barad, O., et al., *Efficiency and specificity in microRNA biogenesis*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(6): p. 650-2.
234. Herbert, K.M., et al., *Phosphorylation of DGCR8 increases its intracellular stability and induces a progrowth miRNA profile*. *Cell Rep*, 2013. **5**(4): p. 1070-81.
235. Tang, X., et al., *Acetylation of drosha on the N-terminus inhibits its degradation by ubiquitination*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72503.
236. Wada, T., J. Kikuchi, and Y. Furukawa, *Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8*. *EMBO Rep*, 2012. **13**(2): p. 142-9.
237. Fukuda, T., et al., *DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(5): p. 604-11.
238. Suzuki, H.I., et al., *Modulation of microRNA processing by p53*. *Nature*, 2009. **460**(7254): p. 529-33.
239. Davis, B.N., et al., *SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 56-61.
240. Davis, B.N., et al., *Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha*. *Mol Cell*, 2010. **39**(3): p. 373-84.
241. Mohr, D., et al., *Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes*. *EMBO J*, 2009. **28**(17): p. 2541-53.
242. Okada, C., et al., *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. *Science*, 2009. **326**(5957): p. 1275-9.
243. Wang, X., et al., *Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5*. *RNA*, 2015. **17**(8): p. 1511-28.
244. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(16): p. 4776-85.
245. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. *RNA*, 2004. **10**(2): p. 185-91.
246. Gwizdek, C., et al., *Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5505-8.
247. Yi, R., et al., *Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs*. *RNA*, 2005. **11**(2): p. 220-6.
248. Wang, X., et al., *Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5*. *RNA*, 2011. **17**(8): p. 1511-28.
249. Singh, C.P., J. Singh, and J. Nagaraju, *A baculovirus-encoded MicroRNA (miRNA) suppresses its host miRNA biogenesis by regulating the exportin-5 cofactor Ran*. *J Virol*, 2012. **86**(15): p. 7867-79.
250. Iwasaki, Y.W., et al., *Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry*. *RNA*, 2013. **19**(4): p. 490-7.
251. Nothnick, W.B., C. Healy, and X. Hong, *Steroid regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1*. *Endocrine*, 2010. **37**(2): p. 265-73.
252. Melo, S.A., et al., *A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(4): p. 303-15.
253. Sun, H.L., et al., *ERK Activation Globally Downregulates miRNAs through Phosphorylating Exportin-5*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(5): p. 723-736.

254. Bennasser, Y., et al., *Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(3): p. 323-7.
255. Lu, S. and B.R. Cullen, *Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis*. *J Virol*, 2004. **78**(23): p. 12868-76.
256. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
257. Provost, P., et al., *Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer*. *EMBO J*, 2002. **21**(21): p. 5864-74.
258. Feng, Y., et al., *A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer*. *RNA*, 2012. **18**(11): p. 2083-92.
259. Taylor, D.W., et al., *Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(6): p. 662-70.
260. Vermeulen, A., et al., *The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency*. *RNA*, 2005. **11**(5): p. 674-82.
261. Lima, W.F., et al., *Human Dicer binds short single-strand and double-strand RNA with high affinity and interacts with different regions of the nucleic acids*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(4): p. 2535-48.
262. Chakravarthy, S., et al., *Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing*. *J Mol Biol*, 2010. **404**(3): p. 392-402.
263. Tsutsumi, A., et al., *Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(10): p. 1153-8.
264. Kurzynska-Kokorniak, A., et al., *The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(9): p. 4365-80.
265. Daniels, S.M., et al., *Characterization of the TRBP domain required for dicer interaction and function in RNA interference*. *BMC Mol Biol*, 2009. **10**: p. 38.
266. Wang, H.W., et al., *Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(11): p. 1148-53.
267. Maniatakis, E. and Z. Mourelatos, *A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA*. *Genes Dev*, 2005. **19**(24): p. 2979-90.
268. Noland, C.L., E. Ma, and J.A. Doudna, *siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes*. *Mol Cell*, 2011. **43**(1): p. 110-21.
269. Taft, R.J., et al., *Small RNAs derived from snoRNAs*. *RNA*, 2009. **15**(7): p. 1233-40.
270. Langenberger, D., et al., *Dicer-processed small RNAs: rules and exceptions*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2013. **320**(1): p. 35-46.
271. Kaneko, H., et al., *DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration*. *Nature*, 2011. **471**(7338): p. 325-30.
272. Tarallo, V., et al., *DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88*. *Cell*, 2012. **149**(4): p. 847-59.
273. Hu, Q., et al., *DICER- and AGO3-dependent generation of retinoic acid-induced DR2 Alu RNAs regulates human stem cell proliferation*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(11): p. 1168-75.
274. Gagnon, K.T., et al., *RNAi factors are present and active in human cell nuclei*. *Cell Rep*, 2014. **6**(1): p. 211-21.
275. Redfern, A.D., et al., *RNA-induced silencing complex (RISC) proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(16): p. 6536-41.
276. Sinkkonen, L., et al., *Dicer is associated with ribosomal DNA chromatin in mammalian cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12175.
277. White, E., et al., *Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA*. *Nat Struct Mol Biol*, 2014. **21**(6): p. 552-9.

278. Doyle, M., et al., *The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal*. RNA, 2013. **19**(9): p. 1238-52.
279. Drake, M., et al., *A requirement for ERK-dependent Dicer phosphorylation in coordinating oocyte-to-embryo transition in C. elegans*. Dev Cell, 2014. **31**(5): p. 614-28.
280. Arur, S., et al., *Multiple ERK substrates execute single biological processes in Caenorhabditis elegans germ-line development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4776-81.
281. Matskevich, A.A. and K. Moelling, *Stimuli-dependent cleavage of Dicer during apoptosis*. Biochem J, 2008. **412**(3): p. 527-34.
282. Ghodgaonkar, M.M., et al., *Abrogation of DNA vector-based RNAi during apoptosis in mammalian cells due to caspase-mediated cleavage and inactivation of Dicer-1*. Cell Death Differ, 2009. **16**(6): p. 858-68.
283. Nakagawa, A., et al., *Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease*. Science, 2010. **328**(5976): p. 327-34.
284. Cerutti, H. and J.A. Casas-Mollano, *On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man*. Curr Genet, 2006. **50**(2): p. 81-99.
285. Mukherjee, K., H. Campos, and B. Kolaczowski, *Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants*. Mol Biol Evol, 2012. **30**(3): p. 627-41.
286. Macrae, I.J., et al., *Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 73-80.
287. Macrae, I.J., et al., *Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer*. Science, 2006. **311**(5758): p. 195-8.
288. Zhang, H., et al., *Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP*. EMBO J, 2002. **21**(21): p. 5875-85.
289. Zhang, H., et al., *Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III*. Cell, 2004. **118**(1): p. 57-68.
290. Takeshita, D., et al., *Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer*. J Mol Biol, 2007. **374**(1): p. 106-20.
291. Tian, Y., et al., *A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer*. Mol Cell, 2014. **53**(4): p. 606-16.
292. Wilson, R.C., et al., *Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis*. Mol Cell, 2015. **57**(3): p. 397-407.
293. Lau, P.W., et al., *The molecular architecture of human Dicer*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(4): p. 436-40.
294. Lau, P.W., et al., *Structure of the human Dicer-TRBP complex by electron microscopy*. Structure, 2009. **17**(10): p. 1326-32.
295. Liu, Z., et al., *Structure of precursor microRNA's terminal loop regulates human Dicer's dicing activity by switching DExH/D domain*. Protein Cell, 2014. **6**(3): p. 185-93.
296. Ma, J.B., K. Ye, and D.J. Patel, *Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain*. Nature, 2004. **429**(6989): p. 318-22.
297. Yan, K.S., et al., *Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 468-74.
298. Ma, E., et al., *Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing*. J Mol Biol, 2012. **422**(4): p. 466-76.
299. Wostenberg, C., et al., *The role of human Dicer-dsRBD in processing small regulatory RNAs*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51829.
300. Gu, S., et al., *The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo*. Cell, 2012. **151**(4): p. 900-11.

301. Bennasser, Y. and K.T. Jeang, *HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA*. *Retrovirology*, 2006. **3**: p. 95.
302. Ma, E., et al., *Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain*. *J Mol Biol*, 2008. **380**(1): p. 237-43.
303. Flores-Jasso, C.F., et al., *First step in pre-miRNAs processing by human Dicer*. *Acta Pharmacol Sin*, 2009. **30**(8): p. 1177-85.
304. MacRae, I.J. and J.A. Doudna, *Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(1): p. 138-45.
305. Kurzynska-Kokorniak, A., et al., *Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23989.
306. Ota, H., et al., *ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing*. *Cell*, 2013. **153**(3): p. 575-89.
307. Martello, G., et al., *A MicroRNA targeting dicer for metastasis control*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1195-207.
308. Jafarnejad, S.M., et al., *Sox4-mediated Dicer expression is critical for suppression of melanoma cell invasion*. *Oncogene*, 2013. **32**(17): p. 2131-9.
309. Levy, C., et al., *Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes*. *Cell*, 2010. **141**(6): p. 994-1005.
310. Boominathan, L., *The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. **29**(4): p. 613-39.
311. Singh, S., et al., *Extensive variation in the 5'-UTR of Dicer mRNAs influences translational efficiency*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **335**(3): p. 643-50.
312. Irvin-Wilson, C.V. and G. Chaudhuri, *Alternative initiation and splicing in dicer gene expression in human breast cells*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(4): p. R563-9.
313. Grelier, G., et al., *Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype*. *Br J Cancer*, 2009. **101**(4): p. 673-83.
314. Hinkal, G.W., et al., *Complexity in the regulation of Dicer expression: Dicer variant proteins are differentially expressed in epithelial and mesenchymal breast cancer cells and decreased during EMT*. *Br J Cancer*, 2011. **104**(2): p. 387-8.
315. Potenza, N., et al., *A novel splice variant of the human dicer gene is expressed in neuroblastoma cells*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(15): p. 3452-7.
316. Feinberg-Gorenshtein, G., et al., *MiR-192 directly binds and regulates Dicer1 expression in neuroblastoma*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e78713.
317. Forman, J.J., A. Legesse-Miller, and H.A. Collier, *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*, 2008. **105**(39): p. 14879-84.
318. Pepin, G., M.P. Perron, and P. Provost, *Regulation of human Dicer by the resident ER membrane protein CLIMP-63*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(22): p. 11603-17.
319. Gibbins, D., et al., *Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(12): p. 1314-21.
320. Mayr, C. and D.P. Bartel, *Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells*. *Cell*, 2009. **138**(4): p. 673-84.
321. Hamaya, Y., et al., *A distinct expression pattern of the long 3'-untranslated region dicer mRNA and its implications for posttranscriptional regulation in colorectal cancer*. *Clin Transl Gastroenterol*, 2012. **3**: p. e17.
322. Agger, K., et al., *UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development*. *Nature*, 2007. **449**(7163): p. 731-4.
323. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. *Nature*, 2006. **439**(7078): p. 811-6.



324. Pelechano, V. and L.M. Steinmetz, *Gene regulation by antisense transcription*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(12): p. 880-93.
325. Wiesen, J.L. and T.B. Tomasi, *Dicer is regulated by cellular stresses and interferons*. Mol Immunol, 2009. **46**(6): p. 1222-8.
326. Rigbolt, K.T., et al., *System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation*. Sci Signal, 2011. **4**(164): p. rs3.
327. Gross, T.J., et al., *A microRNA processing defect in smokers' macrophages is linked to SUMOylation of the endonuclease DICER*. J Biol Chem, 2014. **289**(18): p. 12823-34.
328. von Muhlinen, N., et al., *NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria*. Autophagy, 2010. **6**(2): p. 288-9.
329. Casey Klockow, L., et al., *The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection*. Virology, 2013. **444**(1-2): p. 191-202.
330. Haase, A.D., et al., *TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing*. EMBO Rep, 2005. **6**(10): p. 961-7.
331. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. EMBO J, 2006. **25**(3): p. 522-32.
332. Duarte, M., et al., *Characterization of TRBP1 and TRBP2. Stable stem-loop structure at the 5' end of TRBP2 mRNA resembles HIV-1 TAR and is not found in its processed pseudogene*. J Biomed Sci, 2000. **7**(6): p. 494-506.
333. Gagnon, A., et al., *Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR*. Science, 1991. **251**(5001): p. 1597-600.
334. Patel, R.C. and G.C. Sen, *PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR*. EMBO J, 1998. **17**(15): p. 4379-90.
335. Lee, H.Y., et al., *Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing*. Nucleic Acids Res, 2013.
336. Lee, H.Y., et al., *Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(13): p. 6568-76.
337. Fareh, M., et al., *TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13694.
338. Fukunaga, R., et al., *Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals*. Cell, 2012. **151**(3): p. 533-46.
339. Wilson, R.C., et al., *Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis*. Mol Cell, 2014. **57**(3): p. 397-407.
340. Paroo, Z., et al., *Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling*. Cell, 2009. **139**(1): p. 112-22.
341. Rybak-Wolf, A., et al., *A Variety of Dicer Substrates in Human and C. elegans*. Cell, 2014. **159**(5): p. 1153-67.
342. Andersson, M.G., et al., *Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA*. J Virol, 2005. **79**(15): p. 9556-65.
343. Tahbaz, N., et al., *Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer*. EMBO Rep, 2004. **5**(2): p. 189-94.
344. Lee, H.Y. and J.A. Doudna, *TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro*. RNA, 2012. **18**(11): p. 2012-9.
345. Melo, S.A., et al., *A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function*. Nat Genet, 2009. **41**(3): p. 365-70.
346. Robb, G.B. and T.M. Rana, *RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading*. Mol Cell, 2007. **26**(4): p. 523-37.

347. Plante, I., et al., *Dicer-derived microRNAs are utilized by the fragile X mental retardation protein for assembly on target RNAs*. J Biomed Biotechnol, 2006. **2006**(4): p. 64347.
348. Dincbas-Renqvist, V., et al., *Human Dicer C-terminus functions as a 5-lipoxygenase binding domain*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(2): p. 99-108.
349. Radmark, O., et al., *5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(7): p. 332-41.
350. Ando, Y., et al., *Nuclear pore complex protein mediated nuclear localization of dicer protein in human cells*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23385.
351. Wang, Y., et al., *Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response*. Gastroenterology, 2006. **130**(3): p. 883-92.
352. Chen, W., et al., *HCV core protein interacts with Dicer to antagonize RNA silencing*. Virus Res, 2008. **133**(2): p. 250-8.
353. Bennasser, Y., M.L. Yeung, and K.T. Jeang, *HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP*. J Biol Chem, 2006. **281**(38): p. 27674-8.
354. Krol, J., et al., *Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42230-9.
355. Starega-Roslan, J., et al., *Structural basis of microRNA length variety*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(1): p. 257-68.
356. Starega-Roslan, J., P. Galka-Marciniak, and W.J. Krzyzosiak, *Nucleotide sequence of miRNA precursor contributes to cleavage site selection by Dicer*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(22): p. 10939-51.
357. Park, J.E., et al., *Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing*. Nature, 2011. **475**(7355): p. 201-5.
358. Ritchie, W., M. Legendre, and D. Gautheret, *RNA stem-loops: to be or not to be cleaved by RNase III*. RNA, 2007. **13**(4): p. 457-62.
359. Li, Y., et al., *MiR-92b regulates the cell growth, cisplatin chemosensitivity of A549 non small cell lung cancer cell line and target PTEN*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **440**(4): p. 604-10.
360. Mirihana Arachchilage, G., A.C. Dassanayake, and S. Basu, *A potassium ion-dependent RNA structural switch regulates human pre-miRNA 92b maturation*. Chem Biol, 2015. **22**(2): p. 262-72.
361. Kim, B., et al., *TUT7 controls the fate of precursor microRNAs by using three different uridylation mechanisms*. EMBO J, 2015. **34**(13): p. 1801-15.
362. Hagan, J.P., E. Piskounova, and R.I. Gregory, *Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(10): p. 1021-5.
363. Thornton, J.E., et al., *Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7)*. RNA, 2012. **18**(10): p. 1875-85.
364. Lehrbach, N.J., et al., *LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate let-7 microRNA processing in Caenorhabditis elegans*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(10): p. 1016-20.
365. Xhemalce, B., S.C. Robson, and T. Kouzarides, *Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing*. Cell, 2012. **151**(2): p. 278-88.
366. Kawahara, Y., et al., *RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex*. EMBO Rep, 2007. **8**(8): p. 763-9.
367. Suzuki, H.I., et al., *MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation*. Mol Cell, 2011. **44**(3): p. 424-36.

368. Nicastro, G., et al., *Noncanonical G recognition mediates KSRP regulation of let-7 biogenesis*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(12): p. 1282-6.
369. Briata, P., et al., *PI3K/AKT signaling determines a dynamic switch between distinct KSRP functions favoring skeletal myogenesis*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(3): p. 478-87.
370. Ruggiero, T., et al., *LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages*. *FASEB J*, 2009. **23**(9): p. 2898-908.
371. Zhang, X., et al., *The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response*. *Mol Cell*, 2011. **41**(4): p. 371-83.
372. Heo, I., et al., *Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA*. *Mol Cell*, 2008. **32**(2): p. 276-84.
373. Heo, I., et al., *TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation*. *Cell*, 2009. **138**(4): p. 696-708.
374. Piskounova, E., et al., *Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms*. *Cell*, 2011. **147**(5): p. 1066-79.
375. Piskounova, E., et al., *Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(31): p. 21310-4.
376. Viswanathan, S.R. and G.Q. Daley, *Lin28: A microRNA regulator with a macro role*. *Cell*, 2010. **140**(4): p. 445-9.
377. Newman, M.A., V. Mani, and S.M. Hammond, *Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification*. *RNA*, 2011. **17**(10): p. 1795-803.
378. Pilotte, J., E.E. Dupont-Versteegden, and P.W. Vanderklish, *Widespread regulation of miRNA biogenesis at the Dicer step by the cold-inducible RNA-binding protein, RBM3*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28446.
379. Cho, D.S., et al., *Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 17093-102.
380. Peters, L. and G. Meister, *Argonaute proteins: mediators of RNA silencing*. *Mol Cell*, 2007. **26**(5): p. 611-23.
381. Hutvagner, G. and M.J. Simard, *Argonaute proteins: key players in RNA silencing*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 22-32.
382. Siomi, M.C., et al., *PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(4): p. 246-58.
383. Jinek, M. and J.A. Doudna, *A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference*. *Nature*, 2009. **457**(7228): p. 405-12.
384. Elkayam, E., et al., *The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a*. *Cell*, 2012. **150**(1): p. 100-10.
385. Schirle, N.T. and I.J. MacRae, *The crystal structure of human Argonaute2*. *Science*, 2012. **336**(6084): p. 1037-40.
386. Kwak, P.B. and Y. Tomari, *The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(2): p. 145-51.
387. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. *Science*, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
388. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. *Mol Cell*, 2004. **15**(2): p. 185-97.
389. Hauptmann, J., et al., *Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(7): p. 814-7.
390. Burroughs, A.M., et al., *Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin*. *RNA Biol*, 2011. **8**(1): p. 158-77.

391. Turchinovich, A. and B. Burwinkel, *Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma*. RNA Biol, 2012. **9**(8): p. 1066-75.
392. Noland, C.L. and J.A. Doudna, *Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways*. RNA, 2013. **19**(5): p. 639-48.
393. Hu, H.Y., et al., *Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 413.
394. Frank, F., N. Sonenberg, and B. Nagar, *Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 818-22.
395. Liu, Y., et al., *C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation*. Science, 2009. **325**(5941): p. 750-3.
396. Ye, X., et al., *Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(6): p. 650-7.
397. Lee, L.W., et al., *Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing*. RNA, 2010. **16**(11): p. 2170-80.
398. Wyman, S.K., et al., *Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity*. Genome Res, 2011. **21**(9): p. 1450-61.
399. Morin, R.D., et al., *Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells*. Genome Res, 2008. **18**(4): p. 610-21.
400. Neilsen, C.T., G.J. Goodall, and C.P. Bracken, *IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome*. Trends Genet, 2012. **28**(11): p. 544-9.
401. Burroughs, A.M., et al., *A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness*. Genome Res, 2010. **20**(10): p. 1398-410.
402. Fernandez-Valverde, S.L., R.J. Taft, and J.S. Mattick, *Dynamic isomiR regulation in Drosophila development*. RNA, 2010. **16**(10): p. 1881-8.
403. Starega-Roslan, J., et al., *Sequence features of Drosha and Dicer cleavage sites affect the complexity of isomiRs*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(4): p. 8110-27.
404. Han, B.W., et al., *The 3'-to-5' exoribonuclease Nibbler shapes the 3' ends of microRNAs bound to Drosophila Argonaute1*. Curr Biol, 2011. **21**(22): p. 1878-87.
405. Liu, N., et al., *The exoribonuclease Nibbler controls 3' end processing of microRNAs in Drosophila*. Curr Biol, 2011. **21**(22): p. 1888-93.
406. Katoh, T., et al., *Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2*. Genes Dev, 2009. **23**(4): p. 433-8.
407. Jones, M.R., et al., *Zcchc11 uridylylates mature miRNAs to enhance neonatal IGF-1 expression, growth, and survival*. PLoS Genet, 2012. **8**(11): p. e1003105.
408. Juvvuna, P.K., et al., *Argonaute identity defines the length of mature mammalian microRNAs*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(14): p. 6808-20.
409. Martin, G. and W. Keller, *RNA-specific ribonucleotidyl transferases*. RNA, 2007. **13**(11): p. 1834-49.
410. D'Ambrogio, A., et al., *Specific miRNA stabilization by Gld2-catalyzed monoadenylation*. Cell Rep, 2012. **2**(6): p. 1537-45.
411. Katoh, T., H. Hojo, and T. Suzuki, *Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(15): p. 7521-34.
412. Lee, M., et al., *Adenylation of maternally inherited microRNAs by Wispy*. Mol Cell, 2014. **56**(5): p. 696-707.
413. Backes, S., et al., *Degradation of host microRNAs by poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(2): p. 200-10.

414. Bail, S., et al., *Differential regulation of microRNA stability*. RNA, 2010. **16**(5): p. 1032-9.
415. Gantier, M.P., et al., *Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(13): p. 5692-703.
416. Schwanhausser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-42.
417. Sharova, L.V., et al., *Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells*. DNA Res, 2009. **16**(1): p. 45-58.
418. Zhang, Z., et al., *Uracils at nucleotide position 9-11 are required for the rapid turnover of miR-29 family*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(10): p. 4387-95.
419. Rissland, O.S., S.J. Hong, and D.P. Bartel, *MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 993-1004.
420. Cazalla, D., T. Yario, and J.A. Steitz, *Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1563-6.
421. Bosse, G.D., et al., *The decapping scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in Caenorhabditis elegans*. Mol Cell, 2013. **50**(2): p. 281-7.
422. Chatterjee, S., et al., *Target-mediated protection of endogenous microRNAs in C. elegans*. Dev Cell, 2011. **20**(3): p. 388-96.
423. Chatterjee, S. and H. Grosshans, *Active turnover modulates mature microRNA activity in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2009. **461**(7263): p. 546-9.
424. Das, S.K., et al., *Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11948-53.
425. Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 721-6.
426. Ebert, M.S. and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: progress and possibilities*. RNA, 2010. **16**(11): p. 2043-50.
427. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
428. Meister, G., et al., *Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing*. RNA, 2004. **10**(3): p. 544-50.
429. Orom, U.A., S. Kauppinen, and A.H. Lund, *LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function*. Gene, 2006. **372**: p. 137-41.
430. Choi, W.Y., A.J. Giraldez, and A.F. Schier, *Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430*. Science, 2007. **318**(5848): p. 271-4.
431. Lunse, C.E., et al., *An aptamer targeting the apical-loop domain modulates pri-miRNA processing*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(27): p. 4674-7.
432. Subramanian, N., et al., *Blocking the maturation of OncomiRNAs using pri-miRNA-17 approximately 92 aptamer in retinoblastoma*. Nucleic Acid Ther, 2015. **25**(1): p. 47-52.
433. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
434. Juliano, R.L., *The delivery of therapeutic oligonucleotides*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(14): p. 6518-48.
435. Esposito, C.L., S. Catuogno, and V. de Franciscis, *Aptamer-mediated selective delivery of short RNA therapeutics in cancer cells*. J RNAi Gene Silencing, 2014. **10**: p. 500-6.
436. Tyczewska, A., et al., *Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human dicer activity in vitro*. Nucleic Acid Ther, 2011. **21**(5): p. 333-46.

437. Kandalam, M.M., et al., *Oncogenic microRNA 17-92 cluster is regulated by epithelial cell adhesion molecule and could be a potential therapeutic target in retinoblastoma*. *Mol Vis*, 2012. **18**: p. 2279-87.
438. Szczepanski, J.T. and G.F. Joyce, *Specific Inhibition of MicroRNA Processing Using L-RNA Aptamers*. *J Am Chem Soc*, 2015. **137**(51): p. 16032-7.
439. Fahlman, R.P. and O.C. Uhlenbeck, *Contribution of the esterified amino acid to the binding of aminoacylated tRNAs to the ribosomal P- and A-sites*. *Biochemistry*, 2004. **43**(23): p. 7575-83.
440. Bellaousov, S., et al., *RNAstructure: web servers for RNA secondary structure prediction and analysis*. *Nucleic Acids Research*, 2013. **41**(Web Server issue): p. W471-W474.
441. Mathews, D.H., et al., *Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure1*. *Journal of Molecular Biology*, 1999. **288**(5): p. 911-940.
442. Reuter, J.S. and D.H. Mathews, *RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis*. *BMC Bioinformatics*, 2010. **11**(1): p. 1-9.
443. Mathews, D.H., et al., *Predicting oligonucleotide affinity to nucleic acid targets*. *RNA*, 1999. **5**(11): p. 1458-1469.
444. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10.
445. Roos, M., et al., *Short loop-targeting oligoribonucleotides antagonize Lin28 and enable pre-let-7 processing and suppression of cell growth in let-7-deficient cancer cells*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(2): p. e9.
446. Bose, D., et al., *Selective inhibition of miR-21 by phage display screened peptide*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(8): p. 4342-52.
447. Terrazas, M., et al., *Rational design of novel N-alkyl-N capped biostable RNA nanostructures for efficient long-term inhibition of gene expression*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(9): p. 4354-67.
448. Wheeler, L.A., et al., *Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(6): p. 2401-12.
449. Koralewska, N., et al., *How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing*. *Acta Biochim Pol*, 2016. **63**(4): p. 773-783.
450. Kurzynska-Kokorniak, A., et al., *A New Short Oligonucleotide-Based Strategy for the Precursor-Specific Regulation of microRNA Processing by Dicer*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77703.
451. Nakajima, D., et al., *Identification of three novel non-classical cadherin genes through comprehensive analysis of large cDNAs*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001. **94**(1-2): p. 85-95.
452. Roussigne, M., et al., *The THAP domain: a novel protein motif with similarity to the DNA-binding domain of P element transposase*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(2): p. 66-9.
453. Lesnik, E.A. and S.M. Freier, *What affects the effect of 2'-alkoxy modifications? 1. Stabilization effect of 2'-methoxy substitutions in uniformly modified DNA oligonucleotides*. *Biochemistry*, 1998. **37**(19): p. 6991-7.
454. Cummins, L.L., et al., *Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(11): p. 2019-24.
455. Majlessi, M., N.C. Nelson, and M.M. Becker, *Advantages of 2'-O-methyl oligoribonucleotide probes for detecting RNA targets*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(9): p. 2224-9.

456. Leuschner, P.J. and J. Martinez, *In vitro analysis of microRNA processing using recombinant Dicer and cytoplasmic extracts of HeLa cells*. *Methods*, 2007. **43**(2): p. 105-9.
457. Booy, E.P., et al., *The RNA helicase RHAU (DHX36) unwinds a G4-quadruplex in human telomerase RNA and promotes the formation of the P1 helix template boundary*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(9): p. 4110-24.
458. Malgowska, M., et al., *Overview of the RNA G-quadruplex structures*. *Acta Biochim Pol*, 2016. **63**(4): p. 609-621.
459. Liu, H., et al., *Quadruplex structures of RNA 14-mer, r(GGAGGUUUUGGAGG) and DNA 14-mer, d(GGAGGTTTTGGAGG)*. *Nucleic Acids Res Suppl*, 2002(2): p. 177-8.
460. Bardin, C. and J.L. Leroy, *The formation pathway of tetramolecular G-quadruplexes*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(2): p. 477-88.
461. Reddy, K., et al., *The disease-associated r(GGGGCC)<sub>n</sub> repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(14): p. 9860-6.
462. Fukunaga, R., et al., *Inorganic phosphate blocks binding of pre-miRNA to Dicer-2 via its PAZ domain*. *EMBO J*, 2014. **33**(4): p. 371-84.
463. Xu, W., et al., *Artificial small RNA for sequence specific cleavage of target RNA through RNase III endonuclease Dicer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(34): p. 54549-54554.
464. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science*, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
465. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
466. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
467. Gutschner, T., et al., *The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells*. *Cancer Res*, 2013. **73**(3): p. 1180-9.
468. Tano, K., et al., *MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(22): p. 4575-80.
469. Liu, J., et al., *MALAT1-mediated tumorigenesis*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017. **22**: p. 66-80.
470. Plante, I., et al., *Modulation of microRNA Activity by Semi-microRNAs*. *Front Genet*, 2012. **3**: p. 99.
471. Wang, Q., et al., *Identification and functional characterization of tRNA-derived RNA fragments (tRFs) in respiratory syncytial virus infection*. *Mol Ther*, 2013. **21**(2): p. 368-79.
472. Pircher, A., et al., *An mRNA-derived noncoding RNA targets and regulates the ribosome*. *Mol Cell*, 2014. **54**(1): p. 147-55.
473. Jackowiak, P., et al., *RNA degradome--its biogenesis and functions*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(17): p. 7361-70.
474. Huang, X., et al., *Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing*. *BMC Genomics*, 2013. **14**: p. 319.
475. Batagov, A.O. and I.V. Kurochkin, *Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions*. *Biol Direct*, 2013. **8**: p. 12.
476. van Balkom, B.W., et al., *Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting*. *J Extracell Vesicles*, 2015. **4**: p. 26760.

477. Vojtech, L., et al., *Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(11): p. 7290-304.
478. Dethoff, E.A., et al., *Functional complexity and regulation through RNA dynamics*. *Nature*, 2012. **482**(7385): p. 322-30.
479. Cromie, M.J., et al., *An RNA sensor for intracellular Mg(2+)*. *Cell*, 2006. **125**(1): p. 71-84.
480. Nechooshtan, G., et al., *A pH-responsive riboregulator*. *Genes Dev*, 2009. **23**(22): p. 2650-62.
481. Nocker, A., et al., *A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(23): p. 4800-7.
482. Johansson, J., et al., *An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in Listeria monocytogenes*. *Cell*, 2002. **110**(5): p. 551-61.
483. Falb, M., et al., *Structure of the K-turn U4 RNA: a combined NMR and SANS study*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(18): p. 6274-85.
484. Orr, J.W., P.J. Hagerman, and J.R. Williamson, *Protein and Mg(2+)-induced conformational changes in the S15 binding site of 16 S ribosomal RNA*. *J Mol Biol*, 1998. **275**(3): p. 453-64.
485. Puglisi, J.D., et al., *Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy*. *Science*, 1992. **257**(5066): p. 76-80.
486. Winkler, W., A. Nahvi, and R.R. Breaker, *Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression*. *Nature*, 2002. **419**(6910): p. 952-6.
487. Ke, A., et al., *A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis*. *Nature*, 2004. **429**(6988): p. 201-5.
488. Lamanna, A.C. and K. Karbstein, *An RNA conformational switch regulates pre-18S rRNA cleavage*. *J Mol Biol*, 2011. **405**(1): p. 3-17.
489. Lima, W.F., et al., *Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics*. *Biochemistry*, 1992. **31**(48): p. 12055-61.
490. Mir, K.U. and E.M. Southern, *Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays*. *Nat Biotechnol*, 1999. **17**(8): p. 788-92.
491. Walton, S.P., et al., *Thermodynamic and kinetic characterization of antisense oligodeoxynucleotide binding to a structured mRNA*. *Biophys J*, 2002. **82**(1 Pt 1): p. 366-77.
492. Herschlag, D., *RNA chaperones and the RNA folding problem*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(36): p. 20871-4.
493. Rajkowitsch, L., et al., *RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases*. *RNA Biol*, 2007. **4**(3): p. 118-30.
494. Lehner, B. and C.M. Sanderson, *A protein interaction framework for human mRNA degradation*. *Genome Res*, 2004. **14**(7): p. 1315-23.
495. Roy, R., et al., *hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(20): p. 12483-97.
496. Zhou, Z., et al., *Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome*. *Nature*, 2002. **419**(6903): p. 182-5.
497. Towbin, H., et al., *Systematic screens of proteins binding to synthetic microRNA precursors*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(3): p. e47.
498. Woolf, T.M., D.A. Melton, and C.G. Jennings, *Specificity of antisense oligonucleotides in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(16): p. 7305-9.
499. Janssen, H.L., et al., *Treatment of HCV infection by targeting microRNA*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(18): p. 1685-94.
500. Gebert, L.F., et al., *Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(1): p. 609-21.



501. Avitabile, C., et al., *Targeting pre-miRNA by peptide nucleic acids: a new strategy to interfere in the miRNA maturation*. *Artif DNA PNA XNA*, 2012. **3**(2): p. 88-96.
502. Straarup, E.M., et al., *Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(20): p. 7100-11.
503. Lanford, R.E., et al., *Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection*. *Science*, 2010. **327**(5962): p. 198-201.
504. Esau, C., et al., *miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting*. *Cell Metab*, 2006. **3**(2): p. 87-98.
505. Castoldi, M., et al., *The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(4): p. 1386-96.
506. Henke, J.I., et al., *microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA*. *EMBO J*, 2008. **27**(24): p. 3300-10.
507. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. *Science*, 2005. **309**(5740): p. 1577-81.
508. Stefani, G., et al., *A novel mechanism of LIN-28 regulation of let-7 microRNA expression revealed by in vivo HITS-CLIP in C. elegans*. *RNA*, 2015. **21**(5): p. 985-96.
509. Loughlin, F.E., et al., *Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(1): p. 84-9.
510. Kurreck, J., *Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(8): p. 1628-44.
511. Freier, S.M. and K.H. Altmann, *The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(22): p. 4429-43.
512. Shukla, S., C.S. Sumaria, and P.I. Pradeepkumar, *Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook*. *ChemMedChem*, 2010. **5**(3): p. 328-49.
513. Soifer, H.S., et al., *Silencing of gene expression by gymnotic delivery of antisense oligonucleotides*. *Methods Mol Biol*, 2011. **815**: p. 333-46.
514. Stein, C.A., et al., *Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(1): p. e3.
515. Wanrooij, P.H., et al., *G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(37): p. 16072-7.
516. Subramanian, M., et al., *G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting*. *EMBO Rep*, 2011. **12**(7): p. 697-704.
517. Ishiguro, A., et al., *TDP-43 binds and transports G-quadruplex-containing mRNAs into neurites for local translation*. *Genes Cells*, 2016. **21**(5): p. 466-81.
518. Schofield, J.P., J.L. Cowan, and M.J. Coldwell, *G-quadruplexes mediate local translation in neurons*. *Biochem Soc Trans*, 2015. **43**(3): p. 338-42.
519. Drepper, C. and M. Sendtner, *A new postal code for dendritic mRNA transport in neurons*. *EMBO Rep*, 2011. **12**(7): p. 614-6.
520. Beaudoin, J.D. and J.P. Perreault, *Exploring mRNA 3'-UTR G-quadruplexes: evidence of roles in both alternative polyadenylation and mRNA shortening*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(11): p. 5898-911.
521. Nielsen, F.C. and J. Christiansen, *Posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor II mRNA*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1995. **220**: p. 37-46.
522. Christiansen, J., M. Kofod, and F.C. Nielsen, *A guanosine quadruplex and two stable hairpins flank a major cleavage site in insulin-like growth factor II mRNA*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(25): p. 5709-16.

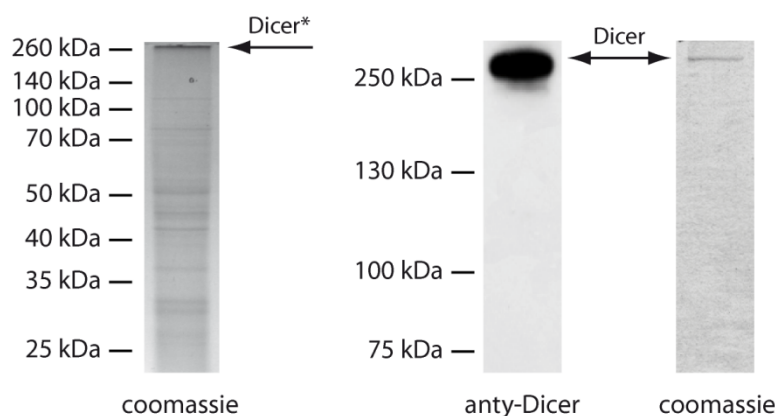
523. Decorsiere, A., et al., *Essential role for the interaction between hnRNP H/F and a G quadruplex in maintaining p53 pre-mRNA 3'-end processing and function during DNA damage*. *Genes Dev*, 2011. **25**(3): p. 220-5.
524. Gomez, D., et al., *Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(1): p. 371-9.
525. Marcel, V., et al., *G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms*. *Carcinogenesis*, 2011. **32**(3): p. 271-8.
526. Min, H., R.C. Chan, and D.L. Black, *The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event*. *Genes Dev*, 1995. **9**(21): p. 2659-71.
527. Ribeiro, M.M., et al., *G-quadruplex formation enhances splicing efficiency of PAX9 intron 1*. *Hum Genet*, 2015. **134**(1): p. 37-44.
528. Sirand-Pugnet, P., et al., *An intronic (A/U)GGG repeat enhances the splicing of an alternative intron of the chicken beta-tropomyosin pre-mRNA*. *Nucleic Acids Res*, 1995. **23**(17): p. 3501-7.
529. Agarwala, P., et al., *The G-quadruplex augments translation in the 5' untranslated region of transforming growth factor beta2*. *Biochemistry*, 2013. **52**(9): p. 1528-38.
530. Arora, A., et al., *Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif*. *RNA*, 2008. **14**(7): p. 1290-6.
531. Bolduc, F., et al., *Irregular G-quadruplexes Found in the Untranslated Regions of Human mRNAs Influence Translation*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(41): p. 21751-21760.
532. Gomez, D., et al., *A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(20): p. 7187-98.
533. Koukouraki, P. and E. Doxakis, *Constitutive translation of human alpha-synuclein is mediated by the 5'-untranslated region*. *Open Biol*, 2016. **6**(4): p. 160022.
534. Kumari, S., et al., *An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation*. *Nat Chem Biol*, 2007. **3**(4): p. 218-21.
535. Morris, M.J. and S. Basu, *An unusually stable G-quadruplex within the 5'-UTR of the MT3 matrix metalloproteinase mRNA represses translation in eukaryotic cells*. *Biochemistry*, 2009. **48**(23): p. 5313-9.
536. Morris, M.J., et al., *An RNA G-quadruplex is essential for cap-independent translation initiation in human VEGF IRES*. *J Am Chem Soc*, 2010. **132**(50): p. 17831-9.
537. Ofer, N., et al., *The quadruplex r(CG<sub>n</sub>) destabilizing cationic porphyrin TMPyP4 cooperates with hnRNPs to increase the translation efficiency of fragile X premutation mRNA*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(8): p. 2712-22.
538. Wolfe, A.L., et al., *RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer*. *Nature*, 2014. **513**(7516): p. 65-70.
539. Zhang, R., Y. Lin, and C.T. Zhang, *Greglist: a database listing potential G-quadruplex regulated genes*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(Database issue): p. D372-6.
540. Stefanovic, S., G.J. Bassell, and M.R. Mihailescu, *G quadruplex RNA structures in PSD-95 mRNA: potential regulators of miR-125a seed binding site accessibility*. *RNA*, 2015. **21**(1): p. 48-60.
541. Kobayashi, H., et al., *Expansion of intronic GGCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement*. *Am J Hum Genet*, 2011. **89**(1): p. 121-30.
542. Kwok, C.K., A.B. Sahakyan, and S. Balasubramanian, *Structural Analysis using SHALiPE to Reveal RNA G-Quadruplex Formation in Human Precursor MicroRNA*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016. **55**(31): p. 8958-61.
543. Pandey, S., et al., *The RNA Stem-Loop to G-Quadruplex Equilibrium Controls Mature MicroRNA Production inside the Cell*. *Biochemistry*, 2015. **54**(48): p. 7067-78.

544. Henn, A., et al., *Inhibition of dicing of guanosine-rich shRNAs by quadruplex-binding compounds*. *Chembiochem*, 2008. **9**(16): p. 2722-9.
545. Martadinata, H. and A.T. Phan, *Structure of propeller-type parallel-stranded RNA G-quadruplexes, formed by human telomeric RNA sequences in K<sup>+</sup> solution*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(7): p. 2570-8.
546. Martadinata, H. and A.T. Phan, *Formation of a stacked dimeric G-quadruplex containing bulges by the 5'-terminal region of human telomerase RNA (hTERC)*. *Biochemistry*, 2014. **53**(10): p. 1595-600.
547. Zhang, D.H., et al., *Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors*. *Biochemistry*, 2010. **49**(21): p. 4554-63.
548. Vondruskova, J., et al., *Role of loops in the guanine quadruplex formation by DNA/RNA hybrid analogs of G4T4G4*. *Int J Biol Macromol*, 2008. **43**(5): p. 463-7.
549. Cusanelli, E. and P. Chartrand, *Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity*. *Front Genet*, 2015. **6**: p. 143.
550. Peltier, H.J. and G.J. Latham, *Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues*. *RNA*, 2008. **14**(5): p. 844-52.
551. Miyoshi, D., T. Fujimoto, and N. Sugimoto, *Molecular crowding and hydration regulating of G-quadruplex formation*. *Top Curr Chem*, 2013. **330**: p. 87-110.
552. Zhang, Y., et al., *FMRP interacts with G-quadruplex structures in the 3'-UTR of its dendritic target Shank1 mRNA*. *RNA Biol*, 2014. **11**(11): p. 1364-74.
553. Stefanovic, S., et al., *Fragile X mental retardation protein interactions with a G quadruplex structure in the 3'-untranslated region of NR2B mRNA*. *Mol Biosyst*, 2015. **11**(12): p. 3222-30.
554. Blice-Baum, A.C. and M.R. Mihailescu, *Biophysical characterization of G-quadruplex forming FMR1 mRNA and of its interactions with different fragile X mental retardation protein isoforms*. *RNA*, 2014. **20**(1): p. 103-14.
555. Kruger, A.C., et al., *Interaction of hnRNP A1 with telomere DNA G-quadruplex structures studied at the single molecule level*. *Eur Biophys J*, 2010. **39**(9): p. 1343-50.
556. Enokizono, Y., et al., *Destruction of quadruplex by proteins, and its biological implications in replication and telomere maintenance*. *Nucleic Acids Res Suppl*, 2003(3): p. 231-2.
557. Hudson, J.S., et al., *Recognition and binding of human telomeric G-quadruplex DNA by unfolding protein 1*. *Biochemistry*, 2014. **53**(20): p. 3347-56.
558. Redon, S., I. Zemp, and J. Lingner, *A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hnRNPA1*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(19): p. 9117-28.
559. Muddashetty, R.S., et al., *Reversible inhibition of PSD-95 mRNA translation by miR-125a, FMRP phosphorylation, and mGluR signaling*. *Mol Cell*, 2011. **42**(5): p. 673-88.
560. Sutton, M.A. and E.M. Schuman, *Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory*. *Cell*, 2006. **127**(1): p. 49-58.
561. Hornberg, H. and C. Holt, *RNA-binding proteins and translational regulation in axons and growth cones*. *Front Neurosci*, 2013. **7**: p. 81.
562. Sellier, C., et al., *Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*. *Cell Rep*, 2013. **3**(3): p. 869-80.
563. Handa, V., T. Saha, and K. Usdin, *The fragile X syndrome repeats form RNA hairpins that do not activate the interferon-inducible protein kinase, PKR, but are cut by Dicer*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(21): p. 6243-8.

## IX ZAŁĄCZNIKI

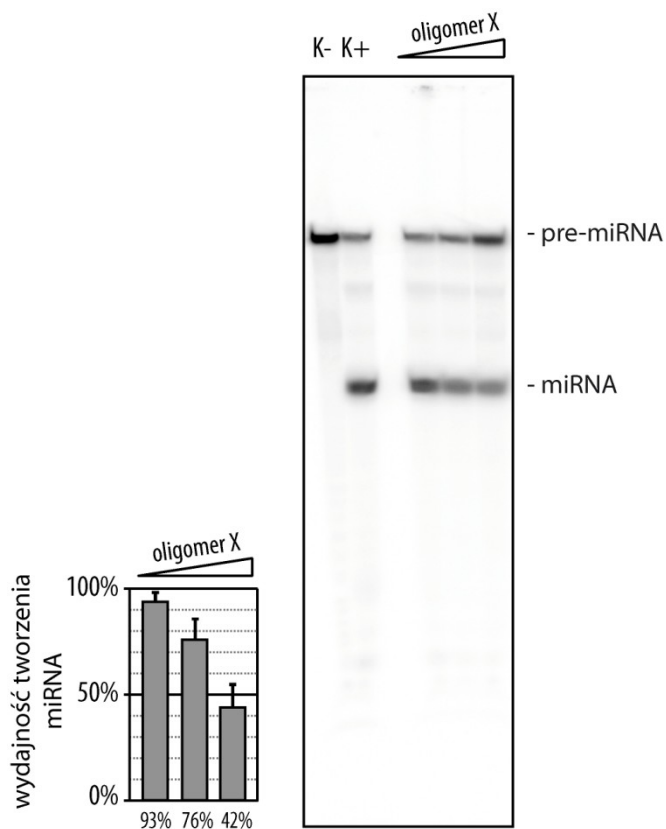
**Załącznik 1.** Plik tekstowy zawierający sekwencje 120 aptamerów wiążących Dicer (dostępny na płycie CD dołączonej do pracy).

**Załącznik 2.** Wynik analizy SDS-PAGE komercyjnie dostępnego preparatu Dicer (Dicer\*, *lewy panel coomasie*), oczyszczonego i zagęszczonego preparatu Dicer otrzymanego w systemie bakulowirusowy (Dicer, *prawy panel coomasie*), a także analizy tego ostatniego metodą immunodetekcji z wykorzystaniem przeciwciał anti-Dicer (*środkowy panel*). Schematycznie zaznaczono wzorce masy cząsteczek białek (kDa). Strzałkami wskazano pozycję prążków odpowiadających rybonukleazie Dicer.



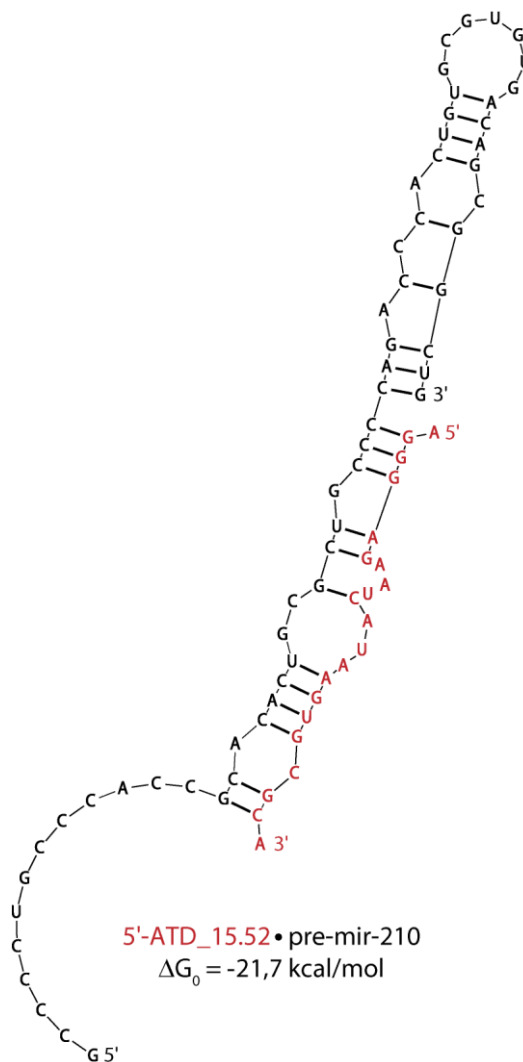
**Załącznik 3.** Przykładowy wynik analizy potencjału inhibitorowego oligomeru RNA w reakcjach z Dicer i znakowanym radioizotopowo pre-miRNA. Trójkątami oznaczono zmianę stężenia wskazanego oligomeru (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M). K(-) reakcja kontrolna bez Dicer i testowanego inhibitora; (K+) reakcja z Dicer, bez testowanego inhibitora. Zaznaczono pozycję prążków odpowiadających pre-miRNA i miRNA. Wykres przedstawia wartości wydajności tworzenia miRNA w reakcjach z testowanym inhibitorem, po normalizacji względem K+ (100%). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych w przynajmniej trzech niezależnych powtórzeniach eksperymentu.

Na autoradiogramach żeli nie obserwowano prążków świadczących o wtórnej degradacji RNA czy powstawaniu niespecyficznych produktów cięcia pre-miRNA przez Dicer, dlatego, zgodnie z konwencją stosowaną w dotychczasowych publikacjach, w rozprawie zdecydowano się prezentować jedynie fragmenty zdjęć obejmujące prążki odpowiadające pre-miRNA i miRNA

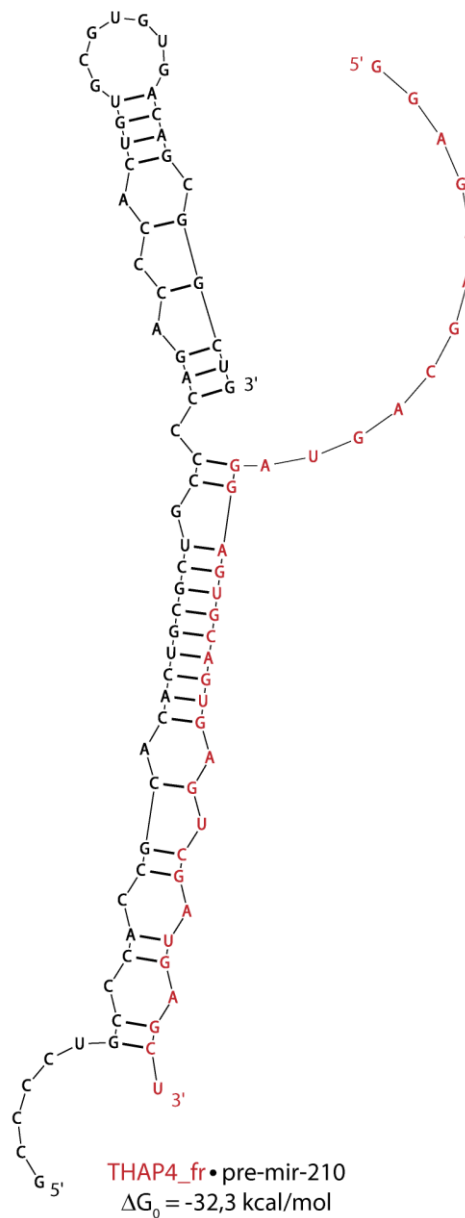
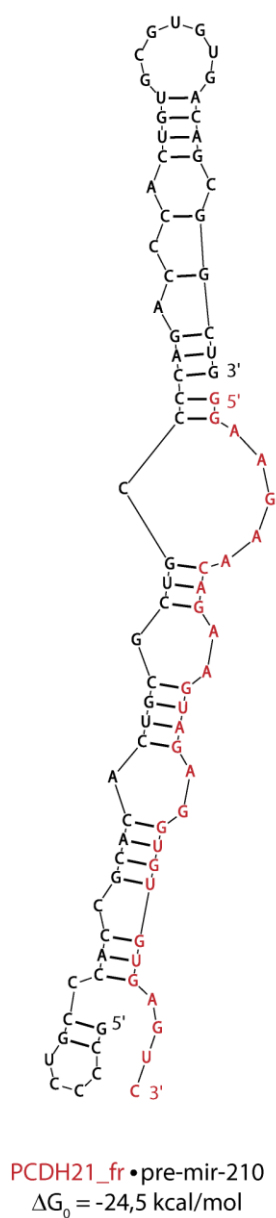


**Załącznik 4.** Tabela transkryptów o sekwencjach podobnych do wyselekcjonowanych wcześniej aptamerów (dostępny na płycie CD dołączonej do pracy).

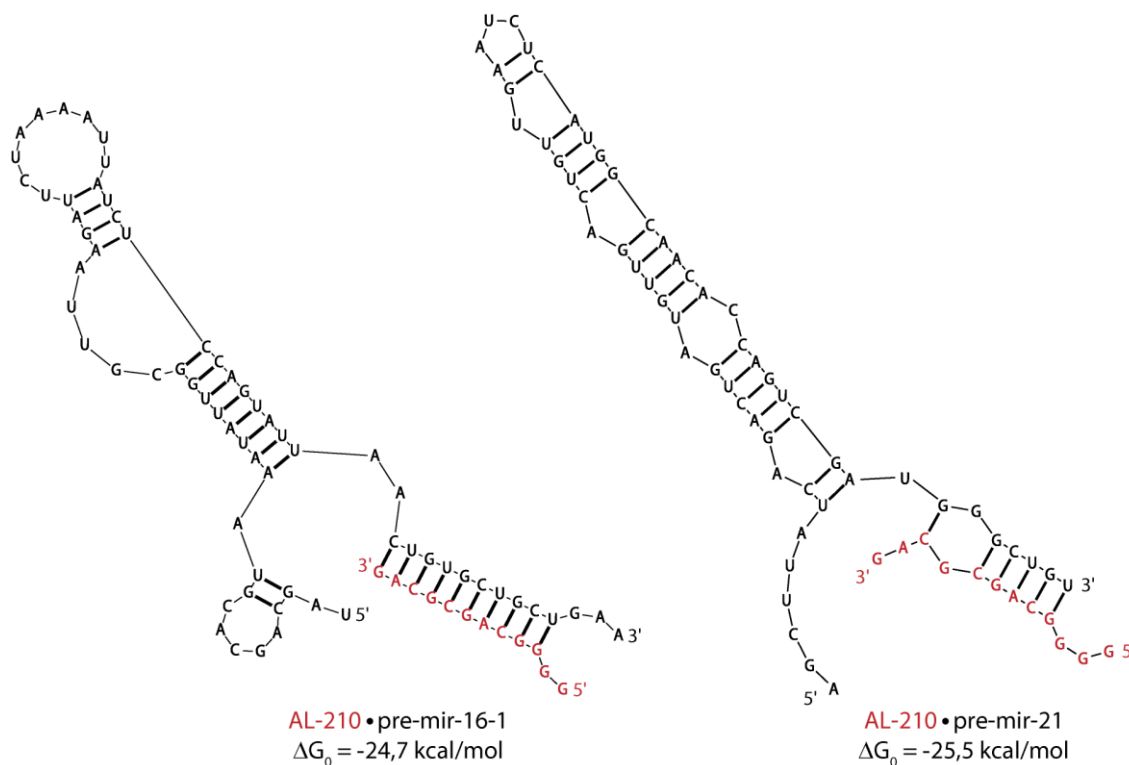
**Załącznik 5.** Struktura o najniższej energii swobodnej ( $\Delta G_0$ ) przewidziana w programie bifold dla heterodupleksu 5'-ATD\_15.52 i pre-mir-210.



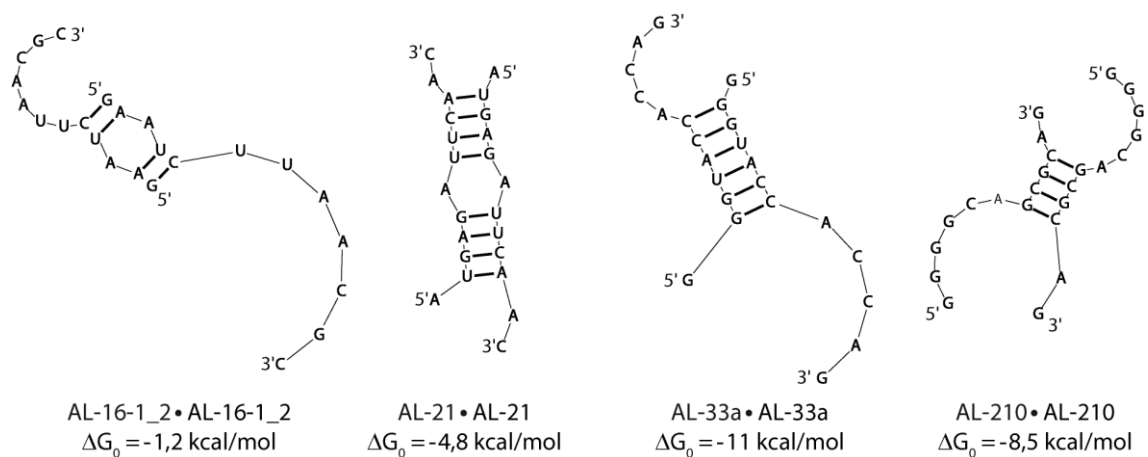
**Załącznik 6.** Struktury o najniższej energii swobodnej ( $\Delta G_0$ ) przewidziane przez program bifold dla heterodupleksów wskazanych oligomerów (PCDH21\_fr, THAP4\_fr) i pre-mir-210.



**Załącznik 7.** Struktury o najniższej energii swobodnej ( $\Delta G_0$ ) przewidziane w programie bifold dla heterodupleksów AL-210 i wskazanych pre-miRNA (pre-mir-16-1, pre-mir-21).



**Załącznik 8.** Struktury o najniższej energii swobodnej ( $\Delta G_0$ ) przewidziane w programie bifold dla homodupleksów wskazanych 12-merów (AL).

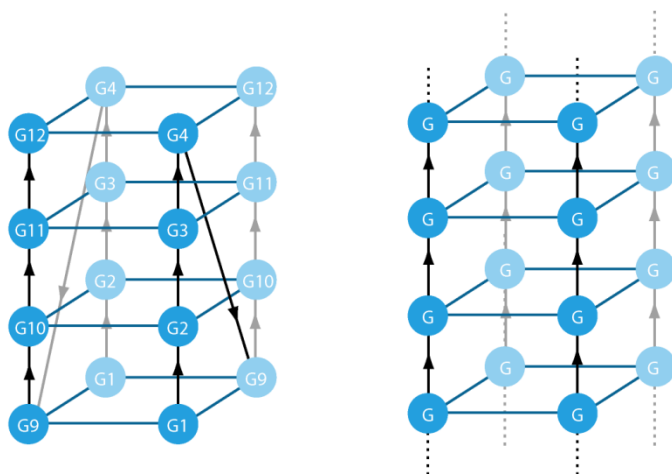




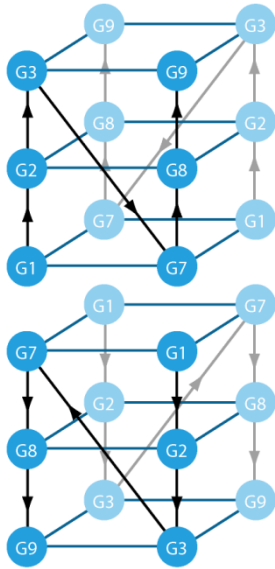
**Załącznik 9.** Tabela prezentująca podstawowe informacje dotyczące oligomerów o strukturze G-kwadrupleksów wykorzystanych w badaniach regulacji aktywności Dicer. Poniżej przedstawiono schematyczne reprezentacje struktury wskazanych oligomerów.

nazwa oligomeru	długość	nr dostępu PDB	budowa G-kwadrupleksu	ref.
G4U4G4	12 nt	-	dwu- lub czterocząsteczkowy, w zależności od warunków środowiska	[548]
TER10	10 nt	2M18	dwucząsteczkowy, dimeryzujący	[545]
TER12	12 nt	2KBP	dwucząsteczkowy	[545]
TER18	18 nt	-	jednocząsteczkowy, dimeryzujący	[546]
TER18-2A	20 nt	-	jednocząsteczkowy	[546]
TER22	22 nt	-	jednocząsteczkowy	[547]

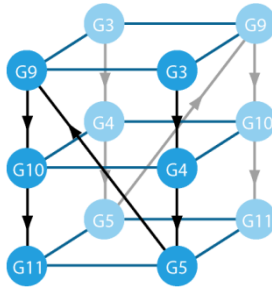
### G4U4G4



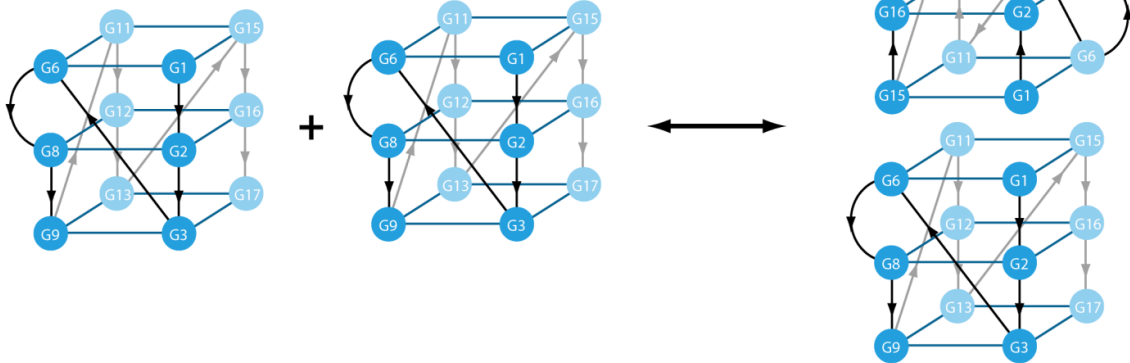
**TER10**



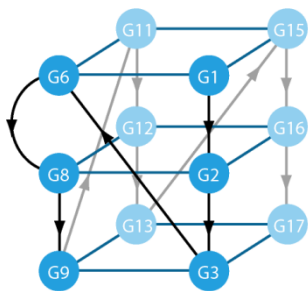
**TER12**



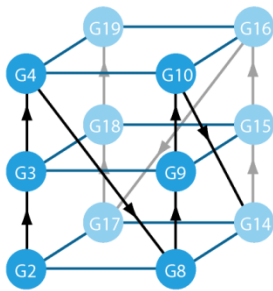
**TER18**



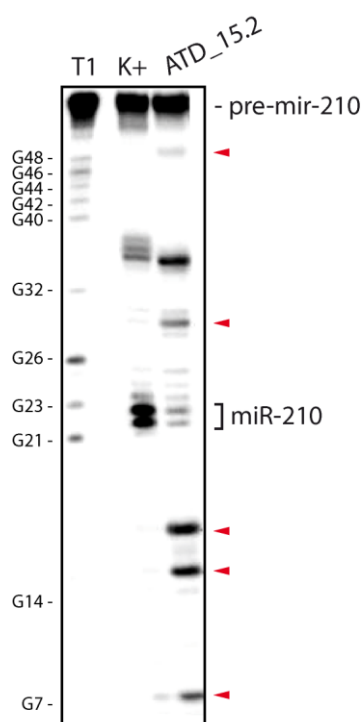
**TER18-2A**



**TER22**



**Załącznik 10.** Przykład ilustrujący model inhibicji powstawania miRNA, zgodnie z którym spadek poziomu dojrzałego miRNA wynika ze zmiany wzoru cięcia przez Dicer prekursora tego miRNA. Odmienny wzór cięcia spowodowany jest zmianą struktury prekursora, do której dochodzi w następstwie hybrydyzacji komplementarnego oligomeru RNA. Autoradiogram przedstawia wynik analizy produktów reakcji cięcia pre-mir-210 przez Dicer. Przed zainicjowaniem reakcji, pre-mir-210 wyznakowany radioizotopowo na końcu 5' inkubowano z komplementarnym aptamerem (ATD\_15.2). (K+) – reakcja kontrolna z Dicer, bez aptameru. (T1) – drabinka T1 służąca jako wzorzec długości RNA, wskazanym na zdjęciu prążkom przypisano odpowiadające im miejsca hydrolizy w obrębie pre-miRNA (G1-G48). Zaznaczono prążki odpowiadające pre-mir-210 i miR-210. Na czerwono wskazano prążki odpowiadające produktom powstającym w wyniku zmiany wzoru cięcia pre-mir-210 przez Dicer w reakcjach z ATD\_15.2.



---

## X DOROBEK NAUKOWY

### Publikacje

1. **Koralewska N**, Hoffmann W, Pokornowska M, Milewski M, Lipinska A, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M, Kurzynska-Kokorniak A. *How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing.* Acta Biochim Pol. 2016; 63 (4), 773-783. doi: 10.18388/abp.2016\_1339.
2. Kurzynska-Kokorniak A, Pokornowska M, **Koralewska N**, Hoffmann W, Bienkowska-Szewczyk K, Figlerowicz M. *Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro.* Sci Rep. 2016; 6:23989. doi: 10.1038/srep23989.
3. Tworak A, Urbanowicz A, Podkowinski J, Kurzynska-Kokorniak A, **Koralewska N**, Figlerowicz M. *Six Medicago truncatula Dicer-like protein genes are expressed in plant cells and upregulated in nodules.* Plant Cell Rep. 2016; 35(5):1043-52. doi: 10.1007/s00299-016-1936-8.
4. Kurzynska-Kokorniak A, **Koralewska N**, Pokornowska M, Urbanowicz A, Tworak A, Mickiewicz A, Figlerowicz M. *The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities.* Nucleic Acids Res. 2015; 43(9):4365-80. doi: 10.1093/nar/gkv328.
5. Kurzynska-Kokorniak A, **Koralewska N**, Tyczewska A, Twardowski T, Figlerowicz M. *A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by Dicer.* PLoS One. 2013; 8(10):e77703. doi: 10.1371/journal.pone.0077703.
6. Tyczewska A, Kurzyńska-Kokorniak A, **Koralewska N**, Szopa A, Kietrys AM, Wrzesiński J, Twardowski T, Figlerowicz M. *Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro.* Nucleic Acid Ther. 2011; 21(5):333-46. doi: 10.1089/nat.2011.0304.

### Patenty

1. Figlerowicz M., Tworak A., Podkowiński J., **Koralewska N.**, Kurzyńska-Kokorniak A.: „*Peptide with the enzymatic activity of a Dicer-like protein, a method for preparing short RNA molecules, and use thereof*”, 2012, PCT/PL2012/000049.

### Zgłoszenia patentowe

1. Kurzyńska-Kokorniak A., Figlerowicz M., **Koralewska N.**, Tyczewska A., Twardowski T., zgłoszenie w Europejskim Urzędzie Patentowym: „*An RNA oligomer, methods for regulating a microRNA production proces and RNA oligomers used as microRNA production proces regulators*”, 2013, PCT/PL2013/000024.
2. Kurzyńska-Kokorniak A., Figlerowicz M., **Koralewska N.**, Tyczewska A., Twardowski T., zgłoszenie w Urzędzie Patentowym RP: „*Oligomer RNA, sposób regulowania procesu powstawania miRNA oraz zastosowanie oligomerów RNA jako regulatorów powstawania miRNA*”, 2012, P-398 211.
3. Figlerowicz M., Tworak A., Podkowiński J., **Koralewska N.**, Kurzyńska-Kokorniak A.; zgłoszenie w Urzędzie Patentowym RP: „*Peptyd o aktywności enzymatycznej białka typu Dicer, sposób otrzymywania krótkich cząsteczek RNA oraz jego zastosowanie*”, 2011, P-395 495.

## XI FINANSOWANIE



Projekt „*Apta-miRs: novel strategy for controlling miRNA's biogenesis and functioning*” realizowany dzięki wsparciu Unii Europejskiej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013.



Projekt „*Ochrona patentowa oligomerów RNA regulujących biogenezę i funkcjonowanie mikroRNA*” realizowany dzięki wsparciu Unii Europejskiej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013.



Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący

Poznańskie  
Konsorcjum  
RNA



Praca realizowana dzięki wsparciu Polskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu KNOW.