



**Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii**

Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

---

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

---

***mgr Weronika Hoffmann***

**Analiza funkcji i biogenezy wybranych mikroRNA  
wirusa pseudowścieklizny (PRV)**

**Analysis of the functions and biogenesis of selected  
microRNAs of pseudorabies virus (PRV)**

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie biotechnologia

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk

Promotor pomocniczy: dr hab. Anna Kurzyńska-Kokorniak, prof. IChB PAN

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2024



*Chciałabym złożyć serdeczne podziękowania wszystkim osobom,  
które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy:*

*Prof. Krystynie Bieńkowskiej-Szewczyk za kierownictwo naukowe,  
życzliwość, cenne rady i sugestie.*

*Prof. Annie Kurzyńskiej-Kokorniak za doradztwo naukowe, owocne  
dyskusje i wszelką pomoc.*

*Dr hab. Andrei Lipińskiej za opiekę merytoryczną, pomoc w zakresie  
technik eksperymentach i nieocenione wsparcie.*

*Koleżankom i Kolegom z Instytutu Biotechnologii UG-GUMed i  
Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN za sympatyczną atmosferę  
pracy i okazaną pomoc.*

*Rodzinie i Przyjaciołom za wsparcie, zainteresowanie oraz  
motywację.*



# Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów .....	4
<b>1. Streszczenie.....</b>	<b>9</b>
1.1. Streszczenie w języku polskim.....	9
1.2. Abstract.....	11
<b>2. Wstęp.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. mikroRNA - modulatory potranskrypcyjnej ekspresji genów .....</b>	<b>13</b>
2.1.1. Rybonukleaza Dicer .....	13
2.1.2. Biogeneza miRNA .....	17
2.1.3. Mechanizmy działania miRNA .....	21
2.1.4. Metody badania miRNA .....	24
2.1.5. Biologiczne funkcje miRNA .....	29
<b>2.2. Wirus pseudowścieklizny jako przedstawiciel alfaherpeswirusów .....</b>	<b>31</b>
2.2.1. Patogeneza i eradykacja PRV .....	32
2.2.2. PRV jako model do badań <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	33
2.2.3. Struktura wirionu i organizacja genomu PRV .....	34
2.2.4. Cykl replikacyjny PRV .....	36
2.2.5. Biologiczne funkcje miRNA PRV.....	41
<b>3. Cel pracy.....</b>	<b>44</b>
<b>4. Wyniki.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Przygotowanie i charakterystyka preparatu rekombinowanej hDicer .....</b>	<b>45</b>
4.1.1. Ekspresja rekombinowanych genów kodujących rybonukleazę hDicer .....	45
4.1.2. Produkcja i oczyszczanie preparatu hDicer .....	49
4.1.3. Analiza aktywności rekombinowanej hDicer .....	54
<b>4.2. Analiza roli miRNA PRV w infekcji komórek świńskich .....</b>	<b>60</b>
4.2.1. Konstrukcja linii komórkowej stabilnie produkującej miRNA PRV .....	61
4.2.2. Charakterystyka linii ST_LLT[1-3].....	63
4.2.3. Profile ekspresji miRNA LLT-[1-3] podczas infekcji komórek wirusem PRV .....	65
4.2.4. Analiza oddziaływania miRNA LLT[1-3] na poziom transaktywatorów PRV .....	66
4.2.5. Badanie wpływu miRNA LLT[1-3] na glikoproteinę gE PRV .....	69
4.2.6. Analiza potencjału regulatorowego miRNA LLT[1-3] wobec replikacji PRV .....	71
<b>4.3. Wykorzystanie inhibitorów do badań nad biogenezą i rolą miRNA PRV .....</b>	<b>74</b>
4.3.1. Analiza potencjału inhibitorowego wybranych oligomerów wobec cięcia syntetycznych prekursorów wirusowych miRNA w warunkach <i>in vitro</i> .....	74
4.3.1.1. Analiza przetwarzania syntetycznych prekursorów miRNA PRV w układzie <i>in vitro</i> .....	75
4.3.1.2. Badanie wpływu oligomerów 2'-O-metylowanych i Morpholino na proces cięcia wirusowych pre-miRNA przez Dicer .....	78
4.3.2. Wykorzystanie inhibitorów do badań nad funkcją miRNA PRV w systemie komórkowym.....	88
4.3.2.1. Analiza potencjału oligomerów 2'-O-metylowanych i Morpholino do hamowania cięcia pre- miRNA PRV w komórkach linii ST_LLT[1-3] .....	88
4.3.2.2. Badania nad rolą miRNA wirusa PRV z wykorzystaniem inhibitorów typu AMO .....	94
<b>Podsumowanie wyników.....</b>	<b>99</b>
<b>5. Dyskusja .....</b>	<b>100</b>

5.1. Biologiczne znaczenie miRNA z klastra LLT[1-3] PRV .....	100
5.2. Produkcja, analiza i wykorzystanie preparatu hDicer .....	108
5.3. Analiza potencjału inhibitorowego oligomerów AMO i Morpholino w systemie komórkowym oraz badania efektu fenotypowego .....	115
<b>6. Wnioski .....</b>	<b>127</b>
<b>7. Metody .....</b>	<b>128</b>
<b>7.1. Techniki pracy z DNA .....</b>	<b>128</b>
7.1.1. Przygotowanie komórek kompetentnych .....	128
7.1.2. Transformacja komórek kompetentnych .....	128
7.1.3. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym .....	128
7.1.4. Izolacja DNA na kolumnkach .....	128
7.1.5. Klonowanie .....	129
7.1.6. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) .....	129
7.1.7. Analiza ilościowa i jakościowa DNA .....	129
<b>7.2. Techniki pracy z komórkami owadzimi i bakulowirusami.....</b>	<b>129</b>
7.2.1. Hodowla komórek owadzych .....	129
7.2.2. Otrzymywanie rekombinantów bakulowirusowych (system Bac-to-Bac) .....	130
7.2.2.1. Transpozycja miejscowo-specyficzna .....	130
7.2.2.2. Transfekcja komórek owadzych .....	131
7.2.2.3. Namnażanie bakulowirusów .....	131
7.2.3. Miareczkowanie bakulowirusów za pomocą komórek Sf9 ET .....	131
7.2.4. Produkcja białek w komórkach owadzych .....	132
<b>7.3. Techniki pracy z komórkami ssaczymi i wirusem PRV .....</b>	<b>132</b>
7.3.1. Hodowla komórek ssaczycy .....	132
7.3.2. Namnażanie i miareczkowanie wirusa PRV .....	133
7.3.3. Izolacja DNA wirusowego z supernatantu .....	133
7.3.4. Konstrukcja linii komórkowych stabilnie ekspresujących miRNA PRV .....	133
7.3.4.1. Otrzymywanie rekombinowanych retrowirusów .....	134
7.3.4.2. Transdukcja komórek docelowych .....	134
7.3.4.3. Sortowanie komórek .....	134
7.3.5. Infekcja wirusowa .....	135
7.3.6. Pomiar wielkości łysek PRV .....	135
7.3.8. Przygotowanie frakcji cytoplazmatycznych zawierających sDicer .....	136
7.3.9. Transfekcja .....	136
7.3.10. Test żywotności komórek .....	136
<b>7.4. Techniki pracy z białkami .....</b>	<b>136</b>
7.4.1. Przygotowania lizatów komórkowych .....	136
7.4.2. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w obecności SDS (SDS-PAGE) .....	137
7.4.3. Barwienie żeli poliakrylamidowych roztworem Coomassie .....	137
7.4.4. Elektrotransfer białek z żelu na błonę PVDF .....	137
7.4.5. Western blotting .....	137
7.4.6. Test IPMA na komórkach owadzych .....	138
7.4.7. Barwienie immunofluorescencyjne .....	138
7.4.8. Cytometria przepływowa .....	139
7.4.9. Chromatografia powinowactwa IMAC .....	139
7.4.10. Chromatografia jonowymienna IEC .....	139
7.4.11. Zagęszczanie preparatów białkowych .....	140

<b>7.5. Techniki pracy z RNA.....</b>	<b>140</b>
7.5.1. Izolacja frakcji całkowitego RNA .....	140
7.5.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji .....	141
7.5.3. Ilościowa reakcja PCR .....	141
7.5.4. Znakowanie radioizotopowe prekursorów miRNA PRV .....	141
7.5.4.1. Znakowanie końca 5' .....	142
7.5.4.2. Znakowanie końca 3' .....	142
7.5.5. Oczyszczanie RNA wyznakowanego radioizotopowo .....	142
7.5.6. Elektroforeza RNA w żelach PAA w warunkach denaturujących .....	142
7.5.7. Badanie oddziaływań RNA – RNA .....	143
7.5.8. Elektroforeza RNA w żelach PAA w warunkach natywnych .....	143
7.5.9. Cięcie RNA przez Dicer.....	143
7.5.10. Ocena potencjału inhibitorowego oligomerów .....	144
7.5.11. Analiza statystyczna.....	144
<b>8. Materiały.....</b>	<b>145</b>
8.1. Szczepy bakteryjne .....	145
8.2. Odczynniki do hodowli bakteryjnych .....	145
8.3. Linie komórek eukariotycznych .....	145
8.4. Odczynniki do pracy z komórkami eukariotycznymi .....	146
8.5. Wirusy .....	147
8.6. Plazmidy .....	147
8.7. Przeciwciała .....	148
8.8. Startery .....	148
8.9. Materiały do pracy z DNA.....	149
8.10. Materiały do pracy z białkami .....	150
8.11. Materiały do pracy z RNA .....	150
8.12. Oligomery .....	151
8.13. Żele poliakrylamidowe .....	151
8.14. Bufory i roztwory .....	152
8.15. Odczynniki chemiczne i inne materiały .....	154
8.16. Aparatura specjalistyczna.....	155
<b>9. Załączniki.....</b>	<b>156</b>
<b>10. Bibliografia .....</b>	<b>159</b>
<b>Dorobek naukowy .....</b>	<b>177</b>

## Wykaz stosowanych skrótów

<b>2'OMe</b>	oligorybonukleotydy 2'- <i>O</i> -metylowane
<b>28S</b>	gen kodujący podjednostkę 28S rRNA, służący jako gen referencyjny w reakcji qPCR
<b><sup>32</sup>P</b>	radioizotop fosforu, znacznik promieniotwórczy
<b>3p</b>	oznaczenie mówiące o pochodzeniu dojrzałego miRNA z ramienia 3' pre-miRNA
<b>5p</b>	oznaczenie mówiące o pochodzeniu dojrzałego miRNA z ramienia 5' pre-miRNA
<b>A</b>	nukleotyd adeninowy
<b>aa</b>	aminokwasy (ang. <i>amino acids</i> )
<b>AAV</b>	wirusy związane z adenowirusami (ang. <i>adeno-associated viruses</i> )
<b>AcMNPV</b>	wirus poliedrozy jądrowej <i>Autographa californica</i> (ang. <i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i> )
<b>ADAR1</b>	deaminaza adenozyliny działająca na RNA 1 (ang. <i>adenosine deaminase actin on RNA-1</i> )
<b>APS</b>	nadsiarczan amonu (ang. <i>ammonium persulfate</i> )
<b>ATP</b>	trójfosforan adenozyliny (ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i> )
<b>AGO</b>	białka z rodziny Argonaute (ang. <i>Argonaute protein</i> )
<b>AMO</b>	oligonukleotydy antysensowne wobec miRNA (ang. <i>antisense miRNA oligonucleotides</i> )
<b>ang.</b>	z języka angielskiego
<b>Bac</b>	rekombinowany bakulowirus (ang. <i>baculovirus</i> )
<b>BART</b>	transkrypt lncRNA wirusa EBV (ang. <i>BamHI A rightward transcript</i> )
<b>BHV-1</b>	bydlęcy herpeswirus 1 (ang. <i>bovine herpesvirus 1</i> )
<b>Bim</b>	proapoptotyczne białko wirusa EBV (ang. <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i> )
<b>BSA</b>	albumina surowicy bydlęcej (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
<b>C</b>	nukleotyd cytozynowy
<b>Cas9</b>	związana z CRISPR endonukleaza 9 (ang. <i>CRISPR associated protein 9</i> )
<b>CCR4-(NOT)</b>	kompleks o aktywności hamującej translację (ang. <i>carbon catabolite repressor 4 – negative regulator of transcription</i> )
<b>CD4</b>	koreceptor receptora limfocytów T pomocniczych (ang. <i>cluster of differentiation 4</i> )
<b>cDNA</b>	DNA komplementarny do RNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
<b>cpm</b>	zliczenia na milion (ang. <i>counts per million</i> )
<b>CRISPR</b>	zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromiczne (ang. <i>clustered regularly-interspaced short palindromic repeats</i> )
<b>Ct</b>	liczba cykli wymaganych aby sygnał fluorescencyjny przekroczył poziom tła podczas reakcji qPCR (ang. <i>cycle threshold</i> )
<b>DCL</b>	roślinne białka podobne do Dicer (ang. <i>Dicer-like proteins</i> )
<b>DDX6</b>	helikaza o aktywności hamującej translację (ang. <i>DEAD-box helicase 6</i> )
<b>DExD/H-box</b>	motyw strukturalny charakterystyczny dla RNA helikaz DExD/H-box
<b>DGCR8</b>	białko wchodzące w skład kompleksu Mikroprocesora (ang. <i>DiGeorge syndrome critical region gene</i> )
<b>DIVA</b>	strategia rozróżniania zwierząt zaszczepionych od zakażonych (ang. <i>differentiating infected from vaccinated animals</i> )
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
<b>dNTPs</b>	deoksynukleotydy (ang. <i>deoxynucleotide triphosphate</i> )
<b>dsDNA</b>	dwuniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>double-stranded DNA</i> )
<b>dsRBD</b>	domena wiążąca dsRNA (ang. <i>dsRNA binding domain</i> )
<b>dsRBP</b>	białko wiążące dsRNA (ang. <i>dsRNA binding protein</i> )
<b>dsRNA</b>	dwuniciowy RNA (ang. <i>double-stranded RNA</i> )
<b>DUF283</b>	domena Dicer o nieznannej funkcji (ang. <i>domain of unknown function 283</i> )



<b>E</b>	geny wczesne (ang. <i>early genes</i> )
<b>EBV</b>	wirus Epsteina-Barr (ang. <i>Epstein-Barr virus</i> )
<b>ECL</b>	chemiluminescencja (ang. <i>enhanced chemiluminescence</i> )
<b>EDTA</b>	kwasy etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EE</b>	wczesne endosomy (ang. <i>early endosomes</i> )
<b>EHV-1 i -4</b>	końskie herpeswirusy 1 i 4 (ang. <i>equine herpesvirus</i> )
<b>EIC</b>	chromatografia jonowymienna (ang. <i>ion exchange chromatography</i> )
<b>eIF</b>	czynniki inicjacji translacji (ang. <i>eukaryotic initiation factor</i> )
<b>EMSA</b>	metoda różnicowanej migracji w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>electrophoretic mobility shift assay</i> )
<b>EPO</b>	produkt genu E, transaktywator PRV (ang. <i>early protein 0</i> )
<b>ER</b>	reticulum endoplazmatyczne (ang. <i>endoplasmic reticulum</i> )
<b>Exp-5</b>	eksportyna 5 (ang. <i>exportin 5</i> )
<b>F</b>	starter początkowy (ang. <i>forward</i> )
<b>FBS</b>	płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>G</b>	nukleotyd guaninowy
<b>gag</b>	retrowirusowy gen kodujący strukturalną poliproteinę rdzenia (ang. <i>group antigens</i> )
<b>gE</b>	glikoproteina E (ang. <i>glycoprotein E</i> )
<b>GFP (eGFP)</b>	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i> )
<b>GOF</b>	badania w których podnosi się poziom analizowanego czynnika (ang. <i>gain-of-function</i> )
<b>GTP</b>	trójfosforan guanozyny (ang. <i>guanosine-5'-triphosphate</i> )
<b>GW182</b>	rodzina białek o aktywności hamującej translację, zawierających dużo powtórzeń glicyna (G)/tryptofan (W), (ang. <i>glycine-tryptophan protein of 182 kDa</i> )
<b>HCMV</b>	ludzki wirus cytomegalii (ang. <i>human cytomegalovirus</i> )
<b>HCV</b>	wirus zapalenia wątroby typu C (ang. <i>hepatitis C virus</i> )
<b>hDicer</b>	ludzka rybonukleaza Dicer (ang. <i>human Dicer</i> )
<b>hDicerC</b>	preparat hDicer zawierającej His <sub>6</sub> -tag na C-końcu
<b>hDicerN</b>	preparat hDicer zawierającej His <sub>6</sub> -tag na N-końcu
<b>HeLa</b>	linia komórkowa pochodząca z ludzkiego raka szyjki macicy
<b>His<sub>6</sub>-tag</b>	znacznik histydynowy 6xHis
<b>HIV</b>	ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i> )
<b>hpi</b>	liczba godzin po infekcji (ang. <i>hours post infection</i> )
<b>hpt</b>	liczba godzin po transfekcji (ang. <i>hours post transfection</i> )
<b>HRP</b>	peroksydaza chrzanowa (ang. <i>horsereadish peroxidase</i> )
<b>hsa</b>	pochodzenia ludzkiego (łac. <i>Homo sapiens</i> )
<b>HSV-1 i -2</b>	wirusy opryszczki pospolitej 1 i 2 (ang. <i>herpes simplex virus</i> )
<b>ICP0 i 4</b>	transaktywatory HSV-1 (ang. <i>infected cell protein</i> )
<b>ICTV</b>	Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
<b>IE</b>	geny natychmiastowo-wczesne (ang. <i>immediate-early genes</i> )
<b>IE180</b>	produkt genu IE, jedyny natychmiastowo-wczesny transaktywator PRV
<b>IFN</b>	interferon
<b>IMAC</b>	chromatografia powinowactwowa (ang. <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> )
<b>IPMA</b>	detekcja białek <i>in situ</i> w hodowlach jednowarstwowych komórek ssaczy i owadów (ang. <i>immunoperoxidase monolayer assay</i> )
<b>IR</b>	sekwencja wewnętrznych powtórzeń w genomie PRV (ang. <i>internal repeat</i> )
<b>IRES</b>	wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. <i>internal ribosome entry site</i> )
<b>K<sub>d</sub></b>	stała dysocjacji (ang. <i>dissociation constant</i> )
<b>kDa</b>	jednostka masy cząsteczek (w tysiącach Daltonów, ang. <i>kiloDaltons</i> )
<b>kpz</b>	liczba tysięcy par zasad

<b>KSHV</b>	wirus mięsaka Kaposi'ego (ang. <i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i> )
<b>kz</b>	liczba tysięcy zasad
<b>L</b>	geny późne (ang. <i>late genes</i> )
<b>LAP1</b>	główny promotor genu LAT (ang. <i>latency-associated promoter 1</i> )
<b>LAT</b>	transkrypt związany z latencją (ang. <i>latency associated transcript</i> )
<b>LLT</b>	długi transkrypt związany z latencją (ang. <i>Large Latency Transcript</i> )
<b>LLT[1-3]</b>	klaster zawierający trzy frontalne miRNA zlokalizowane w intronie LLT
<b>LLT1</b>	prv-miR-LLT1-3p
<b>LLT2</b>	prv-miR-LLT2-5p
<b>LLT3</b>	prv-miR-LLT3-3p
<b>LLT7</b>	prv-miR-LLT7-5p
<b>LLT11</b>	prv-miR-LLT11a
<b>LNA</b>	nukleotydy o usztywnionej strukturze (ang. <i>locked nucleic acid</i> )
<b>lncRNA</b>	długi niekodujący RNA (ang. <i>long non-coding RNA</i> )
<b>LOF</b>	badania w których obniża się ilość analizowanego czynnika (ang. <i>loss-of-function</i> )
<b>LTR</b>	długie terminalne powtórzenia identycznych sekwencji DNA lub RNA (ang. <i>long terminal repeats</i> )
<b>łac.</b>	z łaciny
<b>MHV-68</b>	mysi gammaherpeswirus 68 (ang. <i>murine gammaherpesvirus-68</i> )
<b>MICB</b>	indukowany stresem ligand dla limfocytów NK (ang. <i>MHC class I polypeptide-related sequence B</i> )
<b>MJS</b>	ludzkie komórki czerniaka
<b>mRNA</b>	RNA informacyjny (ang. <i>messenger RNA</i> )
<b>MHC I</b>	główny układ zgodności tkankowej klasy I (ang. <i>major histocompatibility complex class I</i> )
<b>miRISC</b>	kompleks wyciszający indukowany przez miRNA (ang. <i>miRNA induced silencing complex</i> )
<b>miRNA, miR</b>	mikroRNA (ang. <i>microRNA</i> )
<b>miRNA-seq</b>	sekwencjonowanie miRNA (ang. <i>microRNA sequencing</i> )
<b>ML</b>	algorytmy uczenia maszynowego (ang. <i>machine learning</i> )
<b>MMLV</b>	wirus mysiej białaczki Moloney'a (ang. <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> )
<b>MO</b>	oligonukleotydy Morpholino
<b>MOI</b>	współczynnik wielokrotności infekcji, liczba wirionów przypadająca na jedną komórkę (ang. <i>multiplicity of infection</i> )
<b>MRE</b>	element odpowiedzi na miRNA (ang. <i>miRNA response elements</i> )
<b>MT</b>	mikrotulube (ang. <i>microtubules</i> )
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazol
<b>mV</b>	oligonukleotydy <i>mirVana</i>
<b>ncRNA</b>	niekodujący RNA (ang. <i>non-coding RNA</i> )
<b>Neuro-2a</b>	linia mysich komórek neuroblastomu
<b>NGS</b>	sekwencjonowanie nowej generacji (ang. <i>next-generation sequencing</i> )
<b>Ni-NTA</b>	złóżo niklowe wykorzystywane w IMAC
<b>NIA-3</b>	dziki szczep PRV (ang. <i>Northern Ireland Aujeszky-3</i> )
<b>NK</b>	limfocyty cytotoksyczne, element wrodzonego układu odpornościowego (ang. <i>natural killer</i> )
<b>NP</b>	pory jądrowe (ang. <i>nuclear pores</i> )
<b>nt</b>	nukleotyd (ang. <i>nucleotide</i> )
<b>OB fold</b>	motyw wiążący oligonukleotydy/ oligosacharydy (ang. <i>oligonucleotide/ oligosaccharide binding fold</i> )
<b>ORF</b>	otwarta ramka odczytu (ang. <i>open reading frame</i> )
<b>OVs</b>	wirusy onkolityczne (ang. <i>oncolytic viruses</i> )
<b>Q HP</b>	anionit, złóżo wykorzystywane do EIC
<b>qPCR</b>	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )

<b>p</b>	określa wartość istotności statystycznej
<b>P1</b>	pierwsze pokolenie rekombinowanych bakulowirusów, zebrane po transfekcji komórek Sf9 za pomocą rekombinowanego bakmidu
<b>P2, P3</b>	kolejne pokolenia rekombinowanych bakulowirusów
<b>PAA</b>	poliakrylamid (ang. <i>polyacrylamide</i> )
<b>PABPC</b>	białko wiążące poliadenylan (ang. <i>poly(A) binding protein cytoplasmic</i> )
<b>PACT</b>	proteinowy aktywator kinazy proteinowej R (ang. <i>protein activator of protein kinase R</i> )
<b>PAGE</b>	poliakrylamidowa elektroforeza żelowa (ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>PAM</b>	motyw sąsiadujący z protoprzerywnikiem (ang. <i>protospacer adjacent motif</i> )
<b>PAN</b>	nukleaza poli(A), (ang. <i>poly(A) nuclease</i> )
<b>PAZ</b>	domena Piwi, Argonaute i Zwillie
<b>PBS</b>	bufor fosforanowy (ang. <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PBS-T</b>	bufor fosforanowy z Tween 20
<b>pfu</b>	jednostka tworząca łysinę (ang. <i>plaque forming unit</i> )
<b>pl</b>	punkt izoelektryczny (ang. <i>isoelectric point</i> )
<b>piRNA</b>	RNA oddziałujący z białkami Piwi (ang. <i>PIWI-interacting RNA</i> )
<b>PK-15</b>	linia komórek nabłonkowych nerki świni 15 (ang. <i>porcine kidney 15</i> )
<b>pLZRS</b>	wektor retrowirusowy zawierający sekwencje pochodzące z mysiego retrowirusa białaczki Moloney'a
<b>PMS</b>	fenantazynometasulfonian (ang. <i>phenazine methosulfate</i> )
<b>PPC</b>	kaseta obejmująca domeny Dicer: Platformę, PAZ, helisę łączącą (ang. <i>Platform-PAZ-Connector helix cassette</i> )
<b>pre-miRNA</b>	prekursor miRNA (ang. <i>precursor miRNA</i> )
<b>pre-siRNA</b>	prekursor siRNA (ang. <i>precursor siRNA</i> )
<b>pri-miRNA</b>	pierwotny transkrypt miRNA (ang. <i>primary miRNA transcript</i> )
<b>ProtK</b>	proteinaza K (ang. <i>proteinase K</i> )
<b>PRV</b>	wirus pseudowścieklizny (ang. <i>pseudorabies virus</i> )
<b>PVDF</b>	polifluorek winylidenu (ang. <i>polyvinylidene fluoride</i> )
<b>pz</b>	pary zasad
<b>R</b>	starter końcowy (ang. <i>reverse</i> )
<b>Ran</b>	enzymy katalizujący hydrolizę GTP (ang. <i>Ras-related nuclear protein</i> )
<b>RES</b>	retrowirusowy system ekspresji genów (ang. <i>retroviral expression system</i> )
<b>RFP</b>	białko czerwonej fluorescencji (ang. <i>red fluorescence protein</i> )
<b>RIG-I</b>	motyw strukturalny charakterystyczny dla helikaz z rodziny RIG-I
<b>RISC</b>	kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. <i>RNA induced silencing complex</i> )
<b>RLC</b>	kompleks ładujący RISC (ang. <i>RISC-loading complex</i> )
<b>RNAi</b>	interferencja RNA (ang. <i>RNA interference</i> )
<b>RNaza</b>	rybonukleaza (ang. <i>ribonuclease</i> )
<b>rpm</b>	liczba obrotów na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i> )
<b>rRNA</b>	rybosomalny RNA (ang. <i>ribosomal RNA</i> )
<b>RT</b>	reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. <i>reverse transcription</i> )
<b>Ryc.</b>	rycina
<b>sDicer</b>	świńska rybonukleaza Dicer (ang. <i>swine Dicer</i> )
<b>SDS</b>	sól sodowa siarczanu dodecyłu (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	elektroforeza poliakryloamidowa w warunkach redukujących (ang. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SEC</b>	chromatografia żelowa (wykluczania, ang. <i>size exclusion chromatography</i> )
<b>Sf9</b>	owadzia linia komórkowa pochodząca z jajnika ćmy <i>Spodoptera frugiperda</i>
<b>SHV-1</b>	świński herpeswirus 1 (ang. <i>suid herpesvirus 1</i> ), inna nazwa PRV
<b>siRNA</b>	mały interferencyjny RNA (ang. <i>small interfering RNA</i> )

<b>SLA-1</b>	świński antygen zgodności tkankowej (ang. <i>swine leukocyte antigen class I</i> )
<b>sncRNA</b>	mały niekodujący RNA (ang. <i>small non-coding RNA</i> )
<b>snoRNA</b>	mały jąderkowy RNA (ang. <i>small nucleolar RNA</i> )
<b>snRNA</b>	mały jądrowy RNA (ang. <i>small nuclear RNA</i> )
<b>sRNA</b>	mały RNA (ang. <i>small RNA</i> )
<b>srRNA</b>	mały regulatorowy RNA (ang. <i>small regulatory RNA</i> )
<b>ssDNA</b>	jednoniciowy DNA (ang. <i>single-stranded DNA</i> )
<b>ssRNA</b>	jednoniciowy RNA (ang. <i>single-stranded RNA</i> )
<b>ST</b>	linia komórkowa jądra świni (ang. <i>swine testicle</i> )
<b>T</b>	nukleotyd tymidynowy
<b>Tab.</b>	tabela
<b>TAE</b>	bufor Tris-octan-EDTA (ang. <i>tris-acetate-EDTA buffer</i> )
<b>TAP</b>	transporter związany z przetwarzaniem antygenów (ang. <i>transporter associated with antigen processing</i> )
<b>TBE</b>	bufor Tris-boran-EDTA (ang. <i>tris-borate-EDTA buffer</i> )
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (ang. <i>tetramethylethylenediamine</i> )
<b>TGN</b>	część trans aparatu Golgiego (ang. <i>trans-Golgi network</i> )
<b>TR</b>	sekwencja zewnętrznych powtórzeń w genomie PRV (ang. <i>terminal repeat</i> )
<b>tRNA</b>	transportujący RNA (ang. <i>transfer RNA</i> )
<b>TRBP</b>	białko wchodzące w skład kompleksu RISC (ang. <i>trans-activation response RNA-binding protein</i> )
<b>TSS-miRNAs</b>	miRNA pochodzące z miejsc startu transkrypcji genów kodujących białka (ang. <i>transcriptional start site miRNAs</i> )
<b>U</b>	rybonukleotyd urydynowy
<b>U6</b>	snRNA, komponent spliceosomu
<b>U<sub>L</sub></b>	unikalny długi region kodujący w genomie PRV (ang. <i>unique long segment</i> )
<b>U<sub>s</sub></b>	unikalny krótki region kodujący w genomie PRV (ang. <i>unique short segment</i> )
<b>US8</b>	gen kodujący gE (ang. <i>unique short 8</i> )
<b>UTR</b>	regiony mRNA niepodlegające translacji (ang. <i>untranslated region</i> )
<b>VP16</b>	białko tegumentu aktywujące transkrypcję genów IE (ang. <i>viral protein 16</i> )
<b>VP26</b>	małe białko kapsydowe alfaherpeswirusów (ang. <i>viral protein 26</i> )
<b>VZV</b>	wirus ospy wietrznej i półpaśca (ang. <i>varicella-zoster virus</i> )
<b>WT</b>	typu dzikiego, niezmodyfikowany (ang. <i>wild type</i> )
<b>XRN1</b>	5'-3' egzorybonukleaza 1 (ang. <i>exoribonuclease 1</i> )
<b>ΔCt</b>	różnica w wartościach Ct między analizowanym genem a genem referencyjnym w jednej próbce
<b>ΔΔCt</b>	różnica pomiędzy wartościami ΔCt między badaną próbką a próbką kontrolną, pozwala na wyliczenie względnych poziomów ekspresji analizowanych genów
<b>Ψ</b>	sygnał pakujący mysiego retrowirusa białaczki Moloney'a

# 1. Streszczenie

## 1.1. Streszczenie w języku polskim

MikroRNA (miRNA) są krótkimi, niekodującymi cząsteczkami RNA, działającymi jako potranskrypcyjne regulatory ekspresji genów. Poprzez wiązanie do sekwencji docelowych transkryptów, miRNA kierują je do degradacji lub hamują translację kodowanych przez nie białek. Biogeneza miRNA jest procesem ściśle kontrolowanym, w którym fundamentalną rolę odgrywa rybonukleaza Dicer, wycinająca dojrzałe miRNA z ich prekursorów (pre-miRNA) o strukturze szpilki do włosów.

Wirusowe miRNA są uznawane za jedne z kluczowych regulatorów oddziaływań pomiędzy wirusem a komórką gospodarza, modulując takie procesy jak replikacja wirusów, przeciwwirusowa odpowiedź immunologiczna, latencja wirusowa (stan utajenia) i patogenezę. Od ponad dekady regularnie wzrasta liczba doniesień na temat identyfikacji kolejnych miRNA kodowanych w genomach alfaherpeswirusów, w tym w genomie wirusa pseudowścieklizny (ang. *pseudorabies virus*, PRV), będącego patogenem świń oraz modelem do badań nad biologią herpeswirusów. PRV koduje jedenaście odrębnych miRNA zgrupowanych w intronie transkryptu związanego z latencją (ang. *Large Latency Transcript*, LLT), jednak ich rola w cyklu replikacyjnym wirusa nie została do tej pory wyczerpująco zbadana.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było bardziej dokładne scharakteryzowanie funkcji trzech pierwszych miRNA zlokalizowanych w intronie LLT PRV. Praca badawcza została podzielona na dwie części – analizę wpływu klastra grupującego trzy miRNA (LLT[1-3]) na przebieg infekcji oraz badania nad selektywną regulacją wycinania miRNA z klastra LLT[1-3], prowadzone za pomocą inhibitorów w celu obserwacji efektu fenotypowego związanego z utratą funkcji danego miRNA.

W pierwszej części projektu skonstruowałam linię komórek jąder świńskich (ST) z konstytutywną ekspresją wirusowych miRNA, nazwaną ST\_LL[1-3]. Korzystając z systemu hodowli komórkowej, zapewniającego stabilną produkcję heterologicznych miRNA na wysokim poziomie dowiodłam, że klaster miRNA LLT[1-3] reguluje poziom aktywności produkcyjnej infekcji i glikoproteiny gE we wczesnych stadiach infekcji PRV. Analiza kinetyki wzrostu wirusa w linii ST\_LL[1-3] wskazała na potencjał analizowanego klastra miRNA do regulowania procesu infekcji poprzez subtelne zakłócanie zdolności wirusa do transmisji i proliferacji.

Druga część mojego projektu doktorskiego była związana z badaniami nad inhibicją aktywności Dicer i kontrolą biogenezy miRNA PRV, prowadzonymi za pomocą oligomerów o potencjale inhibitorowym wobec cięcia prekursorów miRNA. Wstępna część pracy dotyczyła opracowania systemu produkcji i oczyszczania rekombinowanej rybonukleazy Dicer w systemie bakulowirusowym.

Analiza biochemiczna uzyskanego preparatu wykazała jego silną i wysoce specyficzną aktywność, a także potwierdziła jego wysoki stopień jednorodności. Wymienione właściwości pozwoliły na wykorzystanie preparatu Dicer, m.in., do badań nad oddziaływaniami tej rybonukleazy z inhibitorami RNA różnej długości, co przetożyło się na lepsze zrozumienie mechanizmów regulacji aktywności Dicer.

Badania nad regulacją dojrzewania miRNA PRV były prowadzone za pomocą dwóch rodzajów inhibitorów biogenezy miRNA: oligonukleotydów 2'-O-metylowanych, zaprojektowanych w programie EvOligo, oraz komercyjnie dostępnych oligomerów Morpholino. Analiza ich aktywności w warunkach *in vitro* wykazała, że oba rodzaje oligomerów wydajnie hamowały przetwarzanie syntetycznych pre-miRNA PRV przeprowadzane przez Dicer. Kolejnym krokiem było zbadanie aktywności oligomerów 2'-O-metylowanych i Morpholino w układzie komórkowym. Wstępne wyniki doświadczeń nad potencjałem regulatorowym ww. inhibitorów wprowadzonych do komórek linii ST\_LLT[1-3] wykazały jednak, że hamowały one wycinanie miRNA PRV w sposób nieselektywny, co uniemożliwiło ich wykorzystanie do bardziej szczegółowych doświadczeń badających rolę poszczególnych miRNA z klastra LLT[1-3]. W celu potwierdzenia funkcji wybranego miRNA w komórkach zainfekowanych wirusem PRV potrzebne są dalsze optymalizacje warunków pracy z inhibitorami biogenezy miRNA. Niewykluczone, że modyfikacja modelu badawczego ułatwiłaby obserwację efektu fenotypowego związanego ze spadkiem poziomu wybranego miRNA.

Podsumowując, przeprowadzone badania przyczyniły się do dokładniejszego poznania funkcji miRNA w biologii wirusa PRV oraz poszerzyły wiedzę dotyczącą możliwości wykorzystania inhibitorów biogenezy miRNA w układzie komórkowym.

## 1.2. Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that act as post-transcriptional regulators of gene expression. Through their interactions with target transcripts, miRNAs direct them for degradation or inhibit the translation of the encoded proteins. The biogenesis of miRNAs is a tightly controlled process wherein the ribonuclease Dicer plays a fundamental role, cleaving mature miRNAs from their hairpin precursors (pre-miRNAs).

Viral miRNAs have been identified as a class of crucial regulators of virus-host crosstalk, modulating processes such as viral replication, antiviral immune response, viral latency, and pathogenesis. For over a decade, there has been a steady increase in the number of reports on the identification of other miRNAs encoded in the genomes of alphaherpesviruses, including pseudorabies virus (PRV), which is a swine pathogen and a model for research on herpesvirus biology. PRV encodes eleven distinct miRNAs clustered within an intron of a Large Latency Transcript (LLT), but their role in the viral replication cycle has not been thoroughly investigated.

This PhD thesis aimed to provide a more detailed characteristic of the functions of the first three miRNAs located within the LLT intron of PRV. The research was divided into two parts: an analysis of the impact of the miRNA cluster (LLT[1-3]) on the course of infection and studies on the selective regulation of LLT[1-3] miRNA biogenesis using inhibitors to observe the resultant phenotypic effects associated with the loss of specific miRNA function.

In the first part of the project, I generated a research model based on the constitutive expression of viral miRNAs in swine testis cell line, named ST\_LL[1-3]. Using a cell culture system providing a stable production of heterologous miRNAs at high levels, I demonstrated that the LLT[1-3] miRNA cluster downregulated viral transactivators and the glycoprotein gE at the early stages of PRV infection. Analysis of the viral growth kinetics in the ST\_LL[1-3] cell line indicated the potential of the analyzed miRNA cluster to regulate the infection process by slight distortion in transmission and proliferation abilities.

The second part of my PhD project was related to research on the suppression of Dicer activity and the control of PRV miRNA biogenesis by employing oligomers with inhibitory capabilities. The initial part of the work concerned the development of a production and purification system for recombinant Dicer ribonuclease using a baculovirus expression system. The biochemical examination of the obtained Dicer preparation demonstrated its strong and highly specific activity and also confirmed its high degree of homogeneity. The aforementioned properties allowed the use of Dicer preparation, among others, for research concerning the interactions of this ribonuclease with RNA inhibitors of various lengths, consequently enhancing our comprehension of the mechanisms governing Dicer activity.

Research on the regulation of PRV miRNA maturation was conducted using two types of miRNA biogenesis inhibitors: 2'-*O*-methylated oligonucleotides designed in the EvOligo software, and commercially available Morpholino oligomers. *In vitro* analysis of their activity showed that both types of oligomers efficiently inhibited the processing of synthetic PRV pre-miRNAs carried out by Dicer. The next step involved examining the activity of 2'-*O*-methylated and Morpholino oligomers in a cellular system. However, preliminary results of experiments investigating the regulatory potential of the aforementioned inhibitors introduced into ST\_LL1[1-3] cells indicated that they inhibited PRV miRNA maturation in a non-selective manner, which precludes their utilization in more detailed experiments exploring the role of individual miRNAs from the LL1[1-3] cluster. To confirm the involvement of the selected miRNA in PRV-infected cells, additional optimization of the working conditions using miRNA biogenesis inhibitors is required. Modifying the experimental model could potentially facilitate the observation of the phenotypic effect linked to the reduction in the selected miRNA level.

Overall, the conducted research has contributed to a better understanding of the function of miRNAs in PRV biology and has expanded knowledge regarding the potential use of inhibitors of miRNA maturation in a cellular system.



## 2. Wstęp

### 2.1. mikroRNA - modulatory potranskrypcyjnej ekspresji genów

„Centralny dogmat biologii molekularnej”, sformułowany w latach '50. XX wieku, przypisywał RNA rolę jedynie pośrednika w przepływie informacji między materiałem generycznym – DNA, a produktem końcowym – białkiem [Crick 1958]. Dokonane na przestrzeni ostatnich 30 lat odkrycia i postępy w badaniach nad niekodującymi RNA (ncRNA, ang. *non-coding RNA*) zasadniczo zrewolucjonizowały krajobraz naukowy, doprowadzając do innego spojrzenia na cząsteczki RNA i ich biologiczne funkcje, w tym istotną rolę RNA w regulacji ekspresji genów. Odkrycie zjawiska interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*), czyli konserwowanego ewolucyjnie mechanizmu hamowania ekspresji genów przez dwuniciowy RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*) [Fire i in. 1998] było momentem przełomowym, inicjującym prowadzenie badań nad regulacyjną funkcją kwasów rybonukleinowych na szeroką skalę. Czynnikiem efektorowym systemu RNAi są małe regulatorowe RNA (srRNA, ang. *small regulatory RNA*), działające jako specyficzne sondy kierujące swoich partnerów białkowych do docelowych transkryptów, co skutkuje regulacją ich ekspresji [Fjose i in., 2001, Agrawal i in. 2003]. Zidentyfikowano kilka klas srRNA, z których w organizmach zwierzęcych najpowszechniej występują mikroRNA (miRNA, miR, ang. *microRNA*), małe interferencyjne RNA (siRNA, ang. *small interfering RNA*) oraz RNA oddziałujące z białkami Piwi (piRNA, ang. *PIWI-interacting RNA*) [Ghildiyal i in. 2009]. Spośród wymienionych klas srRNA, miRNA przeważają w komórkach somatycznych ssaków, w tym człowieka. miRNA reprezentują grupę jednoniciowych RNA (ssRNA, ang. *single-stranded RNA*) o długości ok. 21-23 nukleotydów. Biogeneza tych regulatorów jest kilkietapowym procesem, w którym rybonukleaza Dicer odgrywa istotną rolę poprzez wycinanie dojrzałych miRNA z ich prekursorów [Grishok i in. 2001, Hutvagner i in. 2001].

#### 2.1.1. Rybonukleaza Dicer

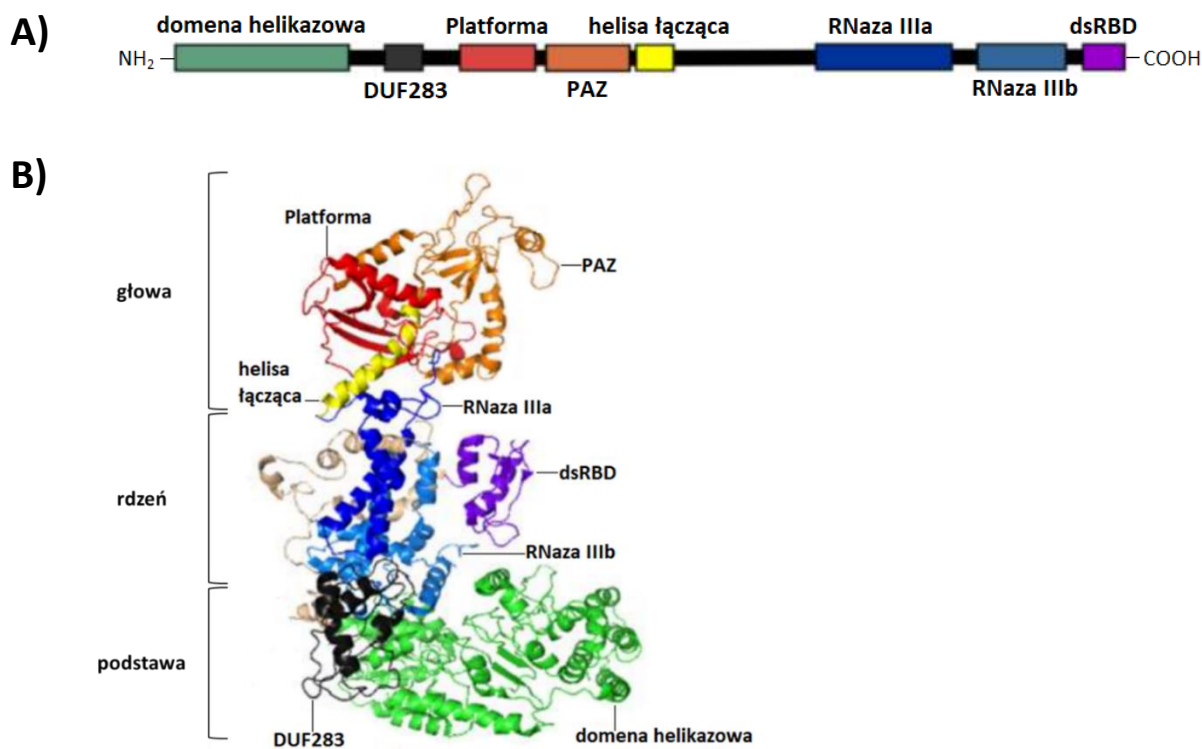
Dicer jest endonukleazą przypisywaną do rodziny rybonukleaz III (RNaz III), przycinających dwuniciowy RNA do krótkich dupleksów RNA [Bernstein i in. 2001] posiadających grupę fosforanową na końcach 5' oraz dwa niesparowane nukleotydy i reszty hydroksylowe na końcach 3' [Zhang i in. 2004]. Najlepiej poznaną funkcją Dicer jest jej udział w procesie biogenezy cząsteczek miRNA oraz siRNA. Dupleksy zawierające miRNA lub siRNA są przekazywane do kompleksu wyciszającego indukowanego przez RNA (RISC, ang. *RNA induced silencing complex*), będącego kompleksem efektorowym ścieżki RNAi. Dicer występuje głównie w cytoplazmie, gdzie wiąże prekursor miRNA (pre-miRNA, ang. *precursor miRNA*) oraz siRNA (pre-siRNA, ang. *precursor siRNA*) [Ketting 2011, Zhang i in. 2021 a]. Rybonukleaza Dicer została wykryta również w jądrze komórkowym, gdzie

uczestniczy, m.in., w transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów oraz degradacji potencjalnie niebezpiecznych transkryptów ruchomych elementów genetycznych [Kaneko i in. 2011].

Centrum katalityczne RNaz III jest tworzone przez dimer domen RNazowych, każda z domen hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w obrębie jednej z nici dupletu RNA, w sposób niezależny od siebie. Aktywność cięcia RNA domen RNazy III jest zależna od jonów  $Mg^{2+}$ . Enzymy z rodziny RNaz III występują u bakterii, bakteriofagów oraz eukariontów i dzieli się je na cztery ewolucyjnie konserwowane klasy. Klasa I RNaz III, obejmuje enzymy zawierające jedną domenę RNazy III oraz jedną domenę wiążącą dsRNA (dsRBD, ang. *dsRNA binding domain*) i występuje u bakterii, fagów i niższych eukariontów [Sun i in. 2005]. Wyższe eukarionty zawierają RNazy III klasy II, III i IV, które pojawiły się u nich prawdopodobnie w wyniku endosymbiozy pierwotnych komórek eukariotycznych z bakteriami i wyewoluowały poprzez dobór kolejnych domen w celu pełnienia coraz bardziej wyspecjalizowanych funkcji [Nicholson 2014]. W rybonukleazach III klasy II można zaobserwować wprowadzenie N-terminalnej domeny umożliwiającej homodimeryzację. Enzymy te biorą udział przede wszystkim w obróbce prekursorów rybosomalnego RNA (rRNA, ang. *ribosomal RNA*), małego jądrowego RNA (snRNA, ang. *small nuclear RNA*) i małego jąderkowego RNA (snoRNA, ang. *small nucleolar RNA*). Bardziej ewolucyjnie rozwinięte enzymy posiadają już dwie domeny RNazowe, tworzące wewnątrzcząsteczkowy dimer katalityczny, dzięki czemu mogą one funkcjonować w formie monomeru [Nicholson 2014]. Klasycznym przykładem RNazy III klasy III jest Drosha, a klasy IV Dicer.

Niemal wszystkie eukarionty posiadają jedną lub więcej rybonukleaz typu Dicer. Jeden gen kodujący Dicer występuje u kręgowców i nicieni, u owadów występują dwa, a u roślin co najmniej cztery geny kodujące białka podobne do Dicer (DCL, ang. *Dicer-like proteins*). Gen *DICER1* kodujący ludzką rybonukleazę Dicer (hDicer, ang. *human Dicer*) jest położony na długim ramieniu chromosomu 14. i jest uznawany za gen metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gene*). Gen kodujący hDicer składa się z 29 egzonów; podstawowy transkrypt genu *DICER1* zawiera relatywnie długi rejon niepodlegający translacji 3'UTR (ang. *untranslated region*), zbudowany z ponad 4000 nt [Martello i in. 2010]. Produkt białkowy składa się z 1922 reszt aminokwasowych, a jego masa molekularna wynosi ok. 220 kDa.

hDicer jest zbudowana, zaczynając od końca aminowego, z domeny helikazowej, domeny DUF283 (ang. *domain of unknown function*), domen: Platformy, PAZ (ang. *Piwi, Argonaute and Zwillie proteins*) i helisy łączącej, razem tworzących kasetę PPC (ang. *Platform – PAZ – Connector helix cassette*), dwóch domen RNazowych (RIIIa i RIIIb) oraz domeny wiążącej dwuniciowy RNA (dsRBD, ang. *dsRNA binding domain*) [Zhang i in. 2004] (**Ryc. 2.1.A**). Struktura trzeciorzędowa hDicer, podobnie jak Dicer innych kręgowców, kształtem przypomina literę „L” (**Ryc. 2.1.B**). W przestrzennej architekturze hDicer można wydzielić trzy rejony strukturalne: głowę (kasetę PPC), rdzeń (RNazy III) oraz podstawę białka (domena helikazy i DUF283) [Liu i in. 2018].



**Ryc. 2.1. Schemat budowy ludzkiej rybonukleazy Dicer. A)** Ułożenie domen w strukturze I-rzędowej hDicer. **B)** Struktura 3D hDicer. Na podstawie [Szczepańska i in. 2021].

### Domena helikazowa

Domena helikazowa jest uznawana za jedną z najsilniej konserwowanych ewolucyjnie domen w rybonukleazach typu Dicer. Domena helikazowa hDicer składa się trzech subdomen, w obrębie których występuje charakterystyczny motyw DExD/H-box (ang. *DExD/H-box helicase*) oraz motyw helikazowy obecny w receptorach typu RIG-I (ang. *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*) [Liu i in. 2018]. Motyw DExD/H-box jest charakterystyczny dla helikaz rozplatających duplekisy RNA lub DNA w sposób zależny od hydrolizy ATP, a motyw RIG-I odpowiada za translokację białka wzdłuż kwasów nukleinowych, również zależną od hydrolizy ATP [Byrd i in. 2012]. Jednak sama obecność ww. motywów nie przekłada się na aktywność rozplatania czy translokacji – u hDicer nie zaobserwowano jak dotąd wymienionych wyżej aktywności. Ponadto uważa się, że aktywność domen helikazowych u kręgowców nie jest zależna od ATP [Zhang i in. 2002]. Dane strukturalne wskazują, że domena helikazowa hDicer wchodzi w interakcję z pętlą apikalną pre-miRNA, dzięki czemu hDicer jest w stanie odróżnić substraty pre-miRNA od pre-siRNA (pre-siRNA nie posiadają pętli apikalnej i występują w formie dsRNA) [Lee i in. 2023]. Przyjmuje się, że dzięki obecności domeny helikazowej hDicer wydajniej tnie pre-miRNA niż pre-siRNA – mutant Dicer, który nie posiada tej domeny, cechuje

się większą wydajnością cięcia pre-siRNA [Kennedy i in. 2015]. Dodatkowo, domena helikazowa służy jako platforma wiążąca partnerów białkowych hDicer, jak białko TRBP i PACT [Ciechanowska i in. 2021].

### Domena DUF283

Funkcje domeny DUF283 wciąż pozostają słabo poznane. Pomimo strukturalnych podobieństw do domen wiążących dsRNA (motyw  $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ ), badania prowadzone w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk (IChB PAN) nie wykazały aktywności wiązania dsRNA ani dsDNA, przez DUF283 hDicer [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2016]; potwierdzono natomiast oddziaływanie tej domeny z ssRNA i ssDNA. Dalsze badania prowadzone w IChB PAN wykazały, że DUF283 wspiera parowanie komplementarnych kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acid annealing activity*). Zauważono także, że dzięki obecności domeny DUF283, hDicer może wspierać hybrydyzację między krótkimi RNA (typu miRNA i siRNA), a komplementarnymi sekwencjami obecnymi w docelowych RNA [Pokornowska i in. 2020, Szczepańska i in. 2021]. Wiadomo także, że mutant hDicer pozbawiony domeny DUF283 cechuje się silniejszym wiązaniem, ale mniejszą wydajnością cięcia dsRNA, choć właściwości te nie zostały potwierdzone w przypadku pre-miRNA [Ma i in. 2008]. Domena ta jest również istotna dla oddziaływania hDicer z białkiem ADAR1 (ang. *adenosine deaminase actin on RNA-1*), stymulującym hDicer do cięcia pre-miRNA oraz do transferu miRNA do białka AGO [Ota i in. 2013].

### Kaseta PPC

Kaseta PPC, na którą składają się domeny PAZ, Platformy oraz helisa łącząca, odpowiada za rozpoznawanie i wiązanie kanonicznych substratów Dicer, tj. pre-miRNA i dsRNA. Rejon ten zawiera dwie kieszenie wiążące: kieszeń 3' oraz kieszeń 5'. Kieszeń 3' znajduje się w obrębie domeny PAZ i zawiera motyw OB (ang. *OB fold, oligonucleotide/oligosaccharide binding fold*), wiążący jednoniciowe kwasy nukleinowe [Flynn 2010]. W kieszeni 3' kotwiczony jest koniec 3' substratu. Z kolei kieszeń 5' jest tworzona przez domenę Platformy i PAZ, i wiąże ona grupę fosforanową z końca 5' substratu [Tian i in. 2014]. W strukturze trzeciorzędowej można wyróżnić jeszcze jeden motyw znajdujący się w tym rejonie białka, czyli helisę łączącą. Domena ta znajduje się pomiędzy kieszeniami wiążącymi RNA i prawdopodobnie uczestniczy w przekazywaniu produktu cięcia do białka AGO [Tian i in. 2014]. Ponadto, delecja tej domeny skutkuje obniżeniem aktywności RNazowej hDicer. Sugeruje się, że helisa łącząca pomaga w prawidłowym dopasowaniu pre-miRNA do centrum katalitycznego Dicer [Lee i in. 2023].

### Domeny RNazy III

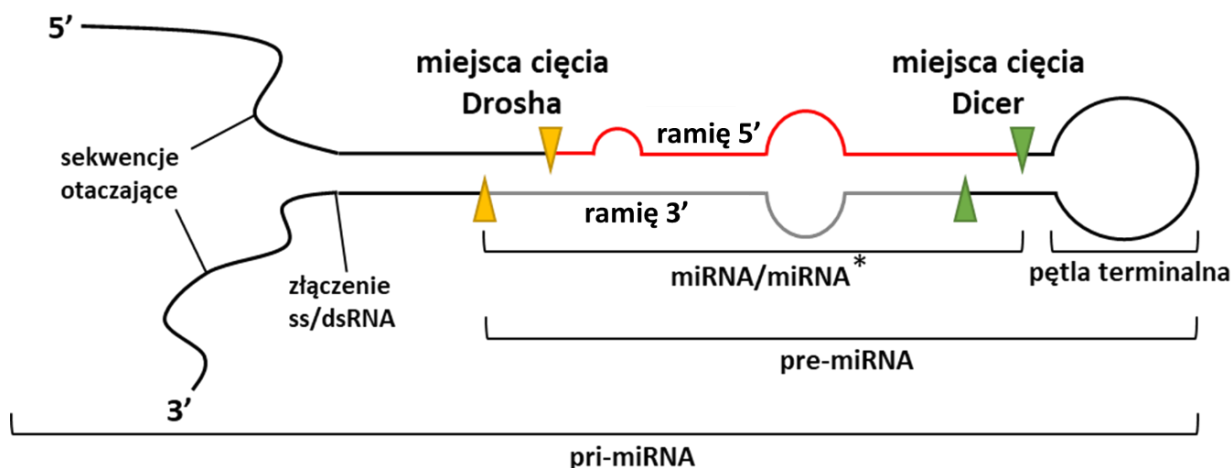
Centrum katalityczne rybonukleazy hDicer stanowi heterodimer zbudowany z domen RNazowych IIIa i IIIb, który katalizuje hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w każdym łańcuchu dsRNA. hDicer, podobnie do innych RNaz III, wiąże dwuwartościowe jony metali (głównie magnezu) w centrum katalitycznym, w celu przeprowadzenia procesu hydrolizy [Dunn 1976]. Dystans pomiędzy kieszeniami 3' i 5' kasety PPC a doliną katalityczną domen RNazowych stanowi decydujący czynnik determinujący długość generowanych przez Dicer produktów [Liu i in. 2018]. W przypadku hDicer generowane przez nią miRNA lub siRNA mają długość ok. 21-23 nt.

### Domena dsRBD

Znajdująca się na karboksylowym końcu hDicer domena dsRBD zawiera, podobnie do DUF283, motyw  $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ , typowy dla domen wiążących dsRNA [Maslah i in. 2013]. W odróżnieniu jednak od DUF283, domena dsRBD wiąże dsRNA. Uważa się, że proces wiązania substratów odbywa się poprzez rozpoznawanie specyficznych motywów w strukturze helisy A dsRNA, czy też w pre-miRNA [Chang i in. 2005, Lee i in. 2023]. Pomimo dużego powinowactwa do kanonicznych substratów Dicer (pre-miRNA i dsRNA), domena dsRBD nie jest uważana za niezbędną do ich wiązania. Jej rola może polegać na przejęciu produktu cięcia oraz uwolnieniu go, co przygotowuje enzym do kolejnej rundy reakcji cięcia [Nicholson 2014]. Ponadto, wyniki najnowszych badań strukturalnych wskazują, iż domena ta jest istotna dla precyzyjnego cięcia substratów pre-miRNA [Lee i in. 2023]. Co ciekawe, dsRBD zawiera sygnał lokalizacji jądrowej, który jest przypuszczalnie maskowany przez domenę helikazową [Pong i in. 2018].

## **2.1.2. Biogeneza miRNA**

Biogeneza miRNA rozpoczyna się od transkrypcji genów miRNA do pierwotnych transkryptów (pri-miRNA, ang. *primary miRNA transcript*) przez polimerazę II lub III RNA [Lee i in. 2004, Borchert i in. 2006]. Około połowa z dotychczas zidentyfikowanych miRNA powstaje w ramach transkrypcji genów kodujących białka, z czego zdecydowana większość sekwencji kodujących miRNA znajduje się w intronach, rzadziej w egzonach. Pozostałe miRNA są regulowane przez własne promotory transkrypcji, niezależnie od genów kodujących białka [Kim i in. 2007]. Znaczna część genów kodujących miRNA lokalizuje się w niewielkiej odległości od siebie, tworząc tzw. klastry, które ulegają transkrypcji do policistronowych transkryptów pri-miRNA [Altuvia i in. 2005, Contrant i in. 2014]. Pierwotne transkrypty zawierają jedną lub kilka struktur drugorzędowych typu spinki oraz jednoniciowe sekwencje flankujące. Schemat budowy prekursorów miRNA, wraz z miejscami cięcia dwóch rybonukleaz zaangażowanych w ich biogenezę, został przedstawiony na **Ryc. 2.2**.



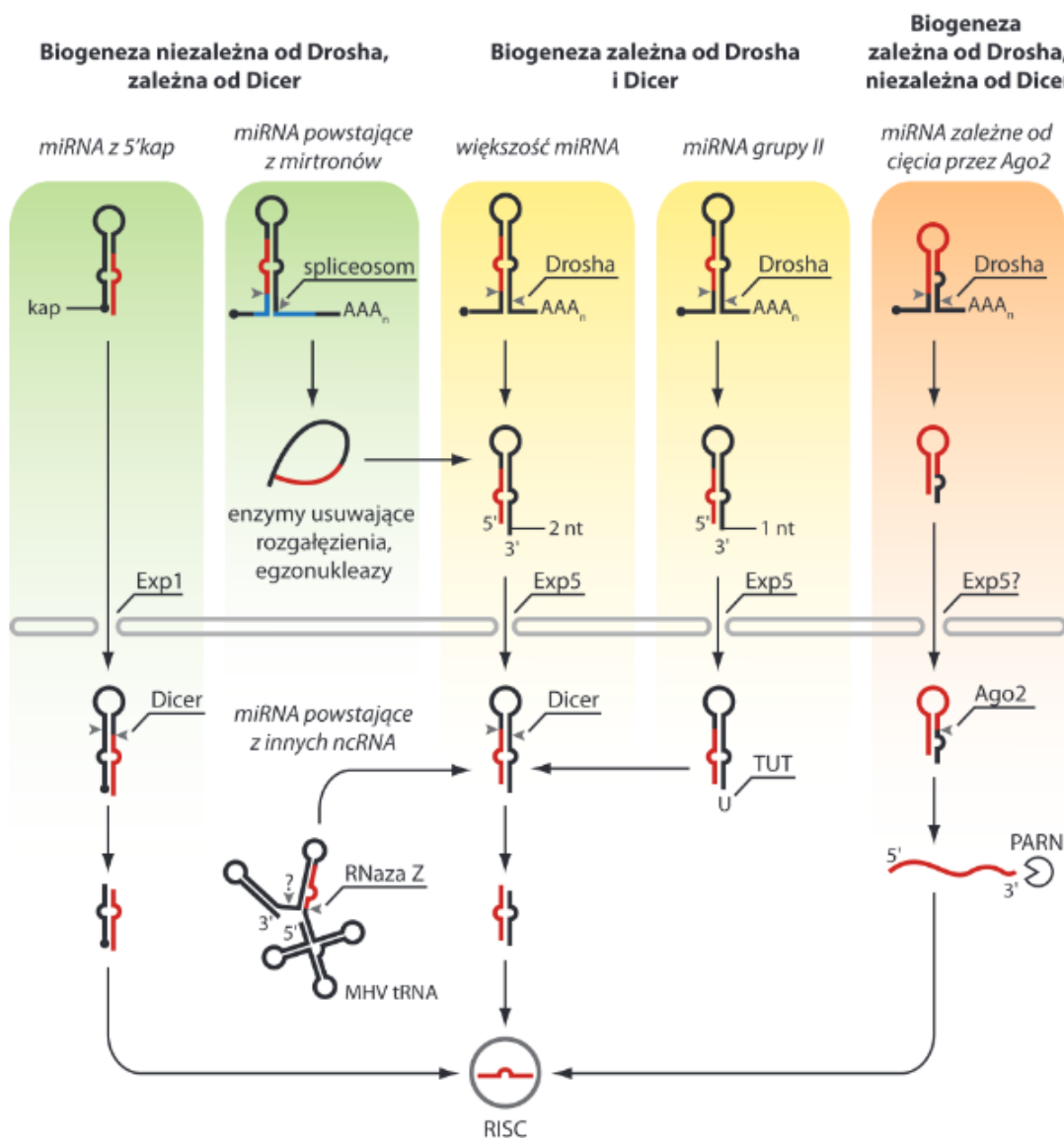
**Ryc. 2.2. Budowa pierwotnego transkryptu miRNA (pri-miRNA).** Nici duplexu miRNA/miRNA\* zostały przedstawione w kolorach czerwonym i szarym.

Ścieżki przetwarzania pri-miRNA można podzielić na ścieżkę kanoniczną - dominującą oraz na ścieżki niekanoniczne. W ścieżce kanonicznej (**Ryc. 2.3**) struktury typu spinki są rozpoznawane i cięte w jądrze przez heterotrimeryczny kompleks Mikroprocesora, zbudowany z jednej podjednostki Drosha i dwóch podjednostek DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome critical region gene*) [Nguyen i in. 2015]. DGCR8 należy do białek dsRBP i wiąże pri-miRNA w rejonie pomiędzy pętlą apikalną a trzonem prekursora. Drosha wiąże się u podstawy spinki, w miejscu rozgałęzienia do struktur jednoniciowych [Denli i in. 2004] i wycina struktury typu spinki z pierwotnych transkryptów miRNA, pri-miRNA, generując prekursory miRNA długości ok. 60-70 nt, zawierające dwunukleotydowe wolne końce 3' [Han i in. 2004]. Kolejnym etapem jest eksport pre-miRNA z jądra do cytoplazmy, przeprowadzany przez kompleks eksportyny 5 i czynnika Ran, wiążącego i hydrolizującego GTP (Exp-5/Ran-GTP) [Lund i in. 2004]. Kompleks ten rozpoznaje dwunukleotydowe wolne końce 3' pre-miRNA oraz dwuniciowy trzon prekursora [Okada i in. 2009].

W cytoplazmie pre-miRNA są rozpoznawane i dalej procesowane przez rybonukleazę Dicer, która odcina pętlę apikalną, generując duplexy miRNA/miRNA\* będące źródłem dojrzałych i funkcjonalnych miRNA [Zhang i in. 2004]. W warunkach *in vitro* rybonukleaza Dicer może ciąć prekursory miRNA samodzielnie, jednak w warunkach komórkowych jej aktywność jest wspierana przez inne białka wiążące, z którymi Dicer tworzy kompleksy. U ssaków podstawowymi partnerami Dicer są dwa białka dsRBP: TRBP (ang. *HIV-1 transactivating response RNA binding protein*) i PACT (ang. *protein activator of protein kinase R*) [Kok i in. 2007]. TRBP i PACT rekrutują RNA do Dicer, wpływają na dopasowanie RNA do centrum aktywnego enzymu oraz stabilizują strukturę rybonukleazy i jej substratu. Analiza *in vitro* wykazała, że TRBP wpływa na kinetykę reakcji

przeprowadzanej przez Dicer, zwiększając prędkość procesowania ok. 4-5-krotnie [Chakravarthy i in. 2010].

Potranskrypcyjna regulacja ekspresji informacji genetycznej przez miRNA jest związana z przekazaniem dupletu miRNA/miRNA\* do kompleksu wyciszającego indukowanego przez miRNA (miRISC, ang. *miRNA induced silencing complex*). Składanie aktywnego kompleksu RISC odbywa się w obrębie kompleksu ładującego RISC (RLC, ang. *RISC-loading complex*). W skład tego kompleksu wchodzi Dicer, TRBP oraz jedno z białek Argonaute (AGO). AGO to konserwowane ewolucyjnie białka dsRBP, które jako główne białka efektorowe kompleksu RISC łączą biogenezę miRNA i innych małych regulatorowych RNA z ich aktywnością fizjologiczną [Gregory i in. 2005, Rivas i in. 2005]. Ago2 nacina duplet miRNA/miRNA\*, prowadząc do jego osłabienia i rozplecenia przez helikazy RNA, takie jak helikaza RNA H i P68 [Robb i in. 2007].



Ryc. 2.3. Szlaki biogenezy miRNA. Opis znajduje się w tekście. Na podstawie [Koralewska i in. 2019].

Lokalizacja przyszłej cząsteczki miRNA w obrębie ramion pre-miRNA określa nazwę dojrzalej formy miRNA – miRNA 5p powstaje z ramienia 5' pre-miRNA i analogicznie, miRNA 3p pochodzi z ramienia 3' pre-miRNA, przy czym zarówno miRNA 5p, jak i miRNA 3p mogą zostać włączone do miRISC. Wybór miRNA opiera się częściowo na stabilności termodynamicznej końców 5' dupletu miRNA/miRNA\*; generalnie, nić o niższej stabilności lub zawierająca uracyl na końcu 5' pozostaje związana z kompleksem miRISC i pełni rolę nici wiodącej (ang. *guide strand*, miRNA) [Meijer i in. 2014]. Druga z nici, tzw. nić pasażerska (ang. *passenger strand*, miRNA\*), zostaje odrzucona i zdegradowana, choć zdarza się że ta nić również pełni funkcję regulatorową [Yang i in. 2011, Medley i in. 2021].

W przypadku miRNA, których prekursor generowany przez rybonukleazę Drosha mają jeden niesparowany nukleotyd na końcu 3', po eksporcie pre-miRNA do cytoplazmy następuje dodatkowy etap monourydylacji prekursora na końcu 3'. Ten etap jest niezbędny do utworzenia kanonicznego, dwunukleotydowego końca 3', który zapewnia stabilne oddziaływanie z Dicer. Przeprowadzają go białka o aktywności UTP-transferazy [Heo i in. 2012].

Generalnie szlaki niekanoniczne można podzielić na niezależne od Mikroprocesora i niezależne od Dicer (**Ryc. 2.3**). Pre-miRNA wytworzone bez udziału Drosha/DGCR8 mogą być wiązane i cięte przez Dicer – przykładem takich miRNA są miRtrony, powstające z krótkich intronów, które po wycięciu przez kompleks splicingowy stanowią substrat dla Dicer [Ruby i in. 2007]. Innym przykładem pre-miRNA wygenerowanych niezależnie od Drosha są produkty przedwczesnej terminacji transkrypcji. Te nowo powstałe transkrypty są bezpośrednio eksportowane do cytoplazmy przez eksportynę 1 i jeśli przyjmują strukturę spinki, to Dicer wycina z nich duplety miRNA/miRNA\*. Co ciekawe, do kompleksu RISC włączany jest zawsze miRNA 3p, co prawdopodobnie wynika z obecności czapki 7-metyloguanozynowej na końcu 5' miRNA 5p, która może stanowić przeszkodę w załadunku tej nici do białka AGO [Xie i in. 2013]. Bez udziału Mikroprocesora powstają również miRNA pochodzące z procesu dojrzewania lub degradacji snoRNA [Scott i in. 2009], struktur typu tRNA (jak w przypadku miRNA kodowanych przez mysiego herpeswirusa MHV-68 [Bogerd i in. 2010]), czy TSS-miRNA (ang. *transcriptional start site miRNA*), które są transkrybowane z rejonów promotorowych genów kodujących białka [Zamudio i in. 2014]. Istnieje również ścieżka biogenezy miRNA niezależna od Dicer, choć dotychczas poznano tylko jeden funkcjonalny miRNA (miR-451), którego prekursor jest zbyt krótki, by był rozpoznawany przez tę rybonukleazę. Prekursor pre-miR-451 jest wiązany i cięty w cytoplazmie przez białko Ago2. Powstający produkt pośredni z ramienia 3' finalnie jest docinany przez rybonukleazę PARN do dojrzalego miRNA [Cheloufi i in. 2010].

Długo uważano, że z każdego ramienia danego typu pre-miRNA powstaje jeden rodzaj miRNA, i jeden rodzaj miRNA\*. Dzięki głębokiemu sekwencjonowaniu wykryto różnorodne warianty dojrziałych miRNA, zwane izomiRami (ang. *isomiRs*), które powstają z jednego typu prekursora i różnią się



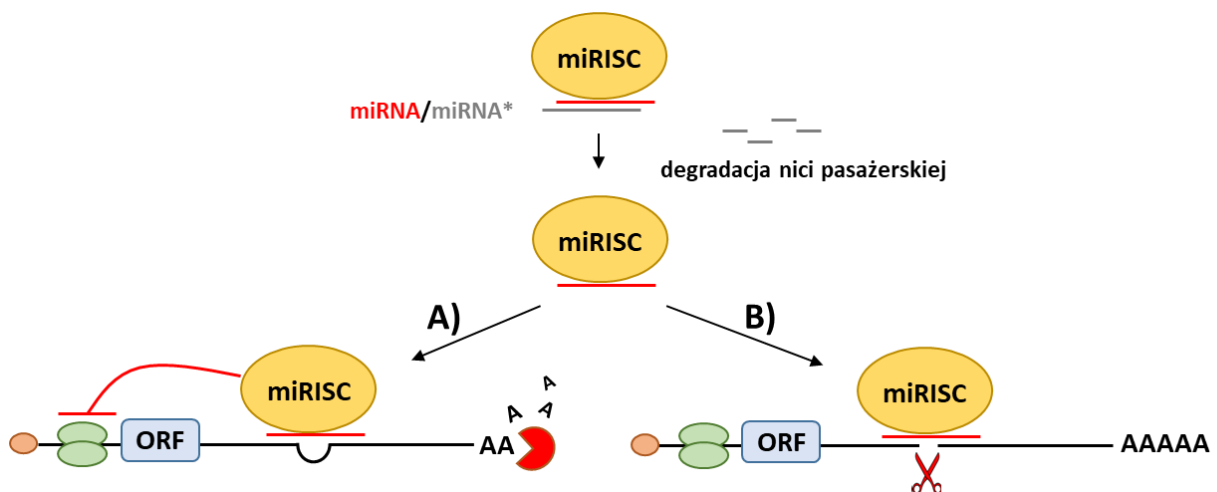
długością, sekwencją lub obiema tymi cechami [Morin i in. 2008, Desvignes i in. 2015, Tomasello i in. 2021]. Obecnie wiadomo, że ogólna liczba izomiRów znacznie przewyższa liczbę referencyjnych miRNA, których sekwencje znajdują się w bazie danych miRBase [Telonis i in. 2015]. Generowanie izomiRów jest głównie spowodowane nieprecyzyjnym cięciem prekursorów przez rybonukleazy Drosha lub Dicer podczas biogenezy miRNA. Nieprecyzyjne cięcie prekursorów miRNA generuje izomiRy o zmiennej długości końców 5' i 3'. Dodatkowo, na długość miRNA mogą wpływać dalsze procesy obejmujące potranskrypcyjną addycję nukleotydów do końca 5' lub 3' oraz ograniczoną degradację miRNA przez egzonukleazy komórkowe [Nielsen i in. 2012]. Niektóre pri-miRNA są przetwarzane przez Droshę w wielu miejscach w obrębie sekwencji, co prowadzi do powstania więcej niż jednego pre-miRNA i kilku dojrzałych miRNA z jednego transkryptu pierwotnego [Kim i in. 2017]. Aktywność rybonukleazy Dicer może być modulowana przez jej partnerów białkowych TRBP i PACT, kontrolujących rekrutację substratu oraz wzajemne ustawienie i zmiany konformacyjne domen Dicer, wpływając tym samym na produkcję izomiRów [Lee i in. 2013]. Ponadto, zidentyfikowano również polimorficzne izomiRy, zawierające w danej pozycji odmienne nukleotydy, niż te obecne w sekwencji referencyjnej miRNA. Obecność izomiRów 3' wiąże się ze zmianą stabilności dupletu miRNA/miRNA\* oraz zmianą preferencji wyboru nici przez białko AGO [Griffiths-Jones i in. 2011]. Występowanie izomiRów 5' ma poważniejsze konsekwencje funkcjonalne, związane ze zmianą rozpoznawania sekwencji docelowej mRNA. Zmiana ta wynika z przesunięcia tzw. regionu „seed” miRNA [Salem i in. 2016], czyli ok. siedmionukleotydowego fragmentu z końca 5' miRNA, odpowiedzialnego za łączenie kompleksu miRISC z komplementarną sekwencją docelowego transkryptu [Lewis i in. 2003].

### **2.1.3. Mechanizmy działania miRNA**

Jak wspomniano wcześniej, połączenie dojrzałego dupletu miRNA/miRNA\* z białkiem AGO prowadzi do powstania kompleksu miRISC, będącego układem efektorowym mechanizmu regulacji ekspresji genów za pośrednictwem miRNA. W kompleksie tym miRNA pełni rolę determinanty specyficzności, a AGO wywiera efekt regulacyjny. Genomy ssaków kodują cztery rodzaje białek AGO (Ago1-4), spośród których Ago2 jest produkowane w największej ilości oraz jako jedyne może przecinać nici docelowych transkryptów [Liu i in. 2004 a]. W większości przypadków kompleks miRISC wywiera efekt hamujący na ekspresję kontrolowanych przez niego genów, choć istnieją również przypadki aktywacji translacji wywołanej przez miRNA [Vasudevan i in. 2007, Bukhari i in. 2016]. Jak już wspomniano, selektywność miRISC wynika z interakcji regionu „seed” z końca 5' miRNA z komplementarnymi sekwencjami docelowego transkryptu, nazywanymi elementami odpowiedzi na miRNA (MREs, ang. *miRNA response elements*). Dodatkowe parowanie nt z końca 3' miRNA zwiększa z kolei stabilność i specyficzność interakcji miRNA : MRE [Broughton i in. 2016]. Generalnie,

sekwencje MRE są zlokalizowane w rejonie 3'UTR, jednak miejsca wiązania miRNA zostały również wykryte w obrębie 5'UTR, sekwencjach kodujących oraz w rejonach promotorowych [Xu i in. 2014]. „Najsilniejsze” kanoniczne (parujące z rejonem „seed”) miejsca docelowe mRNA to te, które są komplementarne do nukleotydów 2-8 miRNA oraz posiadają adeninę parującą z nukleotydem 1. z sekwencji miRNA (zwaną t1A), a następnie miejsca parujące z nukleotydami 2-8 bez t1A oraz nukleotydy 2-7 z t1A. Nukleotyd t1A nie jest rozpoznawany przez nić wiodącą miRNA, ale przez kieszeń wiążącą w obrębie białka AGO. Miejsca docelowe z komplementarnością nukleotydów 2-7 lub 3-8 miRNA są znacznie słabsze, ale wciąż uważane za kanoniczne [Agarwal i in. 2015].

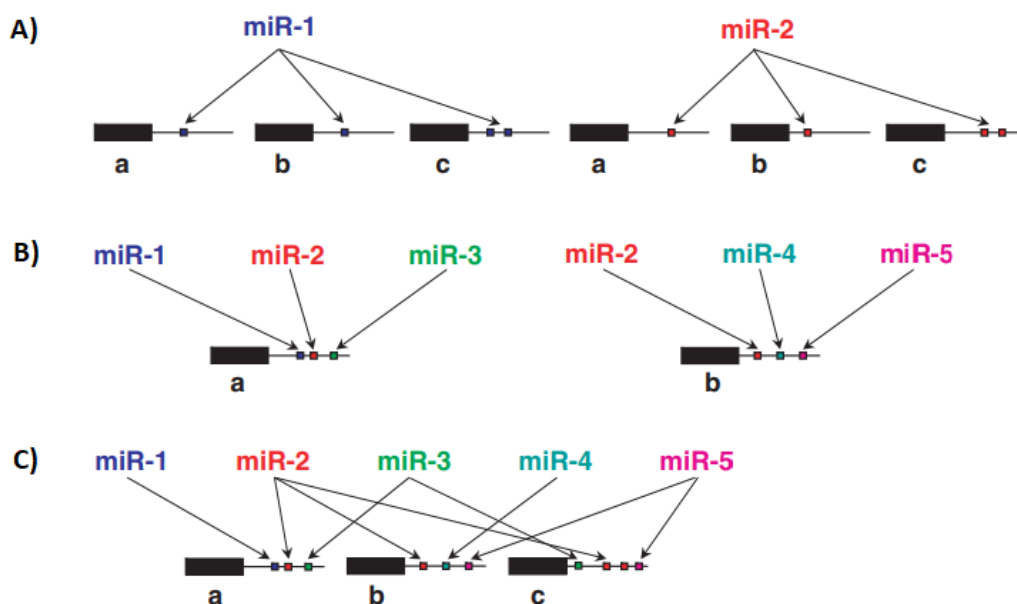
Stopień komplementarności MRE decyduje o mechanizmie wyciszenia docelowego transkryptu (**Ryc. 2.4**). Pełna komplementarność miRNA : MRE, występująca u ssaków niezwykle rzadko, indukuje aktywność nukleazową białka Ago2 i prowadzi do przecięcia docelowego mRNA [Jo i in. 2015]. Interakcja ta destabilizuje jednak połączenie pomiędzy Ago2 a końcem 3' miRNA, co prowadzi do jego degradacji. Brak pełnej komplementarności miRNA : MRE powoduje, że u ssaków przeważającym mechanizmem wyciszenia genów przez miRISC jest degradacja docelowego transkryptu oraz inhibicja translacji. Po zaprogramowaniu miRISC przez nić wiodącą (miRNA) następuje „skanowanie” transkryptów w poszukiwaniu sekwencji komplementarnych oraz rekrutacja jednego z białek GW182 przez AGO. Białka GW182 oddziałują z białkiem wiążącym poliadenylan (PABPC), co sprzyja deadenylacji mRNA poprzez rekrutację PAN2/3 i kompleksu (CCR4)-NOT [Fabian i in. 2011]. Przyłączenie kompleksu (CCR4)-NOT prowadzi również do represji translacji prawdopodobnie poprzez rekrutację helikazy RNA zależnej od ATP (DDX6) [Mathys i in. 2014]. Helikaza DDX6 jest odpowiedzialna, m.in., za usunięcie czapeczki, co czyni transkrypt docelowy podatnym na szybką degradację przez 5'-3' egzorybonukleazę 1 (XRN1) [Braun i in. 2012].



**Ryc. 2.4. Podstawowe mechanizmy działania miRISC.** A) Przy niepełnej komplementarności sekwencji miRNA : MRE dochodzi do destabilizacji mRNA i inhibicji translacji. B) Przy pełnej komplementarności mRNA jest przecinany. ORF – otwarta ramka odczytu.

Inhibicja inicjacji translacji zależnej od obecności czapeczki jest również spowodowana przez zakłócanie funkcji eukariotycznych czynników inicjacji translacji eIF4A-I i eIF4A-II. miRISC powoduje dysocjację tych czynników od mRNA, co hamuje składanie kompleksu inicjacji translacji eIF4F i skanowanie przez małą podjednostkę rybosomu [Fukao i in. 2014]. Z drugiej strony, translacja transkryptów pozbawionych czapeczki, ale posiadających wewnętrzne miejsca wiązania rybosomu (IRES, ang. *internal ribosome entry site*) wydaje się być całkowicie odporna na represję przez miRNA [Mathonnet i in. 2007]. Wiadomo również, że domeny strukturalne białek AGO biorą udział w inhibicji translacji [Kuzuoğlu-Öztürk i in. 2016], jednak mechanizm tego procesu ciągle nie został w pełni wyjaśniony. Po unieczynnieniu danej cząsteczki mRNA, kompleks miRISC oddysocjowuje od transkryptu i „wyszukuje” kolejny mRNA zawierający sekwencje docelowe.

miRNA wraz z genami docelowymi tworzą złożoną sieć regulacyjną (**Ryc. 2.5**). Pojedynczy miRNA może wyciszać nawet setki genów, chociaż efekt przez niego wywoływany wobec pojedynczego genu może być niewielki [Selbach i in. 2008]. Przyjmuje się nawet, że całe szlaki komórkowe mogą być regulowane przez pojedyncze miRNA, jak również przez klastry miRNA [Mestdagh i in. 2010]. Wiele różnych miRNA może z kolei kontrolować jeden gen, łącząc się do różnych fragmentów sekwencji 3'UTR [Wu i in. 2010]. Wiązanie się różnych miRNA do sąsiadujących MRE w obrębie docelowego mRNA może prowadzić do współpracy miRNA w procesie wyciszania ekspresji danego genu, co prowadzi do silniejszej represji mRNA, niż w przypadku działania pojedynczego miRNA na ten transkrypt [Briskin i in. 2020].



**Ryc. 2.5. Sieć regulacyjna miRNA – mRNA.** A) Pojedynczy miRNA ma wiele genów docelowych. B) Jeden gen zawiera sekwencje docelowe dla wielu miRNA. C) Złożona sieć wzajemnych interakcji pomiędzy miRNA a mRNA.

#### 2.1.4. Metody badania miRNA

Od czasu odkrycia miRNA i przypisania im roli potranskrypcyjnych regulatorów ekspresji genów, badacze włożyli ogromny wysiłek w zrozumienie biogenezy oraz poznanie biologicznych celów i funkcji miRNA. Arsenał narzędzi i technik analitycznych służących do głębszego poznania wpływu miRNA na różnorakie procesy biologiczne jest sukcesywnie rozwijany od ponad dwóch dekad. W niniejszym podrozdziale zostaną przedstawione kluczowe metody służące do identyfikacji miRNA, ilościowego pomiaru ekspresji miRNA oraz poznania ich funkcji.

##### Identyfikacja miRNA - techniki bioinformatyczne

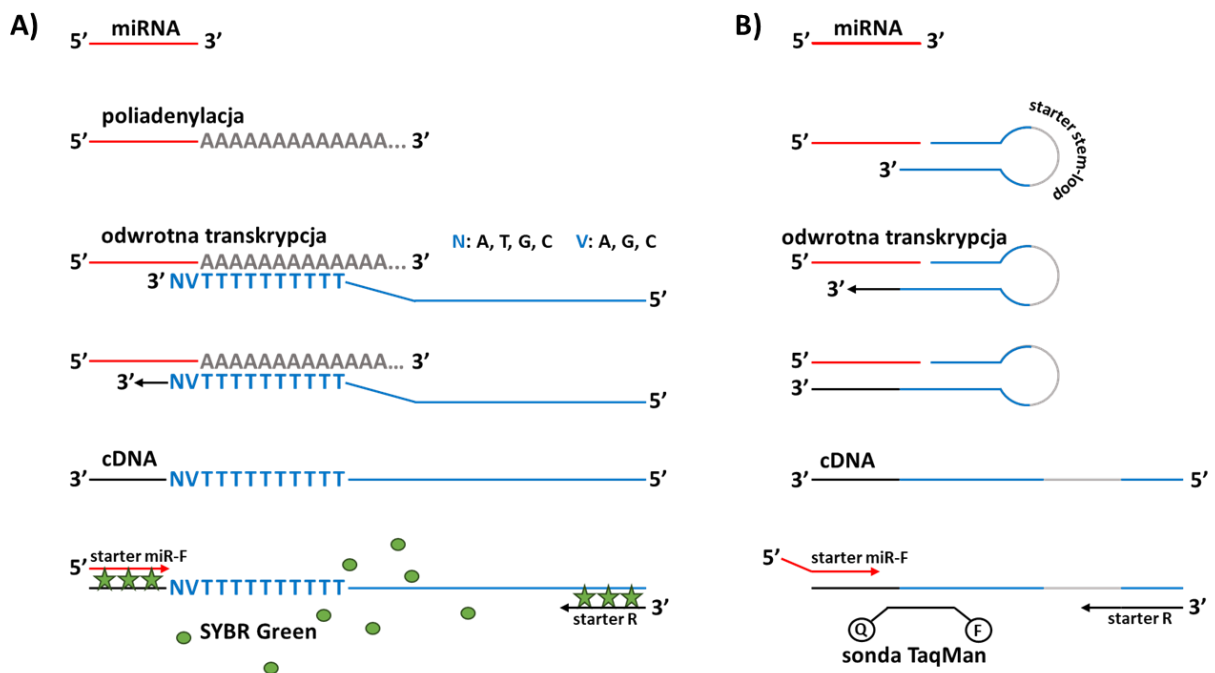
Identyfikacja i charakterystyka miRNA wymagają korzystania z zaawansowanych narzędzi komputerowych, umożliwiających analizę sekwencji, identyfikację konserwowanych regionów w genomie i struktur drugorzędowych w transkryptomie oraz przewidywanie potencjalnych celów miRNA w sekwencjach transkryptów. Wczesne narzędzia bioinformatyczne umożliwiały wykrywanie nowych miRNA poprzez analizę potencjalnych drugorzędowych struktur RNA typu spinki do włosów [opisane w Ritchie i in. 2007]. Algorytmy uczenia maszynowego (ML, ang. *machine learning*) służące identyfikacji miRNA wykraczają poza sekwencję i właściwości strukturalne RNA, umożliwiając programom komputerowym naukę na podstawie informacji zebranych z zestawu wcześniej potwierdzonych prekursorów miRNA oraz z zestawu struktur typu spinki, niebędących prekursorami miRNA [Chen i in. 2019]. Wiele programów zostało opracowanych do wykrywania miRNA z danych uzyskanych podczas sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Najczęściej stosowane narzędzia, wyszukujące znane już oraz nowe miRNA, to miRDeep2 [Friedländer i in. 2012], miRanalyzer [Hackenberg i in. 2011] oraz MiReader [Jha i in. 2013].

Wykrycie sieci regulacyjnych kontrolowanych przez miRNA wymaga identyfikacji interakcji miRNA – mRNA. Cel ten osiąga się z reguły poprzez przewidywania *in silico*, po czym przeprowadza się eksperymentalną walidację komputerowych predykcji. Istnieje wiele narzędzi bioinformatycznych, wykorzystujących różne algorytmy do identyfikacji celów miRNA, a ich liczba stale rośnie [Riolo i in. 2020]. Przykładem jest serwis internetowy TargetScan, przewidujący biologiczne cele miRNA poprzez wyszukiwanie obecności konserwowanych motywów 6-, 7- i 8-mio nukleotydowych, pasujących do rejonu „seed” analizowanych miRNA. Program ten wylicza również energie swobodne i przedstawia struktury drugorzędowe przewidywanych dupleksów [Akhtar i in. 2016]. W przeciwieństwie do klasycznego podejścia, algorytmy ML nie odnoszą się do sekwencji czy stabilności termodynamicznej dupleksów, lecz starają się rozpoznać potencjalne cele miRNA odwołując się do interakcji miRNA – mRNA o udowodnionym znaczeniu biologicznym. Przykładem tego typu oprogramowania, potrafiącego rozróżnić cele „prawdziwe” od „fałszywych” jest DeepMirTar [Wen i in. 2018].

## Detekcja miRNA

Metody detekcji służą do jakościowej identyfikacji oraz ilościowego pomiaru ekspresji miRNA w próbkach biologicznych. Istnieje kilka metod wykorzystywanych do wykrywania poszczególnych miRNA, spośród których najdłużej wykorzystywaną do analizy miRNA jest Northern blotting [Ambros i in. 2003]. Detekcja rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym (PAA, ang. *polyacrylamide gel*) i przeniesionych na membranę miRNA jest przeprowadzana za pomocą znakowanych radioaktywnie sond zbudowanych z oligonukleotydów RNA lub DNA. Northern blotting jest dość czułą metodą, jednak wymaga użycia stosunkowo dużej ilości materiału biologicznego. Drugą tradycyjnie wykorzystywaną metodą detekcji jest hybrydacja *in situ* [Deo i in. 2006], pozwalająca na wykrywanie miRNA bezpośrednio w tkankach i komórkach, dzięki czemu znajduje zastosowanie w badaniu lokalizacji i ekspresji miRNA w kontekście histologicznym.

Obecnie najpowszechniej stosowanym podejściem do monitorowania poziomów poszczególnych miRNA jest metoda ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy, poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR, ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) [Ban i in. 2022]. Metoda RT-qPCR charakteryzuje się szybkością, precyzją i wysoką czułością, dzięki czemu może być wykorzystana do analizy niewielkiej ilości materiału. Opracowano dwie metody RT-qPCR do ilościowego wykrywania miRNA: poli(A) RT-qPCR [Shi i in. 2005] oraz stem-loop RT-qPCR [Varkonyi-Gasic i in. 2007], przedstawione na **Ryc. 2.6**.



**Ryc. 2.6. Porównanie dwóch metod RT-qPCR służących do analizy miRNA: A) poli(T) i B) stem-loop. Na podstawie [Saliminejad i in. 2019].**

W metodzie poly(A), RNA jest początkowo poliadenylowany, po czym jest przeprowadzana reakcja odwrotnej transkrypcji za pomocą uniwersalnych adapterów poli(T). Następnie przeprowadza się reakcję qPCR, najczęściej z wykorzystaniem odczynnika SYBR Green oraz startera początkowego specyficznego wobec danego miRNA (F) oraz uniwersalnego startera końcowego (R) (**Ryc. 2.6.A**). Metoda stem-loop RT-qPCR wymaga użycia starterów typu stem-loop, o strukturze typu spinki, specyficznych wobec danych miRNA. Startery te wiążą się do końca 3' miRNA, po czym następuje reakcja odwrotnej transkrypcji. Produkty odwrotnej transkrypcji są następnie ilościowo analizowane za pomocą konwencjonalnej reakcji qPCR, z wykorzystaniem sond TaqMan i specyficznych starterów F skierowanych wobec wykrywanych miRNA oraz specyficznych bądź uniwersalnych starterów R (w zależności od zaleceń producenta używanych odczynników) (**Ryc. 2.6.B**). Analiza porównawcza wykazała, że profile ekspresji miRNA określone za pomocą metody poli(A) RT-qPCR były w większym stopniu zgodne z tymi uzyskanymi za pomocą głębokiego sekwencjonowania, niż profile uzyskane metodą stem-loop [Han i in. 2014].

Poza metodami służącymi do wykrywania pojedynczych, określonych miRNA, są również techniki służące do profilowania miRNA, takie jak techniki mikromacierzowe czy sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*). Techniki te cechuje większa przepustowość niż wcześniej wymienione metody detekcji. Dzięki temu umożliwiają one jednoczesne wykrywanie wielu miRNA w próbkach, co pozwala na kompleksową analizę ich ekspresji. Technika mikromacierzy jest oparta na hybrydyzacji między miRNA obecnymi w próbce a sondami rozmieszczonymi na macierzy [Liu i in. 2004 b], przez co detekcja miRNA ogranicza się do sekwencji zastosowanych sond. Mikromacierze zatem są odpowiednie do porównywania ekspresji znanych miRNA, jednak nie mogą wykryć nowych cząsteczek. Detekcję nieznanymi wcześniej miRNA umożliwia technologia NGS. Głębokość sekwencjonowania w sekwencjonowaniu o wysokiej przepustowości (ang. *high throughput sequencing*) odnosi się do średniej liczby odczytów nukleotydów podczas procesu sekwencjonowania, a w przypadku miRNA-seq jest bezpośrednio związana z ich względnym poziomem ekspresji [Churko i in. 2013]. Pięć milionów odczytów na próbkę jest odpowiednie by zapewnić wystarczającą moc statystyczną do analizy ekspresji miRNA oraz do odkrywania nowych miRNA [Metpally i in. 2013]. Po przeprowadzeniu masowego sekwencjonowania niezbędne jest wykonanie analizy bioinformatycznej, nanoszącej uzyskane odczyty na sekwencję referencyjną genomu. W tym celu wykorzystuje się oprogramowanie do sekwencjonowania miRNA, jak np. miRDeep2 [Friedländer i in. 2012].

### Strategie kontroli poziomu miRNA

Metody regulacji poziomu miRNA w komórkach koncentrują się na zwiększaniu lub zmniejszaniu ekspresji lub dostępności miRNA w celu zbadania ich wpływu na procesy biologiczne. Strategie

podnoszące poziom miRNA wpisują się w trend badań zwanych „*gain-of-function*” (GOF). Analogicznie, techniki obniżające poziom komórkowych miRNA pozwalają na obserwację efektu fenotypowego związanego z ich utratą i służą do prowadzenia badań typu „*loss-of-function*” (LOF).

#### A) Techniki zwiększające ilość miRNA

Techniki służące do podnoszenia poziomu miRNA były strategią pierwszych badań, mających na celu poznanie funkcji danych miRNA w układach komórkowych ssaków [Xiao i in. 2007]. Przejściowe zwiększenie ilości dojrzałych miRNA może być osiągnięte przez transfekcję komórek analogami, tzw. mimikami miRNA, będącymi najczęściej syntetycznymi dupleksami RNA, naśladującymi produkt cięcia enzymu Dicer. Jedna z nici dupleksu, zawierająca sekwencję badanego miRNA, zostaje włączona do kompleksu miRISC i wycisza ekspresję docelowego genu w sposób analogiczny do miRNA komórkowych [Wang 2011]. Przykładami dostępnych komercyjnie mimików miRNA są produkty typu *mirVana™* (Invitrogen) lub *miScript* (Qiagen). Alternatywnym podejściem wobec krótkotrwałego zwiększania poziomu miRNA są metody oparte na wektorach, pozwalające na ciągłą produkcję miRNA na potrzeby długoterminowych badań w hodowlach komórkowych. Wektory plazmidowe umożliwiające nadekspresję miRNA zawierają sekwencje kodujące prekursorów (pre-miRNA lub pri-miRNA) pod kontrolą promotorów polimerazy II lub III, które po transkrypcji są procesowane w analogiczny sposób do endogennych prekursorów miRNA [Chung i in. 2006]. Przykładem plazmidu umożliwiającego ciągłą produkcję heterologicznych miRNA jest pCMV-MIR (Origene), zawierający gen kodujący neomycynę, pozwalający na przeprowadzenie selekcji antybiotykowej, oraz gen białka zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*), umożliwiający kontrolę efektywności transfekcji.

Narzędziami pozwalającymi na niezależną od wydajności i powtarzalności transfekcji produkcję linii komórkowych z podniesionym poziomem produkcji heterologicznych miRNA są wirusowe systemy wektorowe. W takich systemach wektorami niosącymi kasetę ekspresyjną kodującą prekursorów heterologicznych miRNA najczęściej są rekombinowane retrowirusy, lentiwirusy, adenowirusy lub wirusy związane z adenowirusami (AAV, ang. *adeno-associated viruses*) [systemy te zostały opisane w Liu i in. 2011 oraz Herrera-Carrillo i in. 2017]. Wektory wirusowe cechuje wysoka efektywność infekcji oraz wysoki i stały poziom produkowanych miRNA. Poza tym, są one modyfikowane w sposób uniemożliwiający im replikację w transdukowanej komórce, co przekłada się na bezpieczeństwo ich stosowania. Dodatkowo, systemy lentiwirusowy i retrowirusowy umożliwiają integrację wprowadzonej kasety ekspresyjnej z genomem komórki, co pozwala na generowanie linii komórkowych stabilnie ekspresyjnych heterologicznych miRNA [Shin i in. 2006, Park i in. 2014].

## B) Techniki obniżające ilość miRNA

Podejścia wyciszania miRNA do badań typu *loss-of-function* można podzielić na strategie bazujące na modyfikacjach genetycznych oraz na metody związane z wprowadzaniem do komórek gąbek miRNA czy oligonukleotydów wyciszających, o sekwencjach komplementarnych do sekwencji badanych miRNA. Strategie genetyczne odnoszą się, m.in., do wyłączenia (ang. *knock-out*) lub obniżenia (ang. *knock-down*) komórkowej produkcji poszczególnych komponentów ścieżki biogenezy miRNA. Początkowo strategie te umożliwiały wprowadzanie modyfikacji genetycznych wyłącznie w embrionalnych komórkach macierzystych, w których badano ścieżkę RNAi poprzez wyłączenie Dicer [Murchison i in. 2005] czy DGCR8 [Wang i in. 2007]. Metody te wywołują globalną supresję produkcji miRNA i sprawdzają się w badaniach nad biogenezą tych regulatorów, nie znajdują jednak zastosowania w analizowaniu funkcji poszczególnych miRNA. Postęp w metodologii edycji genów związany z rozwojem technologii CRISPR/Cas9 umożliwił wyłączenie ekspresji wybranych genów również w powszechnie stosowanych liniach komórkowych. Metoda ta pozwoliła ponadto na usuwanie z genomów poszczególnych miRNA w celu badania ich funkcji [Chang i in. 2016]. W kontekście badań nad miRNA technologia CRISPR/Cas9 posiada jednak istotne ograniczenie związane z wymogiem obecności w edytowanej sekwencji tzw. motywu PAM, koniecznego do skutecznego rozpoznania i cięcia przez enzymy Cas9, którego większość genów miRNA nie posiada [Bi i in. 2020].

Narzędziem pozwalającym na hamowanie całych rodzin cząsteczek miRNA (o wspólnym rejonie „seed”), są gąbki miRNA, będące wprowadzanymi z zewnątrz transkryptami zawierającymi wiele miejsc wiązania komplementarnych do rejonu „seed” analizowanych miRNA [Ebert i in. 2010]. Aktywność poszczególnych endogennych miRNA może być z kolei selektywnie blokowana przez oligonukleotydy antysensowne wobec miRNA (AMOs, ang. *antisense miRNA oligonucleotides*), których sekwencje są komplementarne do sekwencji analizowanych miRNA. Inhibitory te działają poprzez bezpośrednie wiązanie do jednoniciowych dojrzałych miRNA, przez co blokują ich zdolność do parowania się z docelowymi transkryptami. Oligomery zbudowane z niemodyfikowanych oligonukleotydów są wrażliwe na degradację wywołaną przez komórkowe rybonukleazy, poza tym ich skuteczność w przekraczaniu błon komórkowych jest ograniczona. W związku z powyższym wprowadzono szereg modyfikacji chemicznych zwiększających użyteczność inhibitorów AMO. Pierwszym rodzajem zastosowanych modyfikacji było wprowadzenie do rybozy w pozycji 2' grupy metylowej [Hutvagner i in. 2004], czego skutkiem była zwiększona odporność oligomerów 2'-O-metylowanych (2'OMe) na nukleazy oraz ich silniejsze wiązanie do miRNA. Termin „antagomiR”, często używany jako ogólna nazwa dla inhibitorów miRNA, odnosił się pierwotnie do oligomerów 2'OMe skoniugowanych na końcu 3' z fragmentem cholesterolowym, co ułatwiało dostarczenie tych oligonukleotydów do komórek [Krützfeldt i in. 2005]. Podobną skutecznością wejścia do komórek



cechują się inhibitory typu LNA (ang. *locked nucleic acid*), zawierające bicykliczne nukleotydy o usztywnionej strukturze, stabilizującej powstający kompleks LNA : RNA [Kaur i in. 2006], dostępne pod handlową nazwą miRCURY LNA™ (Qiagen).

Innym podejściem do zmniejszenia poziomu miRNA jest blokowanie procesu ich biogenezy. Selektywne regulowanie produkcji miRNA osiąga się poprzez stosowanie oligonukleotydów komplementarnych do określonych sekwencji ich prekursorów. Przykładem cząsteczek, które mają potencjał do hamowania przetwarzania prekursorów miRNA są oligomery typu Morpholino (Gene Tools), będące syntetycznymi, nieposiadającymi ładunku analogami kwasów nukleinowych. W strukturze Morpholino pierścienie rybozy zostały zastąpione przez pierścienie morfoliny, a wiązania fosfodiesterowe przez grupy fosfordiamidynianowe, co powoduje odporność oligomerów typu Morpholino na działanie nukleaz komórkowych [Moulton 2007]. Morpholino wykazują zdolność do selektywnej inhibicji dojrzewania określonych miRNA poprzez blokowanie miejsc cięcia rybonukleazy Drosha lub Dicer w obrębie odpowiednich prekursorów [Kloosterman i in. 2007]. Oligomery blokujące procesowanie pri-miRNA lub pre-miRNA okazują się być użytecznym narzędziem służącym zarówno do badania ścieżek dojrzewania miRNA, jak i do analizowania ich aktywności biologicznej, jednak komercyjna dostępność tego typu narzędzi jest ograniczona do wspomnianych Morpholino.

### 2.1.5. Biologiczne funkcje miRNA

Wzrost różnorodności miRNA w królestwie Metazoa rozpoczął się ok. 650 mln lat temu i obejmował wszystkie linie zwierząt [Wheeler i in. 2009]. W toku ewolucji liczba miRNA stale wzrastała, dostarczając organizmom zwierzęcym zróżnicowanego zestawu narzędzi do regulacji ekspresji genów. Cząsteczki miRNA zostały włączone do sieci regulacyjnych kontrolujących różnorodne procesy biologiczne, zarówno rozwojowe, jak i związane z innymi aspektami życia organizmów [Bartel 2004]. Żadna linia ewolucyjna wyższych zwierząt nie toleruje utraty kluczowych komponentów szlaku miRISC. Upośledzenie maszynerii biogenezy miRNA lub defekty efektorowych czynników wyciszających prowadzą do poważnych wad rozwojowych u wszystkich badanych zwierząt. Przykładowo, w przypadku nicienia *C. elegans* usunięcie genów *AGO* powoduje śmiertelność embrionalną, spowodowaną głównie przez zatrzymanie morfogenetycznego procesu wydłużania [Vasquez-Rifo i in. 2012], podczas którego komórki ulegają podziałom i różnicowaniu. Utrata Dicer u danio pręgowanego (ang. *zebrafish*, łac. *Danio rerio*) powoduje nieprawidłową gastrulację, skutkującą poważnymi wadami rozwoju mózgu i organogenezy [Giraldez i in. 2005].

Szacuje się, że ekspresja ok. 60% ssaczych genów kodujących białka jest regulowana przynajmniej przez jeden miRNA [Bartel 2009]. Poza zaangażowaniem w regulację różnicowania komórek i proliferacji, miRNA pełnią również istotną rolę w procesach związanych z zachowaniem homeostazy

organizmu. Przykładami tych funkcji jest kontrola metabolizmu energetycznego komórki [Lopes i in. 2017], udział w naprawie DNA [Liu i in. 2015], regulacja odpowiedzi immunologicznej [Baumjohann i in. 2013] i odpowiedzi na stres [Mendell i in. 2012], czy indukcja apoptozy [Tarasov i in. 2007].

W świetle powyższych informacji widać, że niekontrolowane zmiany zarówno ilościowe, jak i jakościowe w profilu miRNA mogą przyczyniać się do powstawania i rozwoju stanów patologicznych. Przykładowo, aktywacja klastra miRNA o charakterze onkogennym (onkomiR miR-17/92) prowadzi do rozwoju wielu typów nowotworów, zwłaszcza w ich najbardziej agresywnej postaci. Pojedyncze miRNA z tego klastra celują zarówno w transkrypty różnych efektorów kaskady sygnalizacyjnej szlaku TGF- $\beta$  (transformujący czynnik wzrostu beta, zarządzający komórkami w trakcie ich rozwoju), jak i w geny na nie wrażliwe [Mu i in. 2009, Mestdagh i in. 2010]. Poza nowotworami, innymi przykładami chorób zależnych od miRNA są, m.in., cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe czy choroby nerek [omówione w Paul i in. 2018].

Komórkowe miRNA pełnią także ważną rolę w oddziaływaniach wirus – gospodarz. Pierwszym odkrytym komórkowym miRNA wchodzącym w interakcje z genomem wirusa był miR-122, który pozytywnie reguluje replikację wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*). Funkcja regulacyjna miR-122 związana jest z hybrydyzacją tego regulatora do rejonu 5'UTR transkryptu wirusa, co prowadzi do wydajniejszej produkcji wirusowego RNA [Jopling i in. 2005]. Przykładami komórkowych miRNA o działaniu przeciwwirusowym są z kolei miR-221 i miR-222, obniżające ekspresję genu receptora CD4, występującego na powierzchni komórek układu odpornościowego. Przykładowo, CD4 pełni rolę receptora wejścia do komórki dla wirusa ludzkiego niedoboru odporności 1 (HIV-1, ang. *human immunodeficiency virus 1*) [Lodge i in. 2017].

Obok tysięcy zidentyfikowanych miRNA komórkowych, od niemal dwóch dekad obserwuje się wzrost liczby doniesień dotyczących miRNA pochodzenia wirusowego. Te cząsteczki regulatorowe wydają się stanowić idealne narzędzie dla wirusów RNA i DNA [Nanbo i in. 2021], służące do potranskrypcyjnej modulacji ekspresji genów zarówno komórkowych, jak i wirusowych. Co ważne, w przeciwieństwie do wirusowych białek, wirusowe miRNA nie prowokują odpowiedzi immunologicznej gospodarza, wymagają stosunkowo niewielkiej „pojemności kodującej”, a także mogą szybko ewoluować w celu zmiany specyficzności rozpoznawania docelowych transkryptów [Skalsky i in. 2010]. Wirusy wykorzystują mechanizmy komórkowe do ekspresji swoich własnych miRNA, które wspomagają tworzenie korzystnego środowiska komórkowego dla przeprowadzenia wirusowego cyklu replikacyjnego. Pierwszy wirusowy miRNA został wykryty w 2004 r., w limfocytach B zainfekowanych herpeswirusem Epsteina-Barr (EBV, ang. *Epstein-Barr virus*) [Pfeffer i in. 2004].

Obecnie znanych jest około 300 wirusowych miRNA, a większość z nich jest kodowana w genomach przedstawicieli rodziny herpeswirusów [Dass i in. 2023]. Wiele wirusowych miRNA jest nacelowanych na geny białek proapoptotycznych. Przykładowo, kodowane w genomie wirusa EBV

miR-BART-16 i miR-BART1-3p wyciszają produkcję kaspazy 3, indukującej komórkową degradację apoptotyczną [Harold i in. 2016]. miR-BART1-3p dodatkowo uczestniczy w hamowaniu produkcji białka Bim, będącego proapoptotycznym mediatorem śmierci komórki [Marquitz i in. 2011]. miRNA kodowane przez EBV, a także przez wirusa mięsaka Kaposi'ego (KSHV, ang. *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*) i ludzkiego wirusa cytomegalii (HCMV, ang. *human cytomegalovirus*), obniżają ekspresję mRNA kodującego białko MICB, stanowiące ligand dla limfocytów NK, dzięki czemu wirusy te unikają rozpoznania i eliminacji przez komórki układu odpornościowego [Nachmani i in. 2009]. Unikalną cechą herpeswirusów, ułatwiającą im replikację w organizmie gospodarza, jest utajona infekcja, zwana latencją. Latencja może być promowana, m.in., przez miRNA wirusa KSHV, takie jak miR-K12-7 i miR-K12-9, celujące w gen *Orf50* kodujący wirusowy aktywator transkrypcji (transaktywator), którego inhibicja skutkuje zahamowaniem przejścia do stanu aktywnej infekcji [Lin i in. 2011]. W przeciwieństwie do ww. strategii, miR-H-27 kodowany przez wirusa opryszczki pospolitej 1 (HSV-1, ang. *herpes simplex virus 1*) hamuje komórkowy represor transkrypcji wirusowych transaktywatorów, co promuje replikację i proliferację wirusa [Wu i in. 2013].

## 2.2. Wirus pseudowścieklizny jako przedstawiciel alfaherpeswirusów

Wirus pseudowścieklizny (PRV, ang. *pseudorabies virus*), znany również jako SHV-1 (ang. *suid herpesvirus 1*) jest świńskim herpeswirusem należącym do rzędu *Varicellovirus* podrodziny *Alphaherpesvirinae*. Alfaherpeswirusy są neurotropowymi wirusami o szerokim zakresie gospodarza, charakteryzującymi się szybką replikacją, wywołującą ostrą lityczną infekcję, oraz przechodzącymi w stan latencji w neuronach, głównie w zwojach nerwów czuciowych. Do varicellowirusów należą również inne herpeswirusy o znaczeniu weterynaryjnym, jak bydlęcy herpeswirus 1 (BHV-1, ang. *bovine herpesvirus 1*), czy końskie herpeswirusy 1 i 4 (EHV-1 i EHV-4, ang. *equine herpesvirus*). Powszechnie znanymi przedstawicielami ludzkich alfaherpeswirusów są wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV, ang. *varicella zoster virus*) oraz wirusy opryszczki pospolitej (HSV-1 i HSV-2), przy czym dwa ostatnie należą do rzędu *Simplexvirus*. Alfaherpeswirusy są spokrewnione z przedstawicielami dwóch pozostałych podrodzin herpeswirusów, czyli *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae*. Do podrodzin tych należą, m.in., wspomniane wcześniej ludzkie patogeny – HCMV, zaliczany do betaherpeswirusów, oraz onkogenne gammaherpeswirusy EBV i KSHV [Davison 2010]. Poniżej przedstawiono pozycję systematyczną PRV oraz jego nową nazwę gatunkową, zaproponowane w 2022 r. przez ICTV (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*):

- Domena: *Duplodnaviria*
- Królestwo: *Heunggongvirae*

- Gromada: *Peploviricota*
- Klasa: *Herviviricetes*
- Rząd: *Herpesvirales*
- Rodzina: *Orthoherpesviridae*
- Podrodzina: *Alphaherpesvirinae*
- Rodzaj: *Varicellovirus*
- Gatunek: *Varicellovirus suidalpha1 (Wirus pseudowścieklizny)*

### 2.2.1. Patogeneza i eradykacja PRV

PRV jest czynnikiem etiologicznym pseudowścieklizny, znanej również jako choroba Aujeszky'ego. Choroba ta została opisana po raz pierwszy w Ameryce już w 1813 r. i rozprzestrzeniła się niemal globalnie od początku lat 80. XX w. Naturalnymi gospodarzami oraz rezerwuarem PRV są członkowie rodziny *Suidae* (świnie i dziki), w organizmach których wirus może wejść w stan latencji. Zagrożonych infekcją jest również wiele innych ssaków, w tym przeżuwaczy, zwierząt mięsożernych czy gryzoni, u których infekcja kończy się śmiercią [Müller i in. 2011]. W populacji świń choroba Aujeszky'ego wywołuje różne symptomy, w zależności od wieku zainfekowanych zwierząt. Choroba dla młodych prosiąt jest śmiertelna. Dorosłe zwierzęta z reguły przeżywają infekcję, jednak obserwuje się u nich zaburzenia w rozrodzie (resorpcja zarodków, poronienia, porody martwych prosiąt) oraz uszkodzenia układu nerwowego i oddechowego. Szczególnie groźny jest fakt, że latentnie zainfekowane zwierzę stanowi rezerwuuar wirusa, który po reaktywacji może zakażać inne osobniki [Wittmann i in. 1989].

Wcześniejsze badania eksperymentalne prowadzone na wyższych naczelnych wykazały, że szympany i ludzie nie są podatni na infekcję PRV. Jednakże, w 2019 r. zgłoszono ponad 20 przypadków ciężkiego zapalenia mózgu u ludzi, wywołanego przez tego wirusa [Wong i in. 2019]. Wszyscy pacjenci zarażeni wariantami PRV mieli bliski kontakt z trzodą chlewną, co sugeruje, że świnie mogły być etiologicznym źródłem PRV infekującego ludzi.

Na całym świecie, w tym w Polsce, choroba Aujeszky'ego spowodowała olbrzymie straty w produkcji trzody chlewnej oraz innych gatunków zwierząt. W wielu krajach wdrożono intensywne programy eliminacji i zapobiegania pseudowściekliznie, polegające głównie na masowej immunizacji szczepionkami markerowymi w połączeniu z testami diagnostycznymi. Podstawą szczepionek markerowych są genetycznie atenuowane (osłabione) żywe szczepy wirusowe pozbawiane jednego bądź kilku genów determinujących wirulencję, jednak nie zaburzających replikacji wirusa [Mettenleiter 2000]. Genami markerowymi są, m.in., geny kodujące glikoproteiny powierzchniowe, spośród których najczęściej usuwanymi są geny kodujące glikoproteiny E (gE) i gI [Quint i in. 1987,

Yan i in. 2021]. Zastosowanie szczepionek markerowych w połączeniu z badaniami serologicznymi pozwoliło na rozróżnienie zwierząt zaszczepionych od zainfekowanych dzikimi szczepami PRV. Strategia ta, nosząca nazwę DIVA (ang. *differentiating infected from vaccinated animals*) [van Oirschot 1999], stała się podstawą programów zwalczających PRV na całym świecie, a także posłużyła jako schemat programów zwalczania innych chorób wirusowych zwierząt.

W Polsce programy zwalczania i monitorowania choroby Aujeszky'ego są prowadzone od ponad piętnastu lat. Od dnia 5 czerwca 2023 r. terytorium Polski zostało oficjalnie uznane przez Komisję Europejską za obszar wolny od zakażenia PRV. Pomimo skutecznych kampanii eradykacyjnych, ogniska choroby Aujeszky'ego nadal pojawiają się w stadach trzody chlewnej na całym świecie [Ye i in. 2016]. Wybuchy epidemii w zaszczepionych stadach wynikają, m.in., z faktu, że szczepienia atenuowanymi wirusami nie powstrzymują terenowych szczepów PRV przed ustanowieniem latentnej infekcji u szczepionych zwierząt [Chen i in. 2022].

### **2.2.2. PRV jako model do badań *in vitro* i *in vivo***

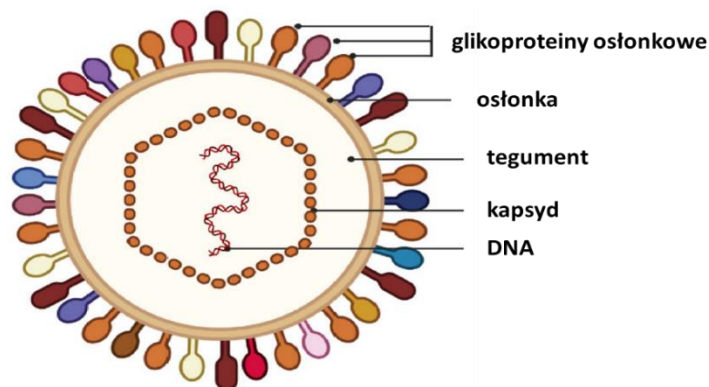
Wirus pseudowścieklizny, oprócz swojego znaczenia jako patogen zwierząt gospodarskich, jest często wykorzystywany jako model do badań nad mechanizmami infekcji alfa herpeswirusowej w hodowlach komórkowych oraz w zwierzętach. Jednym z powodów, dzięki którym PRV jest szeroko stosowanym modelem wirusowym, jest jego niezwykle szeroki zakres gospodarzy, co pozwala na wykorzystanie innych niż świński, dobrze poznanych modeli zwierzęcych do analizy infekcji letalnej [Mettenleiter 2000]. Myszy i szczury infekowane PRV służą jako standardowe modele zwierzęce w badaniach nad neuroinwazją alfa herpeswirusową i odpowiedzią immunologiczną gospodarza [Klopfleisch i in. 2004, Laval i in. 2019]. Ze względu na swoje szczególne właściwości neurotropowe, PRV stał się również głównym narzędziem w neurobiologii do śledzenia sieci neuronowych. PRV był również wykorzystywany do badania reaktywacji ze stanu latencji, zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w eksplantach nerwu trójdzielnego [Brockmeier i in. 1993]. Dzięki temu, że PRV rośnie wyjątkowo dobrze w hodowlach komórkowych, jest on odpowiednim modelem do szczegółowej analizy wymagań replikacyjnych innych alfa herpeswirusów. Do obszarów, które szczególnie skorzystały z wykorzystania do badań PRV, należą m.in. molekularne mechanizmy wiązania i wejścia wirusa do komórki oraz składanie i wydostawanie się wirionów potomnych na zewnątrz komórki [Pomeranz i in. 2005, Granzow i in. 2005].

Badania prowadzone na mysich modelach infekowanych wirusem pseudowścieklizny są pomocne w zrozumieniu mechanizmów leżących u podstaw chorób wywołanych ludzkimi alfa herpeswirusami, takimi jak zapalenie mózgu spowodowane infekcją HSV-1 [Sehl i in. 2020], lub

neuropatie wywołane przez blisko spokrewniony z PRV wirus VZV [Laval i in. 2020]. Ponadto, trwają badania nad wykorzystaniem PRV jako wektora onkolitycznego w przeciwnowotworowej terapii genowej u ludzi [Chai i in. 2022, Han i in. 2023]. Wirusy onkolityczne (OVs, ang. *oncolytic viruses*) wywołują selektywną lizę komórek nowotworowych, przy czym nie infekują zdrowych komórek. Dzięki niskiej toksyczności wektory OV stanowią atrakcyjną alternatywę wobec standardowych metod leczenia.

### 2.2.3. Struktura wirionu i organizacja genomu PRV

Wiriony wszystkich alfaherpeswirusów charakteryzują się podobnym rozmiarem oraz strukturą. Kompletne wiriony PRV są kuliste bądź owalne, o średnicy ok. 150-180 nm, zbudowane z czterech morfologicznie odrębnych komponentów strukturalnych. W ich centrum znajduje się genomowy DNA zamknięty w ikozaedralny kapsyd, który otoczony jest przez warstwę białek tworzących tegument oraz osłonkę lipidową zawierającą białka wirusowe (**Ryc. 2.7**).

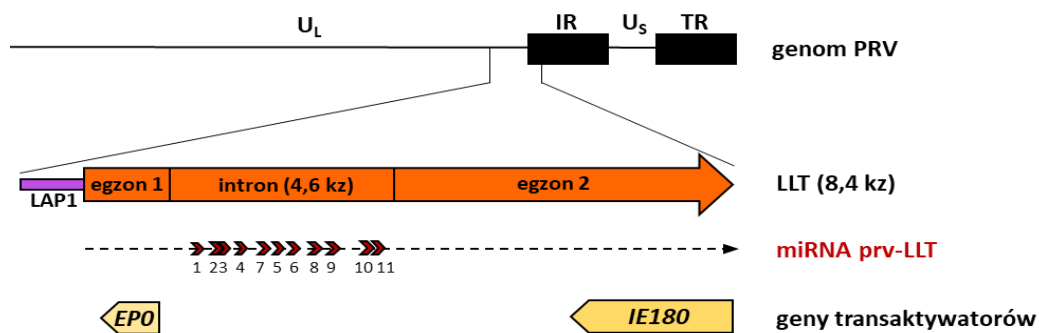


**Ryc. 2.7. Schemat budowy wirionu PRV.** Na podstawie [Zheng i in. 2022].

Na elementy strukturalne dojrzałych cząstek wirusa składa się około połowa kodowanych przez niego białek. Typowy kapsyd PRV zawiera 162 podjednostki białkowe zwane kapsomerami (150 heksamerów i 12 pentamerów). Tegument jest zbiorem ok. 12 białek zorganizowanych w dwie warstwy, z których zewnętrzna wchodzi w interakcje z białkami osłonki, a wewnętrzna jest ściśle związana z kapsydem. Do funkcji białek tegumentu należy regulowanie ważnych procesów zachodzących we wczesnych stadiach infekcji, jak przejęcie komórkowej maszyny syntezy białek czy modulacja ekspresji genów; białka te są również istotne dla właściwego składania wirionów potomnych. Osłonka jest zbudowana z dwuwarstwowej błony lipidowej pochodzenia komórkowego, w której jest zakotwiczonych ponad 10 różnych białek, w większości glikozylowanych, które modulują interakcje pomiędzy wirusem a jego gospodarzem. Glikoproteiny uczestniczą w wejściu wirusa i

uwalnianiu wirionów potomnych z komórki, bezpośrednim transporcie międzykomórkowym (ang. *cell-to-cell spread*) czy modulacji odpowiedzi immunologicznej [Mettenleiter 1991, Pomeranz i in. 2005, Kramer i in. 2011, Zheng i in. 2022].

Genom herpeswirusów, przedstawiony na **Ryc. 2.8**, ma postać pojedynczej cząsteczki dwuniciowego DNA długości ok. 145 kpz i zawiera ok. 75% par GC. Organizacja genomu PRV jest ściśle określona i reprezentuje klasę D genomów herpeswirusów, których klasy są określane na podstawie ogólnego układu rejonów unikatowych i powtórzeniowych. W genomie PRV można wyróżnić dwa unikatowe segmenty – długi ( $U_L$ , ang. *unique long*) oraz krótki ( $U_S$ , ang. *unique short*).  $U_S$  jest flankowany przez dwie sekwencje odwróconych powtórzeń: wewnętrzną i terminalną (odpowiednio IR i TR, ang. *internal/ terminal repeat*), o długości 15 kpz [Pomeranz i in. 2005]. Rekombinacja między powtórzeniami może prowadzić do powstania dwóch możliwych izomerów genomu, z rejonem  $U_S$  w przeciwnych orientacjach, przy czym obie formy izomeryczne nie różnią się właściwościami biologicznymi [Mettenleiter 1991, Klupp i in. 2004].



**Ryc. 2.8. Schemat organizacji genomu PRV.** Oznaczono lokalizację promotora LAP1 oraz genów kodujących IE180, EPO i LLT, który zawiera w intronie 11 genów kodujących miRNA.

Genom PRV zawiera 67 genów kodujących białka, i podobnie do innych herpeswirusów, geny PRV są upakowane w policistronowe jednostki organizacyjne. Dodatkowo, można wyróżnić cztery transkrypty podlegające procesowi splicingu, kodujące wczesne białko EPO (ang. *early protein 0*), US1 i UL15 oraz duży transkrypt związany z latencją – LLT (ang. *Large Latency Transcript*) [Cheung 1991, Tombáč i in. 2017]. Ostatni z nich, LLT, jest jednym z mRNA współtworzących tzw. transkrypt związany z latencją (LAT, ang. *latency associated transcript*), który jako jedyny jest transkrybowany w latentnie zainfekowanych neuronach [Cheung i in. 1999]. LAT zawiera transkrypty różnej długości, spośród których wykrywa się głównie mRNA o długości 0,95 kpz (tysięcy zasad), 1,0 kpz, 2,0 kpz i 8,0 kpz. LLT ma długość 8,4 kpz, przez co jest zaliczony do grupy długich niekodujących RNA (lncRNAs, ang. *long non-coding RNAs*). Transkrypcja LLT jest inicjowana z promotora LAP1 [Jin i in. 2000]. Matrycą, na której odbywa się transkrypcja LLT, jest dodatnia nić DNA, w związku z czym LLT jest antysensownym

lncRNA, syntetyzowanym z nici komplementarnej do tej kodującej geny transkryptorów IE180 i EPO [Cheung 1991]. Produktem splicingu LLT jest intron o długości 4,6 kb, służący jako pierwotny prekursor (pri-miRNA) dla 11 miRNA PRV [Wu i in. 2012]. W bazie miRBase regulatory te są oznaczone jako prv-miR-LLT1 do prv-miR-LLT11 (**Ryc. 2.8**), przy czym prv-miR-LLT11 i prv-miR-LLT12 występują w genomie w dwóch kopiach.

#### 2.2.4. Cykl replikacyjny PRV

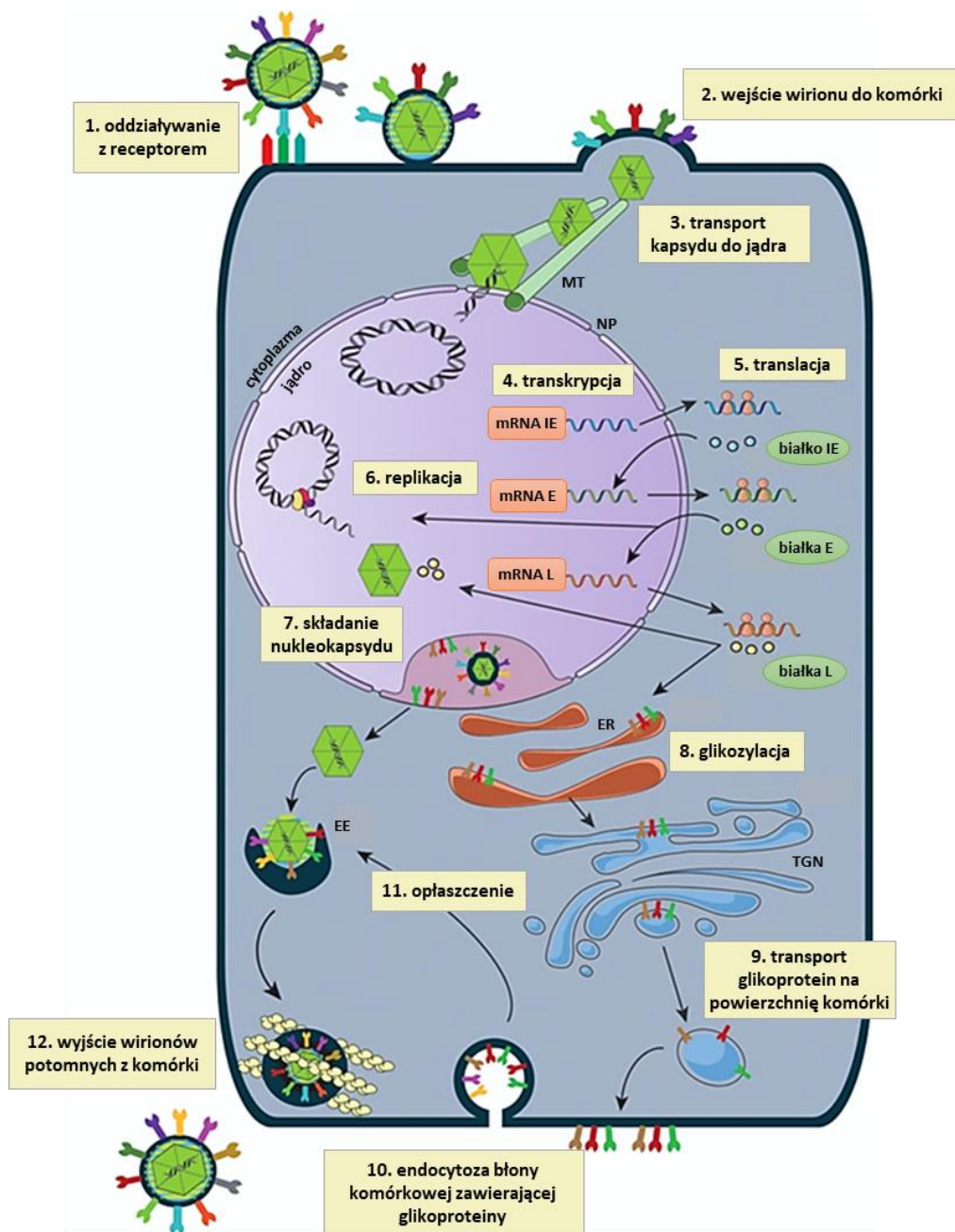
W organizmie naturalnego gospodarza, czyli dorosłej świni, wirus pseudowścieklizny przeprowadza pełen cykl replikacyjny, składający się z dwóch faz: krótkiej fazy litycznej, oznaczającej aktywną infekcję oraz następującej po niej chronicznej fazy latentnej (stan uśpienia), trwającej do momentu reaktywacji cyklu litycznego [Mettenleiter 2000].

##### Faza lityczna

Cykl lityczny, przedstawiony na **Ryc. 2.9**, rozpoczyna się od wejścia wirusa do epitelialnych komórek błony śluzowej nozdrzy. Wiriony PRV przyłączają się do komórek poprzez interakcję glikoproteiny gC z resztami cukrowymi siarczanu heparanu, po czym glikoproteina gD wiąże się z receptorami komórkowymi (przede wszystkim nektyną 1), stabilizując interakcję wirion – komórka. Następnie glikoproteiny gB, gH i gL pośredniczą w fuzji osłonki z błoną komórkową, co w rezultacie prowadzi do wejścia kapsydu wraz z białkami tegumentu do cytoplazmy [Granzow i in. 2005]. Pozbawione osłonki kapsydy wchodzi w interakcje z dyneiną, i przy pomocy mikrotubul są transportowane do porów błony jądrowej, przez które materiał genetyczny PRV zostaje uwolniony do wnętrza jądra komórkowego, gdzie ulega cyrkularyzacji.

Podczas herpeswirusowej infekcji litycznej, transkrypcja wirusowych genów jest sekwencyjnie rozłożona w czasie, co jest określane jako kaskada ekspresji genów i stanowi jedną z cech charakteryzujących przedstawicieli tej rodziny. Wirusowe geny lityczne mogą być podzielone na trzy klasy sukcesywnie produkowanych transkryptów, których produkty charakteryzują trzy powiązane ze sobą etapy. W fazie natychmiastowo-wczesnej (IE, ang. *immediate-early*) ekspresji ulegają geny IE, które stymulują fazę wczesną (E, ang. *early*), podczas której zachodzi produkcja białek odpowiedzialnych m.in. za replikację materiału genetycznego. Faza późna (L, ang. *late*) zachodzi po syntezie DNA, a jej produktami są białka kapsydu, osłonki i tegumentu [Mettenleiter 2000, Pomeranz i in. 2005].





**Ryc. 2.9. Skrócony schemat cyklu litycznego PRV.** MT – mikrotubule, NP – pory jądrowe, ER – retikulum endoplazmatyczne, TGN – część *trans* aparatu Golgiego, EE – wczesny endosom. Na podstawie [Ibáñez i in. 2018].

U PRV, białko tegumentu VP16 dociera do jądra niezależnie od kapsydu i aktywuje transkrypcję genu IE, przeprowadzaną przez komórkową polimerazę II RNA. PRV, w przeciwieństwie do innych alfa herpeswirusów, koduje tylko jeden gen IE, którego produktem jest transaktywator IE180, będący głównym aktywatorem produktywnej infekcji [Wu i in. 2014]. Gen *IE180* jest homologiem genu kodującego transaktywator ICP4 (ang. *infected cell protein 4*) HSV-1 [Gomez-Sebastian i in. 2004] i, podobnie do ICP4, występuje w genomie wirusa w dwóch kopiach, zlokalizowanych w rejonach

powtórzeniowych IR i TR. Produktem genu *IE180* jest białko o masie molekularnej wynoszącej ok. 180 kDa, posiadające domeny odpowiedzialne za wiązanie DNA oraz za aktywność transaktywacyjną [Taharaguchi i in. 1994]. Białko IE180 zawiera sygnał lokalizacji jądrowej, dzięki któremu po syntezie odbywającej się w cytoplazmie jest kierowane do jądra komórkowego. W jądrze IE180 aktywuje transkrypcję genów wczesnych, jak *EPO* i *UL54*, których produkty również uczestniczą w aktywacji kaskady transkrypcyjnej. Wykazano, że IE180 transaktywuje również geny wczesno-późne, jak *UL41*, kodujący białko regulatorowe vhs o aktywności endonukleazy, hamujące syntezę białek komórkowych (ang. *virion host shutoff*) [Lin i in. 2010]. Innym przykładem genu wczesno-późnego aktywowanego przez IE180, jest *US4* kodujący glikoproteinę gG, która poprzez powinowactwo do chemokin odgrywa rolę w unikaniu odpowiedzi immunologicznej [Viejo-Borbolla i in. 2010]. Ponadto, IE180 może wiązać się do promotora LAP1 i hamować produkcję transkryptu LLT [Ou i in. 2002], w związku z czym wyciszenie ekspresji genu *IE180* wiąże się zarówno z zahamowaniem kaskady ekspresji genów litycznych, jak i z promowaniem ustanowienia latentnej fazy infekcji. Drugim wirusowym transaktywatorem o szerokim zakresie aktywowanych genów jest białko EPO. To wczesne białko jest homologiem transaktywatora ICPO (ang. *infected cell protein 0*) wirusa HSV-1 [Moriuchi i in. 1995]. EPO również lokalizuje się w jądrze, gdzie aktywuje transkrypcję z promotorów genów wczesnych oraz późnych, takich jak *IE180*, *US4* czy *UL23*. Ten ostatni koduje kinazę tymidynową, zaangażowaną w metabolizm nukleotydów i warunkującą wirulencję PRV [McGregor i in. 1985]. Utrata przez PRV funkcji EPO wiąże się z zahamowaniem replikacji DNA wirusa, co prowadzi do obniżenia wirulencji PRV i zaburzeń reaktywacji cyklu litycznego [Wesley i in. 1996].

Produkty genów wczesnych, m.in. *UL5*, *UL8*, *UL9*, *UL30*, są zaangażowane w replikację DNA wirusowego, która początkowo odbywa się wg modelu *theta*, gdzie kolistą formą genomu służy jako matryca do pierwszej rundy replikacji. Następnie zachodzi zmiana sposobu replikacji na model toczącego się koła, co skutkuje generowaniem konkatamerycznej formy DNA o złożonej strukturze [Pomeranz i in. 2005]. Następująca później rekombinacja pomiędzy konkatamerami prowadzi do powstania genomów PRV o różnej konfiguracji rejonów  $U_L$  i  $U_S$ . Rozpoczęcie syntezy wirusowego DNA sygnalizuje wejście cyklu replikacyjnego w późny etap i zainicjowanie produkcji białek późnych (ang. *true late*), w tym komponentów kapsydu. Po syntezie białka kapsydu są kierowane do jądra komórkowego, gdzie następuje składanie kapsydów i upakowanie do nich pojedynczych kopii genomu PRV, co skutkuje formowaniem nukleokapsydów. Złożone nukleokapsydy przechodzą przez wewnętrzną błonę jądrową i trafiają do przestrzeni perinuklearnej, w której ulegają pierwotnemu opłaszczeniu. Następnie za pośrednictwem fuzji z zewnętrzną błoną jądrową pozbawione osłonki nukleokapsydy dostają się do cytoplazmy [Fuchs i in. 2002].

W kolejnym etapie cyklu replikacyjnego do nukleokapsydów dołączają białka tegumentu, po czym formujący się wirion ulega wtórnemu opłaszczeniu, czyli nabywa osłonkę lipidową z

zakotwiczone w niej glikoproteinami. W procesie formowania się osłonki wtórnej, glikoproteiny są transportowane z siateczki retikulum endoplazmatycznego do sieci *trans* aparatu Golgi'ego, gdzie są poddawane glikozylacji [Spear 1976]. Dojrzałe glikoproteiny są transportowane do błony komórkowej, po czym ulegają endocytozie. Nukleokapsydy wraz z tegumentem zostają opłaszczane albo za pośrednictwem wczesnych endosomów, albo poprzez sieć *trans*-Golgi [Owen i in. 2015]. Dojrzałe wiriony PRV są transportowane w pęcherzykach w kierunku błony komórkowej i opuszczają komórkę na drodze egzocytozy [Hogue i in. 2014]. Po uwolnieniu wirionów potomnych z zainfekowanej komórki, PRV rozprzestrzenia się do komórek sąsiadujących.

Alternatywnym sposobem rozprzestrzeniania się wirionów potomnych jest mechanizm *cell-to-cell spread*, w którym PRV jest kierowany do połączeń międzykomórkowych, bez wychodzenia do środowiska zewnątrzkomórkowego [Johnson i in. 2002]. Dla alfaherpeswirusów jest to podstawowa droga wtórej infekcji komórek nabłonkowych i nerwowych [Cifuentes-Munoz i in. 2020]. Główną determinantą wirusową pośredniczącą w tym procesie jest glikoproteina gE, działająca w kompleksie z gI, będąca produktem genu wczesno-późnego *US8* [Tombácz i in. 2017]. Mutant PRV z delecją *US8* cechuje się obniżoną wirulencją i zredukowanym rozprzestrzenianiem w systemie nerwowym [Jacobs 1994]. Warunkowana przez gE neuroinwazyjność jest jednym z czynników umożliwiających wirusowi przeprowadzenie infekcji latentnej, co jest związane z modulowaniem przez gE wejścia białek wirusowych do aksonów komórek nerwowych [Ch'ng i in. 2005]. Ponadto, gE determinuje aksoplazmatyczny transport postępujący (ang. *anterograde transport*) [DuRaine i in. 2021], dzięki któremu reaktywowany PRV dociera ze zwojów nerwowych z powrotem do komórek nabłonkowych układu oddechowego gospodarza, który staje się rezerwuarem wirusa i umożliwia mu dalsze rozprzestrzenianie się.

### Faza latentna

W warunkach naturalnych, PRV może wejść w stan latencji jedynie w dorosłym (przynajmniej kilkumiesięcznym) organizmie naturalnego gospodarza. Infekcja latentna alfaherpeswirusów odbywa się głównie w należących do obwodowego układu nerwowego zwojach nerwu trójdzielnego, do których potomne wiriony PRV docierają z miejsca pierwotnej infekcji. Przejście PRV z komórek nabłonkowych do zakończeń aksonów odbywa się poprzez warunkowaną przez gE fuzję błon. Następnie wiriony podlegają aksoplazmatycznemu transportowi wstecznemu (ang. *retrograde transport*) i za pomocą mikrotubul trafiają do ciał komórek nerwowych [Koyuncu i in. 2013]. Po dotarciu nukleokapsydów do porów jądrowych, genom PRV zostaje uwolniony do wnętrza jądra komórkowego, w którym pozostaje w formie tzw. episomu. Wiąże się to z cyrkularyzacją DNA oraz ze związaniem go z białkami histonowymi [Kent i in. 2004]. Wirus pozostający w formie episomu nie podlega replikacji, przez co wiriony potomne nie są generowane. „Uśpienie” wirusa uniemożliwia

układowi odpornościowemu rozpoznanie latentnie zainfekowanych komórek [Zhang i in. 2021 b]. Faza latentna uważana jest za stabilną, jednak „uśpiony” PRV może zostać reaktywowany, co oznacza aktywację kaskady transkrypcyjnej i rozpoczęcie kolejnego cyklu litycznego [Pomeranz in. 2005]. Jak już wspomniano, jedynym wirusowym mRNA wykrywanym w latentnie zainfekowanych komórkach są transkrypty LAT, kodujące prekursorsy miRNA PRV. Dotychczas poznane funkcje LLT w kontekście kodowanych w jego obrębie miRNA będą rozpatrzone w rozdziale **Wstęp 2.2.5**. W tej części natomiast zostaną omówione pokrótce białkowe czynniki warunkujące latencję PRV.

Cykl latencja – reaktywacja u alfaherpeswirusów jest ściśle regulowany przez subtelne i wciąż słabo poznane interakcje pomiędzy wirusem, komórkami nerwowymi i systemem immunologicznym [Decman i in. 2005, Szpara i in. 2010]. Staje się coraz bardziej oczywiste, że układ odpornościowy odgrywa ważną rolę w procesie wejścia infekcji herpeswirusowej w fazę latentną. W odporności wrodzonej, komórkowa ścieżka interferonowa (IFN, ang. *interferon pathway*) odgrywa rolę pierwszej linii obrony przeciwwirusowej poprzez ograniczanie replikacji i rozprzestrzeniania się alfaherpeswirusów [Sainz i in. 2002]. Co więcej, wykazano, że ścieżka IFN wprowadza HSV-1 i PRV w stan spoczynku przypominający latencję w hodowlach neuronów *in vitro* [De Regge i in. 2010]. Ścieżka IFN hamuje produkcję białek ICP4 i IE180, co może stanowić kluczowy krok w promowaniu wejścia alfaherpeswirusów w stan latencji. Dla HSV-1 wykazano ponadto, że IFN typu I moduluje oddziaływanie pomiędzy DNA wirusa a środowiskiem jądrowym, sprzyjając ustanowieniu latencji poprzez promowanie wzorca genomu właściwego dla infekcji latentnej w neuronach zainfekowanych HSV-1 [Maroui i in. 2016]. Czynnikiem komórkowym wyciszającym ekspresję genów litycznych są białka histonowe, które tworzą kompleksy z promotorami tych genów. Warto nadmienić, że determinantą HSV-1 pośredniczącą w wytworzeniu nieaktywnej transkrypcyjnie heterochromatyny są transkrypty LAT [Cliffe i in. 2009]. Jak dotąd, nie poznano białkowych czynników produkowanych przez PRV, warunkujących wejście tego wirusa w stan latencji.

Reaktywacja cyklu litycznego jest związana z wystawieniem latentnie zainfekowanego zwierzęcia na działanie czynników stresowych, takich jak głód, ekspozycja na zimno czy transport [Tanaka i in. 2003, Pan i in. 2023]. Jedynymi dotychczas poznanymi białkami promującymi reaktywację cyklu litycznego PRV są białka wirusowe. Podczas reaktywacji wzrasta poziom transaktywatora IE180, który poprzez wiązanie z promotorem LAP1 wycisza ekspresję genu *LLT*; proces ten może stanowić ważny „przełącznik” pomiędzy stanem latencji a cyklem litycznym [Ou i in. 2002, Wang i in. 2020]. Wykazano również, że u mutantów PRV z delacjami genów *EPO* [Wesley i in. 1996, Boldogkői i in. 2000], *US8* [Jacobs 1994], *UL23* [Ferrari i in. 2000] i *UL54* [Pan i in. 2023] proces reaktywacji do produktywnej infekcji był mocno upośledzony lub zablokowany, w porównaniu do wirusów typu dzikiego.

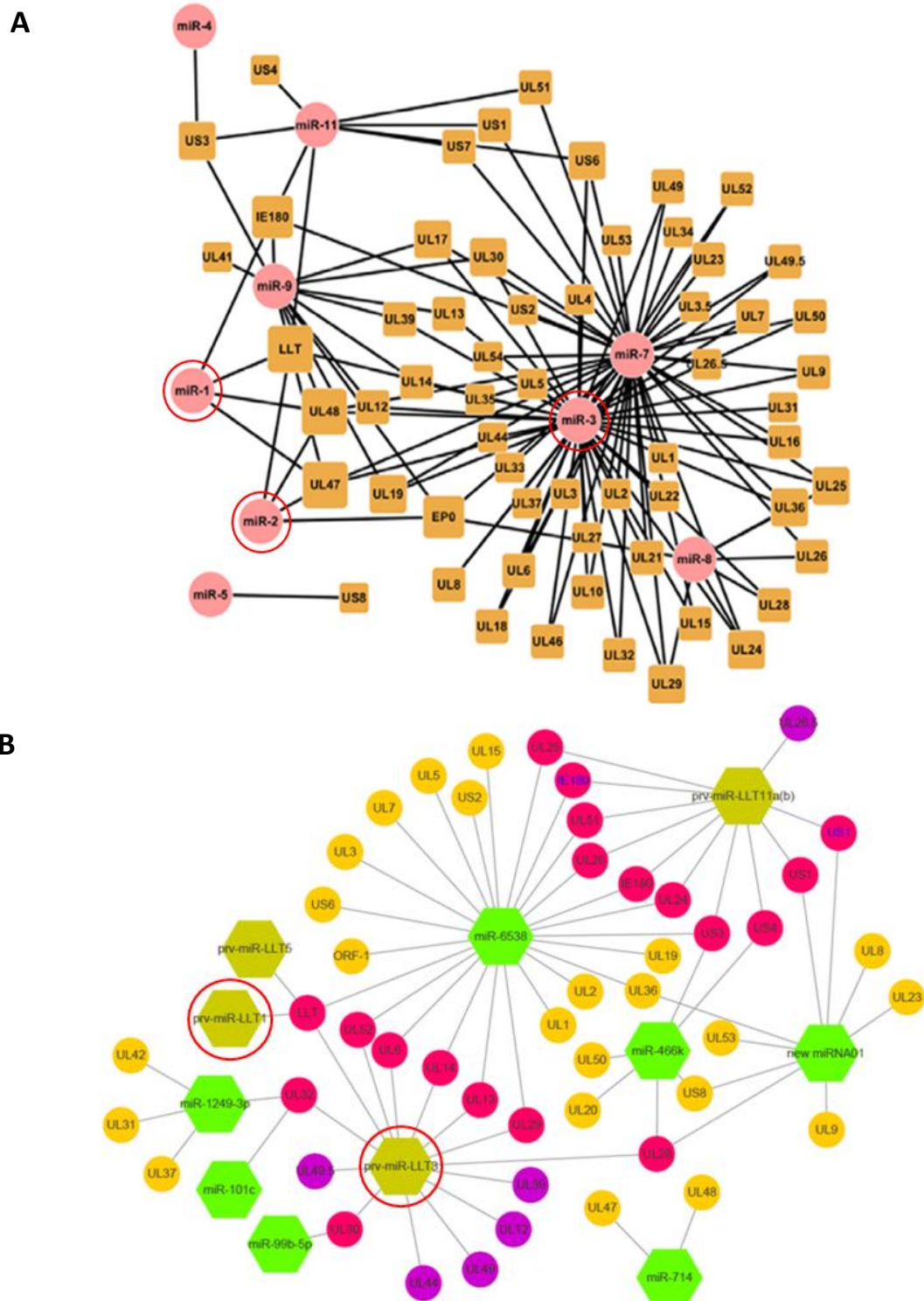
### 2.2.5. Biologiczne funkcje miRNA PRV

Transkrypty LAT u alfaherpeswirusów generują kilka typów ncRNA, takich jak miRNA, małe RNA (sRNAs, ang. *small RNAs*), lncRNA czy małe niekodujące RNA (sncRNAs, ang. *small non-coding RNAs*) [da Silva i in. 2013, Cheng i in. 2019]. Spośród wymienionych typów, miRNA stanowią najintensywniej badaną grupę ncRNA. Pierwsze doniesienia na temat miRNA kodowanych w genomach alfaherpeswirusów pochodzą z laboratorium Thomasa Tuschla z 2005 r. Badacze przeprowadzili komputerowe analizy drugorzędowych struktur typu spinki, reprezentujących pre-miRNA i wykryli, że HSV-1 i HSV-2 kodują odpowiednio siedem i sześć miRNA [Pfeffer i in. 2005]. Predykcje te nie zostały jednak potwierdzone eksperymentalnie. W 2006 r. grupa Donalda Coena zidentyfikowała metodami bioinformatycznymi 13 miRNA kodowanych przez HSV-1, przy czym obecność miR-H1 została potwierdzona doświadczalnie [Cui i in. 2006]. Pierwsze badania eksperymentalne nad regulacyjną funkcją miRNA alfaherpeswirusów zostały przeprowadzone w 2008 r. przez grupę Bryana Cullena która dowiodła, że miR-H2 i miR-H6 kodowane przez HSV-1 redukują ekspresję genów *ICP0* i *ICP4*, kodujących wirusowe transaktywatory [Umbach i in. 2008]. Podobne doniesienia dotyczyły miRNA kodowanych przez HSV-2 [Tang i in. 2009] oraz BHV-1 [Jaber i in. 2010], alfaherpeswirusa o znaczeniu weterynaryjnym.

W 2011 r., wykorzystując technologię NGS, Elisabetta Giuffra i jej grupa jako pierwsi zidentyfikowali pięć wirusowych miRNA w zainfekowanych PRV świńskich komórkach dendrytycznych [Anselmo i in. 2011]. Od tamtego czasu zainteresowanie miRNA PRV zaczęło sukcesywnie wzrastać. W oparciu o analizę z 2011 r., grupa Zheng-Fei Liu wykryła 11 miRNA PRV w zainfekowanych wirusem komórkach nabłonkowych nerki świńskiej (PK-15, ang. *porcine kidney-15*), kodowanych w intronie transkryptu LLT PRV [Wu i in. 2012]. W bazie danych miRBase funkcjonują identyfikatory miRNA PRV przedstawione w ww. publikacji. miRNA PRV były także wykrywane w zainfekowanych modelach zwierzęcych, jak świnię [Timoneda i in. 2014] i myszy [Li i in. 2017]. Co ciekawe, za pomocą techniki NGS wykryto w zainfekowanych komórkach PK-15 20 miRNA PRV, kodowanych w otwartych ramach odczytu genów kodujących białka wirusa [Liu i in. 2016], jednak uwaga badaczy jest skupiona w głównej mierze na 11 miRNA kodowanych w rejonie intronu LLT.

Wymienione zespoły badawcze przeprowadziły również analizy bioinformatyczne mające na celu predykcję genów docelowych dla poszczególnych miRNA PRV. Najczęściej wskazywanymi celami tych regulatorów, podobnie jak w przypadku innych alfaherpeswirusów, są geny kodujące transaktywatory produktywnej infekcji – białka IE180 i EPO, jak również kinazy, glikoproteiny powierzchniowe oraz komórkowe geny kodujące białka zaangażowane, m.in., w regulację odpowiedzi immunologicznej. Predykcje proponowane przez różne zespoły są dość rozbieżne, jednak można

założyć, że miRNA kodowane przez PRV wraz z docelowymi genami tworzą złożoną sieć regulacyjną. Przykładowe sieci regulacyjne zostały przedstawione na **Ryc. 2.10**.



**Ryc. 2.10.** Graficzne przedstawienie przewidywań *in silico* dotyczących interakcji miRNA PRV – docelowe transkrypty. Zaadaptowano z **A)** [Wu i in. 2012] i **B)** [Li i in. 2017]. Za pomocą czerwonych okręgów zaznaczono miRNA PRV analizowane w przedstawionej pracy doktorskiej.

Liczba doniesień dotyczących eksperymentalnie potwierdzonych funkcji i celów miRNA PRV jest ograniczona. Pierwsze badania funkcjonalne analizujące rolę miRNA w biologii PRV zostały opublikowane w 2015 r. przez zespół Elisabetty Giuffry. Badacze skonstruowali mutanta PRV z delecją fragmentu genu kodującego LLT, zawierającego dziewięć miRNA (od prv-miR-LLT1 do prv-miR-LLT9). Wygenerowany mutant delecyjny posłużył do infekcji świń, w których był zdolny do przejścia do latentnej fazy infekcji, bez oznak reaktywacji. Na podstawie uzyskanych wyników badacze stwierdzili, że miRNA nie są wymagane do ustanowienia latencji [Mahjoub i in. 2015]. Obserwacja ta była zgodna z wcześniej uzyskanymi wynikami badań nad aktywnością mutantów PRV niezdolnych do ekspresji genu *LAT*, które również były w stanie osiągnąć fazę latentną [Cheung 1996, Jin i in. 2000]. Ponadto, u świń zainfekowanych mutantem z delecją dziewięciu miRNA zaobserwowano wzrost ekspresji świńskich genów zawiadujących komórkową odpowiedzią immunologiczną, co sugeruje, że *LAT* może uczestniczyć w unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza [Mahjoub i in. 2015]. Dalsze doświadczenia analizujące rolę miRNA w biologii PRV zostały przeprowadzone przez zespół Zheng-Fei Liu, który wykorzystał do badań mutanta delecyjnego pozbawionego wszystkich 11 miRNA z intronu LLT. Badacze wykazali, że pełen klaster miRNA hamuje kinetykę replikacji oraz proliferację wirusa *in vitro*. Ponadto, wyniki eksperymentów przeprowadzonych na zwierzętach zainfekowanych skonstruowanym mutantem delecyjnym sugerowały wpływ miRNA PRV na wirulencję wirusa u jego naturalnych gospodarzy oraz u myszy [Wang i in. 2018].

Do tej pory przeprowadzono jedynie dwa badania funkcjonalne, które analizowały potencjał regulacyjny oraz docelowe transkrypty poszczególnych miRNA PRV. Pierwsze badanie nad wpływem pojedynczego miRNA na fenotyp PRV dotyczyło analizy prv-miR-LLT7. Eksperymenty były prowadzone w warunkach *in vitro* i obejmowały transfekcję komórek PK-15 za pomocą antysensownego oligonukleotydu anty-prv-miR-LLT7 i następującą po niej infekcję komórek wirusem PRV dzikiego typu. Analiza RT-qPCR wykazała hamujące działanie prv-miR-LLT7 na ekspresję genu *IE180* oraz, co ciekawe, pozytywny wpływ tego miRNA na wielkość łysinek PRV przy jednoczesnym braku oddziaływania na kinetykę wzrostu wirusa [Wang i in. 2018]. Drugim miRNA, którego funkcja była badana poza kontekstem pełnego klastra, był prv-miR-LLT11a. Na potrzeby tego eksperymentu opracowano model badawczy, w którym zainfekowano dzikim PRV komórki PK-15, wcześniej poddając je transfekcji za pomocą mimików tego miRNA. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazywały na potencjał ekspresowanego prv-miR-LLT11a do hamowania replikacji PRV. Badacze wykazali również, że celami dla analizowanego miRNA były komórkowe transkrypty kodujące świński antygen zgodności tkankowej (SLA-1, ang. *swine leukocyte antigen class I*) oraz transporter związany z przetwarzaniem antygenów (TAP, ang. *transporter associated with antigen processing*). SLA-1 i TAP są mediatorami komórkowej odpowiedzi immunologicznej, przez co prv-miR-LLT11a może wpływać na interakcje wirus – gospodarz [Liu i in. 2019].

### 3. Cel pracy

Z informacji zawartych we wstępie wynika, że miRNA kodowane w genomach herpeswirusów sprzyjają tworzeniu korzystnego dla nich środowiska komórkowego, regulującego wirusowy cykl życiowy i wspierającego unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Badania eksperymentalne dotyczące funkcji miRNA wirusa pseudowścieklizny przeprowadzone do tej pory skupiały się w głównej mierze na analizie roli klastrów zbudowanych z dziewięciu lub jedenastu miRNA kodowanych w intronie LLT PRV. Niewiele natomiast wiadomo na temat biologicznych funkcji pojedynczych miRNA PRV. Z tego powodu wymagane jest kontynuowanie badań nad tym zagadnieniem, aby lepiej zrozumieć, w jaki sposób miRNA wpływają na kontrolę wirusowego cyklu replikacyjnego.

Celem mojej pracy doktorskiej była analiza funkcji klastra trzech pierwszych miRNA zlokalizowanych w intronie LLT PRV. Badania obejmowały ocenę potencjału miRNA do modulowania ekspresji wybranych genów wirusowych oraz określenie ich roli w regulowaniu cyklu życiowego wirusa. Dalsze badania obejmowały weryfikację, prowadzoną za pomocą inhibitorów miRNA, który spośród miRNA z klastra LLT[1-3] pełni dominującą rolę.

Realizacja tak zarysowanych celów wymagała przeprowadzenia następujących badań:

- opracowanie i konstrukcja modelu badawczego zapewniającego stałą produkcję miRNA PRV w komórkach świńskich;
- wybór podejścia eksperymentalnego umożliwiającego wprowadzanie genów PRV i analizę ich ekspresji w komórkach stabilnie produkujących miRNA PRV;
- produkcja, oczyszczanie i charakterystyka preparatu rekombinowanej rybonukleazy Dicer, służącego do testowania oligomerów RNA o charakterze inhibitorowym;
- analiza potencjału zaprojektowanych oligomerów do hamowania wycinania miRNA PRV z ich prekursorów w warunkach *in vitro*;
- ocena możliwości wykorzystania oligomerów do kontroli generowania miRNA PRV w warunkach *in cellulo*;
- optymalizacja warunków pracy z oligomerami w systemie komórkowym.



## 4. Wyniki

### 4.1. Przygotowanie i charakterystyka preparatu rekombinowanej hDicer

Realizację mojego projektu doktorskiego rozpoczęłam od przygotowania preparatu rekombinowanej ludzkiej rybonukleazy Dicer (hDicer). Jest to jedno z kluczowych białek w procesie biogenezy miRNA, które przetwarza prekursory RNA o strukturze spinki do włosów do dwuniciowego RNA, który następnie służy jako źródło dojrzałych, funkcjonalnych miRNA [Bartel 2004]. Preparat hDicer został wykorzystany do określenia rodzaju oddziaływań pomiędzy Dicer a różnej długości oligomerami RNA, będącymi potencjalnymi inhibitorami procesu cięcia pre-miRNA przez Dicer. Preparat ten był również niezbędny do przeprowadzenia panelu analiz *in vitro* dotyczących cięcia (hydrolizy) syntetycznych prekursorów miRNA wirusa PRV przez tę rybonukleazę, prowadzonych w ramach badań nad wydajnością inhibicji tego procesu w obecności ww. oligomerów.

Konsultując się z zespołem dr hab. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, prof. Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, opracowałam własną metodę produkcji preparatu hDicer, opierającą się na ekspresji genu *DICER1* w systemie bakulowirusowym oraz na następującym po niej dwuetapowym oczyszczaniu preparatu za pomocą chromatografii powinowactwa i jonowymiennej. Jako system ekspresyjny wybrałam bakulowirusowy system ekspresji genów Bac-to-Bac, m.in. ze względu na duże doświadczenie naszego Zespołu w pracy z rekombinowanymi bakulowirusami [Tyborowska i in. 2006; Grabowska i in. 2009] oraz ze względu na fakt, że jest to dobrze ugruntowana technika produkcji rekombinowanych białek [Altman i in. 1999, Provost i in. 2002].

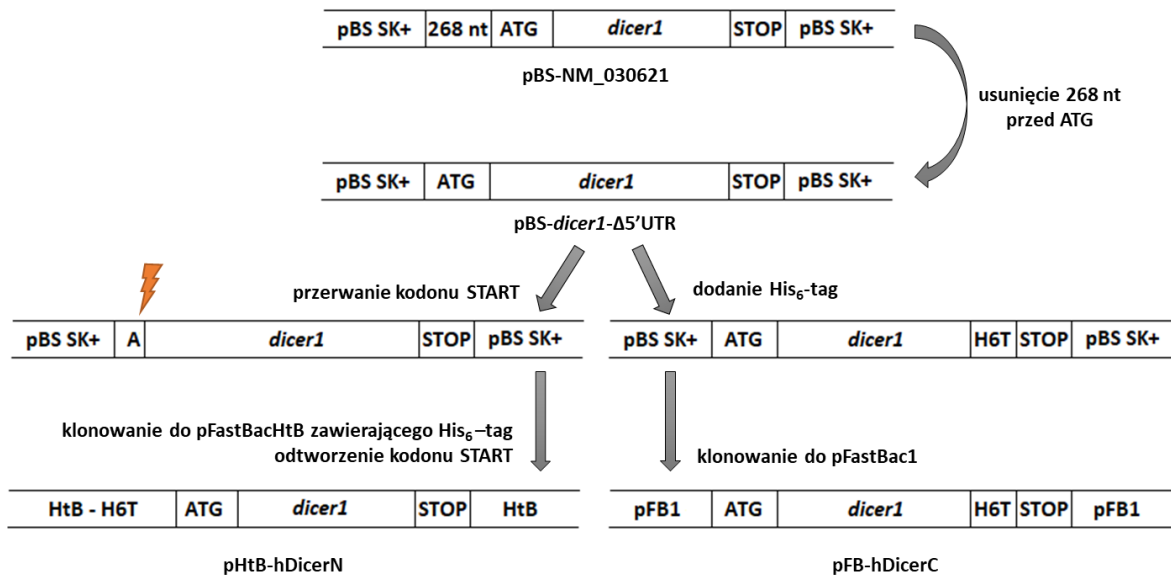
#### 4.1.1. Ekspresja rekombinowanych genów kodujących rybonukleazę hDicer

Materiałem wyjściowym służącym do konstrukcji rekombinowanych bakulowirusów Bac-hDicerC i Bac-hDicerN był wektor pBlueScript SK(+) zawierający kompletną sekwencję cDNA genu ludzkiej rybonukleazy Dicer1 (*DICER1*, PubMed accession number NM\_030621), zamówiony w firmie GenCopoeia. W celu optymalizacji produkcji hDicer, zdecydowałam się na wprowadzenie dwóch modyfikacji do wyjściowej sekwencji cDNA. Preferowany podczas translacji kodon START jest umiejscowiony w pozycji 269-271 genu *DICER1*, co skutkuje syntezą białka składającego się z 1922 aa, o masie ok. 216 kDa [Provost i in. 2002]. Pierwsza modyfikacja sekwencji DNA polegała na delecji fragmentu długości 268 pz z rejonu 5'UTR, znajdującego się bezpośrednio przed kodonem ATG. Krok ten miał na celu zwiększenie wydajności ekspresji genu hDicer w komórkach owadzych, ponieważ sekwencje znajdujące się powyżej preferowanej otwartej ramki odczytu mogą powodować obniżenie ekspresji genu, m.in. poprzez mniej wydajną translację [Calvo i in. 2009].

Zdecydowałam się również na dołączenie do sekwencji kodującej hDicer sekwencji znacznika, składającej się z sześciu reszt histydynowych (His<sub>6</sub>-tag). Białka ze znacznikiem His<sub>6</sub>-tag można łatwo oczyścić za pomocą chromatografii powinowactwa IMAC (chromatografia powinowactwa do unieruchomionych jonów metali, ang. *immobilized metal ion affinity chromatography*) [Loughran i in. 2017]. Ponadto, przeciwciała anty-His<sub>6</sub>-tag są powszechnie dostępne i pozwalają na wykrywanie oczyszczanego białka bez konieczności używania swoistych dla niego przeciwciał. Zaplanowałam konstrukcję dwóch kaset ekspresyjnych: kasety kodującej rybonukleazę hDicer ze znacznikiem histydynowym na końcu aminowym oraz kasety kodującej rybonukleazę hDicer ze znacznikiem histydynowym na końcu karboksylowym.

Strategia klonowania obu wersji rekombinowanego genu kodującego hDicer (z dołączoną sekwencją znacznika His<sub>6</sub>-tag na końcu 5' i 3') opierała się w pierwszej fazie na stworzeniu wspólnego dla nich konstrukt (pBS-*dicer1*-Δ5'UTR), pozbawionego 268 pz z rejonu 5'UTR, znajdujących się przed kodonem START. W tym celu przeprowadziłam reakcję PCR z użyciem zestawu starterów Δ5'UTR-F/ Δ5'UTR-R, po czym umieściłam produkt reakcji PCR w plazmidzie pBS-*dicer1*, pomiędzy miejscami cięcia rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne *Acc65I* i *NsiI*. Klonowany gen został poddany sekwencjonowaniu (we fragmentach, ze względu na jego długość), co potwierdziło zgodność otrzymanej sekwencji z sekwencją referencyjną. Na bazie powstałego konstrukt pBS-*dicer1*-Δ5'UTR zostały przeprowadzone dalsze modyfikacje, których efektem było uzyskanie dwóch wersji klonowanego genu.

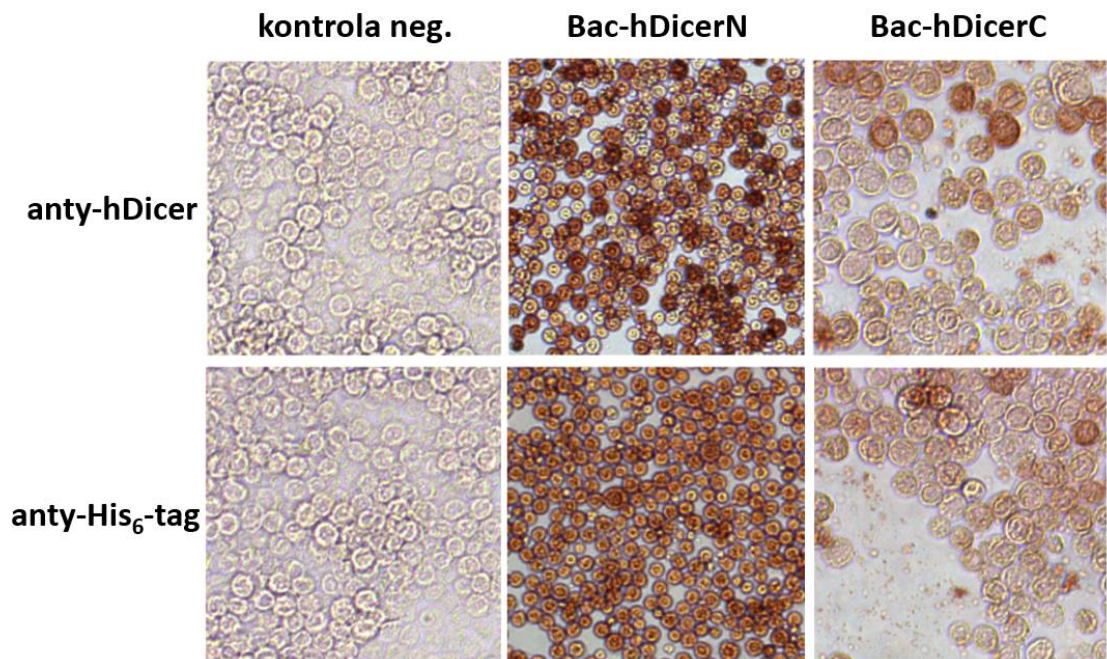
Pierwsza wersja genu zawierała sekwencję kodującą His<sub>6</sub>-tag na końcu 5'. Początkowo, w reakcji PCR (przy użyciu starterów ΔATG-F/Δ5'UTR-R) uzyskałam syntetyczny fragment genu z usuniętym kodonem ATG. Przy pomocy enzymów *Sall* oraz *NsiI* wprowadziłam produkt PCR w odpowiadające im miejsca w konstrukcie pBS-Dicer-Δ5'UTR. Pełna sekwencja genu *DICER1*, pozbawiona kodonu START, została wycięta z wektora pBluescript SK(+) przy użyciu enzymów *Sall* i *NotI*, a następnie przeniesiona do wektora transferowego pFastBac HtB. Uzyskany konstrukt pHtB-hDicerN posiadał odtworzony kodon ATG, za którym znajdowała się sekwencja kodująca znacznik histydynowy i pełna sekwencja *DICER1*. Druga wersja genu, kodująca rekombinowane białko hDicer ze znacznikiem histydynowym znajdującym się na C-końcu, została skonstruowana poprzez wycięcie enzymami *XagI* i *NotI* sekwencji znajdującej się na końcu 3' konstrukt pBS-Dicer-Δ5'UTR i wymienienie jej na produkt reakcji PCR, wprowadzający sekwencję His<sub>6</sub>-tag, otrzymany przy użyciu zestawu starterów H6T-F/H6T-R. W celu wycięcia z wektora pBluescript SK(+) (pBS SK+) pełnej sekwencji *DICER1* z dodaną sekwencją nukleotydową kodującą znacznik histydynowy na końcu 3', posłużyłam się enzymami *Sall* i *NotI*, a następnie klonowałam ją w docelowym wektorze pFastBac1, uzyskując konstrukt pFB-hDicerC. Schemat przygotowania konstruktów został przedstawiony na **Ryc. 4.1**.



**Ryc. 4.1. Schemat konstrukcji rekombinowanych wektorów transferowych systemu Bac-to-Bac z genem kodującym hDicer ze znacznikiem histydynowym na końcu aminowym albo karboksylowym.** Opis znajduje się w tekście. Zaznaczono miejsce delekcji sekwencji ATG. H6T – sekwencja kodująca znacznik His<sub>6</sub>-tag.

W kolejnym etapie przeprowadziłam transformację komórek kompetentnych DH10Bac plazmidami pHtB-hDicerN i pFB-hDicerC, czego skutkiem było zajście transpozycji miejscowo-specyficznej i otrzymanie rekombinowanych bakmidów (DNA bakulowirusa w postaci plazmidu) kodujących obie wersje białka hDicer ze znacznikiem histydynowym. Rekombinanty bakulowirusowe Bac-hDicerN i Bac-hDicerC otrzymałam poprzez transfekcję komórek Sf9 oczyszczonym z bakterii DNA bakmidowym, kodującym odpowiednio hDicerN i hDicerC. Zebrany po transfekcji lizat bakulowirusowy P1 posłużył do namnożenia bakulowirusów do drugiego pasażu P2. W celu namnożenia rekombinowanych bakulowirusów do wysokiego miana (>10<sup>7</sup>/ml), pasażowałam je do trzeciego pokolenia, które po zmiareczkowaniu służyło do infekcji komórek Sf9 w celu produkcji rekombinowanej rybonukleazy hDicer.

W celu potwierdzenia, że w hodowli komórek owadzych infekowanych skonstruowanymi rekombinantami bakulowirusowymi powstaje białko hDicer zawierające znacznik histydynowy na N- albo na C-końcu, przeprowadziłam immunodetekcję *in situ* białka (test IPMA) w komórkach przy użyciu przeciwciał anty-Dicer i anty-His<sub>6</sub>-tag. Komórki Sf9 wysiane na płytkę M6 infekowałam 200 µl lizatów P2 przez 72 godziny. Wynik badania (przedstawiony na **Ryc. 4.2**) potwierdził, że w wyniku infekcji rekombinowanymi bakulowirusami komórki Sf9 produkowały białko hDicer z przyłączonym znacznikiem His<sub>6</sub>-tag zarówno na końcu aminowym, jak i karboksylowym.

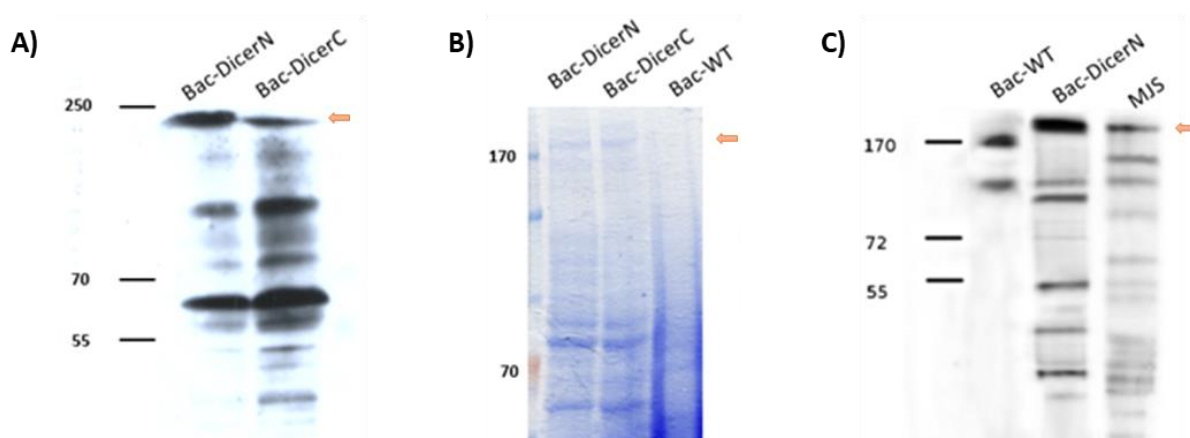


**Ryc. 4.2.** Detekcja *in situ* rybonukleazy hDicer ze znacznikiem His<sub>6</sub>-tag na końcu aminowym albo karboksylowym w komórkach Sf9 infekowanych rekombinowanymi bakulowirusami. IPMA z wykorzystaniem przeciwciał anty-Dicer (1:1000) lub anty-His<sub>6</sub>-tag (1:1000).

Testem potwierdzającym, że białko hDicer jest produkowane do pełnej długości formy i cechuje się spodziewanym ciężarem molekularnym, był rozdział białek w żelu poliakryloamidowym (PAA, ang. *polyacrylamide*) i analiza Western blotting. Rosnące na płytce M6 komórki Sf9 infekowałam 400 µl lizatów Bac-hDicerN lub Bac-hDicerC pokolenia drugiego, lub niezmodyfikowanym bakulowirusem (Bac-WT, jako kontrola negatywna), hodowałam przez 48 godzin, po czym lizowałam je przy pomocy 4× stężonego buforu obciążająco-redukującego i przeprowadziłam rozdzielanie SDS-PAGE oraz immunodetekcję z użyciem przeciwciał anty-His<sub>6</sub>-tag i anty-Dicer. W celu zbadania, czy rekombinowane białko hDicer po rozdzielaniu elektroforetycznym znajduje się na wysokości właściwej dla hDicer występującej naturalnie w komórkach ludzkich, przeprowadziłam analizę Western blotting lizatów zainfekowanych komórek Sf9 oraz ludzkich komórek czerniaka (MJS, dostępna w Zakładzie linia ludzkich komórek), przy użyciu przeciwciał anty-Dicer.

Przeprowadzona analiza wykazała obecność białek o masie ok. 220 kDa w lizatach komórek Sf9 infekowanych bakulowirusami Bac-hDicerN i Bac-hDicerC. Masa ta odpowiadała masie ludzkiej rybonukleazy Dicer (216 kDa). Wynik badania został przedstawiony na **Ryc. 4.3**. Rekombinowane wersje białka hDicer reagowały zarówno z przeciwciałami anty-His<sub>6</sub>-tag (**Ryc. 4.3.A**), jak i anty-Dicer (**Ryc. 4.3.C**). W żelu barwionym Coomassie, powyżej wzorca 170 kDa, można zauważyć wyraźne prążki odpowiadające dwóm wersjom białka hDicer (ze znacznikiem na N- i C-końcu), co świadczyło o

wydajnej ekspresji genów kodujących hDicer w komórkach owadzych infekowanych rekombinantami bakulowirusowym (**Ryc. 4.3.B**). Nie wykryłam badanego białka w kontroli negatywnej, którą stanowiły komórki Sf9 infekowane niezmodyfikowanym szczepem bakulowirusa (Bac-WT). Wynik analizy z wykorzystaniem lizatów komórek MJS (**Ryc. 4.3.C**) potwierdził, że obie wersje rekombinowanej rybonukleazy hDicer produkowanej w systemie Bac-to-Bac charakteryzują się masą molekularną odpowiadającą masie ludzkiej Dicer.



**Ryc. 4.3. Detekcja rybonukleazy hDicer w lizatach komórek Sf9 infekowanych rekombinowanymi bakulowirusami.** **A)** Analiza Western blotting prowadzona za pomocą przeciwciał anti-His<sub>6</sub>-tag 1:2000. **B)** Żel wybarwiony Coomassie Brilliant Blue R-250. **C)** Analiza Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-Dicer 13D6 1:2000. Bac-WT – komórki Sf9 infekowane niezmodyfikowanym szczepem bakulowirusa; MJS – lizat ludzkich komórek czerniaka. Strzałki wskazują wysokość, na jakiej znajduje się pełnej długości forma białka hDicer.

#### 4.1.2. Produkcja i oczyszczanie preparatu hDicer

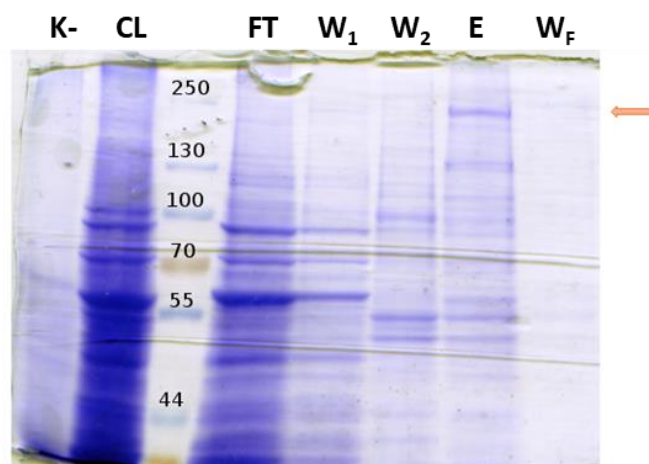
Przygotowanie preparatu rekombinowanej rybonukleazy hDicer wymagało podjęcia następujących kroków: produkcji hDicer w komórkach Sf9, lizy komórek (sekwencje konstruktów rekombinowanej rybonukleazy hDicer nie zawierają peptydu sygnałowego kierującego produkowane białka do pożywki), oczyszczenia wyprodukowanej w komórkach Sf9 hDicer oraz zawieszenia hDicer w buforze zapewniającym zachowanie aktywności enzymatycznej preparatu.

Nadprodukcja obu wariantów rybonukleazy hDicer odbywała się w płynnej hodowli zawiesinowej komórek Sf9 w szklanych kolbach, w objętości 50-100 ml. W celu zwiększenia wydajności produkcji rekombinowanych białek, zoptymalizowałam warunki hodowli dotyczące stężenia komórek, wielokrotności infekcji (MOI, *multiplicity of infection*) oraz czasu jej trwania. Hodowle Sf9 o żywotności minimum 95% były rozcieńczane do stężenia  $2 \times 10^6$ /ml, zapewniającego wysoką

żywołność komórek znajdujących się w fazie wykładniczego wzrostu. Zdecydowałam się na stosowanie wysokiego MOI (1-5 pfu/kom.) rekombinowanych bakulowirusów, ponieważ w tych warunkach szybciej następuje maksymalna ekspresja wprowadzonych genów [Licari i in. 1991]. Czas trwania infekcji był zdeterminowany momentem obserwacji efektu cytopatycznego, związanego z lizą komórek. Nadprodukowane w systemie owadziim białka izolowane były z komórek, dlatego w trakcie prowadzenia hodowli zwracałam uwagę by nie doszło do lizy komórek, co spowodowałoby uwolnienie nadprodukowanych białek do pożywki. Zainfekowane komórki Sf9 produkujące rekombinowaną hDicer zbierałam ok. 48 godzin po infekcji (hpi, ang. *hours post infection*), co jest zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi produkcji w systemie bakulowirusowym rekombinowanych rybonukleaz Dicer-1 i Dicer-2, pochodzących z *Drosophila melanogaster* [Ye i in. 2008].

Pierwszym złożem chromatograficznym, którego użyłam do oczyszczania preparatów hDicer, była agarozą niklowo-nitrylo-trioctowa (Ni-NTA), mająca zastosowanie w chromatografii powinowactwa IMAC. Przeprowadzona analiza porównawcza warunków oczyszczania wykazała, że hDicer oczyszcza się równie wydajnie w warunkach natywnych, jak w denaturujących (z zastosowaniem czynnika redukującego – 5 mM  $\beta$ -merkaptoetanolu, dane niezałączone). Świadczyło to o dobrej rozpuszczalności białka hDicer w roztworach wodnych, dobrej dostępności znacznika histydynowego oraz o braku powstawania agregatów białkowych.

Do oczyszczania wykorzystywałam 1 ml złoża niklowego oraz lizaty z komórek Sf9, produkujących obie wersje hDicer (hDicerN albo hDicerC), z hodowli o objętości 50-100 ml. Buforem służącym do lizy komórek i płukania złoża był bufor Ni100 o pH 7,5 i sile jonowej 100 mM NaCl. W celu zminimalizowania ryzyka rozkładu proteolitycznego izolowanych białek, komórki były lizowane na lodzie w buforze Ni100 z inhibitorami proteaz, a inkubacja ze złożem i oczyszczanie hDicer były przeprowadzane w temperaturze 4 °C. Po uformowaniu kolumny i zebraniu frakcji białek niezwiązanych ze złożem, wypłukiwałam zanieczyszczenia najpierw za pomocą samego buforu Ni100, a następnie za pomocą buforu Ni100 z 10 mM imidazolem, co ułatwiło wymywanie ze złoża białek związanych niespecyficznie. Elucja była prowadzona za pomocą buforu Ni100 z dodatkiem 250 mM imidazolu. W celu upewnienia się, że rybonukleaza hDicer została całkowicie wyeluowana ze złoża, przeprowadzałam ostatnie płukanie złoża za pomocą buforu Ni100 z 1 M imidazolem. **Ryc. 4.4.** przedstawia frakcje z optymalizacyjnego oczyszczania hDicer na złożu Ni-NTA, na przykładzie białka ze znacznikiem na N-końcu (hDicerN).

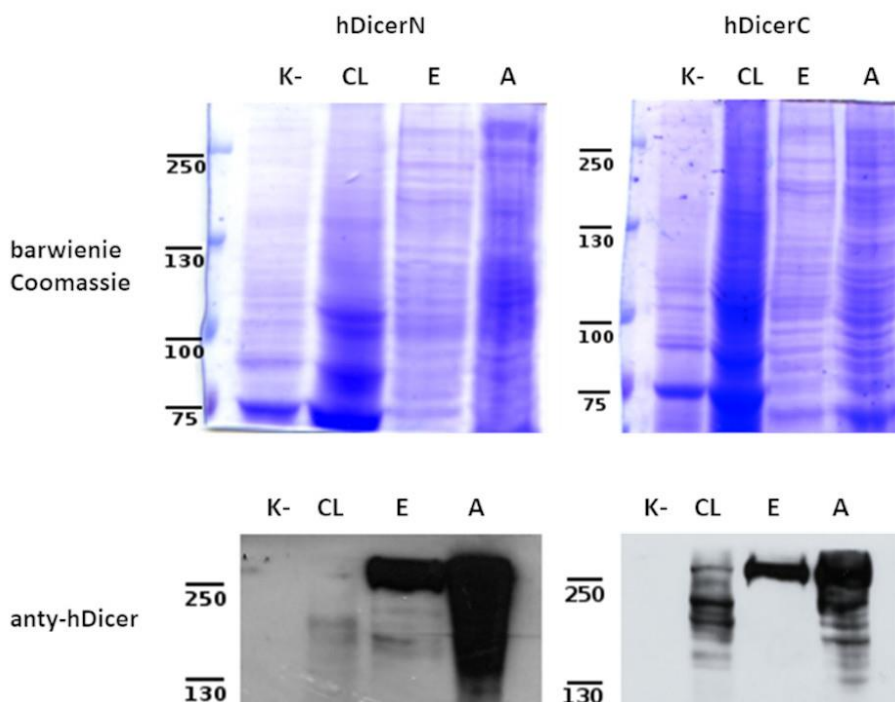


**Ryc. 4.4. Analiza frakcji z poszczególnych etapów oczyszczania hDicerN na złożu Ni-NTA, przedstawiona w żelu barwionym Coomassie Brilliant Blue.** (K-) - kontrola negatywna (kom. Sf9 infekowane niezmodyfikowanym szczepem bakulowirusa); CL - lizat komórek Sf9 infekowanych rekombinowanymi bakulowirusami; FT - frakcja białek niezwiązanych ze złożem; W<sub>1</sub> - płukanie złoża buforem Ni100; W<sub>2</sub> - płukanie Ni100 z 10 mM imidazolu, E - elucja (Ni100 + 250 mM imidazolu), W<sub>F</sub> - płukanie Ni100 z 1 M imidazolem po elucji. Strzałka wskazuje wysokość, na jakiej znajduje się hDicer.

Analiza przedstawionego oczyszczania wskazała na efektywne wiązanie rekombinowanej hDicerN do złoża Ni-NTA. W użytym do tego badania lizacie komórek Sf9 produkcja hDicer była na stosunkowo niskim poziomie (w żelu nie widać wyraźnego prążka o masie cząsteczkowej odpowiadającej hDicer we frakcji lizatu), jednak prążek odpowiadający hDicer przeważa we frakcji elucyjnej. Na wysoką wydajność wiązania hDicer do złoża wskazuje również brak prążka odpowiadającego hDicer we frakcji niezwiązanej ze złożem. Podczas płukania złoża z zanieczyszczeń, hDicer wypłukiwała się w nieznacznej ilości również po dodaniu do buforu płuczącego 10 mM imidazolu. Warunki elucji zostały poprawnie dobrane, na co wskazuje całkowite wypłukanie hDicer we frakcji elucyjnej.

Po pierwszym etapie oczyszczania postanowiono sprawdzić aktywność otrzymanych preparatów hDicer. W tym celu izolowałam hDicerN oraz hDicerC zgodnie z opracowanym protokołem, a po oczyszczeniu frakcje elucyjne zostały naniesione na filtry Amicon Ultra 100 kDa, co pozwoliło na zagęszczenie preparatów ok. 15 razy. Krok ten miał również na celu wymianę buforu Ni100 z imidazolem na bufor do mrożenia, zawierający m.in. 30% glicerol i umożliwiający przechowywanie preparatów w -80 °C. Na **Ryc. 4.5** przedstawiłam analizę próbek z poszczególnych etapów przygotowywania preparatów hDicer. Do pierwszej analizy aktywności zostały skierowane próbki obu wersji rybonukleazy hDicer, podpisane na rycinie jako A. Analiza ta była niezbędna do ustalenia, czy preparaty hDicer cechują się oczekiwaną aktywnością RNazową (opisane w rozdziale **Wyniki 4.1.3**).





**Ryc. 4.5. Analiza frakcji z poszczególnych etapów przygotowywania preparatów hDicerN i hDicerC.** Żele barwione błękitem Coomassie i wyniki analizy Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-hDicer 13D6 (1:1000). (K-) – komórki Sf9 infekowane niezmodyfikowanym szczepem bakulowirusa; CL – lizaty komórkowe z  $0,5 \times 10^6$  komórek infekowanych; E – frakcje elucyjne Ni-NTA – 50  $\mu$ l z 10 ml; A – frakcje zagęszczone na filtrach Amicon – 15  $\mu$ l z 600  $\mu$ l.

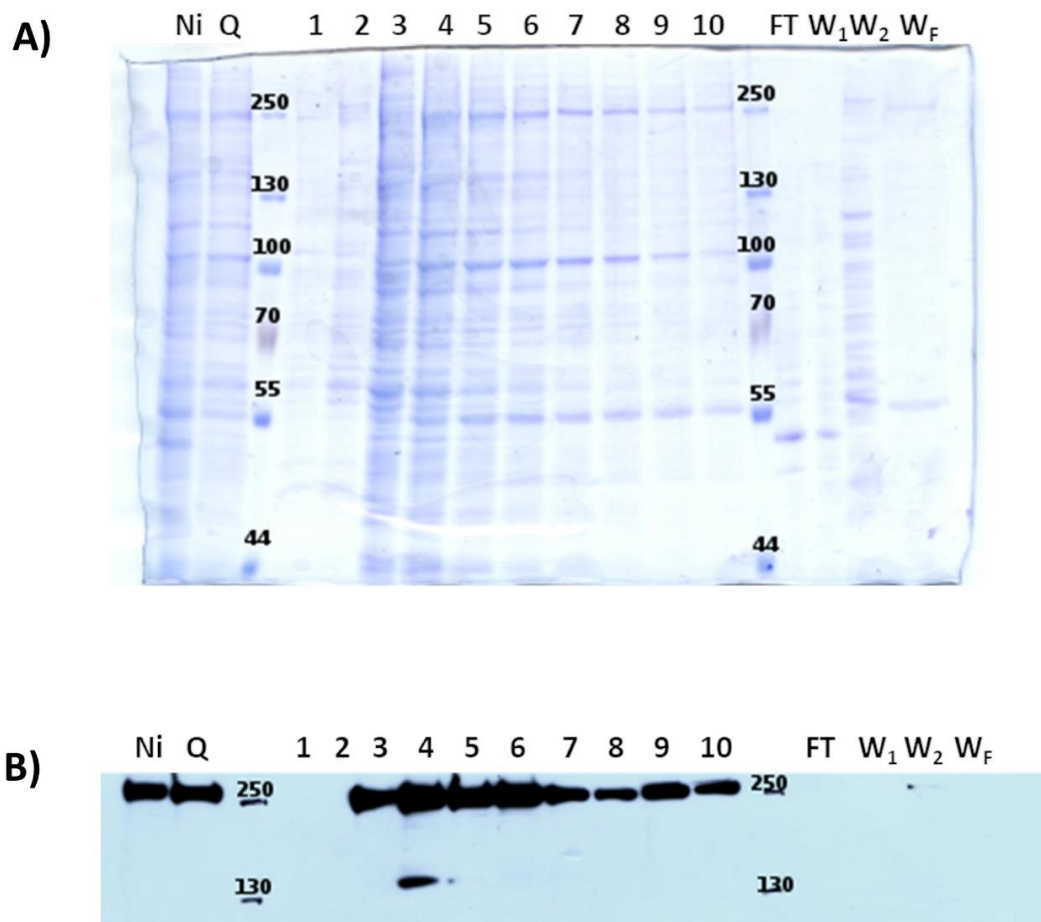
Już na tym etapie badań założyłam, że homogenność frakcji elucyjnych wymytych ze złoża Ni-NTA prawdopodobnie była niewystarczająca do przeprowadzenia testów wiązania RNA przez hDicer, więc zdecydowałam się na doczyszczanie preparatu metodą chromatografii jonowymiennej. Drugi etap oczyszczania preparatu hDicer prowadziłam przy pomocy gotowych kolumniek do chromatografii anionowymiennej HiTrap Q HP, o objętości złoża wynoszącej 1 ml i wymagających podłączenia do pompy perystaltycznej. Również na tym etapie oczyszczanie preparatu hDicer miało miejsce w temperaturze 4 °C.

Podczas dopracowywania procedury oczyszczania hDicer zaobserwowałam, że hDicerC była produkowana z coraz mniejszą wydajnością. Prawdopodobnie rekombinant produkujący hDicerC tracił transgen, co wymuszało powrót do wcześniejszych pasaży i dodatkowe namnażanie bakulowirusa. Wiązało się to ze zwiększonym zużyciem materiałów, a także z dłuższym czasem potrzebnym na przygotowanie hDicerC, przez co dalsza produkcja tego preparatu okazała się nieopłacalna. W związku z napotkanymi trudnościami, dalsze etapy doczyszczania prowadzone były tylko z użyciem preparatu hDicerN.



Pracę nad doczyszczaniem hDicerN rozpoczęłam od serii oczyszczających optymalizacyjnych, mających na celu ustalenie siły jonowej, z jaką białko to będzie wiązać się do złoża, oraz przy której zanieczyszczenia białkowe będą wyłukiwane. Eluaty po pierwszym etapie oczyszczania łączyłam w objętości 1:1 z buforem Q100 o sile jonowej 100 mM NaCl i pH 7,5, po czym nanosiłam je na kolumnę. Po zebraniu frakcji niezwiązanej ze złożem, wyłukiwałam zanieczyszczenia najpierw za pomocą buforu Q100, a następnie za pomocą buforu Q200 (siła jonowa 200 mM NaCl), co powodowało wyłukiwanie większej ilości współocyszczających się białek komórkowych. Metoda EIC pozwala na elucję białek poprzez zmianę pH lub zwiększenie siły jonowej buforu elucyjnego; zdecydowałam się na elucję hDicer tą drugą metodą, wykorzystując do tego celu bufor Q450 (siła jonowa 450 mM NaCl) i zbierając frakcje po 500  $\mu$ l. W celu upewnienia się, że całe białko zostało wyłukane ze złoża, płukałam je pod koniec oczyszczania buforem Q1000 o sile jonowej 1 M NaCl (**Ryc. 4.6**).

Przedstawiony na **Ryc. 4.6** wynik oczyszczania wskazuje, że rybonukleaza hDicer wydajnie wiązała się do złoża, a część zanieczyszczeń została wyłukana. Z porównania frakcji: (i) elucyjnej z Ni-NTA (Ni) i (ii) uśrednionej frakcji powstałej z połączenia wszystkich frakcji elucyjnych ze złoża Q (Q) wynika, że udało się wyciągnąć część zanieczyszczeń, bez straty ilości białka. W początkowej fazie elucji (frakcje 1-5), prócz białka hDicer, ze złoża wyłukana została znaczna ilość zanieczyszczeń. Końcowe frakcje (6-10) zostały połączone i zagęszczone na filtrze Amicon z jednoczesną wymianą buforu na bufor do mrożenia hDicer. Następnie stężenie hDicer w otrzymanym preparacie zostało ocenione poprzez porównanie intensywności sygnału pochodzącego od prążków odpowiadających hDicer do standardu BSA (albuminy surowicy bydlęcej, ang. *bovine serum albumin*). Na podstawie serii wyników optymalizacyjnych opracowałam procedurę oczyszczania hDicer, opisaną w rozdziale **Metody 7.4.9-7.4.11**. Preparat rekombinowanej rybonukleazy hDicer oczyszczany dwuetapowo został skierowany do badania aktywności enzymatycznej, tj. testów cięcia pre-miRNA i wiązania RNA.

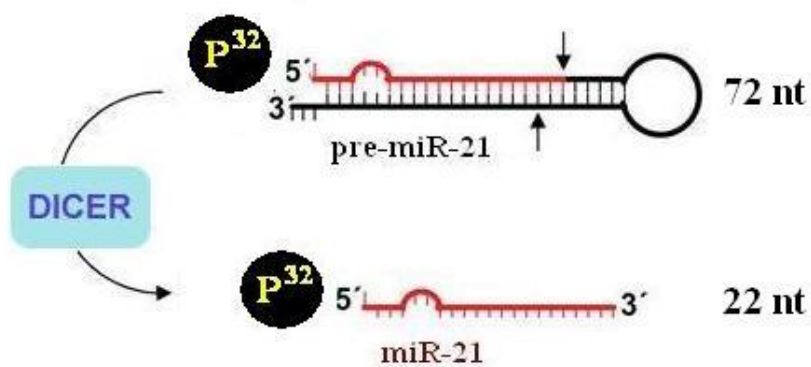


**Ryc. 4.6. Doczyszczanie preparatu hDicerN na kolumnkach HiTrap Q HP. A)** Żel barwiony błękitem Coomassie. Ni – wyjściowy preparat oczyszczany na złożu niklowym, Q – połączone frakcje elucyjne z kolumnki HiTrap Q HP, 1-10 – frakcje elucyjne, FT - frakcja białek niezwiązanych ze złożem, W<sub>1</sub> - płukanie złoża buforem Q100, W<sub>2</sub> – płukanie złoża buforem Q200, W<sub>F</sub> - płukanie złoża buforem Q1000 po elucji. **B)** Analiza Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anti-Dicer 13D6 1:1000.

#### 4.1.3. Analiza aktywności rekombinowanej hDicer

W celu ustalenia, czy preparaty rekombinowanej rybonukleazy hDicer otrzymywane w systemie bakulowirusowym wykazują aktywność RNazową wobec substratów RNA, przeprowadziłam standardowe testy cięcia RNA w warunkach *in vitro*. Badania te były prowadzone w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Analizie poddałam preparaty hDicerN i hDicerC po pierwszym etapie oczyszczania na złożu niklowym oraz preparat hDicerN oczyszczany dwuetapowo. Próbkę przed analizą przechowywane były w -80 °C w buforze do mrożenia hDicer zawierającym 30% glicerol. Substratem dla hDicer we wszystkich przeprowadzonych reakcjach był syntetyczny prekursor

ludzkiego miRNA-21 (pre-hsa-miR-21) wyznakowany radioizotopowo ( $^{32}\text{P}$ ) na końcu 5'. Radioizotopowe wyznakowanie substratu umożliwiało detekcję produktów, które po reakcji cięcia były rozdzielane metodą poliakryloamidowej elektroforezy żelowej (PAGE) w warunkach denaturujących, a następnie wizualizowane w żelu za pomocą autoradiografii. Na **Ryc. 4.7** przedstawiłam schemat generowania możliwego do detekcji produktu reakcji: dzięki temu, że pre-miRNA został wyznakowany radioizotopowo na końcu 5', po cięciu przez hDicer obserwowany był na odpowiedniej wysokości dojrzały miRNA-5p.

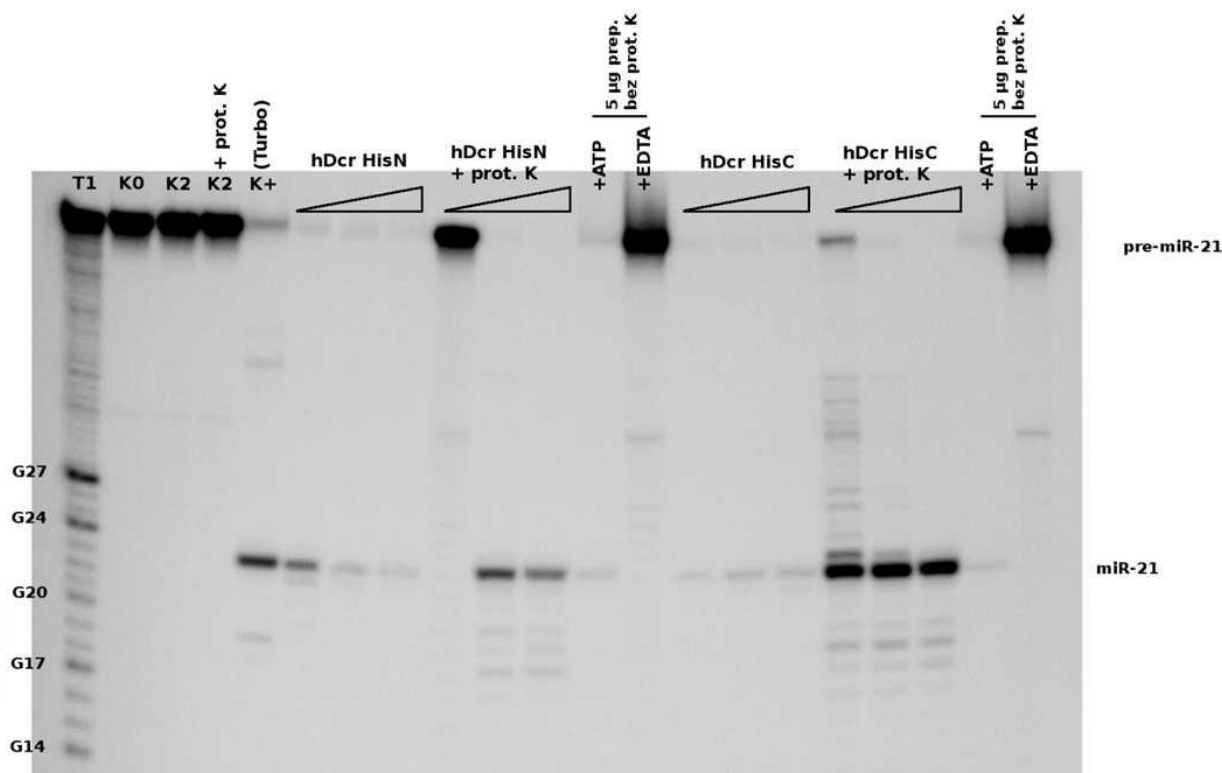


**Ryc. 4.7.** Schemat cięcia przez hDicer pre-miRNA wyznakowanego  $^{32}\text{P}$  na końcu 5'. Opis w tekście.

Badania nad aktywnością preparatów hDicerN i hDicerC, oczyszczanych jednoetapowo na złożu niklowym, obejmowały wyznaczenie optymalnej ilości białka w mieszaninie reakcyjnej oraz sprawdzenie wydajności cięcia substratu w czasie trwania reakcji. W bazowym składzie mieszanin reakcyjnych znajdowała się wyznaczona ilość enzymu hDicer, wyznakowany radioaktywnym fosforem substrat pre-miRNA w ilości 10000 cpm oraz bufor reakcyjny. W składzie buforu znajdował się chlorek magnezu, gdyż reakcja hydrolizy RNA katalizowana przez hDicer jest zależna od jonów magnezu  $\text{Mg}^{2+}$ , koordynowanych w centrum aktywnym enzymu [Provost i in. 2002]. Do części nastawionych reakcji dodawałam proteinazę K (ProtK, ang. *proteinase K*), ze względu na doniesienia literaturowe wskazujące, iż ograniczona proteoliza zwiększa procesywność enzymu hDicer [Ma i in. 2008]. Trójfosforan adenozyliny (ATP) nie jest wymagany do aktywności rybonukleazy Dicer ludzkiej, czy innych kręgowców. Nastawiłam jednak część reakcji z dodatkiem ATP (stężenie końcowe 5 mM) w celu sprawdzenia, czy przyspieszy on uwalnianie produktu, poprzez zwiększenie liczby obrotów enzymu w czasie (ang. *enzyme turnover*, aktywność ATP zasugerowana w [Zhang i in. 2002]). W celu potwierdzenia, że cięcie substratu jest wynikiem aktywności enzymatycznej hDicer, nastawiłam reakcje kontrolne obejmujące: reakcje bez hDicer, bez hDicer z ProtK (50 ng) oraz z hDicer i EDTA (czynnik chelatujący dwuwartościowe jony  $\text{Mg}^{2+}$ ). Reakcje z komercyjnie dostępną rybonukleazą

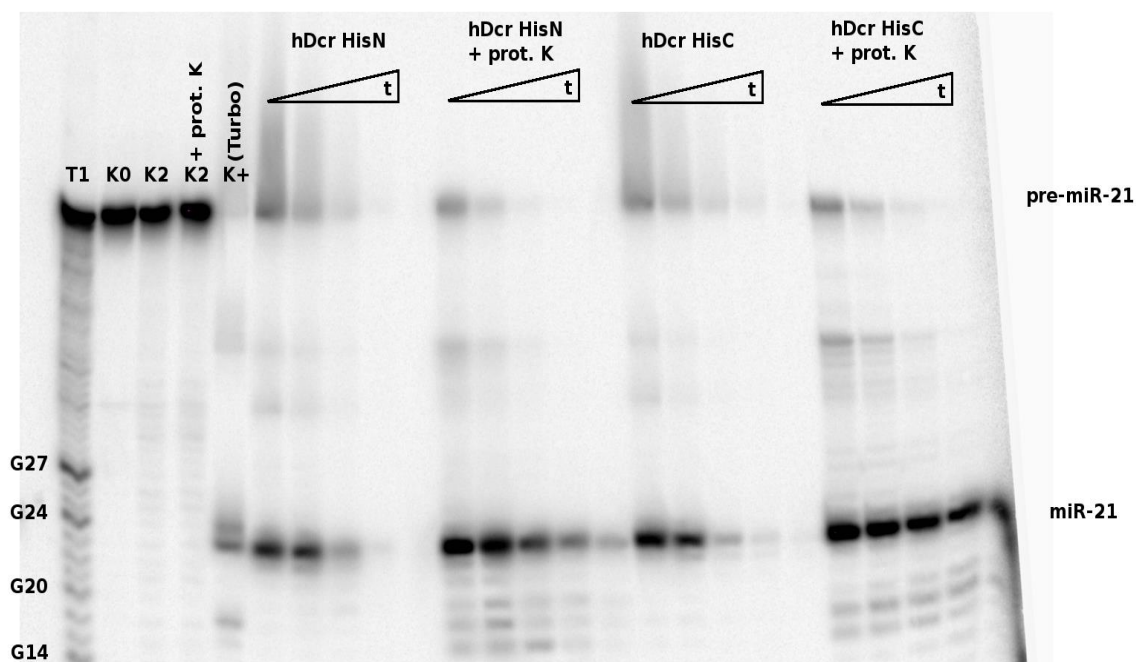
hDicer (Turbo Dicer, dodawana do reakcji w objętości 1  $\mu$ l, odpowiadającej 0,5 U) stanowiły kontrolę pozytywną. Wzorzec molekularny stanowiły produkty cięcia pre-hsa-miR-21 przez rybonukleazę T1.

Na **Ryc. 4.8** przedstawiłam wyniki analizy rozdziału produktów reakcji w żelu PAA, w której pre-hsa-miR-21 inkubowałam ze wzrastającą ilością oczyszczanych jednoetapowo preparatów hDicer (1, 2,5 i 5  $\mu$ l) przez 2 godziny. Oba analizowane preparaty wydajnie przetwarzały substrat (odnotowałam ubytek pre-hsa-miR-21) oraz generowały miR-21-5p o długości 22 nt. Nie odnotowałam zwiększenia ilości produktu po dodaniu do reakcji ATP. W reakcjach kontrolnych bez hDicer produkt nie powstawał. Dodatkowo, obserwowałam brak cięcia substratu w obecności EDTA, czyli w warunkach, w których hDicer nie jest aktywna (chelatowanie jonów  $Mg^{2+}$ ). Na podstawie tych obserwacji można stwierdzić, że obserwowany produkt długości właściwej dla miR-21-5p świadczy o obecności w testowanych preparatach hDicer o aktywności RNazowej. Wbrew oczekiwaniom, nie odnotowałam jednak akumulacji miRNA wraz ze wzrostem ilości preparatu. Dodanie natomiast ProtK wpływało pozytywnie na utrzymywanie się produktu, jednocześnie generując sporo produktów niespecyficznych, widocznych na skanie jako „drabinka” poniżej oraz powyżej miR-21-5p (w szczególności, w reakcjach z hDicerC).



**Ryc. 4.8.** Cięcie pre-hsa-miR-21 za pomocą preparatów ludzkiej rekombinowanej rybonukleazy Dicer posiadającej znacznik histydynowy na końcu aminowym lub karboksylowym (preparaty po pierwszym etapie oczyszczania, na złożu Ni-NTA). T1 – trawienie pre-miRNA rybonukleazą T1; K0 i K2 – kontrole bez enzymu, inkubacja pre-miRNA w czasie, odpowiednio: 0 i 2 godziny; K2 (+ProtK) – kontrola bez hDicer, pre-miRNA inkubowany był razem z proteinazą K; (K+) – reakcja cięcia substratu przez komercyjną Turbo Dicer, +ATP/+EDTA – reakcje, do których oprócz 5 µl preparatu dodano także odpowiednio: ATP (stężenie końcowe 5 mM) lub EDTA (stężenie końcowe 50 mM); hDcr HisN – hDicerN; hDcr HisC – hDicerC. Za pomocą trójkątów zaznaczono wzrastające stężenia hDicerN i hDicerC w reakcjach cięcia substratu.

Reakcje, w których badałam wydajność cięcia pre-miRNA w czasie (inkubację przerywano po 10 min, 30 min, 1,5 h, 3 h i 5 h) z wykorzystaniem 5 µl preparatów hDicer oczyszczanych jednoetapowo potwierdziły, że hDicer bardzo efektywnie procesuje pre-hsa-miR-21 (**Ryc. 4.9**). Zaobserwowałam spadek ilości substratu pre-hsa-miR-21 wraz z czasem trwania reakcji, jednak w zastosowanych warunkach reakcyjnych ubytkowi substratu nie towarzyszył wzrost ilości produktu miR-21-5p. Co ciekawe, specyficzne produkty reakcji prowadzonych przez hDicerC w obecności ProtK utrzymywały się dłużej, jednak również w tym badaniu reakcje z ProtK, prowadzone przez obie wersje hDicer, generowały znaczne ilości produktów niespecyficznych. Na podstawie powyższych testów ustaliłam optymalny czas reakcji, wynoszący 15-30 min, oraz optymalną ilość enzymu – 1-2 µl. Nie zaobserwowałam wpływu lokalizacji znacznika histydynowego na specyficzność działania białka – oba badane preparaty generowały miRNA o identycznej długości, porównywalnej z długością produktów cięcia substratu przez komercyjnie dostępny enzym (**Ryc. 4.8 i Ryc. 4.9**).

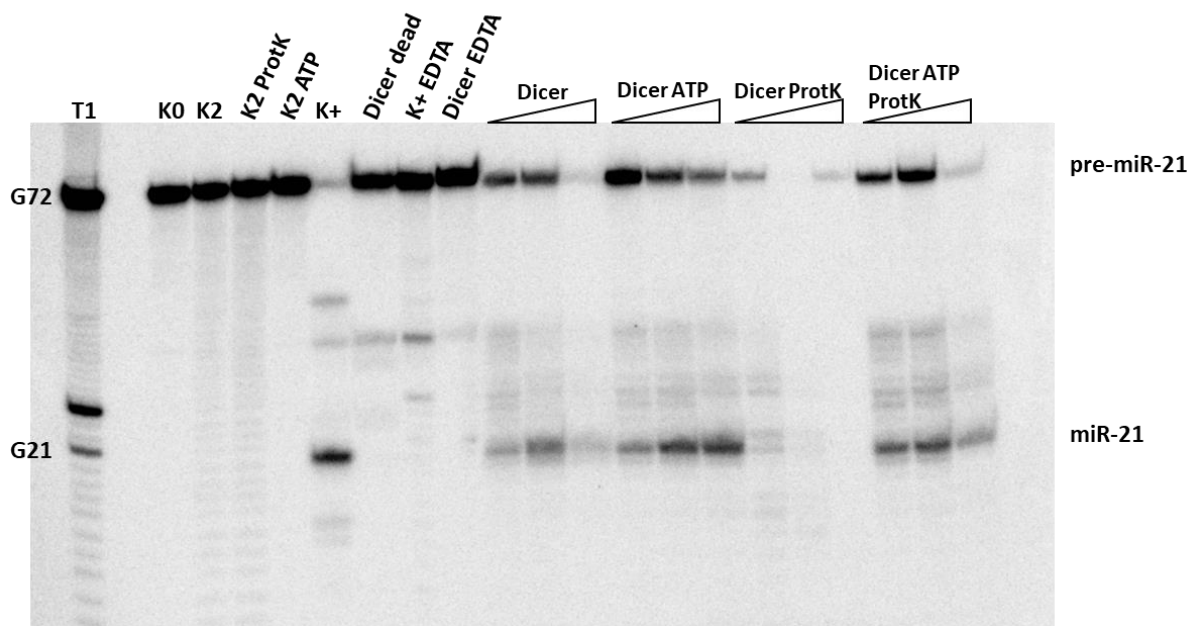


**Ryc. 4.9.** Cięcie pre-hsa-miR-21 za pomocą preparatów hDicerN i hDicerC (preparaty po pierwszym etapie oczyszczania, na złożu Ni-NTA); reakcje prowadzone w czasie: 10 min, 30 min, 1,5 h, 3 h i 5 h. T1 – trawienie pre-miRNA rybonukleazą T1; K0 i K2 – kontrole bez enzymu, jw.; K2 (+ProtK) – kontrola bez hDicer, pre-miRNA inkubowany był razem z proteinazą K; (K+) – reakcja cięcia substratu przez komercyjną Turbo Dicer; hDcr HisN – hDicerN; hDcr HisC – hDicerC. Za pomocą trójkątów zaznaczono wzrastający czas inkubacji reakcji: 10 min, 30 min, 1,5 h, 3 h i 5 h.

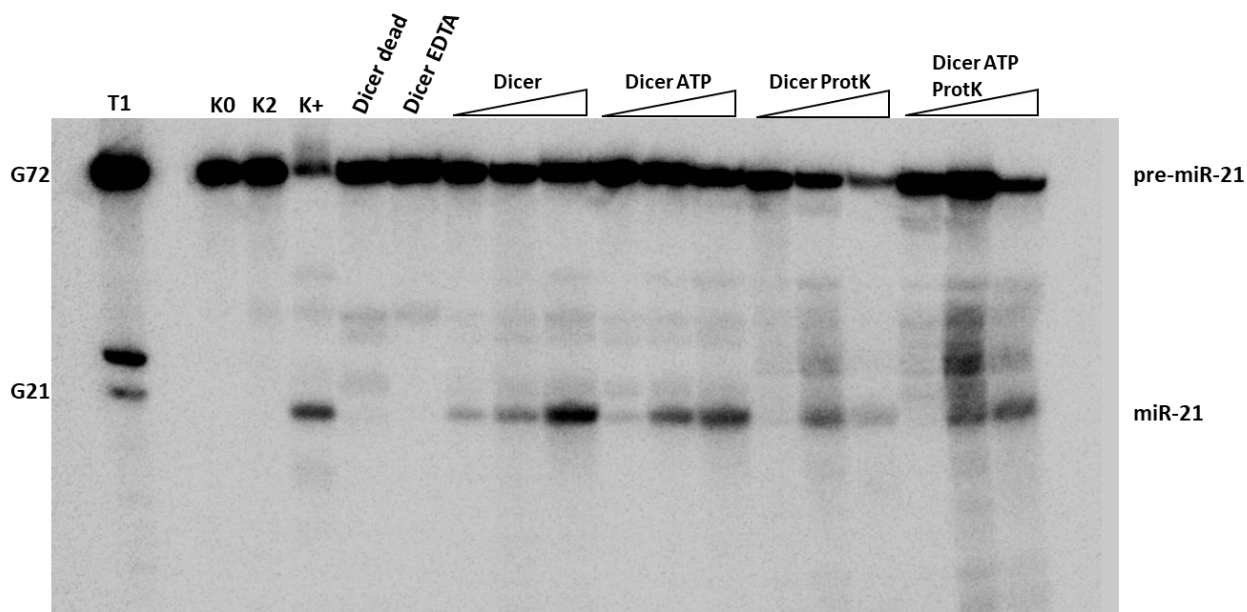
Badania aktywności preparatów potwierdziły, że rekombinowana rybonukleaza hDicer produkowana w systemie bakulowirusowym cechuje się swoistą aktywnością RNazową. Przeprowadzona analiza aktywności uzasadniła również konieczność doczyszczania hDicer; przypuszczalnie zanieczyszczenia obecne w preparatach hDicer wpływały na stabilność generowanych miRNA (brak akumulacji produktów miRNA, pomimo spadku ilości substratu pre-miRNA).

W celu zbadania aktywności RNazowej preparatu oczyszczanego dwuetapowo (na złożach Ni-NTA i Q HP), przeprowadziłam reakcje cięcia ze wzrastającą ilością enzymu hDicerN (80, 200 i 400 nM) i przy użyciu tego samego substratu: pre-hsa-miR-21 (10000 cpm), jak w przypadku reakcji przedstawionych na **Ryc. 4.8** i **Ryc. 4.9**. Czas trwania reakcji wynosił 2 godziny, podczas gdy skład buforu oraz reakcje kontrolne pozostały bez zmian. Ponadto, dodałam dwie kontrole negatywne: reakcje bez hDicer z ATP oraz z hDicer inaktywowaną termicznie (Dicer dead). W celu porównania aktywności preparatów hDicerN po jedno- i dwuetapowym oczyszczeniu, nastawiłam równocześnie reakcje cięcia z preparatem hDicerN oczyszczanym jednoetapowo (1, 2,5 i 5  $\mu$ l) oraz z preparatem hDicerN doczyszczanym na złożu Q HP (80, 200 i 400 nM). Wynik analizy aktywności RNazowej

preparatu oczyszczonego jednoetapowo przedstawiłam na **Ryc. 4.10**, a preparatu oczyszczonego dwuetapowo, na **Ryc. 4.11**.



**Ryc. 4.10.** Cięcie pre-hsa-miR-21 za pomocą preparatu ludzkiej rekombinowanej rybonukleazy hDicerN, oczyszczonego jednoetapowo na złożu niklowym. Opis wg ww. schematów.



**Ryc. 4.11.** Cięcie pre-hsa-miR-21 za pomocą preparatu ludzkiej rekombinowanej rybonukleazy hDicerN, oczyszczonego dwuetapowo na złożu niklowym oraz na kolumnkach HiTrap Q HP. Opis wg ww. schematów.

Przeprowadzone badania potwierdziły, że preparat hDicerN oczyszczany zarówno jedno- jak i dwuetapowo wykazuje specyficzną aktywność RNazową względem pre-miRNA, generując produkty o długości właściwej dla miRNA. W reakcjach kontrolnych (bez hDicer, ze zdenaturowaną hDicer oraz z hDicer i EDTA) produkt miR-21-5p nie powstawał.

W odróżnieniu od preparatu hDicer oczyszczanego jednoetapowo (**Ryc. 4.10**), preparat oczyszczany dwuetapowo (**Ryc. 4.11**) generował produkt miRNA, który utrzymywał się w mieszaninie reakcyjnej. Wiązało się to również z akumulacją miRNA wraz ze wzrostem stężenia białka w mieszaninie reakcyjnej. Dodanie ATP do reakcji z hDicer oczyszczaną dwuetapowo nie przekładało się na zwiększenie ilości powstającego produktu, z kolei dodanie ProtK przyczyniło się, jak wcześniej (**Ryc. 4.8** i **Ryc. 4.9**) do powstawania szeregu niespecyficzných produktów różnej długości. Podsumowując, preparat hDicer oczyszczany dwuetapowo generował więcej specyficznego i stabilnego produktu miRNA, w porównaniu do preparatu oczyszczanego jednoetapowo. W związku z tym preparat doczyszczany na złożu Q HP został wykorzystany w dalszych badaniach dotyczących zastosowania oligonukleotydów RNA do inhibicji cięcia pre-miRNA przez rybonukleazę Dicer.

## 4.2. Analiza roli miRNA PRV w infekcji komórek świńskich

Jak wspomniano we wstępie, liczba badań nad funkcją pojedynczych miRNA wirusa pseudowścieklizny jest ograniczona, w związku z czym ich kontynuacja jest potrzebna by w pełni zrozumieć rolę miRNA PRV w regulowaniu cyklu życiowego wirusa. W celu zbadania wpływu miRNA PRV na ekspresję genów wirusowych oraz na replikację wirusa, opracowałam model badawczy oparty na linii komórkowej jądra świni (ST, ang. *swine testicle*), z konstytutywną produkcją miRNA wirusa PRV. Stała, niezależna od infekcji, produkcja wirusowych miRNA na wysokim poziomie wpisuje się w trend badań typu „*gain-of-function*”. Postanowiłam zbadać funkcję trzech pierwszych miRNA wirusa PRV znajdujących się w intronie LLT, które, ze względu na pochodzenie z jednej policistronowej jednostki transkrypcyjnej, prawdopodobnie są produkowane w komórce jednocześnie. Skonstruowana linia komórkowa, nazwana ST\_LL[1-3], posłużyła do badań nad rolą miRNA PRV, prowadzonych za pomocą szeregu technik analitycznych.

Moje badania nad miRNA PRV dotyczyły, m.in., empirycznego wyznaczenia genów docelowych, wobec których są skierowane te cząsteczki regulatorowe. Aby poznać cele miRNA PRV, na początkowych etapach pracy skonstruowałam panel plazmidów ekspresyjnych kodujących pojedyncze geny PRV z kompletnymi sekwencjami 3'UTR. Opracowałam również analogiczny panel wektorów bakulowirusowych, kodujących geny PRV i zaadaptowanych do ekspresji genów w komórkach ssaczy przez wprowadzenie promotora wirusa HCMV (tzw. system BacMam). Docelowych mRNA dla miRNA LL[1-3] szukałam również za pomocą reporterowego systemu



lucyferazy, transfekując komórki linii stabilnej wektorami DUAL-GLO zawierającymi pełne sekwencje 3'UTR wybranych genów wirusowych. Wymienione narzędzia posłużyły do badań nad potencjałem regulacyjnym miRNA LLT[1-3] wobec poszczególnych genów PRV, jednak stosując techniki Western blottingu i cytometrii przepływowej, a także wykonując test lucyferazy, nie udało mi się z ich pomocą zidentyfikować genów docelowych dla miRNA PRV. Prawdopodobnie przyczyną niepowodzenia było „wypętlanie” i usunięcie części rejonów 3'UTR z plazmidów, co mogło być spowodowane stosunkowo wysoką ilością par G-C, wynoszącą ponad 75%, w genomie PRV.

Kolejnym podejściem badawczym była analiza wpływu miRNA LLT[1-3] na produktywną infekcję PRV przy użyciu fluorescencyjnie znakowanego wirusa. Komórki linii stabilnej ST\_LL[1-3] infekowałam mutantem PRV-VP26-RFP, kodującym białko czerwonej fluorescencji (RFP, ang. *red fluorescent protein*), a następnie poprzez analizę cytometryczną sprawdzałam, czy siła sygnału dla RFP ulega spodziewanemu obniżeniu w obecności nadekspresjonowanych miRNA PRV. Analiza potencjału inhibitorowego miRNA PRV była niemożliwa do przeprowadzenia w tak zaprojektowanym układzie badawczym przy dostępnej aparaturze. Sygnał fluorescencji białka GFP, produkowanego w linii stabilnej z wektora retrowirusowego pLZRS-IRES-GFP, zakłócał odczyt sygnału fluorescencji RFP, głównie w wyniku nakładania się widm emisyjnych, co wykluczało uzyskanie wiarygodnych wyników. W przedstawionej pracy doktorskiej nie zamieszczam opisu metod, których zastosowanie nie dało jednoznacznych rezultatów, nie załączam również wyników tych obserwacji.

Podejście badawcze, którego wdrożenie pozwoliło na określenie funkcji miRNA LLT[1-3] PRV, opierało się na infekcji komórek linii ST\_LL[1-3] za pomocą dzikiego PRV szczepu NIA-3 (ang. *Northern Ireland Aujeszky-3*). Funkcjonalna identyfikacja roli poszczególnych miRNA z klastra LLT[1-3] miała zostać zdefiniowana w badaniach typu „*loss-of-function*”, poprzez zastosowanie selektywnych inhibitorów miRNA. Opis tych doświadczeń stanowi odrębną część niniejszej pracy (rozdział **Wyniki 4.3.2**).

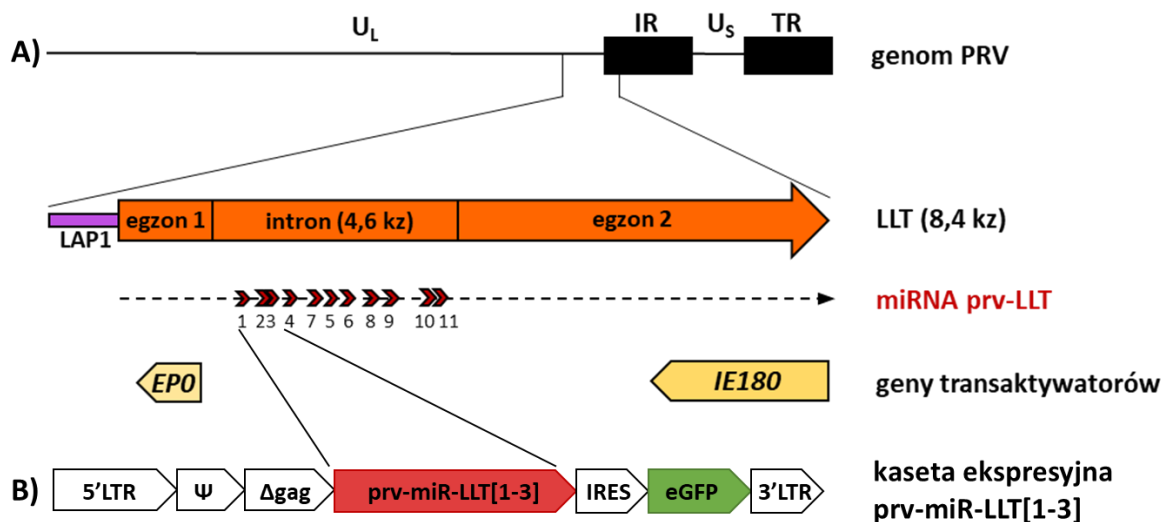
#### **4.2.1. Konstrukcja linii komórkowej stabilnie produkującej miRNA PRV**

W trakcie konstruowania linii stabilnej, miRNA PRV zostały wyselekcjonowane do analizy na podstawie istotności genów, które przypuszczalnie kontrolują. Zdecydowałam się na skonstruowanie linii grupującej miRNA prv-miR-LLT1-3p (LLT1), prv-miR-LLT2-5p (LLT2) i prv-miR-LLT3-3p (LLT3), ponieważ niezależne badania bioinformatyczne sugerowały, że mogą one celować w geny aktywatorów produktywności infekcji – IE180 i EPO. Wykorzystanie konstruktów grupujących miRNA miało na celu zwiększenie prawdopodobieństwa obserwacji efektu miRNA, które w związku ze wspólnym pochodzeniem mogą współpracować w regulowaniu ekspresji genów wirusa. Poza tym, badania wskazują, że spośród miRNA PRV, LLT1 i LLT2 są produkowane w największej ilości w

epitelialnych komórkach PK15 [Timoneda i in. 2015, Liu i in. 2016] oraz mysich komórkach Neuro-2a [Li i in. 2017]. Istotne jest również, że LLT2 i LLT3 są produkowane z prekursorów pre-miRNA, których sekwencje częściowo na siebie nachodzą [Wu i in. 2012]. Zakładając, że współdzielona sekwencja prekursorów obu miRNA może mieć znaczenie w ich biologicznym funkcjonowaniu, zdecydowałam się ich nie rozdzielać i badać ich aktywność w naturalnym układzie.

Wykorzystane do konstrukcji linii stabilnej komórki ST to unieśmiertelnione, nienowotworowe komórki o morfologii podobnej do fibroblastów, scharakteryzowane jako niedojrzała świńska linia komórek Sertolego – komórek podporowych kanalików nasiennych [Ma i in. 2016]. Komórki te są często wykorzystywane do pracy z wirusem pseudowścieklizny [Favoreel i in. 2005, Romero i in. 2020]. Komórki ST, o proponowanym statusie podobnym do mezenchymalnego, mogą wykazywać unikalne cechy, różniące się od linii epitelialnych komórek nerki świńskiej PK15, świńskich komórek dendrytycznych lub mysich neuroblastów Neuro-2A, które były wykorzystywane dotychczas do badań nad ekspresją i funkcją miRNA wirusa PRV [Anselmo i in. 2011, Wu i in. 2012, Timoneda i in. 2014, Liu i in. 2016, Li i in. 2017].

System pozwalający na stałą nadprodukcję miRNA jest użytecznym narzędziem pozwalającym na uwytłumienie funkcji specyficznych dla miRNA oraz na rozdzielenie funkcji wirusowych miRNA od innych mechanizmów związanych z infekcją. W celu skonstruowania linii komórkowej stabilnie ekspresyjnej miRNA z klastra LLT[1-3] PRV, posłużyłam się retrowirusowym systemem ekspresji genów (RES). Wektor retrowirusowy pLZRS-IRES-GFP (**Ryc. 4.12.B**) zawiera heterologiczny promotor retrowirusowy (5'LTR), sekwencję kodującą eGFP, (pozwalającą na sortowanie pozytywnych komórek) oraz sekwencję IRES, umożliwiającą ekspresję miRNA PRV i GFP z jednego transkryptu. Za pomocą reakcji PCR, starterów miR1-3-F i miR1-3-R oraz matrycy w postaci izolowanego DNA PRV amplifikowałam fragment genomu wirusa zawierający sekwencję klastra LLT[1-3] (razem z sekwencjami otaczającymi), po czym klonowałam go do wektora pLZRS-IRES-GFP. Uzyskany rekombinant retrowirusowy kodował sekwencję nukleotydów z pozycji 97,486-98,687 genomu PRV NIA-3 (GenBank accession no. KU900059 [Mathijs i in. 2016]). Włączony region jest zlokalizowany na prawym ramieniu unikalnego długiego segmentu (U<sub>L</sub>), w intronie dużego transkryptu związanego z latencją (LLT) w genomie PRV. Pomimo tego, że PRV koduje miRNA również w otwartych ramach odczytu genów litycznych [Liu, i in. 2016], postanowiłam badać miRNA znajdujące się wyłącznie w rejonie LLT, który jest antyrównoległy i nakłada się na geny dwóch kluczowych aktywatorów wirusowej transkrypcji: białek IE180 i EPO [Cheung 1991] (**Ryc. 4.12.A**).

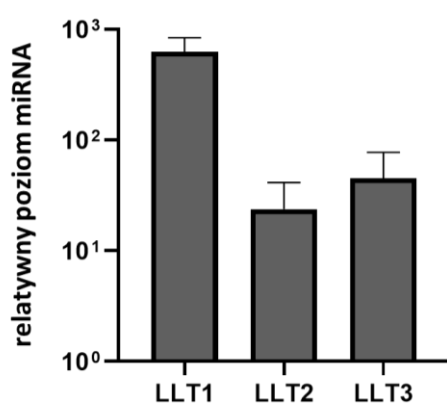


**Ryc. 4.12. Charakterystyka linii ST\_LL[1-3] z konstytutywną ekspresją miRNA wirusa PRV.** **A)** Schematyczna mapa genomu wirusa PRV szczepu NIA-3, zawierająca sekwencje unikalne ( $U_L$  i  $U_S$ ) oraz sekwencje końcowych powtórzeń (IR i TR). Powiększony fragment obrazuje region graniczny między  $U_L$  a IR, zawierający *loci* dla genów kodujących IE180 i EPO. *Loci* dla prv-miR-LLT (ponumerowane od 1 do 11) zostały zaznaczone strzałkami. **B)** Schematyczna mapa przedstawiająca retrowirusową kasetę ekspresyjną prv-miR-LLT[1-3]. Klaster zawierający LLT[1-3] został wprowadzony do wektora retrowirusowego pLZRS-IRES-GFP, zawierającego końcowe powtórzenia (5'LTR i 3'LTR), sygnał pakujący ( $\Psi$ ) z mysiego retrowirusa białaczki Moloney'a, sekwencję IRES oraz sekwencję kodującą eGFP.

#### 4.2.2. Charakterystyka linii ST\_LL[1-3]

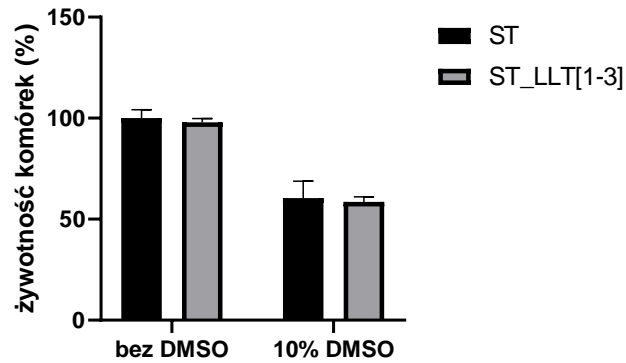
Analizę ekspresji genów trzech miRNA PRV kodowanych w skonstruowanej linii ST\_LL[1-3] przeprowadziłam za pomocą ilościowej reakcji PCR poprzedzonej reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR). Używany przeze mnie zestaw do odwrotnej transkrypcji (Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit) jest przeznaczony do pracy z miRNA i opiera się na metodzie poli(A). Dzięki ogonowi reszt adeninowych jest możliwe użycie uniwersalnego startera w reakcji odwrotnej transkrypcji, jak i uniwersalnego startera końcowego (R) w ilościowej reakcji PCR. Startery początkowe (F), specyficzne wobec danych miRNA, zawierały sekwencje wybranych miRNA, zaprojektowane w oparciu o sekwencje umieszczonej w bazie miRBase (numery dostępu w nawiasach): prv-miR-LLT1-3p – (MIMAT0025304), prv-miR-LLT2-5p – (MIMAT0025305) i prv-miR-LLT3-3p – (MIMAT0025306). Aby zapewnić wiązanie tych oligonukleotydów do dojrzałych miRNA i uniknąć ich hybrydyzacji do prekursorów miRNA, do sekwencji trzech starterów początkowych w trakcie ich syntezy chemicznej zostały dodane dwa nukleotydy adeninowe na końcu 3', co zapewniło wiązanie starterów do rejonu poli(T) w cDNA dojrzałych miRNA.

Do badania wykorzystywałam frakcje całkowitego RNA (ang. *total RNA*), wyizolowane z komórek linii ST\_LLT[1-3] nieinfekowanych wirusem PRV. W celu normalizowania ilości całkowitego RNA w każdej reakcji, wykorzystywałam snRNA U6 jako endogenną kontrolę. Średnie różnice w ekspresji miRNA oszacowałam metodą  $\Delta\Delta Ct$ . Relatywny poziom danego miRNA (wartości  $\Delta Ct$ ) w linii ST\_LLT[1-3] porównywałam do jego relatywnego poziomu w linii kontrolnych komórek ST (poziom tła). Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdziłam, że sygnały dla LLT1, LLT2 i LLT3 były odpowiednio ok. 600-, 20- i 50-krotnie większe w stosunku do tła. Wynik analizy RT-qPCR potwierdził więc nadekspresję wirusowych miRNA w linii ST\_LLT[1-3], wskazując na przeważającą produkcję LLT1 (**Ryc. 4.13**)



**Ryc. 4.13. Charakterystyka ekspresji miRNA PRV w linii ST\_LLT[1-3].** Nadekspresja miRNA wirusa PRV w linii komórek ST\_LLT[1-3] została potwierdzona metodą RT-qPCR. Względne różnice w ilości prv-miR-LLT1-3p, prv-miR-LLT2-5p i prv-miR-LLT3-3p, odniesione do wewnętrznej kontroli U6, zostały określone za pomocą metody  $\Delta\Delta Ct$  (normalizowane wobec relatywnego poziomu miRNA w kontrolnych komórkach ST). Ekspresję miRNA przedstawiono jako średnie wartości z trzech niezależnych analiz.

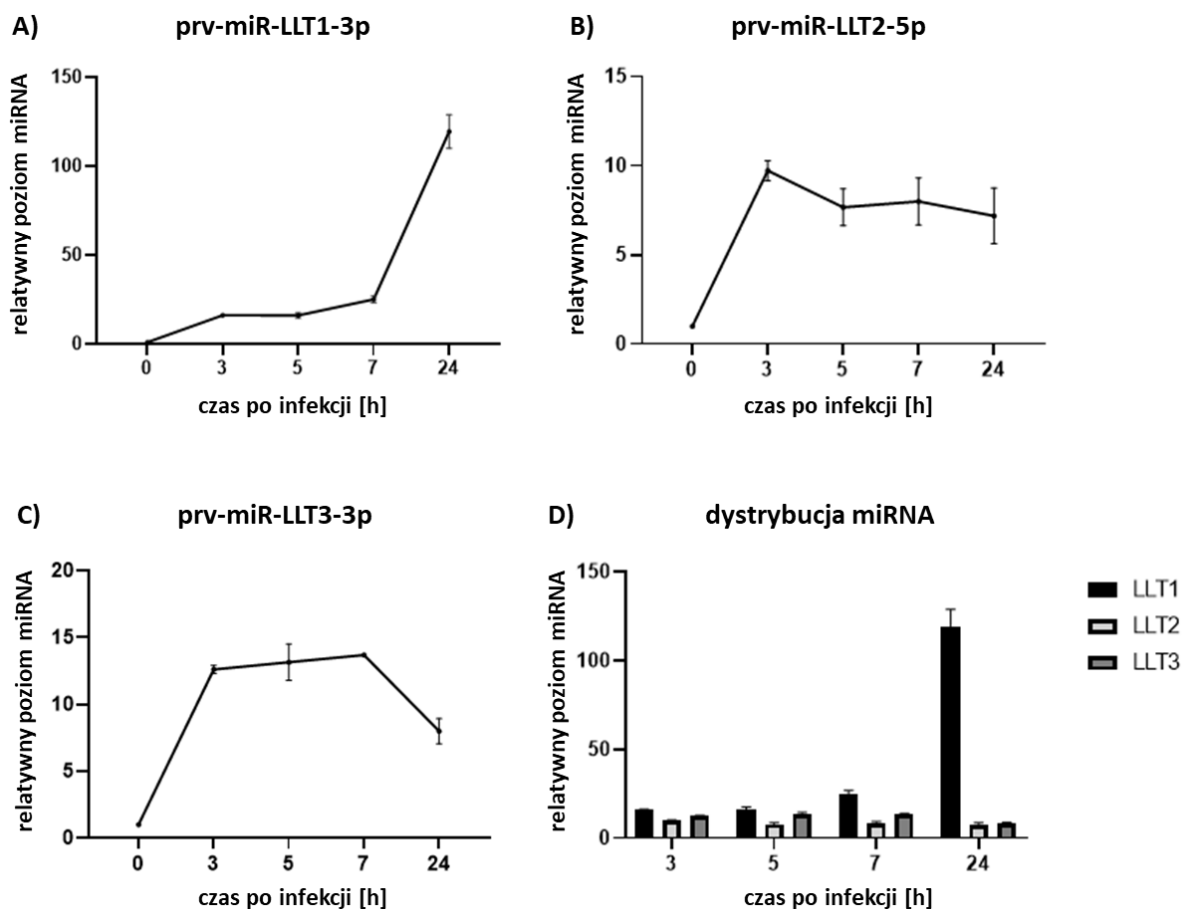
W celu sprawdzenia, czy miRNA PRV wpływają na żywotność produkujących je komórek ST\_LLT[1-3], przeprowadziłam test żywotności (inaczej test proliferacji). Nie zaobserwowałam znaczących różnic w żywotności pomiędzy linią ST\_LLT[1-3] a kontrolną linią ST, co wskazuje, że miRNA wirusa PRV nie są toksyczne oraz że nie wpływają na ekspresję genów komórkowych, wymaganych do utrzymania komórki przy życiu oraz do podziału komórkowego (**Ryc. 4.14**).



**Ryc. 4.14. Wpływ miRNA wirusa PRV na żywotność komórek i ich zdolność do podziału analizowany metodą MTS.** Analiza została przeprowadzona za pomocą testu proliferacji. Komórki ST\_LLT[1-3] oraz komórki kontrolne ST analizowano w ośmiu powtórzeniach (na rysunku pokazano średnie wartości z odchyleniami standardowymi). Kontrolą do testu były komórki obu linii poddane działaniu 10% DMSO.

#### 4.2.3. Profile ekspresji miRNA LLT-[1-3] podczas infekcji komórek wirusem PRV

Po zweryfikowaniu produkcji wirusowych miRNA w komórkach linii ST\_LLT[1-3] przeanalizowałam profil ekspresji LLT1, LLT2 i LLT3 podczas produktywnej infekcji wirusowej. Badanie to miało na celu sprawdzenie, czy proporcje miRNA LLT[1-3] ekspresjonowanych w komórkach linii stabilnej oraz produkowanych podczas infekcji są zbliżone, co potwierdziłoby właściwe przetwarzanie miRNA z klastra LLT[1-3] w komórkach linii stabilnej. W tym doświadczeniu infekowałam niemodyfikowane komórki ST wirusem PRV NIA-3 przy MOI 1, po czym zbierałam próbki po 3, 5, 7 i 24 hpi. Poziom wirusowych miRNA w komórkach ST infekowanych PRV określałam za pomocą metody RT-qPCR. Analiza wykazała, że wszystkie trzy miRNA PRV można było wykryć już w 3 hpi. Ilość LLT1 wzrastała wraz z postępem infekcji, osiągając maksimum przy 24 hpi. Poziom LLT1 w zainfekowanych komórkach ST wzrósł średnio 16-krotnie w ciągu pierwszych 5 hpi oraz odpowiednio 25- i 120-krotnie po 7 i 24 hpi, w porównaniu do niezainfekowanych kontrolnych komórek ST (**Ryc. 4.15.A**). Poziom LLT2 wzrósł średnio 8-krotnie w stosunku do kontroli i był dość stabilny podczas przebiegu infekcji (**Ryc. 4.15.B**). Poziom LLT3 wzrastał w ciągu pierwszych siedmiu godzin infekcji (średni 13-krotny wzrost), a następnie znacznie się obniżył – 8-krotny wzrost w porównaniu z kontrolą niezainfekowanych komórek ST (**Ryc. 4.15.C**). Na **Ryc. 4.15.D** zobrazowałam dystrybucję trzech miRNA PRV z klastra LLT[1-3], która w analizowanym czasie była na zbliżonym poziomie, z przeważającą ekspresją LLT1 po 24 hpi.



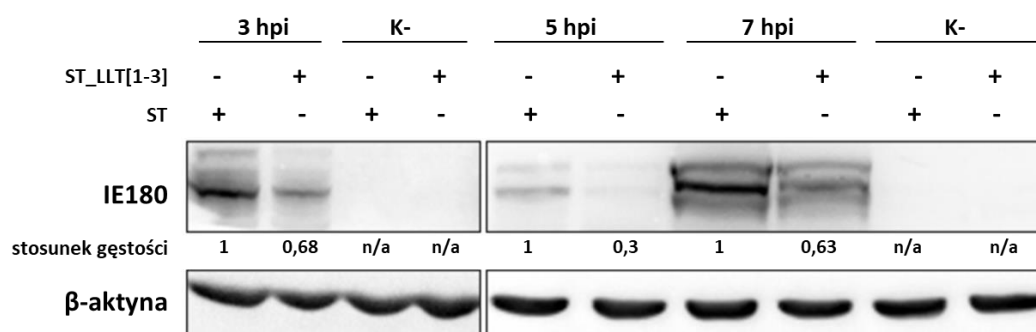
**Ryc. 4.15. Produkcja miRNA PRV LLT[1-3] w hodowli komórkowej zainfekowanej wirusem PRV.** Komórki ST infekowano wirusem przy MOI 1 i zbierano 3, 5, 7 i 24 hpi. Profile ekspresji dla: **A)** LLT1, **B)** LLT2 i **C)** LLT3 zmierzono za pomocą RT-qPCR i oszacowano metodą  $\Delta\Delta Ct$  względem kontroli U6 (w odniesieniu do nieinfekowanych komórek ST – punkt czasowy 0). Dane podano jako średnią z trzech niezależnych doświadczeń. Słupki błędów obrazują odchylenie standardowe. **D)** Wykres przedstawia porównanie dystrybucji miRNA LLT[1-3] PRV w przebiegu infekcji.

#### 4.2.4. Analiza oddziaływania miRNA LLT[1-3] na poziom transkrypcyjny PRV

Wirusowe miRNA, wraz z docelowymi genami wirusowymi i genami gospodarza, tworzą złożoną sieć regulatorową, w której wiele miRNA, takich jak prv-miR-LLT1-3p i prv-miR-LLT3-3p, może celować w wiele genów. Większość przewidywań bioinformatycznych wskazuje na 3'UTR transkryptu IE180 jako domniemany cel dla miRNA z klastra LLT[1-3] PRV, a spośród nich prv-miR-LLT1-3p jest najczęściej wskazywany jako miRNA ukierunkowany na mRNA IE180 [Wu i in. 2012, Timoneda i in. 2015]. Jak już wspomniano, IE180 jest głównym regulatorem produktywności infekcji, aktywującym transkrypcję wczesnych i późnych genów wirusowych [Wu i in. 2014], a jego mRNA jest syntetyzowany w ciągu 40 minut od zakażenia [Pomeranz i in. 2005]. Aby sprawdzić, czy wirusowe

miRNA produkowane w linii komórkowej ST\_LLT[1-3] wykazują potencjał do regulowania ekspresji genu kodującego IE180, przeprowadziłam badania funkcjonalne we wczesnych stadiach infekcji. Pierwszym etapem doświadczeń było zbadanie, po jakim czasie od momentu rozpoczęcia infekcji białko IE180 będzie możliwe do wykrycia przy użyciu dostępnej surowicy anty-IE180. Analiza metodą Western blottingu wykazała, że sygnał specyficzny dla IE180 mogłam wykryć w komórkach ST infekowanych przy MOI 1 w trzy godziny po infekcji.

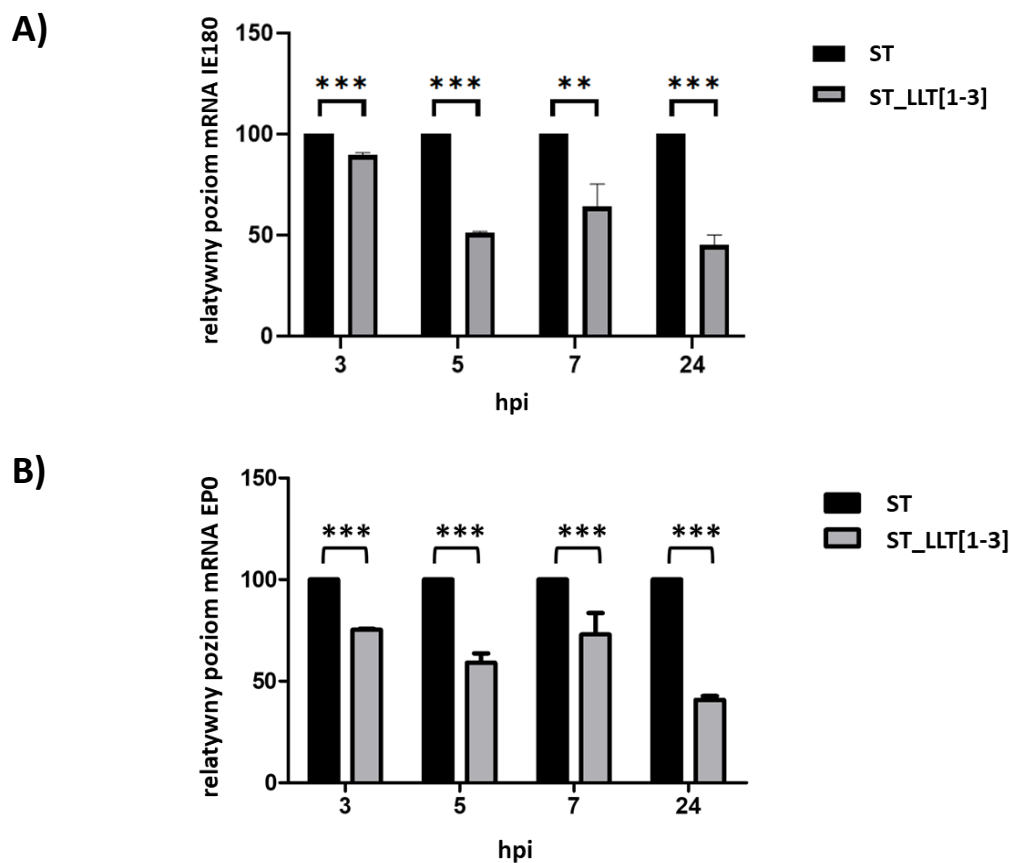
Analogiczne doświadczenie na infekowanych wirusem PRV komórkach linii stabilnej pokazało, że obecność klastra miRNA LLT[1-3] znacząco obniżyła poziom białka IE180 w tym punkcie czasowym, co przedstawiłam na **Ryc. 4.16**. Po tym teście przeanalizowałam, czy efekt inhibitorowy wirusowych miRNA utrzymuje się w czasie. Jak pokazałam na **Ryc. 4.16**, przy 5 i 7 hpi wpływ miRNA na produkcję białka IE180 wciąż był możliwy do zaobserwowania. Badanie densytometryczne wykazało, że ilość IE180 w zainfekowanych komórkach PRV mogła zostać obniżona w obecności miRNA z klastra LLT[1-3] nawet o 70% (5 hpi).



**Ryc. 4.16. Analiza wpływu miRNA LLT[1-3] PRV na poziom białka IE180.** Komórki ST\_LLT[1-3] i kontrolne komórki ST infekowano wirusem PRV przy MOI 1, po czym zbierano próbki po 3, 5 i 7 hpi. Poziom białka IE180 określono metodą Western blottingu wykorzystując surowicę anty-IE180 (rozcieńczoną 1:5000). Na żel PAA nakładano 160 µg całkowitego ekstraktu białkowego na studzienkę (dla próbek zbieranych po 3 hpi), lub 40 µg całkowitego ekstraktu białkowego na studzienkę (dla próbek zbieranych po 5 i 7 hpi). Jako kontrolę ilości naniesionego lizatu komórkowego wykrywano β-aktynę. Wyliczenia densytometryczne prążków IE180 (wskazanych jako stosunek gęstości optycznej prążków), znormalizowane do gęstości odpowiednich prążków β-aktyny, obliczono między kontrolnymi komórkami ST a komórkami ST\_LLT[1-3] dla każdego punktu czasowego po infekcji PRV. (K-) – komórki nieinfekowane; n/a – nie analizowano.

Kolejne doświadczenie miało na celu zbadanie, czy miRNA z klastra LLT[1-3] wpływają również na poziom transkryptu IE180. Analiza RT-qPCR wykazała, że w zainfekowanych PRV komórkach ST\_LLT[1-3] poziom mRNA IE180 był obniżony w wyznaczonych punktach czasowych, w porównaniu do zainfekowanych kontrolnych komórek ST (**Ryc. 4.17.A**).

Wyniki te wskazują, że miRNA PRV wykazują potencjał regulacyjny zarówno wobec poziomu białka, jak i transkryptu IE180, podczas cyklu życiowego PRV. Następnie zbadalam, czy miRNA z klastra LLT[1-3] regulują także ekspresję genu *EPO*, którego transkrypt również był wskazywany przez analizy *in silico* jako cel aktywności miRNA wirusa PRV. Jak już wspomniano, gen *EPO* jest zależny od białka IE180, a jego produkt działa, we współpracy z IE180, jako aktywator transkrypcji genów wirusowych [Moriuchi i in. 1995, Ono i in. 1997]. Uzyskane wyniki wykazały, że obecność miRNA z klastra LLT[1-3] również spowodowała obniżenie poziomu mRNA EPO w zainfekowanych PRV komórkach linii ST\_LL[1-3], co przedstawiłam na **Ryc. 4.17.B**. Ze względu na brak specyficznych przeciwciał, nie miałam możliwości przeanalizowania poziomu białka EPO.

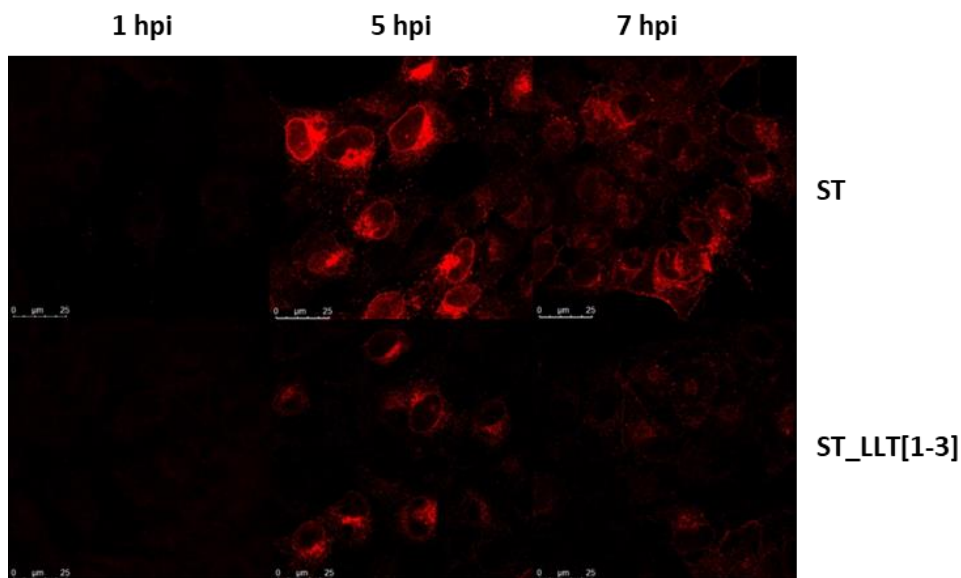


**Ryc. 4.17. Analiza wpływu miRNA LLT[1-3] PRV na poziom transkryptów: A) IE180 i B) EPO.** Komórki ST\_LL[1-3] i kontrolne komórki ST infekowano PRV przy MOI 1, a następnie zbierano próbki po 3, 5 i 7 hpi. Poziom mRNA mierzono metodą RT-qPCR. Gen *28S* zastosowano jako referencyjną kontrolę wewnętrzną. Ekspresję mRNA przedstawiono jako średnie wartości z trzech niezależnych oznaczeń ilościowych. Słupki błędów obrazują odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oszacowano za pomocą dwustronnego testu t-studenta. \*\*p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.



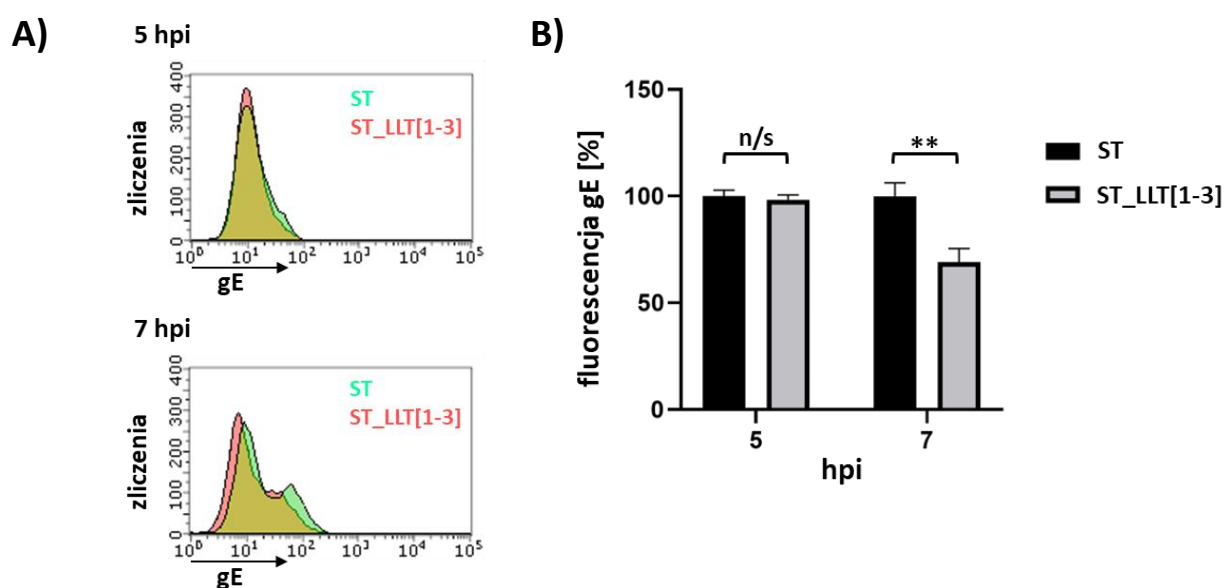
#### 4.2.5. Badanie wpływu miRNA LLT[1-3] na glikoproteinę gE PRV

Po wykazaniu hamującego wpływu miRNA LLT[1-3] na ekspresję genów dwóch głównych transaktywatorów wirusa PRV, przeszłam do analizy potencjału regulatorowego miRNA wirusa PRV wobec ekspresji genu kodującego białko strukturalne wirusa. W kolejnym etapie badań analizowałam czy miRNA z klastra LLT[1-3] wpływają na ekspresję wczesno-późnego genu *US8*. Jak już wspomniano, gen *US8* koduje glikoproteinę gE PRV, będącą białkiem ostonki i przyczyniającą się do wirulencji wirusa [Jacobs 1994, Wang i in. 2014]. Na początku pracy związanej z badaniem oddziaływania miRNA PRV na poziom gE sprawdziłam, kiedy to białko strukturalne będzie możliwe do wykrycia przy użyciu dostępnej surowicy anti-gE. W tym celu zainfekowałam komórki ST wirusem PRV przy MOI 1, a następnie przeprowadziłam immunofluorescencję na całych komórkach, przygotowywanych jako preparaty sukcesywnie co godzinę, od trzech do ośmiu godzin po infekcji. Wynik tego doświadczenia wykazał obecność gE w zainfekowanych komórkach ST po 5 hpi. Przeprowadziłam podobne doświadczenie na komórkach linii ST\_LLT[1-3], zbieranych 5 i 7 hpi. Wynik testu immunofluorescencji przeprowadzonego w tych samych warunkach wykazał widoczne osłabienie sygnału dla gE w infekowanych komórkach ST\_LLT[1-3] w porównaniu do infekowanych kontrolnych komórek ST (**Ryc. 4.18**).



**Ryc. 4.18. Badanie immunofluorescencyjne wpływu miRNA LLT[1-3] na poziom gE w infekowanych komórkach.** Analiza poziomu gE w komórkach zainfekowanych PRV została przeprowadzona za pomocą immunofluorescencji i skaningowej mikroskopii konfokalnej. gE wykrywano w utrwalonych i permeabilizowanych komórkach za pomocą przeciwciał anti-gE (w rozcieńczeniu 1:500) i drugorzędowych sprzężonych ze znacznikiem Alexa Fluor 546 (w rozcieńczeniu 1:2000).

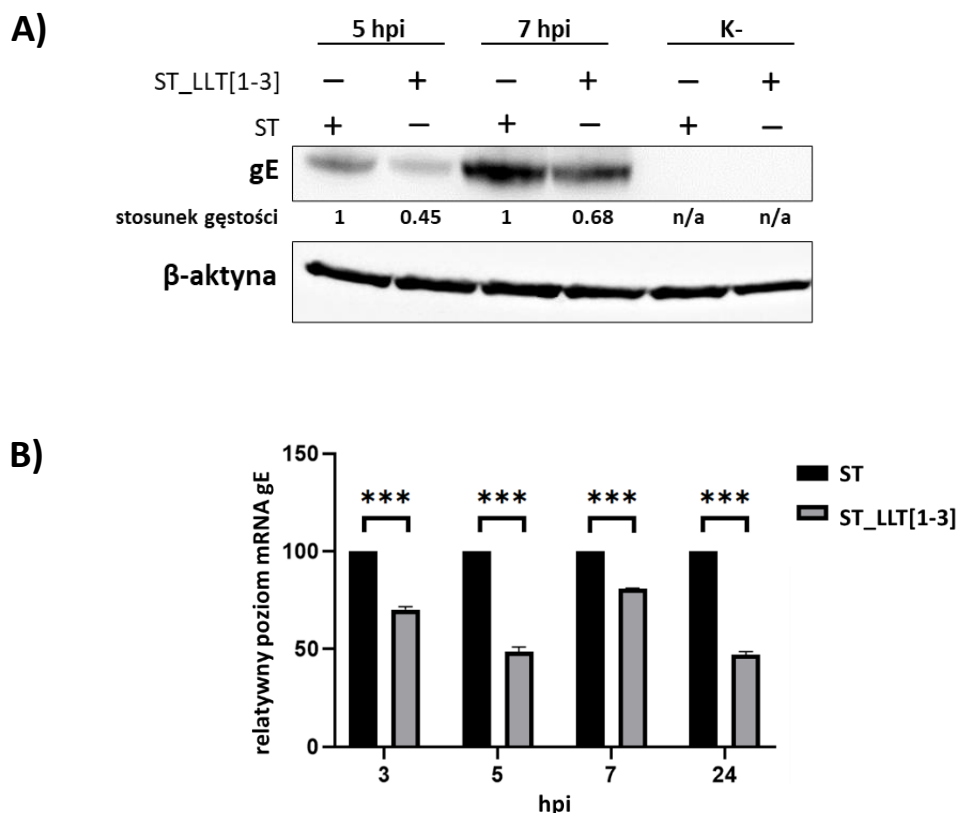
W celu bardziej wymiernej analizy poziomu gE na powierzchni infekowanych komórek, infekowałam komórki obu linii w takich samych warunkach jak we wcześniejszym doświadczeniu, a następnie przeprowadziłam analizę metodą cytometrii przepływowej. Badanie to wykazało, że po siedmiu godzinach po infekcji PRV ilość powierzchniowej gE była o około 30% niższa w komórkach ST\_LLT[1-3] w porównaniu z komórkami kontrolnymi ST. Po 5 godzinach różnice nie były statystycznie istotne, co najprawdopodobniej wynika z faktu, iż w tym punkcie czasowym na powierzchni komórek znajduje się mało gE (pokazują to histogramy), a większość białka jest zlokalizowana wewnątrzkomórkowo (jak pokazała wcześniejsza immunofluorescencja z mikroskopią konfokalną) (Ryc. 4.19).



**Ryc. 4.19. Porównanie poziomu gE obecnej na powierzchni komórek ST\_LLT[1-3] i kontrolnych komórek ST infekowanych PRV i zbieranych po 5 i 7 hpi.** Analiza została przeprowadzona za pomocą cytometrii przepływowej. **A)** Przykładowe histogramy obrazują rozkład sygnału fluorescencji pochodzącej z glikoproteiny gE barwionej przeciwciałami anti-gE (w rozcieńczeniu 1:100) oraz drugorzędowymi sprzężonymi z Alexa 633 (w rozcieńczeniu 1:2000). **B)** Na wykresie słupkowym przedstawiono średnią wartość fluorescencji gE z trzech niezależnych powtórzeń. Słupki błędów obrazują odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oszacowano za pomocą dwustronnego testu t-studenta. \*\* $p < 0,01$ . n/s – brak istotności statystycznej.

W celu zbadania całkowitej ilości gE, przeprowadziłam infekcję PRV w analogicznych warunkach, jak we wcześniejszych doświadczeniach. Zgodnie z oczekiwaniami, całkowity poziom białka gE w lizatach komórkowych analizowany metodą Western blottingu był niższy w komórkach z konstytutywną ekspresją miRNA LLT[1-3] PRV w porównaniu do kontrolnych komórek ST w 5 i 7 hpi (Ryc. 4.20.A). Przeprowadzona analiza RT-qPCR wykazała, że produkcja transkryptu gE uległa

obniżeniu w obecności miRNA z klastra LLT[1-3], co przedstawiłam na **Ryc. 4.20.B**. Wzór inhibicji mRNA glikoproteiny gE był podobny do wzoru inhibicji transkryptu IE180.



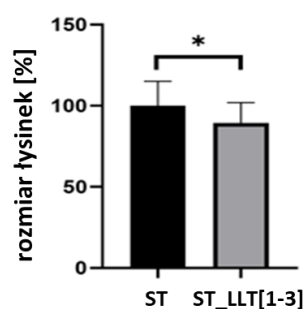
**Ryc. 4.20. Analiza wpływu miRNA LLT[1-3] na ekspresję genu *US8*.** Komórki ST\_LL[1-3] i kontrolne komórki ST zostały zainfekowane PRV przy MOI 1, próbki zbierano po 5 i 7 hpi. **A)** Analiza metodą Western blottingu poziomu gE w lizatach zainfekowanych komórek została wykonana przy użyciu przeciwciał anti-gE (w rozcieńczeniu 1:1000).  $\beta$ -aktynę wykrywano jako kontrolę nałożenia próbek. Ilościowe oznaczenia densytometryczne prążków gE (wskazanych jako stosunek gęstości optycznej), znormalizowanych do gęstości odpowiadających prążków  $\beta$ -aktyny, obliczono między linią kontrolną ST a linią ST\_LL[1-3] dla każdego punktu czasowego po infekcji PRV. (K-) – komórki nieinfekowane; n/a – nie analizowano. **B)** Analiza RT-qPCR poziomu transkryptu gE w komórkach ST\_LL[1-3] zainfekowanych PRV w porównaniu z kontrolnymi komórkami ST. Gen 28S zastosowano jako referencyjną kontrolę wewnętrzną. Ekspresję mRNA przedstawiono jako średnie wartości z trzech niezależnych powtórzeń. Słupki błędów obrazują odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oszacowano za pomocą dwustronnego testu t-studenta. \*\*\*p < 0,001.

#### 4.2.6. Analiza potencjału regulatorowego miRNA LLT[1-3] wobec replikacji PRV

Po zbadaniu efektu nadprodukcji miRNA LLT[1-3] na poziom IE180, EPO i gE, analizowałam, czy zaobserwowane obniżenie poziomu ekspresji genów PRV wpływa na replikację wirusa. Jak wcześniej wspomniano, gE pośredniczy w procesie *cell-to-cell spread* w tkankach nerwowych i kulturach komórek nabłonkowych [Dingwell i in. 1998]. W związku z tym postanowiłam sprawdzić wpływ miRNA LLT[1-3] na morfologię łysinek (przejaśnienia w hodowli komórkowej jednowarstwowej, będące wynikiem lizy komórek spowodowanej działaniem wirusów) tworzonych przez PRV. Wielkość

Łysinek generowanych przez wirusy w hodowli komórkowej umożliwia ocenę prędkości rozprzestrzeniania się wirusa bezpośrednio z komórki do komórki poprzez połączenia międzykomórkowe. Na potrzeby tego doświadczenia infekowałam komórki linii stabilnej oraz kontrolne komórki ST wirusem PRV dodanym do hodowli w ilości umożliwiającej obserwację pojedynczych łysinek. Hodowle prowadziłam pod pożywką z 1% metylocelulozą, która zapobiega wtórnym infekcjom poprzez utrudnienie rozprzestrzeniania się wirusom potomnym, dzięki czemu możliwa jest lepsza wizualizacja pojedynczych łysinek. Łysinki uwidoczniałam po 72 hpi przy pomocy testu IPMA, wykorzystując przeciwciała anti-gE do uwidocznienia komórek zainfekowanych, po czym mierzyłam wielkość łysinek.

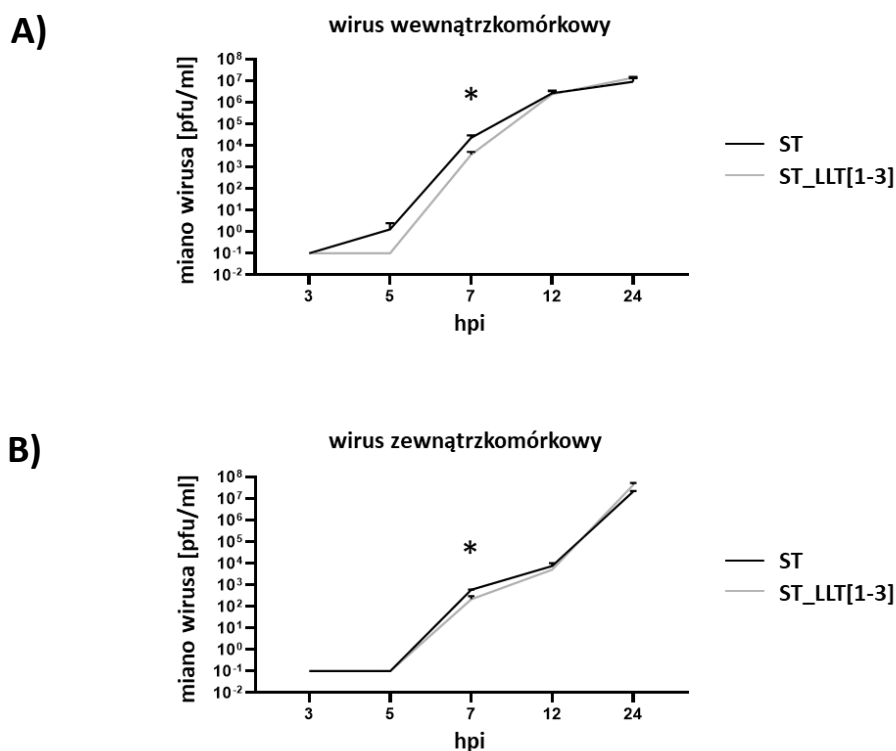
Przeprowadzona analiza wykazała, że w pojedynczej warstwie komórek ST\_LLT[1-3] wirus generuje łysinki średnio o 10% mniejsze w porównaniu do łysinek tworzonych w pojedynczej warstwie kontrolnych komórek ST (**Ryc. 4.21**). Wynik ten sugeruje, że nadekspresja miRNA LLT[1-3] nieznacznie ogranicza rozprzestrzenianie się wirusa PRV do niezainfekowanych komórek sąsiadujących.



**Ryc. 4.21. Nadekspresja miRNA PRV LLT[1-3] wpływa na prędkość bezpośredniego rozprzestrzeniania się PRV z komórki do komórki.** Komórki ST\_LLT[1-3] i kontrolne komórki ST zostały zainfekowane wirusem PRV, po czym zostały przeanalizowane średnice łysinek replikującego wirusa. Słupki błędów obrazują odchylenie standardowe. Istotność statystyczną oszacowano za pomocą dwustronnego testu t-studenta. n = 50; \*p < 0,05.

Białko IE180, będące głównym aktywatorem transkrypcji wirusa PRV, pełni kluczową rolę w ekspresji i replikacji genów wirusowych. Po wykazaniu regulatorowego wpływu miRNA LLT[1-3] na poziom tego białka, w kolejnym kroku zbadałam, w jaki sposób obniżenie poziomu IE180 może wpływać na kinetykę wzrostu wirusa. Przeprowadzone badania miały również na celu sprawdzenie, czy redukcja wielkości łysinek tworzonych w linii ST\_LLT[1-3] koreluje z mniejszą dynamiką wzrostu w hodowli. W celu sprawdzenia, czy miana potomnych wirusów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych produkowanych w zainfekowanych PRV liniach kontrolnej i ST\_LLT[1-3] różnią się, wykonałam analizę krzywej wzrostu wirusa (ang. *one-step growth*). Podczas analizy wyników dla wirionów wewnątrzkomórkowych (**Ryc. 4.22.A**) zaobserwowałam, że namnażanie wirusa PRV po 5 hpi zostało zatrzymane, podczas gdy potomne wiriony wykrywane były w kontrolnych komórkach ST. Po 7 hpi

miano wirusa wewnątrzkomórkowego było w przybliżeniu sześć razy mniejsze, a wirusa zewnątrzkomórkowego trzy razy mniejsze w komórkach linii ST\_LLT [1–3] (Ryc. 4.22.B). Analiza kinetyki wzrostu sugeruje nieznaczne opóźnienie początku produkcji wirusów potomnych: przy 12 hpi miana były o ok. 15% (dla wirusa wewnątrzkomórkowego) i 25% (dla wirusa zewnątrzkomórkowego) niższe w komórkach ST-LLT[1–3] w porównaniu z mianami uzyskanymi w kontrolnych komórkach ST.



**Ryc. 4.22. Krzywa wzrostu PRV replikującego w zainfekowanych komórkach ST\_LLT[1-3] i kontrolnych komórkach ST.** Analiza przyrostu ilości wirionów potomnych w czasie w: **A)** zainfekowanych komórkach i **B)** pożywce znad hodowli zainfekowanych komórek. Miana wirusa określono za pomocą metody seryjnych rozcieńczeń w komórkach ST. Istotność statystyczna została wyliczona za pomocą testu dwuczynnikowej analizy wariancji. Słupki błędów obrazują odchylenie standardowe. \* $p < 0,05$ .

Zarówno dla wirionów wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowych, przy 24 hpi, miana PRV replikującego w komórkach ST-LLT[1-3] były około dwa razy wyższe, co sugeruje, że wirus może kompensować supresję replikacji indukowaną przez miRNA z klastra LLT[1-3]. Sumarycznie, wyniki tych badań sugerują, że nadprodukcja miRNA LLT[1-3] obniża ekspresję *IE180*, *EPO* i *US8*, następstwem czego jest obserwowana redukcja dynamiki replikacji. Porównanie wyników analizy wielkości tyśinek i kinetyki wzrostu może sugerować potencjał miRNA LLT[1-3] wirusa PRV do precyzyjnego dostrajania replikacji wirusa, np. poprzez kontrolę składania wirionów we wczesnych etapach infekcji.

### **4.3. Wykorzystanie inhibitorów do badań nad biogenezą i rolą miRNA PRV**

Badania nad funkcją miRNA wirusa PRV, prowadzone poprzez infekcję wirusem linii stabilnej ST\_LLT[1-3], potwierdziły rolę klastra, składającego się z sekwencji kodującej trzy wirusowe miRNA (prv-miR-LLT1-3p, prv-miR-LLT2-5p i prv-miR-LLT3-3p), w regulacji ekspresji genów i kinetyki wzrostu tego wirusa. Kolejne etapy badań miały na celu wskazanie, który z genów miRNA, ulegających ekspresji w linii ST\_LLT[1-3], jest odpowiedzialny za obserwowane wyniki. W celu zbadania roli danego miRNA w fizjologii PRV, wykorzystałam dwa rodzaje inhibitorów miRNA działających selektywnie wobec wybranego prekursora. Użycie inhibitorów hamujących uwalnianie miRNA z danego prekursora miało na celu umożliwienie obserwowania efektu fenotypowego podczas infekcji, związanego z utratą funkcji określonego miRNA (ang. *loss-of-function studies*, LOF). Badania z wykorzystaniem inhibitorów były prowadzone we współpracy z zespołem prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak. Pierwszy rodzaj selektywnych inhibitorów biogenezy miRNA stanowiły 2'-O-metylowane (2'OMe) oligonukleotydy, których sekwencje zostały zaprojektowane przez mgr Marka Milewskiego w opracowanym przez niego programie EvOligo, służącym do optymalizacji sekwencji i grupowania oligonukleotydów wykorzystywanych w badaniach eksperymentalnych opartych na hybrydyzacji DNA i RNA [Milewski i in. 2017, Corradi i in. 2023]. Drugim rodzajem inhibitorów były komercyjnie dostępne oligomery Morpholino o potwierdzonym działaniu inhibitorowym w procesie biogenezy miRNA [Kloosterman i in. 2007].

Badania przy użyciu inhibitorów prowadziłam dwuetapowo. W pierwszej fazie doświadczeń potencjał inhibitorów do hamowania uwalniania miRNA wirusa PRV z ich prekursorów testowałam w warunkach *in vitro* w Instytucie Chemii Bioorganicznej. W drugiej fazie badań analizowałam możliwość wykorzystania wybranych (na podstawie wyników z fazy pierwszej) oligomerów do hamowania uwalniania miRNA z prekursorów produkowanych w komórkach linii ST\_LLT[1-3] (badania *in cellulo*). Badania typu LOF miały służyć, poprzez obserwację efektu fenotypowego związanego z utratą funkcji danego miRNA, do ustalenia roli poszczególnych miRNA w kontroli ekspresji genów wirusa PRV.

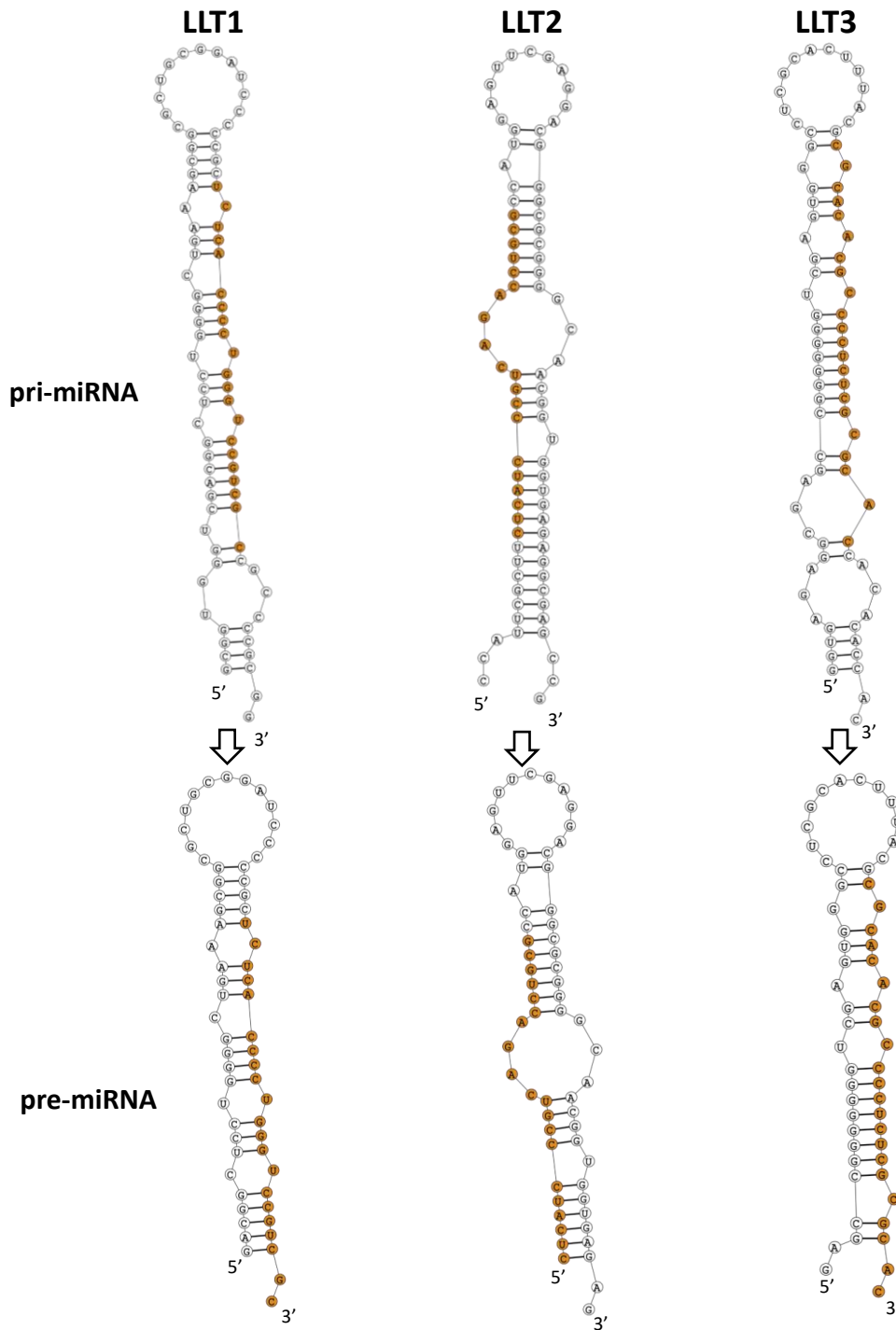
#### **4.3.1. Analiza potencjału inhibitorowego wybranych oligomerów wobec cięcia syntetycznych prekursorów wirusowych miRNA w warunkach *in vitro***

Jednym z zadań w moim projekcie doktorskim było zbadanie w warunkach *in vitro* wpływu wybranych oligomerów, komplementarnych wobec określonych wirusowych pre-miRNA, na proces cięcia tych prekursorów. Badania *in vitro* zostały przeprowadzone z wykorzystaniem otrzymanego preparatu hDicer oraz frakcji cytoplazmatycznej otrzymanej z lizatów komórek ST, zawierającej świńską Dicer (sDicer). Rybonukleaza Dicer jest wysoce konserwowana ewolucyjnie, a identyczność

sekwencji sDicer (GenBank ID: HQ184403) z Dicer ludzką (hDicer) wynosi 90%. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej sDicer i hDicer wykazała, że żaden z obszarów o niższej homologii nie jest związany z funkcjonalnymi domenami białka [Stowe i in. 2012]. Budowa, a także mechanizm działania hDicer zostały dobrze poznane [Provost i in. 2002, Lee i in. 2023], z tego względu białko to często jest wykorzystywane w reakcjach kontrolnych, w badaniach dotyczących stosunkowo słabo poznanych Dicer. Użycie frakcji cytoplazmatycznych (których skład makromolekularny obejmuje m.in. wachlarz białek zaangażowanych w przetwarzanie kwasów nukleinowych oraz szerokie spektrum cząsteczek RNA, które potencjalnie mogą interferować ze ścieżką biogenezy miRNA) umożliwiło porównanie wydajności procesu cięcia określonych pre-miRNA pomiędzy dwoma układami: (i) układem minimalnym, zawierającym: rekombinowaną hDicer oraz pre-miRNA, a (ii) układem o warunkach zbliżonych do tych występujących w żywej komórce.

#### **4.3.1.1. Analiza przetwarzania syntetycznych prekursorów miRNA PRV w układzie *in vitro***

Pierwszym zadaniem tej części projektu było zbadanie, czy sDicer obecna w lizatach komórek ST przeprowadza cięcie prekursorów i produkuje dojrzałe miRNA wirusa PRV. Badania te prowadziłam z wykorzystaniem syntetycznych prekursorów, zaprojektowanych indywidualnie dla każdego z badanych miRNA wirusa PRV na podstawie ich sekwencji pri-miRNA, podanych w bazie miRbase.org. Wskazane sekwencje zostały skrócone do długości odpowiadającej produktom pre-miRNA (ok. 60-nt), z zachowaniem 2-nt wolnych końców od strony 3', co pozwoliło uzyskać charakterystyczne substraty dla Dicer. Przewidywane struktury drugorzędowe prekursorów, wygenerowane w programie RNAstructure [Reuter i in. 2010], zostały przedstawione na **Ryc. 4.23** (predykcja struktury pre-prv-LLT3 wygenerowana w programie RNAstructure nieznacznie różniła się od struktury pre-prv-LLT3 zaprezentowanej w miRBase.org i zawierała również dwa wolne nt na końcu 5').



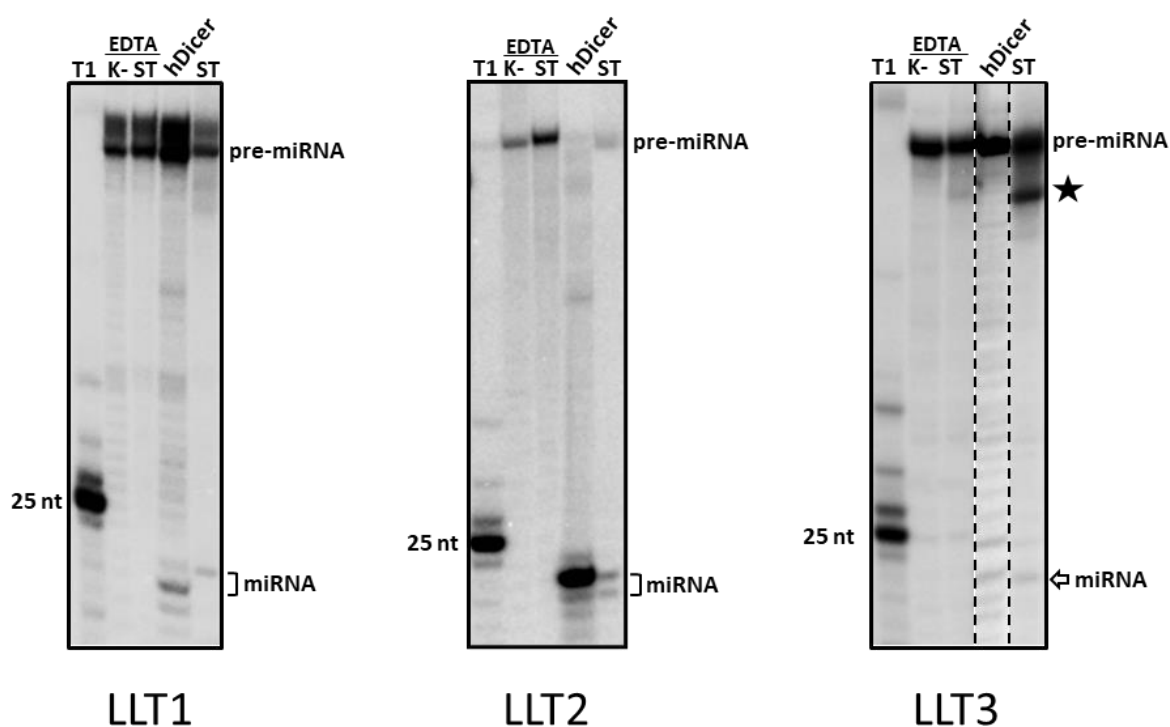
Ryc. 4.23. Przewidywane struktury drugorzędowe wybranych prekursorów miRNA wirusa PRV, wygenerowane w programie RNAstructure. Kolorem pomarańczowym zostały oznaczone sekwencje dojrzałych miRNA.

Syntetyczne prekursorsy wykorzystałam w testach cięcia pre-miRNA przez sDicer, stanowiły one także podstawę układu modelowego, w którym testowałam potencjał inhibitorowy zaprojektowanych oligomerów, komplementarnych wobec prekursorów wybranych wirusowych miRNA. Na początku należało zbadać, czy sDicer obecna w preparacie lizatu komórek ST (we



wszystkich badaniach wykorzystywano ten sam preparat) wycina dojrzałe miRNA wirusa PRV z zaprojektowanych pre-miRNA.

Cząsteczki pre-miRNA zostały wyznakowane izotopem  $^{32}\text{P}$ , co umożliwiło wizualizację rozdzielonych elektroforetycznie substratów i produktów cięcia zawierających radioaktywny nuklid  $^{32}\text{P}$ . Analizowane przez mnie miRNA wirusa PRV są wycinane ze swoich prekursorów zarówno z ramienia 5' (prv-miR-LLT2-5p), jak i z ramienia 3' (prv-miR-LLT1-3p i prv-miR-LLT3-3p), w związku z czym znakowałam prekursor LLT2 na końcu 5' i analogicznie, prekursor LLT1 i LLT3 na końcu 3'. Wyznakowane cząsteczki w ilości 10000 cpm dodałam do mieszanin reakcyjnych zawierających lizaty komórkowe z sDicer, wzbogacone o  $\text{MgCl}_2$  (na **Ryc. 4.24** oznaczone jako ST). Przygotowałam następujące reakcje kontrolne: (i) kontrole negatywne z EDTA, zawierające odpowiedni prekursor bez Dicer, pozwalające na monitorowanie integralności prekursorów w trakcie inkubacji (K- EDTA), (ii) kontrole negatywne zawierające lizat z sDicer, odpowiedni prekursor oraz EDTA (ST EDTA) oraz (iii) kontrole pozytywne zawierające preparat rekombinowanej ludzkiej Dicer i odpowiedni prekursor (hDicer). Wszystkie mieszaniny reakcyjne zawierały inhibitory RNaz A.



**Ryc. 4.24. Badanie wycinania wybranych miRNA wirusa PRV z syntetycznych prekursorów, prowadzone przy pomocy frakcji cytoplazmatycznej komórek ST.** Wyniki reakcji cięcia RNA prowadzonych przez 1 godzinę w 37 °C z udziałem syntetycznych pre-prv-LLT1, pre-prv-LLT2 oraz pre-prv-LLT3 i lizatów z sDicer lub rekombinowanej hDicer. T1 – drabinka RNA powstała poprzez cięcie pre-prv-LLT2 przez rybonukleazę T1. Opis prób umieszczono w tekście powyżej. Klamerkami i strzałką zostały oznaczone produkty reakcji. Gwiazdką został oznaczony pośredni produkt cięcia sDicer.

Wyniki testów cięcia syntetycznych prekursorów miRNA wirusa PRV potwierdziły, że w lizatach znajduje się aktywna sDicer. Na powyższych radiogramach można zauważyć produkty o długości odpowiadającej dojrzałym miRNA, czyli ok. 22-23 nt (na **Ryc. 4.24** produkty te zostały wskazane za pomocą klamerek oraz strzałki). Brak produktów typu miRNA w reakcjach kontrolnych z EDTA, czyli w warunkach, w których Dicer nie jest aktywna (chelatowanie jonów  $Mg^{2+}$ ) sugeruje, że obserwowane produkty zostały wygenerowane przez ten enzym. Co ciekawe, produkty uwolnione przez sDicer z pre-prv-LLT1 były o ok. 1 nt dłuższe niż te wygenerowane przez hDicer, z kolei sDicer w reakcjach z pre-prv-LLT2 generowała dwa produkty (tzw. izomiRy), których różnica długości wynosiła 1 nt. Obecna w lizacie sDicer oraz preparat hDicer generowały prv-miR-LLT3-3p z najniższą wydajnością w porównaniu do dwóch pozostałych miRNA wirusa PRV. Produkty cięcia wygenerowane przez oba warianty Dicer były jednakowej długości, niemniej w reakcji z sDicer można zauważyć dodatkowy prążek, prawdopodobnie odpowiadający pośredniemu produktowi cięcia pre-miRNA, który na **Ryc. 4.24** został oznaczony za pomocą gwiazdki (przypuszczalnie pozostały fragment prekursora, po wycięciu prv-miR-LLT3-5p).

W celu optymalizacji warunków cięcia, pre-prv-LLT1 i pre-prv-LLT3 były testowane także w innych warunkach reakcyjnych, obejmujących dłuższe czasy inkubacji i wyższą temperaturę inkubacji (dane niepokazane). Wydłużenie czasu inkubacji prowadziło jednak do spadku ilości miRNA, z kolei reakcje prowadzone w 39 °C (fizjologiczna temperatura ciała świni) nie wpływały na poziom produktu miRNA. Uwalnianie miRNA-3p było mniej wydajne niż miRNA-5p, co może wynikać z faktu, iż w przypadku substratów znakowanych  $^{32}P$  na końcu 3', substrat taki nie odzwierciedlał naturalnego pre-miRNA, posiadającego grupę hydroksylową na końcu 3'.

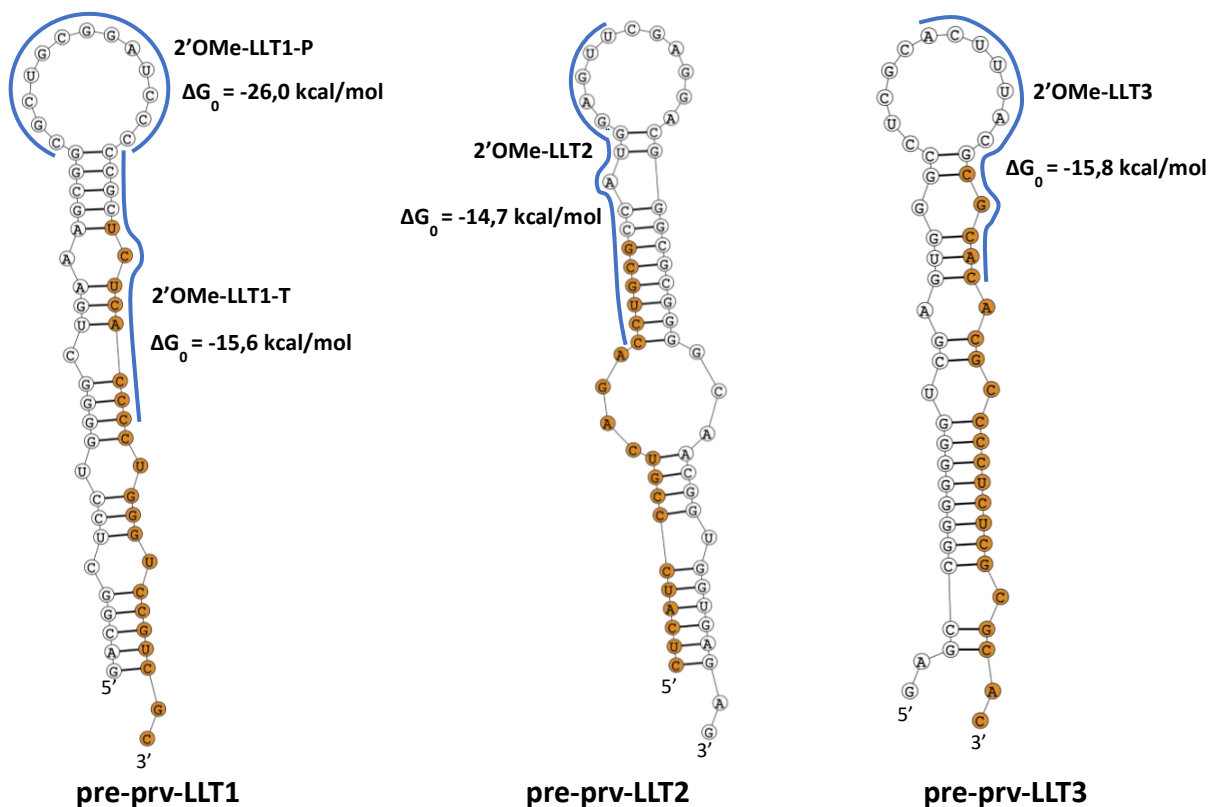
Uzyskane wyniki wskazują, że w testowanym układzie badawczym, składającym się z syntetycznych prekursorów miRNA wirusa PRV oraz z frakcji cytoplazmatycznej komórek ST, generowane były produkty odpowiadające dojrzałym miRNA, przez co mógł on zostać wykorzystany do analizy potencjału inhibitorowego oligomerów komplementarnych wobec wybranych pre-miRNA w warunkach *in vitro*.

#### **4.3.1.2. Badanie wpływu oligomerów 2'-O-metylowanych i Morpholino na proces cięcia wirusowych pre-miRNA przez Dicer**

W badaniach nad inhibicją wycinania miRNA PRV z ich prekursorów wykorzystałam zestaw oligomerów o sekwencjach komplementarnych do rejonów pętli apikalnej i trzonu docelowych pre-miRNA: oligonukleotydy 2'-O-metylowane (2'OMe, **Ryc. 4.25**) i oligomery Morpholino (MO, **Ryc. 4.26**). Pierwszym rodzajem testowanych cząsteczek były oligorybonukleotydy o długości 12-15 nt z modyfikacjami 2'OMe (zbudowane w całości z nukleotydów posiadających grupę metylową

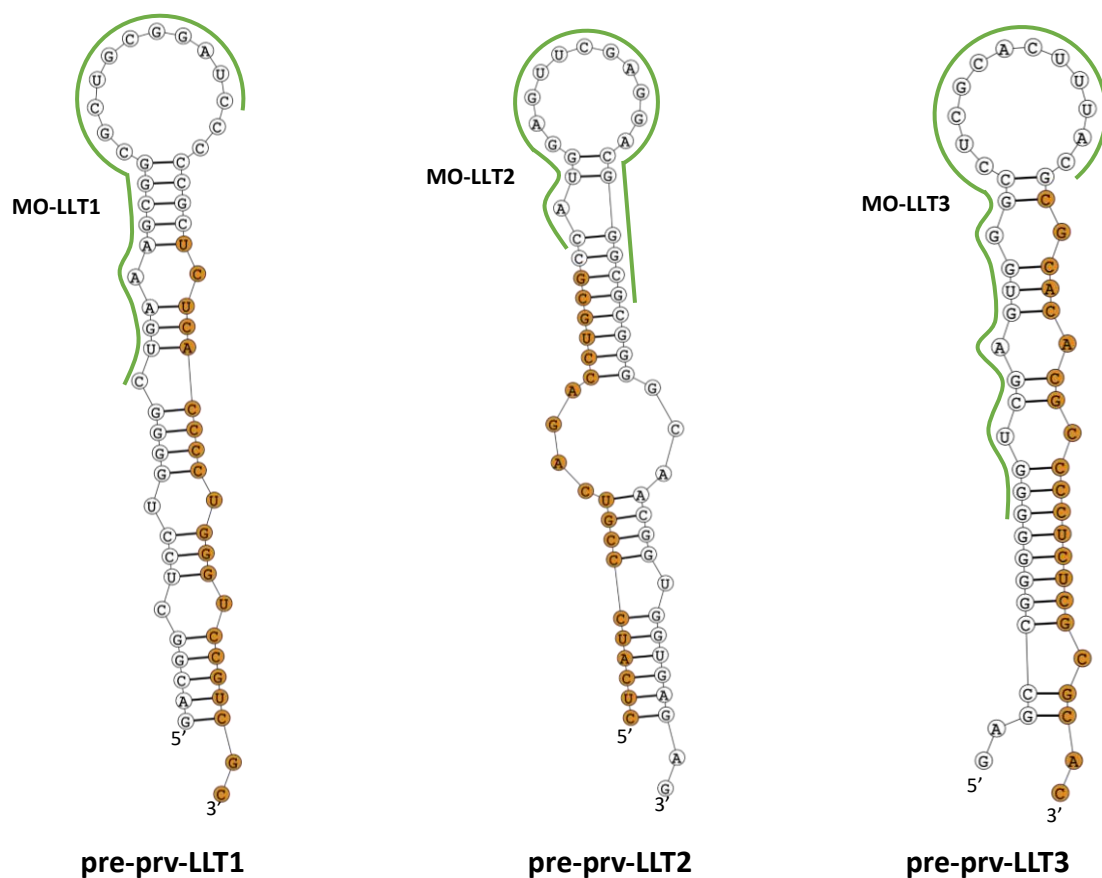
przyłączoną kowalencyjnie do atomu tlenu w pozycji 2' rybozy). Wcześniejsze badania prowadzone przez zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak dowiodły, że cząsteczki tego typu wydajnie hamują proces uwalniania zarówno ludzkich [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2013], jak i żabich [Corradi i in. 2023] miRNA z ich prekursorów.

Zaprojektowane w programie EvOligo oligomery 2'OMe, przedstawione na **Ryc. 7.25**, powinny tworzyć stabilne kompleksy z docelowymi pre-miRNA, charakteryzujące się możliwie niską energią swobodną ( $\Delta G_0$ ). Dla pre-prv-LLT1 zostały zamówione dwa oligomery, z których jeden hybrydyzował z rejonem pętli (2'OMe-LLT1-P, długości 13-nt), a drugi był komplementarny do sekwencji trzonu (2'OMe-LLT1-T, długości 12-nt). Dla pre-prv-LLT2 i pre-prv-LLT3 zamówione oligomery były komplementarne do rejonów apikalnych, obejmujących częściowo sekwencje trzonu i pętli prekursorów (nazwane odpowiednio 2'OMe-LLT2, długości 15-nt, i 2'OMe-LLT3, długości 13-nt). Reakcje kontrolne były prowadzone z użyciem dwóch oligomerów 2'OMe, których sekwencje nie były komplementarne do żadnej sekwencji występującej w genomie świni, czy wirusa PRV (2'OMe-ctrl-1 i 2'OMe-ctrl-2). Oligomery te również zostały zaprojektowane z wykorzystaniem programu EvOligo.



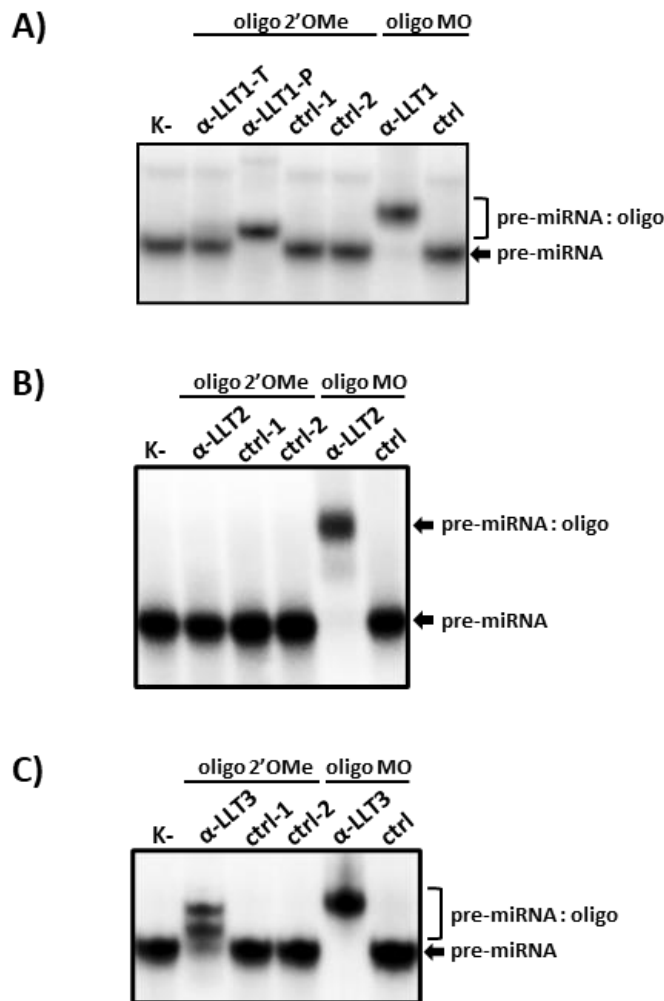
**Ryc. 4.25.** Struktury drugorzędowe prekursorów pre-prv-LLT1, pre-prv-LLT2 i pre-prv-LLT3 z zaznaczonymi rejonami, do których wiązały się zaprojektowane oligomery 2'OMe. Kolorem pomarańczowym zostały oznaczone sekwencje dojrzałych miRNA. Niebieskimi liniami zostały zaznaczone miejsca, do których wiązały się komplementarne oligomery 2'OMe. Podano wartości energii swobodnej ( $\Delta G_0$ ) dla kompleksów danego oligonukleotydu 2'OMe z komplementarną sekwencją dedykowaną dla niego pre-miRNA PRV.

Drugim rodzajem oligomerów, testowanych pod kątem potencjału inhibitorowego wobec procesu cięcia pre-miRNA, były inhibitory Morpholino. Jak wcześniej wspomniano, Morpholino (MO) to syntetyczne oligomery, będące analogami kwasów nukleinowych, zbudowane z zasad DNA przyłączonych do szkieletu zbudowanego z pierścieni metylenomorfolinowych połączonych grupami fosfordiamidynianowymi [Moulton 2007]. Mechanizm działania zamówionych przeze mnie oligomerów, zarówno 2'OMe, jak i Morpholino, polegał na ich hybrydyzacji do pre-miRNA, przez co miały one blokować wycinanie dojrzałych miRNA. Sekwencje tych inhibitorów (MO-LLT1, MO-LLT2 i MO-LLT3), celujących w prekursorzy trzech badanych przeze mnie miRNA wirusa PRV, zostały zaprojektowane przez firmę Gene Tools (**Ryc. 4.26**), która zaproponowała także sekwencję oligomeru kontrolnego – MO-ctrl.



**Ryc. 4.26.** Struktury drugorzędowe prekursorów pre-prv-LLT1, pre-prv-LLT2 i pre-prv-LLT3 z zaznaczonymi rejonami, do których wiązały się oligomery Morpholino. Kolorem pomarańczowym zostały oznaczone sekwencje dojrzałych miRNA. Zielonymi liniami zostały zaznaczone miejsca, do których wiązały się komplementarne oligomery Morpholino.

W celu potwierdzenia, że zsyntetyzowane oligomery oddziałują z pre-miRNA, przeprowadziłam test spowolnionej migracji RNA w żelach PAA w warunkach natywnych (EMSA, ang. *electrophoretic mobility shift assay*). Wybrane syntetyczne prekursorzy miRNA PRV wyznakowane radioizotopowo były inkubowane ze 100-krotnym molowym nadmiarem określonych oligomerów przez 30 min w 37 °C (Ryc. 4.27).



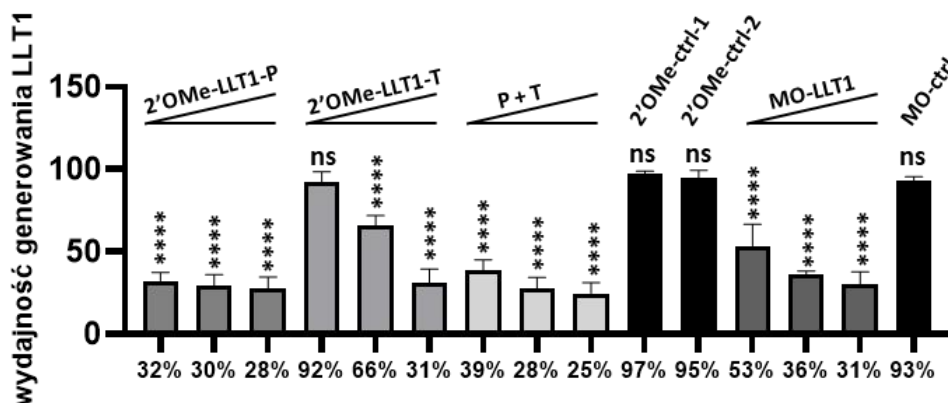
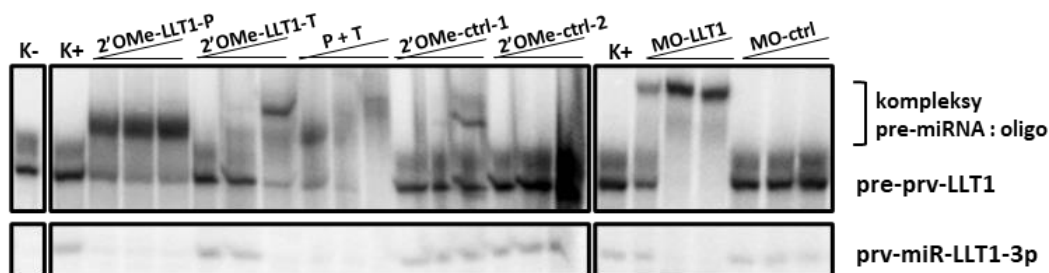
**Ryc. 4.27. Badanie oddziaływań pomiędzy prekursorami: A) pre-prv-LLT1, B) pre-prv-LLT2 i C) pre-prv-LLT3 a oligomerami 2'OMe i Morpholino (MO).** Wynik testu EMSA, w którym wyznakowany radioizotopowo pre-miRNA był inkubowany w samym buforze reakcyjnym (K-) lub ze 100-krotnym molowym nadmiarem wybranego oligomeru. α-LLT1, α-LLT2 i α-LLT3 – oligomery komplementarne do wybranego prekursora. Wskazane zostały pozycje prążków odpowiadających wolnym prekursorom oraz ich kompleksom z oligomerami 2'OMe i MO.

Wynik testu EMSA przeprowadzonego dla pre-prv-LLT1 (Ryc. 4.27.A) potwierdził jego wydajną hybrydyzację z oligomerami 2'OMe-LLT1-P i MO-LLT1. Oddziaływanie tego prekursora z 2'OMe-LLT1-T było natomiast ledwo wykrywalne, co mogło wynikać z niskiej stabilności kompleksów, które

prawdopodobnie ulegały rozpadowi podczas rozdziału. Na radiogramie przedstawionym na **Ryc. 4.27.B** można zauważyć wydajną hybrydyzację MO-LLT2 do pre-prv-LLT2. Pomimo optymalizacji warunków wiązania, nie udało mi się zaobserwować oddziaływania prekursora pre-prv-LLT2 z oligomerem 2'OMe-LLT2, co również mogło wynikać z niskiej stabilności kompleksów. Wyniki doświadczenia z udziałem pre-prv-LLT3 potwierdziły jego silne oddziaływanie z MO-LLT3 (**Ryc. 4.27.C**). Oligomer 2'OMe-LLT3 również hybrydyzował do tego prekursora – na radiogramie widoczne są dwa prążki odpowiadające kompleksom pre-prv-LLT3 : 2'OMe-LLT3, a także frakcja niezwiązanego pre-prv-LLT3. Żaden oligomer kontrolny nie oddziaływał z żadnym z prekursorów. Uzyskane wyniki częściowo potwierdziły wyjściowe założenie, że badane oligomery 2'OMe i MO oddziałują z prekursorami miRNA PRV. W celu weryfikacji zastosowania tych oligomerów jako inhibitorów biogenezy wybranych miRNA należało przeprowadzić testy cięcia pre-miRNA w ich obecności.

Potencjał inhibitorowy zaprojektowanych oligomerów analizowałam w reakcjach hydrolizy pre-miRNA, w skład których wchodziły: (i) frakcja cytoplazmatyczna komórek ST, (ii) wyznakowany radioizotopowo prekursor danego miRNA oraz (iii) zaprojektowany dla tego pre-miRNA oligomer. Prekursory były preinkubowane z komplementarnymi oligomerami (lub oligomerami kontrolnymi), po czym zostały poddawane cięciu przez Dicer. Dla każdego układu pre-miRNA : oligomer przygotowałam trzy mieszaniny reakcyjne, w których ilość znakowanego radioizotopowo pre-miRNA oraz sDicer była stała, natomiast zmieniało się stężenie komplementarnego oligomeru tak, by stosunek molowy pre-miRNA : oligomer wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10 i 1:100. Dodatkowo, przeprowadzałam reakcje umożliwiające monitorowanie integralności prekursorów (substratów) w czasie trwania inkubacji, bez sDicer oraz bez oligomerów (K-), oraz reakcje cięcia pre-miRNA przez sDicer pod nieobecność potencjalnych inhibitorów (K+). Wyniki ww. doświadczeń przedstawiłam na **Ryc. 4.28**, **Ryc. 4.29** i **Ryc. 4.30**. Na rycinach zostały także wskazane pozycje kompleksów pre-miRNA : oligomer.

Wyniki trzech niezależnych powtórzeń doświadczenia przeprowadzanego z udziałem prekursora pre-prv-LLT1 (**Ryc. 4.28**) wykazały, że oligomer 2'OMe-LLT1-P już w najniższym testowanym stężeniu (0,1  $\mu$ M) hamował powstawanie prv-miR-LLT1-3p o średnio 68% w porównaniu do reakcji kontrolnej (K+), a zwiększenie jego stężenia w mieszaninach do 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M podniosło tę wartość do odpowiednio 70 % i 72%. 2'OMe-LLT1-T okazał się mniej wydajnym inhibitorem niż 2'OMe-LLT1-P, obniżał on powstawanie prv-miR-LLT1-3p o 69% jedynie, gdy był obecny w mieszaninie reakcyjnej w stężeniu 10  $\mu$ M. Jednoczesne podanie obu oligomerów do mieszaniny reakcyjnej (na rycinie oznaczone jako „P + T”) w stężeniu 10  $\mu$ M nieznacznie tylko zwiększyło stopień inhibicji cięcia pre-prv-LLT1 (do 75%). Oligomery kontrolne 2'OMe nie wpływały znacząco statystycznie na proces cięcia pre-prv-LLT1 przez sDicer.



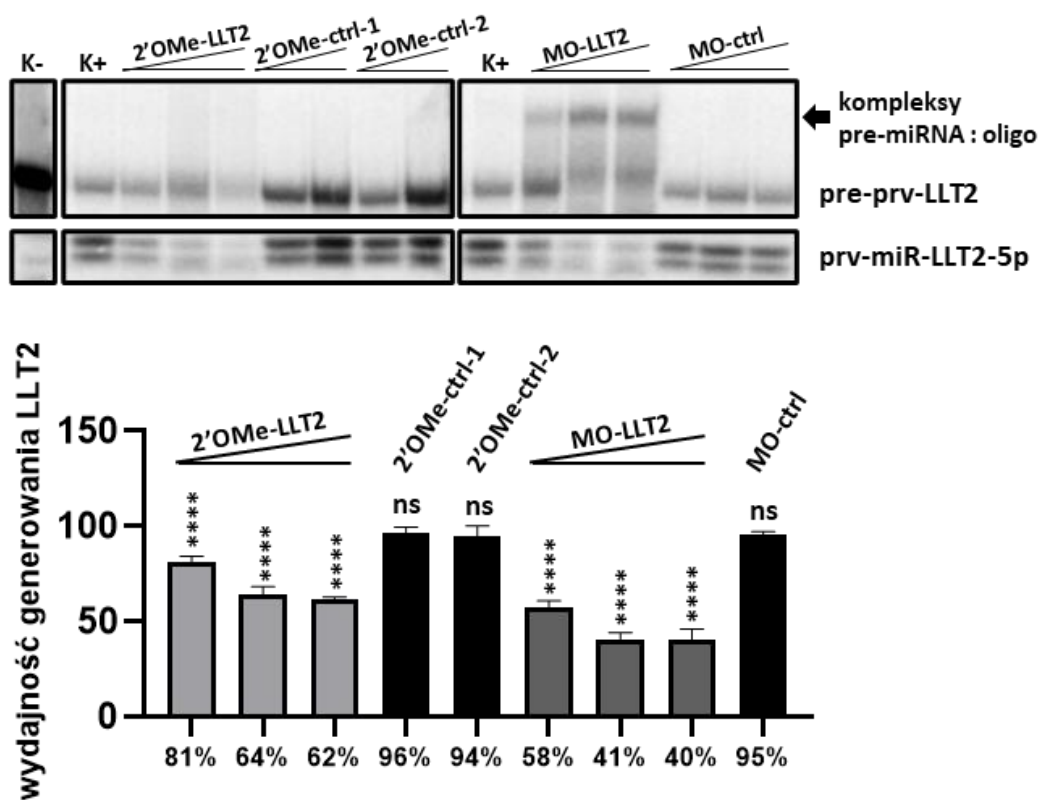
**Ryc. 4.28.** Badanie potencjału inhibitorowego oligomerów 2'OMe i Morpholino (MO) komplementarnych do pre-prv-LLT1. Wynik analizy reakcji, w których prekursor pre-prv-LLT1 był inkubowany z frakcją cytoplazmatyczną ST w obecności oligomerów 2'OMe (2'OMe-LLT1-P, 2'OMe-LLT1-T lub mieszanki tych oligomerów (P + T) lub dwóch oligomerów kontrolnych 2'OMe-ctrl-1 i 2'OMe-ctrl-2), a także oligomerów Morpholino (MO-LLT1 lub kontrolnego MO-ctrl). Trójkątami został zaznaczony wzrost stężenia oligomerów (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M). (K-) - reakcja kontrolna bez dodatku sDicer oraz bez oligomeru. (K+) - reakcja kontrolna z sDicer bez potencjalnego inhibitora (oligomerów). Wykres przedstawia wydajność generowania miRNA w reakcjach z cząsteczkami inhibitorowymi, w odniesieniu do kontroli (K+, 100%). W analizie zostały uwzględnione tylko wartości dla oligomerów kontrolnych dodanych do mieszanin reakcyjnych w najwyższych stężeniach (10  $\mu$ M). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu, obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. Istotność statystyczna dla każdej z prób została obliczona w porównaniu do kontroli pozytywnej (K+) przy pomocy testu jednoczynnikowej analizy wariancji. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns – brak istotności statystycznej.

Analiza przeprowadzona dla oligomerów Morpholino wykazała, że stopień inhibicji generowania LLT1-3p wynosił 47%, 64% i 69% gdy MO-LLT1 został dodany odpowiednio w stężeniach 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M. Oligomer kontrolny MO-ctrl nie wpływał w istotny statystycznie sposób na proces generowania prv-miR-LLT1-3p przez sDicer.

Na przedstawionym skanie (**Ryc. 4.28**) można zauważyć (przypuszczalnie) wygenerowane kompleksy pre-prv-LLT1 : oligomer, migrujące w żelu wolniej od substratu. Obserwacja ta dotyczy reakcji z 2'OMe-LLT1-P oraz MO-LLT1, dodanych w każdym z analizowanych stężeń, z kolei kompleks pre-miRNA : 2'OMe-LLT1-T jest widoczny tylko dla reakcji z dodanym oligomerem w najwyższym stężeniu 10  $\mu$ M. Wynik ten pokrywa się z wynikiem testu EMSA (**Ryc. 4.27.A**), gdzie można zauważyć wyraźne kompleksy tworzone przez pre-prv-LLT1 z 2'OMe-LLT1-P oraz MO-LLT1, a także słaby prążek

(migrujący w żelu wolniej niż sam prekursor) odpowiadający kompleksowi pre-prv-LLT1 : 2'OMe-LLT1-T. Na skanie przedstawionym na **Ryc. 4.28** można zauważyć również niespecyficzne agregaty tworzone przez pre-prv-LLT1 i oligomer kontrolny 2'OMe-ctrl-1 dodany w najwyższym stężeniu (10  $\mu$ M). Oligomer ten nie hamował cięcia pre-prv-LLT1, poza tym jego sekwencja nie jest komplementarna do sekwencji pre-miRNA, w związku z czym wnioskuję, że 2'OMe-ctrl-1 nie oddziaływał z pre-prv-LLT1. Konkluzję tę popiera brak widocznego oddziaływania pomiędzy tymi cząsteczkami na **Ryc. 4.27.A**.

Kolejnym prekursorem, wobec którego analizowałam potencjał inhibitorowy oligomerów 2'OMe i Morpholino, był pre-prv-LLT2 (**Ryc. 4.29**).



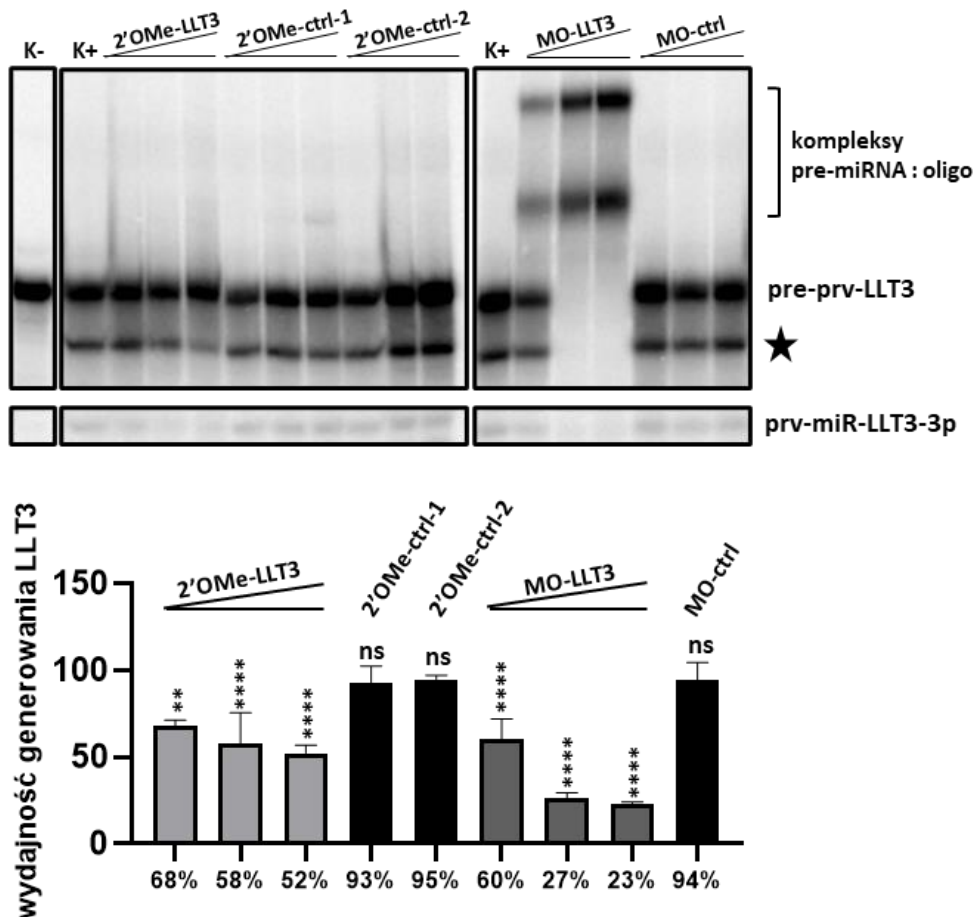
**Ryc. 4.29. Badanie potencjału inhibitorowego oligomerów 2'OMe i Morpholino (MO) komplementarnych do pre-prv-LLT2.** Wynik analizy reakcji, w których prekursor pre-prv-LLT2 był inkubowany z frakcją cytoplazmatyczną ST w obecności oligomerów 2'OMe (2'OMe-LLT2 lub dwóch oligomerów kontrolnych 2'OMe-ctrl-1 i 2'OMe-ctrl-2), a także oligomerów Morpholino (MO-LLT2 lub kontrolnego MO-ctrl). Trójkątami został zaznaczony wzrost stężenia oligomerów (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M). (K-) - reakcja kontrolna bez dodatku sDicer oraz oligomeru. (K+) - reakcja kontrolna z sDicer bez potencjalnego inhibitora. Wykres przedstawia wydajność generowania miRNA w reakcjach z cząsteczkami inhibitorowymi, w odniesieniu do kontroli (K+, 100%). W analizie zostały uwzględnione tylko wartości dla oligomerów kontrolnych dodanych do mieszanin reakcyjnych w najwyższych stężeniach (10  $\mu$ M). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu, obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. Istotność statystyczna dla każdej z prób została obliczona w porównaniu do kontroli pozytywnej (K+) przy pomocy testu jednoczynnikowej analizy wariancji. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns – brak istotności statystycznej.



Aktywność oligomerów 2'OMe-LLT2 i MO-LLT2 również była oceniana w standardowych reakcjach cięcia pre-miRNA przez Dicer, w których stosunek molowy pre-miRNA : oligomer wynosił odpowiednio 1:1, 1:10 i 1:100. W reakcjach, w których 2'OMe-LLT2 był obecny w najniższym stężeniu 0,1  $\mu$ M (stosunek molowy prekursor : oligomer – 1:1) zaobserwowałam blokowanie generowania prv-miR-LLT2-5p na średnim poziomie wynoszącym 19% w odniesieniu do kontroli pozytywnej. Dodanie tego inhibitora w 10- i 100-krotnym nadmiarze molowym podnosiło inhibicję cięcia pre-prv-LLT2 do poziomu odpowiednio 36% i 38%. Analiza wyników wykonana dla MO-LLT2 wykazała, że w najniższym testowanym stężeniu (0,1  $\mu$ M) MO-LLT2 hamował wycinanie prv-miR-LLT2 średnio o ok. 42%, podczas gdy zwiększenie jego stężenia do 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M spowodowało wzrost poziomu inhibicji do odpowiednio 59% i 60% .

Na radiogramie przedstawionym na **Ryc. 4.29** można zaobserwować prążki powyżej pre-miRNA, przypuszczalnie odpowiadające kompleksom pre-prv-LLT2 : MO-LLT2. Pomimo tego, że 2'OMe-LLT2 wywoływał wydajną inhibicję generowania prv-miR-LLT2-5p, na skanie nie widać oddziaływania tego oligomeru z prekursorem pre-prv-LLT2. Uzyskane wyniki są spójne z wynikami testu EMSA, przedstawionymi na **Ryc. 4.27.B**. Przypuszczalnie podczas rozdziału elektroforetycznego dochodziło do rozpadu kompleksów pre-prv-LLT2 : 2'OMe-LLT2.

Ostatni cykl doświadczeń dotyczył inhibicji procesu uwalniania prv-miR-LLT3-3p. Na **Ryc. 4.30** zostały przedstawione wyniki doświadczeń z wykorzystaniem dedykowanych dla pre-prv-LLT3 oligomerów 2'OMe-LLT3 i MO-LLT3.



**Ryc. 4.30. Badanie potencjału inhibitorowego oligomerów 2'OMe i Morpholino (MO) komplementarnych do pre-prv-LLT3.** Wynik analizy reakcji, w których prekursor pre-prv-LLT3 był inkubowany z frakcją cytoplazmatyczną ST w obecności oligomerów 2'OMe (2'OMe-LLT3 lub dwóch oligomerów kontrolnych 2'OMe-ctrl-1 i 2'OMe-ctrl-2), a także oligomerów Morpholino (MO-LLT3 lub kontrolnego MO-ctrl). Trójkątami został zaznaczony wzrost stężenia oligomerów (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M). (K-) - reakcja kontrolna bez dodatku sDicer oraz oligomeru. (K+) - reakcja kontrolna z sDicer bez potencjalnego inhibitora. Wykres przedstawia wydajność generowania miRNA w reakcjach z cząsteczkami inhibitorowymi, w odniesieniu do kontroli (K+, 100%). W analizie zostały uwzględnione tylko wartości dla oligomerów kontrolnych dodanych do mieszanin reakcyjnych w najwyższych stężeniach (10  $\mu$ M). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu, obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu. Istotność statystyczna dla każdej z prób została obliczona w porównaniu do kontroli pozytywnej (K+) przy pomocy testu jednoczynnikowej analizy wariancji. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns – brak istotności statystycznej.

W najniższym zastosowanym stężeniu (0,1  $\mu$ M) oligomer 2'OMe-LLT3 hamował generowanie prv-miR-LLT3-3p o średnio 32% w porównaniu do reakcji kontrolnej (K+). Zwiększenie stężenia tego oligomeru do 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M podniosło wydajność inhibicji cięcia pre-prv-LLT3 do odpowiednio 42% i 48%. Poziomą inhibicję generowania prv-miR-LLT3-3p, wywołanej działaniem MO-LLT3 użytego w stężeniach 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M, wynosił odpowiednio 40%, 73% i 77%.

Na przedstawionym radiogramie (**Ryc. 4.30**) można zauważyć wyraźne prążki przypuszczalnie odpowiadające kompleksom pre-prv-LLT3 i produktu pośredniego (oznaczonego gwiazdką) z MO-LLT3. Wynik ten pokrywa się z wynikiem testu EMSA, przedstawionym na skanie na **Ryc. 4.27.C**, na którym widać także oddziaływanie prekursora pre-prv-LLT3 z oligomerem 2'OMe-LLT3. Co ciekawe, na radiogramie na **Ryc. 4.30** nie widać oddziaływania między tymi cząsteczkami, pomimo zaobserwowanej aktywności inhibitorowej oligomeru 2'OMe-LLT3. Prawdopodobnie wynika to z braku stabilności kompleksów pre-prv-LLT3 : 2'OMe-LLT3 w warunkach rozdziatu elektroforetycznego.

Zebrane wyniki wskazują, że syntetyczne prekursor miRNA PRV były cięte do produktów miRNA zarówno przez preparat hDicer, jak i przez frakcję cytoplazmatyczną komórek ST (**Ryc. 4.24**). Inkubacje substratów z Dicer były prowadzone przez jedną godzinę, co stanowiło optymalny układ badawczy, w którym nie obserwowałam ubytku miRNA (jak w przypadku dłuższych czasów prowadzenia reakcji; dane niezałączone). Oligomery zaprojektowane wobec pre-miRNA wykazywały potencjał inhibitorowy w analizowanych układach badawczych, tj. blokowały wycinanie miRNA PRV z prekursorów, wobec których były komplementarne.

Porównując aktywność inhibitorową obu typów oligomerów można zauważyć, że oligonukleotydy 2'OMe wydajniej niż Morpholino hamowały cięcie pre-prv-LLT1 (**Ryc. 4.28**), z kolei Morpholino okazały się skuteczniejsze wobec prekursora pre-prv-LLT3 (**Ryc. 4.30**). Przeprowadzone analizy wskazują, że 2'OMe-LLT2 wywoływał słabszą inhibicję cięcia pre-prv-LLT2 niż MO-LLT2 (**Ryc. 4.29**). Jednakże należy zauważyć, iż na proporcję substrat/ produkt, i wynikający z niej wyliczony stopień inhibicji, miał wpływ widoczny ubytek substratu pre-prv-LLT2. Ubytek ten najprawdopodobniej był skutkiem obecności we frakcji cytoplazmatycznej komórek ST innych rybonukleaz, docinających analizowany prekursor w czasie trwania reakcji. Wśród oligonukleotydów 2'OMe najskuteczniejszy wobec dedykowanego prekursora miRNA PRV okazał się 2'OMe-LLT1-P, hybrydujący do pętli apikalnej pre-prv-LLT1. Z kolei wśród Morpholino, oligomer MO-LLT3 wykazywał najsilniejszy potencjał do hamowania cięcia dedykowanego mu pre-miRNA. Zestawiając wyniki uzyskane dla trzech syntetycznych prekursorów miRNA PRV można zauważyć, że cięcie pre-prv-LLT1 było wydajnie hamowane zarówno przez oligonukleotyd 2'OMe, jak i przez Morpholino. W związku z tym doświadczenia w układzie komórkowym rozpoczęłam od analizy inhibicji cięcia obecnego w komórkach ST\_LL[1-3] prekursora pre-prv-LLT1, prowadzonej z wykorzystaniem 2'OMe-LLT1-P oraz MO-LLT1.

### **4.3.2. Wykorzystanie inhibitorów do badań nad funkcją miRNA PRV w systemie komórkowym**

Analiza potencjału inhibitorowego oligomerów zaprojektowanych wobec wybranych prekursorów miRNA PRV potwierdziła, że oligonukleotydy 2'-O-metylowane oraz Morpholino blokują wycinanie miRNA z ich prekursorów przez świńską Dicer w warunkach *in vitro*. W związku z tym, że oba rodzaje inhibitorów wykazywały aktywność wobec wybranych pre-miRNA, w badaniach nad funkcją miRNA wirusa PRV w systemie komórkowym testowałam zarówno oligonukleotydy 2'OMe, jak i Morpholino.

Celem badań prowadzonych w układzie komórkowym było wskazanie, który z miRNA z klastra LLT[1-3] odpowiada za regulację ekspresji genów oraz kinetyki wzrostu wirusa PRV. Wykorzystanie inhibitorów miRNA wpisuje się w trend badań typu LOF, związanych z obserwacją efektu fenotypowego wynikającego z utraty funkcji wybranego miRNA i finalnie miało pozwolić na eksperymentalne potwierdzenie roli wyselekcjonowanego miRNA w biologii wirusa PRV.

Badania *in cellulo* z wykorzystaniem inhibitorów miRNA prowadziłam w dwóch etapach. W pierwszej części doświadczeń analizowałam potencjał oligomerów 2'OMe i Morpholino do hamowania procesu uwalniania wybranych endogennych miRNA PRV w komórkach linii ST\_LL[1-3]. Komórki z obniżoną ekspresją docelowego miRNA wirusowego stanowią podstawę układów badawczych dla doświadczeń typu LOF, w których po infekcji wirusem następuje analiza wpływu obniżenia poziomu danego miRNA na przebieg infekcji wirusowej. Drugi etap badań nad rolą miRNA PRV prowadziłam przy pomocy komercyjnie dostępnych inhibitorów *mirVana*, będących tzw. oligonukleotydami antysensownymi wobec miRNA (AMO, ang. *antisense miRNA oligonucleotides*, zwanych także antagomiRami). W przeciwieństwie do zaprojektowanych oligomerów, inhibitory AMO nie oddziałują z prekursorami miRNA, lecz z dojrzałymi cząsteczkami miRNA, co skutkuje blokowaniem wiązania tych ostatnich do docelowych transkryptów.

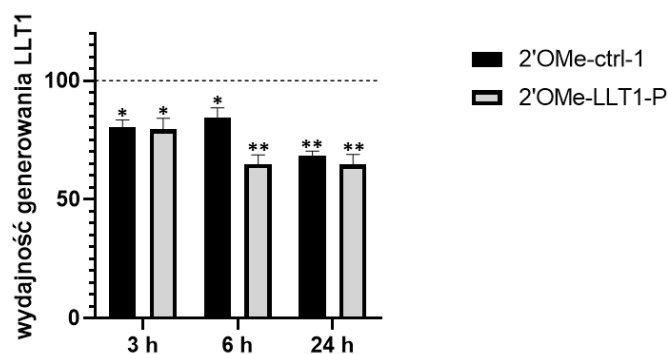
#### **4.3.2.1. Analiza potencjału oligomerów 2'-O-metylowanych i Morpholino do hamowania cięcia pre-miRNA PRV w komórkach linii ST\_LL[1-3]**

Prace nad możliwością wykorzystania oligomerów 2'OMe i Morpholino do badań nad rolą miRNA PRV rozpoczęłam od analizy wpływu tych oligomerów na poziom endogennych miRNA wirusa, produkowanych w komórkach z konstytutywną ekspresją miRNA z klastra LLT[1-3]. Schemat doświadczeń związanych z badaniem poziomu miRNA w układzie komórkowym polegał na transfekcji komórek linii ST\_LL[1-3] za pomocą wybranych oligomerów, zbieraniu próbek po określonym czasie od momentu dodania do komórek mieszanin transfekcyjnych i przeprowadzaniu analizy ekspresji wybranych miRNA za pomocą ilościowej reakcji PCR poprzedzonej reakcją odwrotnej transkrypcji

(RT-qPCR). Analizy poziomu miRNA, po podaniu oligomerów, prowadziłam w podobny sposób jak podczas przeprowadzania charakterystyki skonstruowanej linii ST\_LL1[1-3] (rozdział **Wyniki 4.2.2**). W celu normalizowania ilości całkowitego RNA w każdej reakcji, jako endogenną kontrolę używałam snRNA U6. Relatywny poziom ekspresji miRNA określałam metodą  $\Delta\Delta Ct$ . Relatywny poziom danego miRNA (wartości  $\Delta Ct$ ) w nietransfekowanych komórkach ST\_LL1[1-3] porównywałam do jego relatywnego poziomu w transfekowanych komórkach ST\_LL1[1-3].

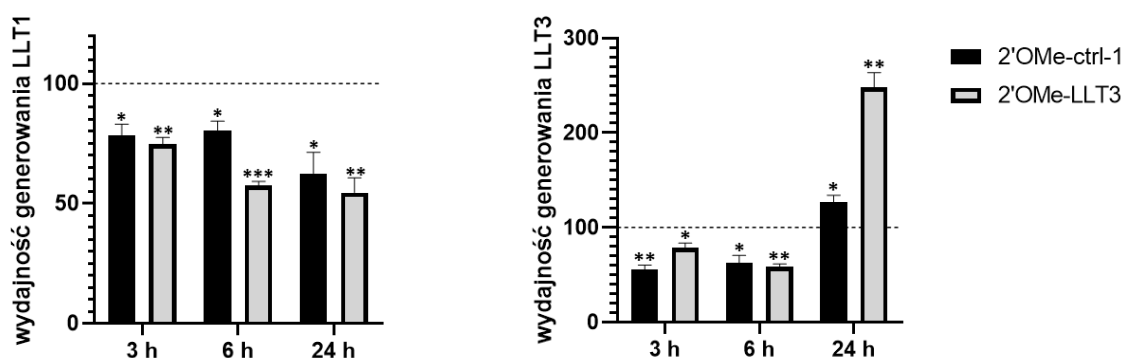
Pracę z inhibitorami w systemie komórkowym rozpoczęłam od analiz poziomu miRNA, wykonanych dla komórek ST\_LL1[1-3] transfekowanych oligonukleotydami 2'OMe. W pierwszych doświadczeniach chciałam sprawdzić po jakim czasie od podania potencjalnych inhibitorów będzie możliwa obserwacja obniżenia poziomu danego miRNA. Badania miały na celu również sprawdzenie, jak długo utrzyma się efekt inhibitorowy po wprowadzeniu oligonukleotydów do komórki. W pierwszej kolejności badałam inhibicję powstawania prv-miR-LL1-3p. Wobec prekursora pre-prv-LL1 zostały zaprojektowane dwa inhibitory 2'OMe: 2'OMe-LL1-P i 2'OMe-LL1-T. W badaniach *in vitro* efektywniejszym inhibitorem okazał się oligomer 2'OMe-LL1-P, dlatego ten właśnie oligomer został wykorzystany podczas doświadczeń *in cellulo*. Wysiane do dołek płytki M12 komórki linii ST\_LL1[1-3] transfekowałam oligonukleotydami 2'OMe-LL1-P lub 2'OMe-ctrl-1 w ilości 10 pmoli na dołek, uzyskując stężenia końcowe wynoszące 10 nM. Użyłam odczynnika Lipofectamine RNAiMAX, dedykowanego transfekcji krótkimi cząsteczkami RNA. Doświadczenie zostało przeprowadzone w trzech powtórzeniach. Po 3, 6 i 24 godzinach od momentu dodania mieszanin transfekcyjnych zbierałam komórki, po czym sprawdziłam poziom prv-miR-LL1-3p. Zbierałam również nietransfekowane komórki ST\_LL1[1-3] (próba kontrolna), dla których poziom miRNA przyjmęłam za 100% i stanowił on punkt odniesienia dla dalszych analiz (na wykresie na **Ryc. 4.31** został on oznaczony przerywaną linią).

Na wykresie na **Ryc. 4.31** można zauważyć spadek poziomu prv-miR-LL1-3p w komórkach ST\_LL1[1-3] o średnio 21% w 3 godziny po podaniu oligonukleotydu 2'OMe-LL1-P, w odniesieniu do próby kontrolnej (100%). 6 i 24 godziny po transfekcji spadek poziomu miRNA wynosił ok. 35%. Na przedstawionym wykresie można zauważyć również wpływ oligomeru kontrolnego na ekspresję prv-miR-LL1-3p. 3, 6 i 24 godziny po transfekcji oligomerem 2'OMe-ctrl-1 obserwowałam spadek poziomu prv-miR-LL1-3p odpowiednio o średnio 20%, 16% i 32%. Analiza danych potwierdziła istotność statystyczną przedstawionych wyników. Obserwacja ta nasunęła pytanie, czy obniżenie poziomu prv-miR-LL1-3p wywołane było specyficznym działaniem 2'OMe-LL1-P oraz czy inne oligonukleotydy 2'OMe mogą wywołać analogiczny efekt.



**Ryc. 4.31. Analiza poziomu prv-miR-LLT1-3p w komórkach ST\_LL1-3 transfekowanych oligomerami 2'OMe-LLT1-P i 2'OMe-ctrl-1.** Komórki były zbierane 3, 6 i 24 godziny po transfekcji. Ekspresja miRNA wirusa PRV była analizowana metodą RT-qPCR. Względne różnice w ilości prv-miR-LLT1-3p, odniesione do wewnętrznej kontroli U6, zostały określone za pomocą metody  $\Delta\Delta Ct$  (normalizowane wobec relatywnego poziomu miRNA w nietransfekowanych komórkach ST\_LL1-3), przyjętego jako 100% na osi Y i oznaczonego na wykresie przerywaną linią). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu, obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych analiz. Istotność statystyczna dla każdej z prób została obliczona w porównaniu do kontroli pozytywnej przy pomocy testu dwuczynnikowej analizy wariancji. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

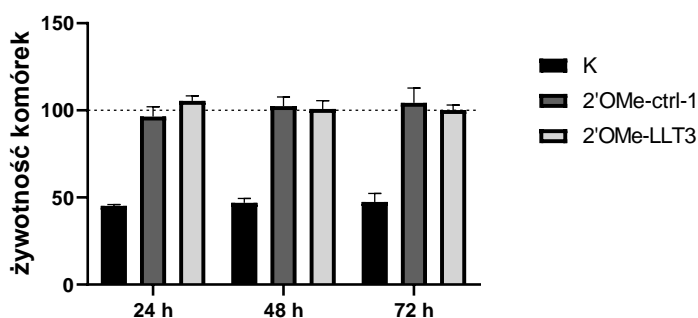
W celu zbadania tego problemu przeprowadziłam doświadczenie podobne do poprzedniego, w którym transfekowałam komórki inhibitorem dedykowanym dla prv-miR-LLT3-3p. Ponownie w badaniach wykorzystywałam oligomer kontrolny 2'OMe-ctrl-1. Po zebraniu komórek w zadanym czasie, analizowałam poziom zarówno LLT1, LLT2, jak i LLT3. Wyniki dla przeprowadzonej analizy zostały przedstawione na **Ryc. 4.32** i obejmują dane tylko dla prv-miR-LLT1-3p i prv-miR-LLT3-3p, ponieważ prv-miR-LLT2-5p w analizowanych próbkach był na niewykrywalnym poziomie.



**Ryc. 4.32. Analiza poziomu prv-miR-LLT1-3p i prv-miR-LLT3-3p w komórkach ST\_LL1-3 transfekowanych oligomerami 2'OMe-LLT3 i 2'OMe-ctrl-1.** Opis jw. \*\*\*p < 0,001.

Wyniki trzech niezależnych powtórzeń doświadczenia pokazały, że po podaniu 2'OMe-LLT3 poziom prv-miR-LLT1-3p spadał w podobnym stopniu, jak po podaniu 2'OMe-LLT1-P (**Ryc. 4.32**). Ilość prv-miR-LLT1-3p w 3, 6 i 24 godziny po transfekcji 2'OMe-LLT3 spadała o odpowiednio: 25%, 42% i 45%. Badanie potwierdziło wcześniej zaobserwowany wpływ oligomeru kontrolnego 2'OMe-ctrl-1 na poziom prv-miR-LLT1-3p. Analiza ilości prv-miR-LLT3-3p po transfekcji 2'OMe-LLT3 i 2'OMe-ctrl-1 wykazała, że podanie obu oligomerów, dedykowanego i kontrolnego, wpływa podobnie na poziom tego miRNA. W 3 godziny po transfekcji ilość prv-miR-LLT3-3p spadała o średnio 22% (2'OMe-LLT3) i 45% (2'OMe-ctrl-1), a w 6 odpowiednio o średnio 41% i 37%. Zaobserwowane obniżenie poziomu prv-miR-LLT3-3p, wywołane przez transfekcję 2'OMe-LLT3 i 2'OMe-ctrl-1, było porównywalne do wykrytego spadku poziomu LLT1 po podaniu tych oligomerów (**Ryc. 4.32**). Po 24 godzinach zaobserwowałam jednak istotny statystycznie wzrost ilości LLT3 w komórkach transfekowanych zarówno 2'OMe-LLT3, jak i 2'OMe-ctrl-1, wynoszący odpowiednio średnio 248% i 127%, w porównaniu do kontroli pozytywnej (100%).

Niezamierzone zmiany poziomu prv-miR-LLT1-3p i prv-miR-LLT3-3p skłoniły mnie do sprawdzenia, czy oligonukleotydy 2'OMe mogą być toksyczne dla komórek. W celu odpowiedzi na to pytanie przeprowadziłam test proliferacji, w którym analizowałam aktywność metaboliczną komórek linii ST\_LL[1-3] transfekowanych oligonukleotydami 2'OMe-LLT3 i 2'OMe-ctrl-1. Po 24, 48 i 72 godzinnej inkubacji zbierałam komórki i analizowałam ich żywotność metodą MTS (**Ryc. 4.33**).



**Ryc. 4.33. Wpływ oligonukleotydów 2'OMe-LLT3 i 2'OMe-ctrl-1 na żywotność komórek i ich zdolność do podziału został zmierzony za pomocą testu proliferacji.** Żywotność kontrolnych nietransfekowanych komórek ST\_LL[1-3] (których żywotność przyjmęłam za 100% na osi Y i oznaczyłam na wykresie przerywaną linią) oraz komórek ST\_LL[1-3] transfekowanych oligomerami 2'OMe-LLT3 i 2'OMe-ctrl-1 była analizowana w trzech niezależnych eksperymentach. Komórki były zbierane po inkubacji trwającej 24, 48 i 72 godzinny. Kontrolą do testu były komórki ST\_LL[1-3] poddane działaniu 10% roztworu Quatrodesu (K).

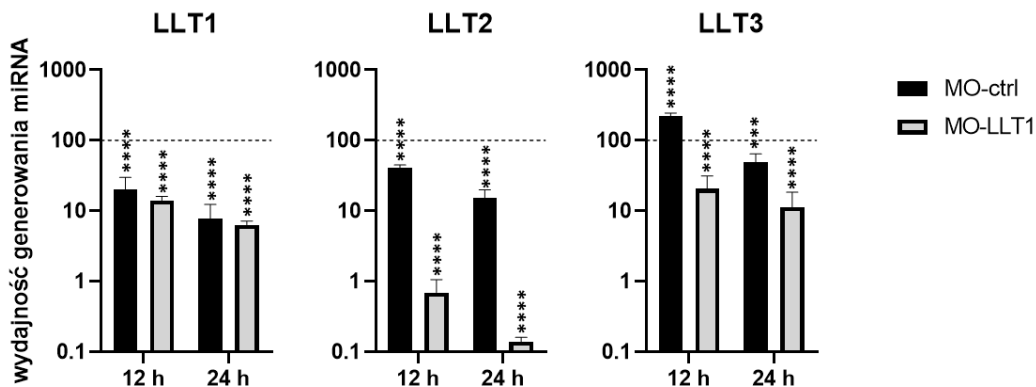
Nie zaobserwowałam znaczących różnic w żywotności pomiędzy komórkami nietransfekowanymi a komórkami po transfekcji oligonukleotydami 2'-O-metylowanymi. Wynik ten wskazuje, że oligonukleotydy 2'OMe nie są toksyczne dla komórek oraz nie wpływają na ekspresję genów

istotnych dla ich przeżycia. Wynik ten sugeruje również, że obserwowane wahania poziomu miRNA nie są skutkiem słabszej proliferacji transfekowanych komórek.

Pracując z oligonukleotydami 2'-O-metylowanymi nie udało mi się wyznaczyć warunków, w których transfekcja komórek linii ST\_LLT[1-3] tymi oligomerami pozwoliłaby na obserwację stabilnego i selektywnego zahamowania cięcia wybranych pre-miRNA wirusa PRV przez sDicer. Na wykresie przedstawionym na **Ryc. 4.32** można zauważyć, że w obecności oligonukleotydu 2'OMe-LLT3 (zaprojektowanego dla prv-miR-LLT3-3p) znacząco spadał poziom LLT1, a detekcja LLT2 była niemożliwa. Ponadto, transfekcja oligonukleotydem kontrolnym 2'OMe-ctrl-1 komórek ST\_LLT[1-3] w istotny statystycznie sposób wpływała na poziom analizowanych miRNA. Uzyskane wyniki wskazują na brak selektywnego działania oligomerów 2'OMe w testowanych warunkach, co skłoniło mnie do rozpoczęcia badań nad możliwością wykorzystania oligomerów Morpholino w procedurze inhibicji wycinania wybranych miRNA PRV w systemie komórkowym.

Doświadczenia w układzie komórkowym z wykorzystaniem oligomerów Morpholino również prowadziłam przy pomocy odczynnika RNAiMAX, ze względu na brak toksyczności tego odczynnika oraz jego potwierdzoną skuteczność we wprowadzaniu Morpholino do komórek [Lim i in. 2020]. Komórki linii ST\_LLT[1-3] transfekowałam oligomerem MO-LLT1, dedykowanym dla prv-miR-LLT1-3p, oraz oligomerem kontrolnym MO-ctrl, w ilości 10 pmoli na dołek płytki M12, uzyskując stężenia końcowe wynoszące 10 nM (jak podczas eksperymentów z oligonukleotydami 2'OMe). Ze względu na trudności podczas pracy z oligonukleotydami 2'OMe, związane z brakiem selektywności tych inhibitorów wobec miRNA PRV w układzie komórkowym, wyjściowe doświadczenia z Morpholino miały na celu sprawdzenie, czy oligomery te nie wpływają na poziom innych miRNA PRV, niż na te, wobec których zostały zaprojektowane. Komórki linii ST\_LLT[1-3] zbierałam po 12-, 24- i 48-godzinnej transfekcji, po czym analizowałam poziom zarówno prv-miR-LLT1-3p, jak i prv-miR-LLT2-5p i prv-miR-LLT3-3p. Wynik doświadczenia przedstawiłam na **Ryc. 4.34**.





**Ryc. 4.34. Analiza poziomu prv-miR-LLL1-3p, prv-miR-LLL2-5p i prv-miR-LLL3-3p w komórkach ST\_LLL[1-3] transfekowanych oligomerami MO-LLL1 i MO-ctrl.** Komórki były zbierane 12 i 24 godziny po transfekcji. Ekspresja miRNA wirusa PRV była analizowana metodą RT-qPCR. Względne różnice w ilości miRNA, odniesione do wewnętrznej kontroli U6, zostały określone za pomocą metody  $\Delta\Delta C_t$  (normalizowane wobec względnego poziomu miRNA w nietransfekowanych komórkach ST\_LLL[1-3], przyjętego jako 100% na osi Y i oznaczonego na wykresie przerywaną linią). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu, obliczonemu na podstawie wyników eksperymentu uzyskanych z trzech niezależnych analiz. Istotność statystyczna dla każdej z prób została obliczona w porównaniu do kontroli pozytywnej przy pomocy testu dwuczynnikowej analizy wariancji. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Na przedstawionym wykresie można zauważyć, że MO-LLL1 obniża poziom zarówno prv-miR-LLL1-3p, jak i dwóch pozostałych miRNA PRV z klastra LLL[1-3], a efekt ten był istotny statystycznie oraz nasilał się w czasie. Po 12 godzinach poziom LLL1 został obniżony o średnio 86%, LLL2 o 99%, a LLL3 o 80%, w porównaniu do komórek nietransfekowanych (100%). Po 24-godzinnej transfekcji poziom LLL1 został obniżony o średnio 94%, poziom LLL2 był bliski 0%, a poziom LLL3 został obniżony o średnio 89%. Analiza wykazała, że również oligomer kontrolny wpływał na ilość wykrywanych miRNA, po 12 godzinach obniżając poziom LLL1 o średnio 80%, a LLL2 o 60%. Co ciekawe, 12-godzinna transfekcja komórek ST\_LLL[1-3] skutkowałą podniesieniem poziomu LLL3 do średnio 220%. Po 24 godzinach efekt ten jednak ustąpił i oligomer MO-ctrl obniżał poziom LLL3 do 50%. Wydłużenie czasu transfekcji do 24 h spowodowało dalszy spadek ilości LLL1 i LLL2, odpowiednio o 92% i 85%. Na wykres zostały naniesione tylko wartości poziomu miRNA z komórek zebranych w 12 i 24 godziny po transfekcji, ponieważ ilość miRNA w komórkach po 48-godzinnej inkubacji oligomerami MO-LLL1 i MO-ctrl była poniżej poziomu detekcji.

Przeprowadziłam dodatkowe doświadczenie sprawdzające, jaki wpływ na poziom miRNA PRV będzie miała zmiana stężenia oligomerów. Komórki ST\_LLL[1-3] transfekowałam oligomerami MO-LLL1 i MO-ctrl w ilości 100 pmoli na dołek płytki M12, uzyskując stężenia końcowe wynoszące 100 nM (10× wyższe niż w przypadku doświadczenia, którego wyniki zostały przedstawione na **Ryc. 4.34**). Transfekowane komórki zbierałam po 12- i 24-godzinnej inkubacji i analizowałam poziom trzech

miRNA PRV z klastra LLT[1-3], a także poziom świńskiego miRNA ssc-miR-21-5p. Analiza wykazała jednak, że przy podniesionym stężeniu obu oligomerów zarówno miRNA PRV, jak i miRNA komórkowy znajdowały się na niewykrywalnym poziomie.

Podsumowując, wyniki uzyskane dla MO-LLT1 i MO-ctrl pokazały, że w testowanych warunkach obecność tych oligomerów obniżała poziom każdego z trzech miRNA z klastra LLT[1-3], jak i poziom miRNA komórki gospodarza. O braku selektywnego działania wobec docelowego miRNA tych inhibitorów świadczy również fakt, że transfekcja oligomerem kontrolnym w stopniu zbliżonym do MO-LLT1 obniżała poziom analizowanych miRNA. Odnosząc wyniki *in cellulo* uzyskane dla Morpholino do wyników badań nad oligonukleotydami 2'OMe przypuszczam, że dalsze doświadczenia z użyciem MO-LLT2 i MO-LLT3 również wykazałyby brak selektywnego działania tych inhibitorów. Wyzwanie związane z pracą z Morpholino w układzie komórkowym polegało również na tym, że efekt wywoływany przez te oligomery mocno nasilał się w czasie, co dodatkowo utrudniało optymalizację warunków reakcji.

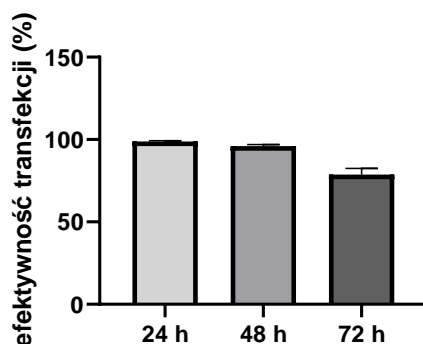
Doświadczenia w układzie komórkowym z inhibitorami potencjalnie ingerującymi w proces biogenezy miRNA, tj. oligomerami 2'OMe i Morpholino, wskazały na niespecyficzne zmiany poziomu miRNA PRV pojawiające się w ich obecności. Przeprowadzone optymalizacje nie pozwoliły na ustalenie warunków, w których możliwe by było zaobserwowanie spadku poziomu danego miRNA, wywołanego wyłącznie przez dedykowany dla niego oligomer. Przeprowadzone analizy wykazały, że inhibitory cięcia pre-miRNA w dalszych badaniach nad wpływem poszczególnych miRNA w biologii wirusa PRV w analizowanym modelu nie mają zastosowania.

#### **4.3.2.2. Badania nad rolą miRNA wirusa PRV z wykorzystaniem inhibitorów typu AMO**

Brak pozytywnych rezultatów badań nad inhibicją wycinania wybranych miRNA PRV za pomocą inhibitorów hybrydujących do ich prekursorów w układzie komórkowym skłonił mnie do modyfikacji podejścia badawczego i kontynuowania doświadczeń nad rolą poszczególnych miRNA w biologii wirusa PRV przy pomocy inhibitorów innego typu. Przy dalszych doświadczeniach zdecydowałam się na wykorzystanie oligomerów *mirVana*, o sekwencjach w pełni komplementarnych i hybrydujących do analizowanych miRNA PRV (inhibitory typu AMO). Działanie tych inhibitorów nie jest związane z hamowaniem produkcji docelowych miRNA lecz z ograniczeniem ich dostępności w komórce. Inhibitory *mirVana* skierowane wobec miRNA z klastra LLT[1-3] (oznaczane dalej jako mV-LLT1, mV-LLT2 i mV-LLT3) oraz inhibitor kontrolny (mV-ctrl) zostały zamówione w firmie Thermo Fisher Scientific. Inhibitory te są modyfikowanymi chemicznie oligomerami RNA, jednak rodzaj wprowadzonych modyfikacji, służących zwiększeniu stabilności wiązania z miRNA oraz podniesieniu ich odporności na degradację, pozostaje tajemnicą handlową producenta.

Strategia pracy z oligomerami *mirVana* była odmienna niż przyjęta dla inhibitorów cięcia pre-miRNA. Podczas doświadczeń z udziałem oligomerów 2'OMe i Morpholino pracowałam z komórkami linii ST\_LLT[1-3], stabilnie produkującymi miRNA PRV i sprawdzałam, jak wprowadzenie tych oligomerów do komórek wpłynie na poziom miRNA LLT[1-3]. Model doświadczalny opracowany do badań z wykorzystaniem inhibitorów *mirVana* opierał się na infekcji PRV komórek ST i analizie wpływu oligomerów na poziom egzogennych miRNA, generowanych w komórce na skutek infekcji wirusowej. Inhibitory *mirVana* przypuszczalnie nie wpływają na wydajność generowania dojrzałych miRNA, jednak powstające kompleksy miRNA : *mirVana* ograniczają dostępność miRNA PRV w zainfekowanej komórce, a stabilność tych kompleksów umożliwia zmierzenie metodą RT-qPCR ilości wolnych miRNA. Zmiana linii komórkowej miała na celu uproszczenie modelu badawczego, pozwalające na analizę zmian poziomu wyłącznie egzogennych miRNA po podaniu inhibitorów *mirVana*, oraz na obserwację efektu fenotypowego w niemodyfikowanych komórkach.

Badania rozpoczęłam od oszacowania efektywności transfekcji komórek ST, prowadzonej za pomocą odczynnika RNAiMAX i fluorescencyjnej kontroli BLOCK-iT. Komórki zbierałam 24, 48 i 72 godziny po transfekcji i analizowałam poziom sygnału zielonej fluorescencji metodą cytometrii przepływowej (Ryc. 4.35).

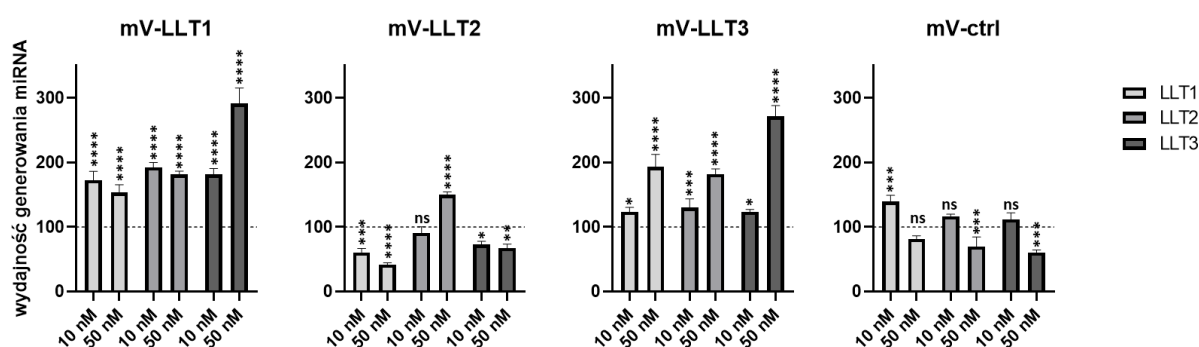


**Ryc. 4.35. Analiza cytometryczna efektywności transfekcji.** Do komórek ST wysianych do dołków płytki M12 został wprowadzony kontrolny oligomer fluorescencyjny BLOCK-iT w ilości 10 pmoli na dołek. Próbki były zbierane po 24, 48 i 72 godzinach i analizowane pod kątem ilości pozytywnych komórek, w odniesieniu do nietransfekowanych komórek. Wynik przedstawiono jako średnie wartości z trzech niezależnych analiz. Słupki błędów przedstawiają odchylenia standardowe.

Uzyskane wyniki wskazują, że siła sygnału nie wzrastała po 48 i 72 h, więc w kolejnych doświadczeniach transfekowałam komórki ST inhibitorami *mirVana* dzień przed infekcją wirusową.

Pierwsze doświadczenie przeprowadzone z wykorzystaniem inhibitorów *mirVana* miało na celu zbadanie wpływu, jaki wywiera każdy z tych oligomerów na poziom trzech miRNA PRV w zainfekowanej komórce. Komórki ST wysiałam do dołków płytki M12, po czym transfekowałam je osobno każdym z czterech oligonukleotydów: mV-LLT1, mV-LLT2, mV-LLT3 i mV-ctrl, w dwóch

końcowych stężeniach wynoszących 10 nM i 50 nM. Do transfekcji *mirVana* używałam dedykowanego dla tych inhibitorów odczynnika RNAiMAX. Dzień po transfekcji infekowałam komórki wirusem przy współczynniku MOI wynoszącym 0,2, a następnie zbierałam je po sześciogodzinnej inkubacji. Analizę poziomu miRNA PRV przeprowadzałam w analogiczny sposób, jak w badaniach z wykorzystaniem oligomerów 2'OMe i MO. Wyniki analizy przedstawiłam na **Ryc. 4.36**.

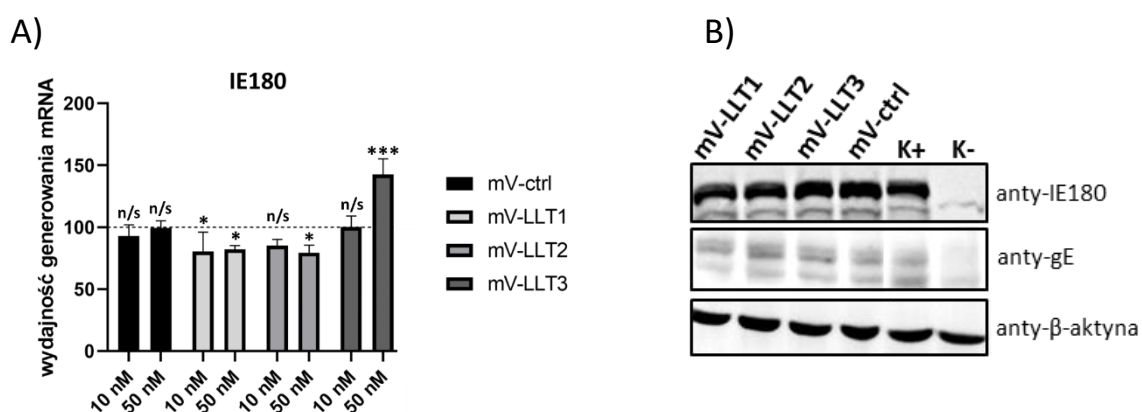


**Ryc. 4.36. Analiza poziomu prv-miR-LLT1-3p, prv-miR-LLT2-5p i prv-miR-LLT3-3p w komórkach ST infekowanych wirusem PRV przy współczynniku MOI wynoszącym 0,2 po wcześniejszej transfekcji oligomerami *mirVana*.** Komórki zostały zebrane sześć godzin po infekcji. Ekspresja miRNA PRV była analizowana metodą RT-qPCR. Względne różnice w ilości miRNA, odniesione do wewnętrznej kontroli U6, zostały określone za pomocą metody  $\Delta\Delta Ct$  (normalizowane wobec względnego poziomu miRNA w nietransfekowanych komórkach ST po infekcji PRV, przyjętego jako 100% na osi Y i oznaczonego na wykresie przerywaną linią). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu, obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych analiz. Istotność statystyczna dla każdej z prób została obliczona w porównaniu do kontroli pozytywnej przy pomocy testu dwuczynnikowej analizy wariancji. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns – brak istotności statystycznej.

Analiza wpływu inhibitorów *mirVana* na poziom wykrywanych miRNA PRV wykazała, że w testowanych warunkach żaden z nich nie działał wyłącznie na miRNA, wobec którego został zaprojektowany (efekt istotny statystycznie). Wprowadzenie do komórek oligomeru mV-LLT1 przed infekcją spowodowało podniesienie poziomu każdego z miRNA z klastra LLT[1-3]. Najsilniej obecność tego oligomeru wpłynęła na LLT3, podnosząc jego poziom do średnio 182% (10 nM) i do 291% (50 nM), w porównaniu do kontroli pozytywnej (100%). Poziom LLT1 po transfekcji mV-LLT1 podniósł się odpowiednio do 173% i 150%, a poziom LLT2 do 192% i 181%. Dodanie do komórek oligomeru mV-LLT2 z kolei obniżyło poziom LLT1 do średnio 60% i 41% w porównaniu do kontroli pozytywnej, a LLT3 do średnio 72% i 67%. Wprowadzenie do komórek mV-LLT2 powodowało, że poziom dedykowanego dla niego miRNA (LLT2) zmieniał się w zależności od stężenia: po dodaniu oligomeru w stężeniu 10 nM poziom LLT2 spadał do średnio 91% (brak istotności statystycznej), a w stężeniu 50 nM poziom LLT2 wzrastał do ok. 150%. Wprowadzenie do komórek oligomeru mV-LLT3 w stężeniu 10 nM

powodowało podniesienie poziomu LLT1, LLT2 i LLT3 odpowiednio do 123%, 130% i 123%, a w stężeniu 50 nM do średnio 193%, 182% i 271%. Transfekcja oligomerem kontrolnym również wpływała na poziom wykrywanych miRNA. Podanie mV-ctrl w niższym stężeniu powodowało wzrost poziomu LLT1, LLT2 i LLT3 do odpowiednio 139%, 117% i 111%, a w wyższym stężeniu spadek tych miRNA do średnio 82%, 69% i 61% (dodanie tego oligomeru w stężeniu 50 nM nie wpływało w istotny statystycznie sposób na poziom LLT1, a w stężeniu 10 nM na poziom LLT2 i LLT3).

Przeprowadzone doświadczenia uzupełniłam o analizę poziomu wirusowych białek IE180 i gE oraz poziomu transkryptu IE180 wirusa PRV, wykonując doświadczenie analogiczne do tego, którego wyniki przedstawiłam na **Ryc. 4.36**. Końcowe stężenia inhibitorów *mirVana* użytych w tym doświadczeniu do transfekcji komórek przed infekcją PRV wynosiły: 10 nM i 50 nM, do analizy RT-qPCR, oraz 50 nM do analizy Western blotting. Wynik doświadczenia przedstawiłam na **Ryc. 4.37**.



**Ryc. 4.37. Analiza poziomu mRNA i białek PRV w komórkach ST infekowanych wirusem przy współczynniku MOI wynoszącym 0,2, po wcześniejszej transfekcji inhibitorami *mirVana*.** Komórki zostały zebrane sześć godzin po infekcji. **A)** Poziom mRNA IE180 analizowano metodą RT-qPCR. Względne różnice w ilości mRNA, odniesione do wewnętrznej kontroli (gen *28S*), zostały określone za pomocą metody  $\Delta\Delta Ct$  (normalizowane wobec relatywnego poziomu mRNA IE180 w nietransfekowanych komórkach ST po infekcji PRV, przyjętego jako 100% na osi Y i oznaczonego na wykresie przerywaną linią). Słupki błędów odpowiadają odchyleniu standardowemu, obliczonemu na podstawie wyników uzyskanych z trzech niezależnych analiz. Istotność statystyczna dla każdej z prób została obliczona w porównaniu do kontroli pozytywnej przy pomocy testu dwuczynnikowej analizy wariancji. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ns – brak istotności statystycznej. **B)** Analiza Western blotting poziomu IE180 w lizatach komórek ST. (K+) – komórki infekowane, nietransfekowane; (K-) – komórki nieinfekowane i nietransfekowane.  $\beta$ -aktyna była wykrywana jako kontrola nałożenia próbek. Surowicę antye-IE180 zastosowano w rozcieńczeniu 1:5000, surowicę antye-gE w rozcieńczeniu 1:1000, przeciwciała antye- $\beta$ -aktyna w rozcieńczeniu 1:5000.

Na wykresie Na **Ryc. 4.37.A** można zauważyć, że transfekcja każdym z czterech oligomerów *mirVana*, w obu zastosowanych stężeniach, powodowała niewielki spadek poziomu transkryptu IE180, przy czym wynik ten nie jest w pełni istotny statystycznie. Wyjątek stanowił oligomer mV-LLT3

użyty w stężeniu 50 nM, którego dodanie podnosiło poziom mRNA IE180 w istotny sposób do poziomu średnio 143%, w porównaniu do kontroli pozytywnej (100%). Podanie inhibitora kontrolnego nie wpłynęło w znaczący sposób ani na poziom mRNA, ani na poziom białka IE180.

Spodziewanym efektem prowadzonych badań byłoby relatywne zwiększenie ilości transkryptu i białka IE180 pod wpływem spadku poziomu określonego miRNA, wywołanego przez użyty inhibitor *mirVana*. W przypadku mV-LLT1 i mV-LLT2, zastosowanych w obu stężeniach, można zaobserwować niewielki spadek ilości transkryptu IE180 oraz brak wpływu dodania obu oligomerów na poziom białka IE180. W przypadku mV-LLT3 (50 nM) zaobserwowany istotny wzrost poziomu transkryptu IE180 (**Ryc. 4.37.A**) nie przełożył się na podniesienie ilości białka IE180 i gE (**Ryc. 4.37.B**). Nie zaobserwowałam także spadku poziomu żadnego z miRNA PRV po podaniu mV-LLT3 (**Ryc. 4.36**), który mógłby wywołać zwiększenie ilości mRNA IE180. Obserwowane działanie mV-LLT3 nie było selektywne w analizowanych warunkach: obecność tego inhibitora w stężeniu 50 nM powodowała zwiększenie detekcji każdego miRNA z klastra LLT[1-3] (**Ryc. 4.36**).

Przeprowadzone analizy nie wykazały selektywnego działania inhibitorów *mirVana* wobec generowania miRNA PRV w testowanych warunkach reakcyjnych. Świadczył o tym wpływ przez nie wywierany na detekcję każdego miRNA z klastra LLT[1-3], nie tylko tego, wobec którego zostały zaprojektowane. Efektem transfekcji oligomerami *mirVana* było zarówno podniesienie (mV-LLT1 i mV-LLT3), jak i obniżenie (mV-LLT2 w większości reakcji) poziomu trzech analizowanych miRNA (**Ryc. 4.36**). Analiza poziomu mRNA IE180 pokazała, że *mirVana* obniżają jego poziom w większości przypadków, z kolei analiza Western blotting nie wykazała istotnej zmiany ilości białka IE180 w transfekowanych komórkach.

Dalsza praca z inhibitorami zarówno cięcia pre-miRNA, jak i dojrzałych miRNA w układzie komórkowym będzie wymagała przeprowadzenia optymalizacji pod kątem selektywności działania wybranych inhibitorów. Badania nad miRNA typu *loss-of-function* w układzie komórkowym wymagają opracowania modelu badawczego, który umożliwi ewidentną kontrolę nad ilością analizowanych miRNA. Wyzwanie związane z brakiem selektywnego działania oligomerów utrudniło mi uzyskanie wyników potwierdzających rolę poszczególnych miRNA PRV na obecnym etapie badań. Uważam jednak, że kontynuowanie pracy w podjętej tematyce jest istotne ze względu na wkład, jaki może ona wnieść do metodologii badawczej związanej z analizą funkcji miRNA w systemie komórkowym.

## Podsumowanie wyników

- Opracowałam metodę produkcji i oczyszczania rekombinowanej ludzkiej rybonukleazy Dicer w systemie bakulowirusowym, która pozwoliła na uzyskanie preparatu o wysokiej jednorodności i aktywności enzymatycznej.
- Skonstruowałam linię komórkową stabilnie produkującą klaster trzech miRNA wirusa pseudowścieklizny w proporcjach porównywalnych do tych obserwowanych podczas infekcji litycznej, służącą do prowadzenia analiz funkcjonalnych miRNA typu *gain-of-function* podczas infekcji PRV.
- Dowiodłam, że klaster miRNA LLT[1-3] PRV kontroluje poziom zarówno aktywatorów produktywniej infekcji (IE180 i EPO), jak i białka strukturalnego wirusa (glikoproteina gE) w modelu komórkowym.
- Wykazałam, że poprzez obniżenie ilości gE, miRNA LLT[1-3] mogą hamować proces *cell-to-cell spread*, i ograniczać rozprzestrzenianie się PRV do niezainfekowanych komórek sąsiadujących.
- Zademonstrowałam, że miRNA LLT[1-3] wykazują potencjał do kontrolowania produkcji wirionów potomnych PRV w modelu komórkowym we wczesnych etapach infekcji.
- Potwierdziłam w warunkach *in vitro* skuteczność inhibicji generowania miRNA PRV przez Dicer, wywołanej przez oligomery 2'OMe i Morpholino komplementarne do rejonów apikalnych substratów pre-miRNA.
- Przeprowadziłam analizę potencjalnego zastosowania oligomerów hybrydujących do prekursorów miRNA w badaniach typu *loss-of-function* w warunkach *in cellulo* i wskazałam na konieczność udoskonalenia modelu badawczego ze względu na zaobserwowany brak selektywnego działania oligomerów w zastosowanym układzie.
- Wdrożyłam alternatywną strategię kontroli poziomu miRNA PRV w modelu komórkowym, bazującą na inhibitorach typu AMO, jednak badania nad określeniem dominującego miRNA PRV z klastra LLT[1-3] wymagają kontynuacji.

## 5. Dyskusja

### 5.1. Biologiczne znaczenie miRNA z klastra LLT[1-3] PRV

Biologiczne funkcje wirusowych miRNA są zagadnieniem intensywnie badanym od niemal dwóch dziesięcioleci. Wiele badań wskazuje, że te małe cząsteczki regulatorowe mogą przyczynić się do poszerzenia wachlarza oddziaływań pomiędzy patogenem a organizmem gospodarza podczas infekcji wirusowej, kontrolując ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym [Skalsky i in. 2010, Bernier i in. 2018]. W przypadku wirusa pseudowścieklizny przedstawiono wiele raportów opartych na predykcjach *in silico*, wskazujących cele aktywności biologicznej kodowanych przez PRV miRNA, i ich domniemaną rolę w regulacji cyklu życiowego wirusa [Anselmo i in. 2011, Wu i in. 2012, Timoneda i in. 2014, Liu i in. 2016]. Liczba przeprowadzonych badań eksperymentalnych dotyczących roli miRNA PRV zlokalizowanych w obrębie *locus* LLT jest ograniczona. Przeprowadzono dwie analizy eksplorujące funkcje klastrów dziewięciu [Mahjoub i in. 2015] i jedenastu miRNA [Wang i in. 2018] oraz dwa badania nad rolą poszczególnych miRNA: prv-miR-LLT7-5p (LLT7) [Wang i in. 2018] i prv-miR-LLT11a (LLT11) [Liu i in. 2019]. Rola wybranych fragmentów *locus* LLT w regulacji ekspresji genów i replikacji PRV nie zyskała odpowiedniej uwagi.

Na potrzeby badań nad miRNA PRV opracowałam model eksperymentalny oparty na stabilnej produkcji frontального klastra miRNA, kodującego trzy spośród jedenastu miRNA zlokalizowanych w intronie LLT wirusa, co wpisuje się w trend badań typu *gain-of-function*. Skonstruowana w komórkach jąder świni (ST) linia ST\_LLT[1-3] posłużyła do funkcjonalnej analizy prv-miR-LLT1-3p (LLT1), prv-miR-LLT2-5p (LLT2) i prv-miR-LLT3-3p (LLT3) podczas litycznej infekcji PRV szczepu NIA-3.

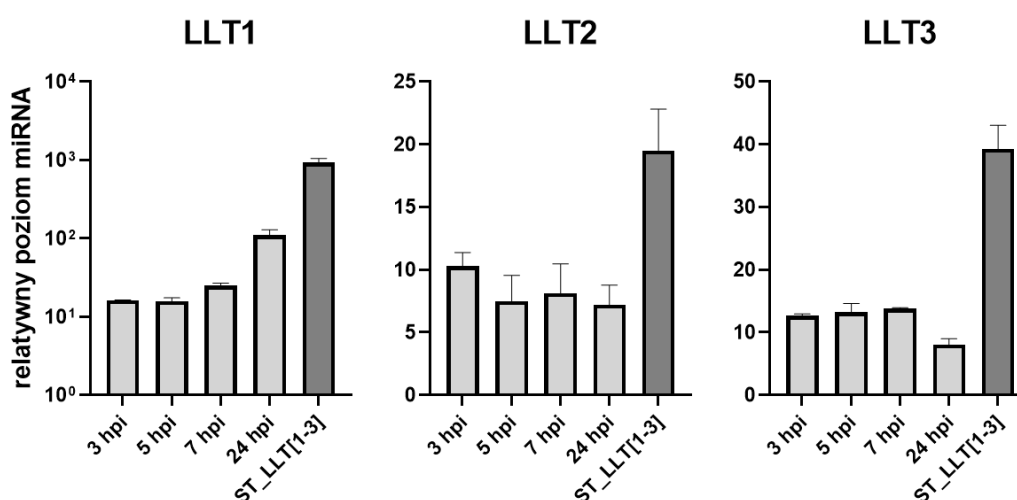
Większość badań donosi, że LLT1 jest najintensywniej produkowany spośród wirusowych miRNA w trakcie infekcji PRV w epitelialnych komórkach świńskich PK-15 [Timoneda i in. 2014, Liu i in. 2016] oraz w mysich komórkach Neuro-2a [Li i in. 2017]. W innym badaniu to LLT2 został wskazany jako najsilniej ekspresyjny miRNA PRV w zainfekowanych komórkach PK-15, a także w latentnie zainfekowanych zwojach nerwu trójdzielnego świni [Mahjoub i in. 2015]. Na podstawie powyższych informacji można zauważyć, że profile ekspresji miRNA między poszczególnymi badaniami różnią się. Rozbieżności mogą wynikać z alternatywnych metod mierzenia poziomu miRNA, z wykorzystania różnych szczepów PRV (PRV-Kaplan w [Mahjoub i in. 2015], PRV-NIA-3 i PRV-Begonia w [Timoneda i in. 2014], PRV-JS-2012 w [Liu i in. 2016], PRV-QXX w [Li i in. 2017]), czy użycia do infekcji różnych linii komórkowych, a także z prowadzenia analiz dla różnych punktów czasowych.

Na początkowym etapie pracy z miRNA PRV-NIA-3 analizowałam poziom ekspresji LLT1, LLT2 i LLT3 w zainfekowanych PRV komórkach ST. Wyniki obserwacji wskazują, że spośród analizowanych miRNA, na najwyższym poziomie wykrywałam produkcję LLT1 (**Ryc. 4.15.A-C**), czyli zgodnie z



wynikami opisanymi w [Timoneda i in. 2014, Liu i in. 2016, Li i in. 2017]. Ponadto, dystrybucja trzech miRNA z klastra LLT[1-3] w trakcie infekcji komórek ST była dość wyrównana w analizowanych punktach czasowych, z wyjątkiem LLT1, którego ekspresja przeważała w późnej fazie infekcji (**Ryc. 4.15.D**). Profile ekspresji analizowanych miRNA wydawały się fluktuować w przebiegu infekcji, co może sugerować, że docelowe geny poszczególnych miRNA należą do różnych klas kinetycznych (geny natychmiastowo-wczesne, wczesne, późne). Co ciekawe, sekwencje prekursorów pre-prv-LLT2 i pre-prv-LLT3 częściowo na siebie nachodzą, przez co LLT2 i LLT3 mogą być generowane w nierównomierny sposób, co może mieć wpływ na poziom ich ekspresji [Wu i in. 2012].

Wynik analizy proporcji miRNA PRV produkowanych w linii ST\_LL[1-3] (**Ryc. 4.13**) potwierdził zgodność z proporcją miRNA generowanych podczas infekcji komórek ST – w obu systemach ekspresja LLT1 stała na najwyższym poziomie spośród analizowanych miRNA. W komórkach ze stabilną ekspresją ilość miRNA PRV była jednak wyższa niż w infekowanych PRV komórkach ST w analizowanych punktach czasowych, co obrazuje **Ryc. 5.1**. Wysoka ekspresja miRNA z klastra LLT[1-3] pozwoliła prawdopodobnie na uchwycenie potencjału regulatorowego tych cząsteczek, który przy niższym poziomie miRNA mógłby być trudny do wykrycia na wczesnych etapach infekcji.



**Ryc. 5.1. Porównanie ilości miRNA generowanych w komórkach ST podczas infekcji PRV oraz produkowanych w linii komórkowej z konstytutywną ekspresją miRNA PRV z klastra LLT[1-3].** Jasnoszare słupki obrazują poziom miRNA w zainfekowanych PRV komórkach ST zbieranych 3, 5, 7 i 24 hpi. Ciemnoszare słupki przedstawiają poziom miRNA w linii ST\_LL[1-3]. Opis wg schematów z rozdziału **Wyniki 4.2**.

Zdecydowałam się pracować z sekwencją fragmentu intronu LLT, kodującą prekursorów trzech osobnych miRNA, w celu zapewnienia kontekstu genetycznego odzwierciedlającego naturalną biogenezę tych regulatorów. Tego typu podejście uwzględnia generowanie potencjalnych izomiRów, a ponadto zapewnia zachowanie właściwych dla naturalnej infekcji proporcji pomiędzy

produkowanymi w komórkach linii stabilnej miRNA wirusa [Contrant i in. 2014]. Wartość opracowanego podejścia eksperymentalnego wynika z zastosowania komórkowego systemu nadprodukcji, pozwalającego na wyeksponowanie potencjału miRNA PRV do regulacji ekspresji genów kodujących wybrane białka wirusowe oraz do kontrolowania wirusowego cyklu replikacyjnego.

miRNA są kodowane w genomie PRV również w obrębie otwartych ramek odczytu genów litycznych [Liu i in. 2016]. W prezentowanym projekcie doktorskim badałam funkcje miRNA kodowanych wyłącznie w obrębie intronu LLT, który jest antyrównoległy i pokrywa się z genami dwóch ważnych wirusowych transaktywatorów – IE180 i EPO [Cheung 1991]. Analiza ekspresji miRNA w komórkach ST zainfekowanych PRV wykazała, iż każdy z trzech miRNA mógł zostać wykryty już po 3 hpi (**Ryc. 4.15.A-C**). Wynik ten sugeruje, że miRNA PRV-NIA-3 kodowane wewnątrz transkryptu związanego z latencją mogą regulować infekcję lityczną na wstępnym etapie, aktywowanym przez IE180.

Przewidywania *in silico* trzech niezależnych grup badawczych wskazywały, że gen *IE180* jest celem aktywności LLT1 [Anselmo i in. 2011, Wu i in. 2012, Timoneda i in. 2014], a gen *EPO* dla LLT1 [Timoneda i in. 2014] i LLT2 [Wu i in. 2012]. Przeprowadzona przeze mnie analiza Western blotting potwierdziła spadek ilości IE180 po 3, 5 i 7 hpi w obecności nadprodukowanych miRNA LLT[1-3]. Wynik ten jest zgodny z badaniami aktywności mutantu PRV-Ea, pozbawionego 11 miRNA (PRV- $\Delta$ miR), prowadzonymi przez zespół Zheng-Fei Liu. Badacze wykazali wyższą produkcję IE180 po 3 hpi w komórkach PK-15 zainfekowanych mutantem PRV- $\Delta$ miR (MOI 5). Co ciekawe, poziom białka EPO z kolei wzrastał we wskazanym punkcie czasowym w komórkach infekowanych PRV- $\Delta$ miR [Wang i in. 2018]. W przedstawionym badaniu poziom transkryptów obu transaktywatorów nie był badany. Grupa Elisabetty Giuffry, wykorzystująca do badań mutantu PRV-Kaplan pozbawionego dziewięciu miRNA (pPRV- $\Delta$ miRN, MOI 10), nie zaobserwowała wpływu delecji na poziom mRNA IE180 [Mahjoub i in. 2015]. Badacze zaobserwowali jednak podniesienie poziomu transkryptu EPO po 8 hpi w komórkach infekowanych pPRV- $\Delta$ miRN, co wskazuje na potencjał klastra dziewięciu miRNA PRV do hamowania ekspresji genu *EPO*. Przeprowadzona przeze mnie analiza RT-qPCR wykazała, że nadprodukowane miRNA z klastra LLT[1-3] obniżają poziom mRNA zarówno IE180, jak i EPO, we wczesnych godzinach infekcji oraz w 24 hpi. Ze względu na niską skuteczność surowicy anty-EPO nie miałam możliwości jednoznacznego udokumentowania wpływu, jaki mogłaby wywrzeć nadprodukcja analizowanych miRNA PRV na poziom białka EPO.

Grupa Zheng-Fei Liu doniosła również, że sam LLT7 obniżał poziom IE180, co w porównaniu z uzyskanymi przeze mnie wynikami popiera tezę, że różne miRNA pochodzące z jednej policistronowej jednostki transkrypcyjnej mogą współpracować w regulacji wspólnych genów docelowych. Zaobserwowany przeze mnie spadek poziomu mRNA IE180 i EPO wskazuje, że mechanizm działania

analizowanych miRNA PRV jest związany z destabilizacją transkryptów. Obecnie uważa się, że rozpad mRNA jest najczęstszym mechanizmem działania miRISC, i obejmuje 66-90% wyciszanych transkryptów [Gebert i in. 2019]. Niemniej jednak nie można wykluczyć, że zmniejszenie ekspresji genu *IE180* mogło wynikać także z indukowanego przez miRNA zahamowania translacji. Ponadto, miRNA PRV mogą potencjalnie wpływać także na maszynę ekspresji genów gospodarza i poprzez obniżanie poziomu czynników transkrypcji lub translacji pośrednio przyczyniać się do hamowania *IE180*.

W celu dalszej oceny wpływu miRNA PRV na ekspresję genów wirusowych, postawiłam pytanie o wpływ miRNA LLT[1-3] na ekspresję wczesno-późnego genu *US8*, kodującego białko strukturalne gE. Jak już wspomniano, gE jest ważnym czynnikiem neurowirulencji, modulującym mechanizm *cell-to-cell spread* i ułatwiającym bezpośrednie przenoszenie infekcji do sąsiednich komórek oraz unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza [Jacobs 1994, Wang i in. 2014]. Uzyskane przeze mnie dane dotyczące poziomu białka gE pokazały, że nadprodukcja LLT[1-3] obniżała jego ilość po 5 hpi o 55%, a po 7 hpi o 32%. Niemniej jednak nie jest jasne, czy zaobserwowany spadek był wynikiem bezpośredniej aktywności miRNA LLT[1-3]; dodatkowo, żadna z analiz bioinformatycznych nie wskazała genu *US8* jako celu dla tych miRNA. Wzorzec inhibicji mRNA gE, jak również EPO, był podobny do tego dla transkryptu *IE180*, co sugeruje, że miRNA LLT[1-3] mogły pośrednio wpływać na produkcję gE. Z tego powodu nie można wykluczyć, że obserwowany efekt regulatorowy miRNA LLT[1-3] wobec mRNA gE był konsekwencją spadku poziomu *IE180*, i ewentualnie EPO, co z kolei byłoby zgodne z modelem kaskadowej ekspresji genów alfa herpeswirusów. Analiza cytometryczna gE na powierzchni zainfekowanych PRV komórek linii ST\_LL[1-3] wskazała na udział miRNA PRV w zahamowaniu produkcji gE o 30% po 7 hpi. Obserwacja ta sugeruje, że miRNA LLT[1-3] są w stanie regulować poziom i tempo pojawiania się glikoprotein wirusowych na powierzchni zainfekowanych komórek. Aby to zweryfikować, należałoby sprawdzić wpływ nadprodukcji LLT[1-3] na poziom innych glikoprotein wirusowych.

Aby zbadać wpływ, jaki mogło wywrzeć wywołane przez miRNA LLT[1-3] obniżenie syntezy białek wirusowych na kinetykę replikacji PRV, postanowiłam w pierwszej kolejności prześledzić zmiany w wielkości łysek generowanych po infekcji PRV. Analiza porównawcza wykazała, że w zainfekowanych PRV komórkach ST\_LL[1-3] wytworzone łyseki były średnio o 10% mniejsze niż w komórkach kontrolnych. Zaobserwowana różnica mogła wynikać z obniżenia poziomu gE, skutkującego zakłóceniem procesu bezpośredniej transmisji międzykomórkowej wirionów potomnych i opóźnieniem rozprzestrzeniania się PRV.

Wspomniane już grupy badawcze pracujące z miRNA PRV również badały wpływ tych regulatorów na replikację wirusa. W przytoczonym badaniu grupa Zheng-Fei Liu wykazała, że brak zarówno wszystkich 11 miRNA PRV, jak i LLT7, przyczynił się do zmniejszenia wielkości łysek [Wang i

in. 2018]. Ponadto, wyniki tej grupy wskazują także na potencjał miRNA PRV do regulowania kinetyki wzrostu wirusa. W analizie *one-step growth* miana potomnych wirionów PRV-ΔmiR (pozbawionych 11 miRNA LLT), znajdujących się w pożywce zebranej z zainfekowanych komórek, po 6-30 hpi były obniżone. W przeciwieństwie do tego wyniku, grupa Hongtao Changa zademonstrowała (przy użyciu mimika miRNA) potencjał LLT11 do hamowania replikacji PRV [Liu i in. 2019]. Z kolei grupa badająca fenotyp mutantu pPRV-ΔmiRN nie zaobserwowała wpływu delecji dziewięciu miRNA na kinetykę replikacji wirusa [Mahjoub i in. 2015].

W przedstawionej pracy badałam wpływ miRNA na kinetykę wzrostu wirusa poprzez analizę mian potomnych wirusów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych, produkowanych w zainfekowanych PRV liniach ST i ST\_LL1[1-3]. Zebrane dane dotyczące kinetyki formowania się wirionów wewnątrzkomórkowych wskazują na subtelne opóźnienie w produkcji wirusa w obecności miRNA LL1[1-3] w 5 i 7 hpi (**Ryc. 4.22.A**). Analiza kinetyki zewnątrzkomórkowych wirionów potomnych również dowodzi, że rola miRNA LL1[1-3] może być związana z hamowaniem uwalniania wirusa na zewnątrz zainfekowanych komórek w początkowych etapach infekcji (7 hpi, **Ryc. 4.22.B**). Analiza *one-step growth* wykazała, że po 12 hpi produkcja wirusa przyspieszała, a po 24 hpi ilość wirionów potomnych w zainfekowanych komórkach ST\_LL1[1-3] była dwa razy większa niż w komórkach kontrolnych.

Zaobserwowane zjawisko „nadganiania” infekcji wykazuje podobieństwo do wyników opisanych przez [Wang i in. 2018], gdzie pod nieobecność 11 miRNA LLT poziom IE180 rósł jedynie po 3 hpi, po czym ilość tego białka ulegała wyrównaniu wraz z postępem infekcji. Jednak, mimo wykazania hamującego wpływu 11 miRNA PRV na ekspresję genu IE180, mutant PRV-ΔmiR replikował wolniej niż dziki PRV. Z kolei wyniki grupy badającej aktywność mutantu pozbawionego dziewięciu miRNA wskazują na brak wpływu delecji tych miRNA na replikację PRV, mimo zaobserwowanego wzrostu ilości EPO [Mahjoub i in. 2015].

Niezgodności w ocenie wpływu miRNA PRV na ekspresję genów wirusa i proces jego replikacji mogą wynikać z odmiennych zestawów miRNA poddanych analizie, z różnych wartości MOI mogących wpływać na kinetykę infekcji, a także z wykorzystania innych szczepów wirusa, czy z zastosowania odmiennych modeli eksperymentalnych przez różne grupy badawcze.

Zaobserwowane przeze mnie upóźnienie kinetyki replikacji we wczesnych godzinach infekcji może wynikać z indukowanego przez miRNA LL1[1-3] obniżenia ilości IE180. Niemniej jednak, jak wskazano w [Anselmo i in. 2011, Wu i in. 2012 i Timoneda i in. 2014], LL1 może być nakierowany także na gen *UL48*, kodujący białko VP16. Jak już wspomniano, VP16 jest białkiem tegumentu, które aktywuje transkrypcję mRNA IE180 we wczesnym etapie infekcji. Poza tym, jako białko strukturalne, VP16 bierze udział w składaniu wirionów potomnych [Fan i in. 2020 a]. Opóźnienie syntezy VP16 na późniejszych etapach infekcji mogłoby skutkować osłabioną produkcją wirionów potomnych, a

następnie osłabioną aktywacją genu *IE180* w nowo zainfekowanych komórkach. Ze względu na brak specyficznych przeciwciał anty-VP16, nie kontynuowałam doświadczeń nad potencjałem regulatorowym miRNA z klastra LLT[1-3] wobec ekspresji genu *UL48*.

Pomimo niskiej istotności statystycznej obserwowanych zmian w kinetyce replikacji w komórkach ST\_LL[1-3] zainfekowanych PRV (za wyjątkiem 7 hpi), sugeruję, że opóźnienie w produkcji wirionów potomnych może znacząco wpływać na interakcje między wirusem a gospodarzem, poprzez hamowanie odpowiedzi immunologicznej, np. zanim nie ulegną efektywnej ekspresji geny białek immunomodulacyjnych. Porównanie wyników analizy wielkości tysinek i kinetyki wzrostu może sugerować potencjał miRNA LLT[1-3] wirusa PRV do precyzyjnego dostrajania replikacji wirusa, np. poprzez kontrolę składania wirionów we wczesnych etapach infekcji. Wspomniane przesunięcie czasowe może wynikać z obniżenia poziomu transktywatorów *IE180* i *EPO* we wczesnych etapach infekcji, oraz z następującej zmiany w profilu ekspresji genów kodujących glikoproteiny, co mogłam zauważyć dla gE (**Ryc. 4.18-4.20**).

Glikoproteina gE, a także gI i gM, są znane jako białka mediujące dojrzewanie wirionów [Brack i in. 1999]. Spadek poziomu tych glikoprotein w komórce produkującej wiriony potomne mógłby przyczynić się do wydłużenia czasu potrzebnego wirusowi na jej opuszczenie. Inne glikoproteiny, których zmiana w tempie produkcji mogłaby znacząco wpłynąć na fenotyp wirusa, to gB i gD. Białka te są dwiema najbardziej immunogennymi glikoproteinami PRV [Ficińska i in. 2005], dlatego spowolnienie ich pojawiania się na powierzchni komórek mogłoby pozwolić wirusowi na opóźnienie odpowiedzi immunologicznej i zyskanie czasu na replikację i składanie wirionów potomnych.

Zebrane dane sugerują, że miRNA PRV mogą modulować wczesne etapy infekcji litycznej. Jednak, w trakcie infekcji komórek ST największą ilość LLT1 wykryłam w 24 hpi, czego nie zaobserwowałam dla LLT2 i LLT3 (**Ryc. 7.15**). LLT1 jest także najintensywniej produkowanym miRNA PRV w linii ST\_LL[1-3]. Możliwe, że podniesiony poziom LLT1 koreluje z akumulacją wirusa w 24 hpi, a także kontroluje ekspresję genów gospodarza, prawdopodobnie zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną; niemniej potrzebne są dalsze badania w celu potwierdzenia tej tezy. Jak dotąd, aktywność jednego z miRNA PRV została powiązana z regulowaniem ekspresji genów gospodarza. W badaniu [Liu i in. 2019] autorzy donieśli, że LLT11 może hamować syntezę SLA-1 i TAP, będących mediatorami komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Wynik ten dowodzi, że miRNA PRV mogą kontrolować przebieg infekcji poprzez regulowanie zarówno genów PRV, jak i komórkowych, na co wskazują również predykcje bioinformatyczne [Wu i in. 2012, Liu i in. 2016].

Alfaherpeswirusy rozwinęły zaawansowane mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Reaktywacja tych wirusów ze stanu latencji może zachodzić w obecności odpowiedzi zarówno wrodzonej, jak i nabytej. Spośród dotychczas poznanych wirusowych czynników modulujących interakcje między wirusem a zainfekowanym organizmem, większość stanowią białka.

Przykładowo, serynowo-treoninowa kinaza US3 alfaherpeswirusów przyczynia się do spadku poziomu cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej klasy I (MHC I, ang. *major histocompatibility complex class I*) [Deruelle i in. 2009]. Z kolei białko UL49.5 varicellovirusów (znane także jako glikoproteina gN) hamuje funkcje transportera TAP, kluczowego dla prezentacji antygenów limfocytom T, poprzez szereg różnorodnych mechanizmów [Deruelle i in. 2009, Verweij i in. 2011], a wspomniana już gD moduluje zależną od komórek NK lizę zainfekowanych komórek [Grauwet i in. 2014]. Wymienione mechanizmy umożliwiają wirusom unikanie wykrycia i eliminacji przez system odpornościowy. W tym kontekście należy przyjąć, że czynniki niebiałkowe, jak miRNA, wzbogacają repertuar oddziaływań pomiędzy (alfaherpes)wirusami a ich gospodarzami.

Większość zidentyfikowanych dotąd miRNA alfaherpeswirusów jest wskazywana jako regulatory wirusowego cyklu życiowego. Znaczna część z nich jest zlokalizowana w obrębie transkryptów związanych z latencją (LAT), niemniej geny je kodujące podlegają również ekspresji podczas produktywnej infekcji. Wskazuje to na udział tych regulatorów w kontrolowaniu ekspresji genów cyklu litycznego, co opisałam w wynikach niniejszego projektu doktorskiego. Uzyskane przeze mnie wyniki są zbieżne z rezultatami badań nad miRNA produkowanymi przez inne alfaherpeswirusy. W badaniu prowadzonym w komórkach zainfekowanych HSV-1 wykazano, że transkrypt LAT koduje kilka miRNA, spośród których miR-H6 wykazuje aktywność wobec natychmiastowo-wczesnego genu *ICP4*, będącego homologiem *IE180* PRV [Duan i in. 2012]. Inny miRNA HSV-1, miR-H2, obniża ekspresję genu kodującego transaktywator ICP0 (homolog EPO PRV), który aktywuje transkrypcję genów IE i L wirusa HSV-1 [Umbach i in. 2008]. Podobne obserwacje dotyczą miRNA kodowanych przez HSV-2 [Tang i in. 2009] i BHV-1 [Jaber i in. 2010].

Wyniki te wskazują, że wspólną funkcją miRNA alfaherpeswirusów jest kontrolowanie poziomu wirusowych aktywatorów cyklu litycznego. Obserwacja, że znaczna część tych regulatorów jest kodowana w obrębie transkryptów LAT sugeruje, że cząsteczki te mogą odgrywać istotną rolę w modulowaniu przebiegu infekcji latentnej. Wyniki badań nad utajoną infekcją alfaherpeswirusów wskazują, że transkrypty LAT nie są czynnikami wymaganymi dla ustanowienia latencji przez HSV-1 i PRV [Javier i in. 1988, Jin i in. 2000, Mahjoub i in. 2015]. Jednak ze względu na fakt, że wspomniane białko ICP4 promuje replikację HSV-1, a ICP0 stymuluje reaktywację HSV-1, przyjmuje się, że miRNA funkcjonujące jako regulatory poziomu tych białek litycznych pośrednio przyczyniają się do wejścia HSV-1 w stan latencji. Powszechnie uważa się, że miRNA alfaherpeswirusów mogą funkcjonować jako czynniki ograniczające produktywną infekcję, lub że mogą pełnić rolę „molekularnych przełączników” (ang. *molecular switch*), uczestnicząc w regulacji przejścia pomiędzy fazą latentną infekcji a reaktywacją [Mishra i in 2020].

Dominująca teoria głosi, że w trakcie infekcji latentnej jedynymi wykrywanymi transkryptami są transkrypty LAT. Wyniki badań nad aktywnością genów HSV-1 wskazują jednak, że ustanawiana przez

tego wirusa utajona infekcja wcale nie jest tak „wyciszona” jak wcześniej sądzono, gdyż w latentnie zainfekowanych komórkach można wykryć na niskim poziomie aktywność genów cyklu litycznego [zagadnienie omówione w Singh i in. 2020]. Badacze proponują dwa główne (co ciekawe, niewykluczające się) wyjaśnienia tego zjawiska. Po pierwsze, przyjmuje się że transkrypty lityczne mogą pochodzić z nieudanych prób reaktywacji, blokowanych na różnych poziomach [Bloom 2016]. Po drugie, ekspresja genów litycznych może być częścią samej latencji, co wiązałoby się z występowaniem cyklicznych zmian pod postacią tzw. „latentnego programu” ekspresji genów wirusowych [Cliffe i in. 2017]. Poparciem dla tej koncepcji jest odkrycie, że lityczne białko ICPO może regulować strukturę latentnych genomów wirusa, przyczyniając się do utrzymania utajonej infekcji [Raja i in. 2016].

W kontekście obu hipotez słuszne wydaje się przypuszczenie, że wzajemne stosunki między transaktywatorami i ich transkryptami a miRNA mogą przyczyniać się do utrzymania stanu latencji lub do ponownego wejścia infekcji alfa herpeswirusowej w fazę lityczną. Jak wcześniej wspomniano, białka kodowane przez geny IE i E mają zdolność do regulowania aktywności genów *LAT*, podczas gdy transkrypty *LAT* zawierają prekursor miRNA mogących kontrolować poziom białek IE i E. Zmiany w profilach ekspresji pomiędzy genami litycznymi a genami miRNA w latentnie zainfekowanych neuronach mogą być efektem wyjścia z latentnego trybu ekspresji genów i prowadzić do reaktywacji. Jednak utrzymanie ilości miRNA celujących w kumulujące się transkrypty IE na odpowiednio wysokim poziomie mogłoby przyczynić się do zachowania infekcji w stanie latencji. W takim modelu, poprzez kontrolowanie poziomu transaktywatorów, miRNA mogłyby funkcjonować jako modulatory przebiegu infekcji zarówno produktywnej, jak i utajonej.

Trzy analizowane przeze mnie miRNA PRV są produkowane jednocześnie w trakcie infekcji litycznej ze wspólnej jednostki transkrypcyjnej, co może wskazywać, że posiadają zbieżną funkcję biologiczną. Pomimo tego, że ich sekwencje „seed” różnią się, miRNA z klastra LLT[1-3] mogą współpracować w regulacji ekspresji wspólnych genów docelowych, wiążąc się do różnych fragmentów rejonów 3'UTR tych genów. Oczywiście nie można również wykluczyć, że zakres interakcji każdego z nich jest rozbieżny, na co wskazują dane uzyskane z analiz bioinformatycznych (**Ryc. 2.10**). Na podstawie przewidywań *in silico* grupa Zheng-Fei Liu zaproponowała model sprzężenia zwrotnego, w którym miRNA pochodzące z intronu LLT pełnią centralną rolę, regulując poziom IE180 i EPO, a także samego LLT [Wu i in. 2012]. Wzajemne proporcje pomiędzy IE180, EPO i LLT mogą przekładać się na przebieg infekcji PRV, dlatego też zrozumienie zależności między tymi czynnikami a miRNA mogłoby przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących fizjologię PRV.

## 5.2. Produkcja, analiza i wykorzystanie preparatu hDicer

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań funkcjonalnych nad rolą miRNA PRV pokrywały się z predykcjami bioinformatycznymi i wskazały na potencjał nadprodukowanych miRNA z klastra LLT[1-3] PRV do regulacji ekspresji genów wirusowych, a także do dostrajania (ang. *fine-tuning*) tempa infekcji litycznej. W celu ustalenia, czy obserwowany efekt wynikał ze współpracy miRNA, czy też z aktywności tylko jednego z nich, przeprowadziłam dalsze badania wpisujące się w trend *loss-of-function studies*. Doświadczenia te, obejmujące pracę z inhibitorami biogenezy miRNA, miały na celu opracowanie metody selektywnego wyciszenia produkcji wybranych miRNA w systemie komórkowym. Wstępną częścią tych badań była produkcja i charakterystyka preparatu rekombinowanej ludzkiej rybonukleazy Dicer, służącego, m.in., do analizy oddziaływań oligorybonukleotydów z hDicer oraz do ewaluacji potencjału tych ostatnich do hamowania aktywności RNazowej hDicer.

Analizując interakcje Dicer z prekursorami miRNA należy rozróżnić dwie aktywności tej rybonukleazy, mianowicie wiązanie oraz cięcie RNA. O ile badania nad aktywnością RNazową Dicer nie wymagają używania enzymów najwyższej czystości, tak do bardziej szczegółowych analiz wiązania RNA niezbędna jest praca z preparatami Dicer cechującymi się wysoką jednorodnością. W czasie gdy rozpoczynałam badania w 2011 r., komercyjne preparaty Dicer dostępne na rynku nie spełniały tego kryterium, przez co nie pozwalały na realizację bardziej dokładnych badań charakteryzujących oddziaływanie Dicer z RNA w warunkach *in vitro*.

Wraz z zespołem prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak zdecydowaliśmy się więc opracować własną metodę produkcji i oczyszczania preparatu Dicer. Ze względu na szybko rosnącą liczbę badań i publikacji poświęconych rybonukleazom typu Dicer, stan wiedzy w tym zakresie dynamicznie się rozwija. W momencie gdy zaczynałam pracę nad przygotowaniem preparatu, różnice w strukturze i funkcjonowaniu rybonukleaz Dicer u różnych gatunków ssaków nie były znane. Z tego powodu, oraz z uwagi na historię wcześniej prowadzonych przez zespół z IChB PAN badań z użyciem dostępnej komercyjnie ludzkiej Dicer o dobrze poznanych właściwościach, moja praca obejmowała produkcję Dicer również pochodzącą od człowieka.

Najczęściej wybieranym systemem do produkcji rekombinowanych preparatów Dicer jest bakulowirusowy system ekspresji genów. W 2002 r. dwa zespoły, grupa Olofa Rådmarka oraz grupa Witolda Filipowicza, niezależnie opisały produkcję i charakterystykę preparatów ludzkiej Dicer produkowanych w komórkach owadzych [Provost i in. 2002, Zhang i in. 2002]. Od tamtego czasu wiele zespołów z powodzeniem wykorzystywało system bakulowirusowy do otrzymywania własnych preparatów Dicer, służących do badań nad aktywnością całego enzymu, jak i jego poszczególnych domen [Ma i in. 2008, Lima i in. 2009]. W komórkach owadzych wiązania dwusiarczkowe są wydajnie



generowane, co umożliwia poprawne fałdowanie produkowanych białek, oraz zachodzi w nich większość modyfikacji potranslacyjnych występujących w komórkach ssaczych [Altman i in. 1999]. Dzięki tym właściwościom system bakulowirusowy jest z powodzeniem wykorzystywany do otrzymywania aktywnych biologicznie rekombinowanych białek.

Opierając się na doświadczeniu wymienionych zespołów badawczych, również zdecydowałam się na dołączenie sekwencji kodującej znacznik polihistydynowy (His<sub>6</sub>-tag) do sekwencji hDicer na N- lub C-końcu (hDicerN i hDicerC). Przygotowanie dwóch wariantów preparatu miało umożliwić późniejsze porównanie ich aktywności. Ze względu na mały rozmiar (0,84 kDa, w przypadku znacznika heksahistydynowego) oraz brak ładunku w fizjologicznym pH, znacznik His<sub>6</sub>-tag zwykle nie wpływa na fałdowanie białka i nie ingeruje w strukturę ani funkcje białka fuzyjnego [Carson i in. 2007]. Aby chronić natywną strukturę rybonukleazy hDicer, oczyszczałam ją w warunkach niedenaturujących, pomimo możliwości oczyszczania białek znakowanych znacznikiem His<sub>6</sub>-tag również w warunkach denaturujących, w których poprawia się wydajność ich wiązanie do złoża.

Podobnie jak w pracy [Provost i in. 2002], początkowo zastosowałam strategię jednoetapowego oczyszczania (**Ryc. 4.5**), po czym analizowałam uzyskane preparaty pod kątem aktywności RNazowej. Ze względu na spadek produkcji hDicerC przy kolejnych pasażach wektora bakulowirusowego, co sugerowało jego niestabilność genetyczną, kontynuowałam pracę wykorzystując wyłącznie hDicerN, w związku z czym zostaną omówione wyniki otrzymane tylko dla tego preparatu. Uzyskane dane wskazały, że preparat hDicerN oczyszczony jednoetapowo charakteryzował się aktywnością RNazową i generował specyficzne produkty miRNA. Obserwowane cięcie pre-miRNA było przypuszczalnie efektem aktywności RNazy III, o czym świadczył brak lub ubytek specyficznych produktów cięcia w reakcjach z EDTA, który chelatuje jony Mg<sup>2+</sup> niezbędne dla aktywności RNazy III, w tym Dicer. Rosnące stężenie hDicer w reakcjach powodowało jednak spadek poziomu produktu miRNA (**Ryc. 4.8** i **Ryc. 4.10**). Podobny efekt wywoływała inkubacja hDicer z pre-miRNA wynosząca więcej niż 30 min (**Ryc. 4.9**). We wszystkich tych reakcjach można było zauważyć również wyraźny spadek ilości substratu pre-miRNA, co można zinterpretować na dwa sposoby. Po pierwsze, analizowany preparat mógł zawierać czynniki degradujące zarówno substrat, jak i produkt. Po drugie, enzym bardzo wydajnie przetwarzał pre-miRNA, lecz powstające produkty były dalej trawione przez nieznane nukleazy.

Poparciem dla drugiej hipotezy mogłaby być obserwacja, że addycja proteiny K (która hydrolizuje białka, w tym zanieczyszczenia białkowe) spowodowała widoczną na **Ryc. 4.9** stabilizację miRNA w czasie trwania reakcji. Jednak dodatek ProtK do reakcji z rosnącym stężeniem enzymu blokował procesowanie substratu przy najniższym stężeniu hDicer (**Ryc. 4.8**), a przeprowadzona później analiza aktywności próbki preparatu z innej preparatyki (ang. *batch*) nie wykazała stabilizującego działania ProtK (**Ryc. 4.10**). Z kolei dodanie do reakcji innego czynnika mogącego mieć wpływ na jej przebieg – ATP – nie przyspieszyło obróbki substratu (**Ryc. 4.8** i **Ryc. 4.10**). Wynik ten był

zgodny z ugruntowanym stanem wiedzy, świadczącym o braku wpływu ATP na procesywność Dicer u kręgowców [Aderounmu i in. 2023].

Zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak przeanalizował następnie preparat oczyszczany jednoetapowo pod kątem zdolności do wiązania RNA. Wyznakowany radioizotopowo pre-hsa-miR-21 inkubowano z hDicer w warunkach umożliwiających wiązanie, ale nie cięcie RNA przez enzym (tj. w temperaturze 4 °C i w buforze niezawierającym jonów  $Mg^{2+}$ ). Poza niewyraźnymi prążkami odpowiadającymi domniemanym kompleksom hDicer : pre-miRNA, na skanie żelu, w którym rozdzielono produkty reakcji, można zauważyć również rozmyty sygnał pochodzący od wyznakowanego substratu, ciągnący się na całej długości żelu (ang. *smearred bands*), oraz dużo materiału zalegającego w studzienkach (**Załącznik 1.A**). Wynik ten świadczy o obecności w preparacie zanieczyszczeń, prawdopodobnie przyczyniających się do zakłócania procesu wiązania RNA przez hDicer, lub do degradacji pre-miRNA. Porównanie jednorodności preparatu hDicer z dostępnym ówczynie komercyjnym preparatem Turbo Dicer wykazało, że czystość obu była porównywalna.

Wykorzystując różne próbki preparatu hDicer oczyszczanego tylko na złożu niklowym nie udało się uzyskać zadowalających i powtarzalnych wyników testu wiązania RNA; z tego względu kolejnym krokiem mojej pracy było „doczyszczanie” preparatu. Rekombinowana rybonukleaza hDicer (hDicerN) posiada tylko jeden rodzaj znacznika ( $His_6$ -tag), przez co kontynuowanie oczyszczania preparatu metodami chromatografii powinowactwa nie było możliwe. Często wykorzystywaną metodą oczyszczania białek jest sączenie molekularne (chromatografia wykluczania – SEC, ang. *size exclusion chromatography*, zwana też żelową), jednak ze względu na ograniczenia związane z małą zdolnością separacji (wymagana różnica w masie molekularnej to min. 10%) oraz z konieczności nakładania próbek w małej objętości (5-10 % końcowej objętości kolumny) [Hong i in. 2012], technika ta nie wydawała się odpowiednią do doczyszczania preparatu hDicer. Zastosowanie metody SEC wymagałoby użycia kilkudziesięciu ml złoża, co przełożyłoby się na zwiększenie kosztów oraz czasu przeprowadzenia całej procedury oczyszczania, nie gwarantując jednocześnie poprawienia czystości preparatu.

W celu doczyszczania preparatu hDicer zdecydowałam się na zastosowanie chromatografii jonowymiennej (EIC, ang. *ion exchange chromatography*), pozwalającej na rozdział białek na podstawie różnic w ich ładunku elektrycznym. Zaletami tej techniki są, m.in., wysoka zdolność rozdzielcza oraz łatwość zwiększania skali oczyszczania, dzięki czemu stała się ona jedną z najbardziej wszechstronnych i szeroko stosowanych metod chromatografii cieczowej, pozwalającą na uzyskanie natywnych białek [Jungbauer i in. 2009]. Drugi etap oczyszczania pozwolił na pozbycie się części zanieczyszczeń (**Ryc. 4.6.A**). Przeznaczone do dalszej analizy, połączone frakcje 6-10 charakteryzowały się wyższą czystością niż wyjściowy preparat oczyszczany jednoetapowo, jednak nie były zupełnie jednorodne. Obecność znacznych ilości zanieczyszczeń w preparacie oczyszczanym

jednoetapowo spowodowała, że nie było możliwości zbadania stężenia zawartej w nim hDicer. Jednak doczyszczanie preparatu pozwoliło na oszacowanie stężenia hDicer w preparacie poprzez odniesienie do standardu BSA. Na podstawie analizy spektrometrii masowej pracownicy IChB PAN ustalili, że głównymi zanieczyszczeniami (prążki o masie ok. 55 kDa i ok. 100 kDa), które były eluowane razem z hDicer, były białka owadzie, a nie produkty degradacji enzymu.

Preparat oczyszczany dwuetapowo również został przeanalizowany pod kątem cięcia i wiązania RNA. Zebrane dane wykazały, że zwiększenie stężenia hDicer skutkowało akumulacją produktu miRNA, który nie ulegał degradacji w mieszaninie reakcyjnej (**Ryc. 4.11**). Dodanie zarówno ProtK, jak i ATP, nie przyniosło poprawy wydajności produkcji miRNA. W porównaniu do preparatu oczyszczanego tylko na złożu Ni-NTA, doczyszczony preparat generował więcej specyficznego produktu, który nie był wtórnie trawiony w czasie trwania reakcji. Analiza wiązania RNA, przeprowadzona dla preparatu oczyszczanego dwuetapowo przez zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak wykazała, że hDicer znajdująca się w doczyszczonym preparacie tworzyła kompleksy z pre-hsa-miR-21 (**Załącznik 1.B**). Wyliczona równowagowa stała dysocjacji (wartość  $K_D$ , opisuje siłę analizowanego oddziaływania) dla kompleksu hDicer : pre-hsa-miR-21 wynosiła  $80 \pm 5,6$  nM (dane niezłączone), co stanowi rząd wielkości zbliżony do wcześniej zgłaszanych wartości dla hDicer i innych pre-miRNA [Ma i in. 2008, Feng i in. 2012]. Zdolność preparatu hDicer do wiązania RNA potwierdziła jego wysoką czystość i predysponowała go do wykorzystania w analizach wiązania RNA przez hDicer, a także do innych badań funkcjonalnych.

Zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak wykorzystał otrzymany przeze mnie preparat hDicer, a także preparat izolowanej domeny DUF283 (otrzymany w IChB PAN), do analizy funkcji tej domeny pod kątem oddziaływań z kwasami nukleinowymi. Wyniki doświadczeń zostały opublikowane w pracy [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2016]. Przeprowadzone analizy wykazały, że domena DUF283 może wiązać zarówno ssRNA, jak i ssDNA, jednak nie wykazuje ona powinowactwa do dwuniciowych kwasów nukleinowych. Wykazano także, że izolowana domena DUF283 oraz pełnej długości hDicer posiadają aktywność wspierającą parowanie komplementarnych oligomerów RNA lub DNA (ang. *RNA/ DNA annealers*). Co więcej, sama domena DUF283 oraz pełnej długości hDicer mogły wspierać hybrydyzację oligonukleotydów RNA z docelowymi sekwencjami komplementarnymi, które stanowiły fragmenty dłuższych RNA przyjmujących stabilne struktury drugorzędowe (**Załącznik 2**). Zaobserwowane zjawisko można odnieść do układu biologicznego, w którym hDicer kieruje srRNA do komplementarnych sekwencji w obrębie 3'UTR docelowych transkryptów. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają, że spektrum aktywności hDicer wykracza poza rolę tego enzymu w procesie biogenezy miRNA i siRNA.

Zagadnieniem badanym równie intensywnie przez zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak są interakcje pomiędzy rybonukleazą hDicer a RNA. Wyniki analiz prowadzonych w IChB PAN wskazują,

że oligorybonukleotydy mogą funkcjonować nie tylko jako substraty dla hDicer, lecz również jako jej regulatory. W badaniach opublikowanych w [Tyczewska i in. 2011 i Kurzyńska-Kokorniak i in. 2013] zespół wykazał, że aktywność RNazowa hDicer może być modulowana przez cząsteczki RNA wiążące się do enzymu, prekursora miRNA lub do obu.

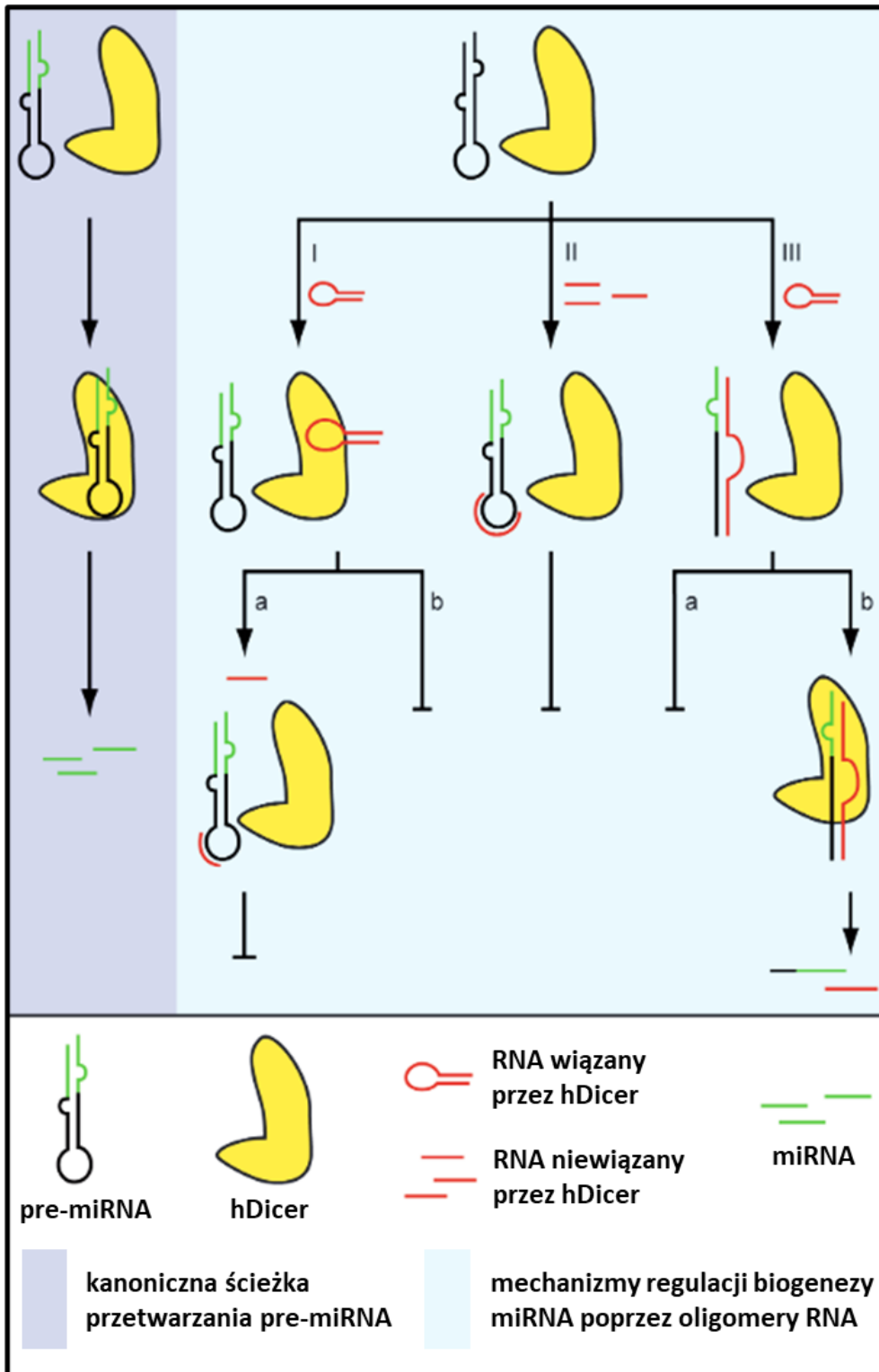
Pierwsze badania nad regulacyjną rolą RNA, prowadzone przez zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak, obejmowały analizę puli wiązanych przez hDicer aptamerów RNA pod kątem ich wpływu na aktywność tego enzymu. Wśród wyselekcjonowanych aptamerów zidentyfikowano cząsteczki stanowiące substrat dla hDicer, w związku z czym zostały one zaklasyfikowane jako inhibitory kompetycyjne, a także cząsteczki wiązane lecz niecięte przez enzym, funkcjonujące prawdopodobnie jako inhibitory allosteryczne [Tyczewska i in. 2011]. Dalsze badania ujawniły, że niektóre z tych oligomerów wykazywały potencjał do selektywnej inhibicji generowania wybranych miRNA poprzez jednoczesne wiązanie zarówno do hDicer, jak i do pre-miRNA. Inhibitory te interferowały z procesem dojrzewania miRNA poprzez zaburzenie struktury prekursora, jak i przechwytywanie (ang. *sequestering*) hDicer. Długość zastosowanych inhibitorów RNA wynosiła 56 nt, jednak w toku prowadzonych analiz ustalono, że to 12-13-nt fragmenty tych cząsteczek hybrydowały do apikalnych rejonów pre-miRNA. Konsekwencją tych oddziaływań było zaburzenie natywnej struktury prekursorów miRNA, skutkujące inhibicją ich cięcia przez hDicer. Na podstawie tych obserwacji zespół rozpoczął badania *in vitro* nad możliwością wykorzystania oligomerów RNA długości ok. 12 nt jako selektywnych inhibitorów dojrzewania wybranych miRNA, z wykorzystaniem ludzkiej Dicer, jak i lizatów komórkowych [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2013].

Innym rodzajem oligonukleotydów RNA testowanych pod kątem aktywności inhibitorowej wobec dojrzewania miRNA były cząsteczki długości ok. 22 nt. Wykorzystując rekombinowaną hDicer produkowaną w systemie bakulowirusowym zespół wykazał, że ssRNA długości odpowiadającej miRNA/ siRNA mogą hamować przetwarzanie pre-miRNA przez hDicer [Koralewska i in. 2016]. W przeprowadzonych doświadczeniach badano hamowanie wycinania dwóch różnych miRNA-5p z ich prekursorów, w obecności oligonukleotydów o sekwencjach identycznych z sekwencjami analizowanych miRNA-5p oraz odpowiadających im miRNA-3p. Uzyskane wyniki świadczyły o potencjale zarówno oligo-5p, jak i oligo-3p, do blokowania produkcji właściwych im miRNA-5p. Dalsze analizy wykazały jednak brak selektywnego działania tak zaprojektowanych inhibitorów w układach *in vitro*. Obserwacja ta była jednak spójna z doniesieniem mówiącym, że jeden miRNA może kontrolować biogenezę innych miRNA poprzez parowanie do ich prekursorów [Tang i in. 2012].

W celu dokładniejszego poznania mechanizmu działania oligomerów RNA o potencjale inhibitorowym zostały przeprowadzone analizy wiązania RNA do hDicer. Do badań został wykorzystany otrzymany przeze mnie preparat hDicer, a ich wyniki zostały opublikowane w [Koralewska i in. 2016]. Otrzymany preparat cechował się wysoką jednorodnością, pozwalającą na

przeprowadzenie badań mających odpowiedzieć na pytanie, które z użytych we wcześniejszych doświadczeniach oligomerów RNA (długości od 12 nt do 62 nt) mogą wejść w interakcje z tą rybonukleazą. Uzyskane wyniki (**Załącznik 3**) świadczyły o wydajnym wiązaniu przez hDicer cząsteczek ssRNA dłuższych niż 20 nt, a im dłuższy był analizowany oligomer RNA, tym obserwowane wiązanie było silniejsze. Oligomery RNA długości 12-nt nie tworzyły kompleksów z hDicer. Wynik ten potwierdził wcześniejsze obserwacje zespołu, że oligorybonukleotydy tej długości, zaprojektowane by oddziaływać z apikalnymi (jednoniciowymi) rejonami pre-miRNA, nie wchodziły w interakcje z hDicer [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2013].

Na podstawie otrzymanych wyników *in vitro* zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak zaproponował mechanizmy inhibicji, poprzez które oligonukleotydy RNA mogą hamować aktywność RNazową hDicer (**Ryc. 5.2**). Sugerowana klasyfikacja dzieli inhibitory RNA na dwie grupy: (i) oligomery wiązane przez hDicer oraz (ii) oligomery wchodzące w interakcje z substratami hDicer. Do pierwszej grupy należą oligorybonukleotydy, które, w zależności od tego czy są cięte przez hDicer czy nie, można zaklasyfikować jako inhibitory kompetycyjne lub allosteryczne (**Ryc. 5.2.I**). Druga grupa obejmuje cząsteczki RNA hybrydujące do pre-miRNA i zaburzające ich strukturę. Powstały kompleks albo nie jest rozpoznawany i cięty przez hDicer (**Ryc. 5.2.II** i **Ryc. 5.2.IIIa**), albo, w przypadku gdy hDicer rozpozna substrat, wzór jego cięcia jest zmieniony w porównaniu do wzoru cięcia natywnego pre-miRNA i w efekcie nie powstaje funkcjonalny miRNA (**Ryc. 5.2.IIIb**).



**Ryc. 5.2. Proponowane mechanizmy regulacji przetwarzania pre-miRNA przez hDicer, kontrolowane przy użyciu oligomerów RNA.** Kanoniczna ścieżka cięcia pre-miRNA przez hDicer (fioletowy panel) może być modyfikowana przez oligomery RNA różnej długości (błękitny panel). Oligorybonukleotydy mogą zaburzać aktywność RNazową hDicer poprzez bezpośrednią interakcję z enzymem (I) lub z pre-miRNA (II i III). Oddziaływania te mogą prowadzić do zahamowania generowania miRNA (I, II i IIIa), lub do powstawania odmiennych produktów cięcia (IIIb). Na podstawie [Koralewska i in. 2016].

### 5.3. Analiza potencjału inhibitorowego oligomerów 2'OMe i Morpholino w systemie komórkowym oraz badania efektu fenotypowego

Do badań typu *loss-of-function* (LOF) nad rolą poszczególnych miRNA z klastra LLT[1-3] wirusa PRV wybrałam oligorybonukleotydy o długości 12-15 nt; potencjał inhibitorowy tego typu oligomerów względem hamowania procesu wycinania dojrzałych miRNA z ich prekursorów pre-miRNA został wcześniej potwierdzony zarówno w warunkach *in vitro* [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2013, Corradi i in. 2023], jak i *in vivo*, w modelu *Xenopus laevis* [Corradi i in. 2023]. Wcześniejsze badania wykazały, że oligonukleotydy o długości poniżej 20 nt nie wiążą się z rybonukleazą Dicer człowieka, a mechanizm ich działania prawdopodobnie polega na ich wiązaniu do rejonu apikalnego (pętli wierzchołkowej) komplementarnych pre-miRNA (**Ryc. 5.2.II**) [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2013, Koralewska i in. 2016 oraz Pokornowska i in. 2020]. Cecha ta umożliwia projektowanie selektywnych inhibitorów, które hamują aktywność RNazową Dicer poprzez zablokowanie dostępu tej rybonukleazie do miejsc cięcia w obrębie pre-miRNA, kluczowych dla powstawania prv-miR-LLT1-3p, prv-miR-LLT2-5p i prv-miR-LLT3-3p.

Analiza funkcji klastra LLT[1-3] (omówiona w rozdziale **Wyniki 4.2**), i następujące po niej badania *in cellulo* typu LOF (rozdział **Wyniki 4.3.2**), były prowadzone w komórkach ST zawierających sDicer (endogenna, homologiczna do ludzkiej świńska Dicer), w związku z czym istniała potrzeba walidacji w warunkach *in vitro* skuteczności zaprojektowanych inhibitorów w badaniach z wykorzystaniem lizatów komórek ST (rozdział **Wyniki 4.3.1**). Wstępne analizy *in vitro* prowadziłam we frakcjach cytoplazmatycznych komórek ST z dwóch powodów. Po pierwsze, podejście to umożliwiło ocenę wpływu oligomerów na aktywność świńskiej Dicer. Po drugie, lizaty komórkowe zawierają również szerokie spektrum czynników białkowych oraz cząsteczek RNA mogących interferować ze ścieżką biogenezy miRNA. Należy także zaznaczyć, że w środowisku komórkowym struktura pre-miRNA oraz proces parowania komplementarnych cząsteczek RNA mogą podlegać wpływom różnorodnych białek [Rajkowitsch i in. 2007, Xhemalce i in. 2012]. Białka te mogą potencjalnie konkurować z testowanymi oligomerami o miejsce oddziaływania z prekursorem, w związku z czym zastosowanie lizatów komórkowych pozwoliło w pewnym stopniu na odzwierciedlenie warunków panujących w żywych komórkach.

Jak już wspomniałam, wykorzystane w badaniach *in vitro* syntetyczne prekursorsy miRNA PRV były zaprojektowane w sposób umożliwiający ich rozpoznanie i cięcie przez Dicer, tzn. cechowały się długością ok. 60 nt, przyjmowały strukturę typu spinki i posiadały dwa wolne nt na końcach 3'. Analiza aktywności RNazowej lizatów komórkowych, przeprowadzona z wykorzystaniem zaprojektowanych prekursorów wykazała, że prawdopodobnie zawierają one aktywną sDicer (**Ryc. 4.24**) - obserwowałam produkty reakcji odpowiadające długością dojrzałym miRNA (ok. 22 nt),

których z kolei nie obserwowałam w reakcjach, w których aktywność Dicer była hamowana za pomocą EDTA, chelatującego dwuwartościowe jony metali. Porównanie aktywności RNazowej lizatów komórek ST (zawierających sDicer) do aktywności preparatu rekombinowanej hDicer o znanych właściwościach (użytego w reakcjach kontrolnych) wykazało, że lizaty generowały produkty długości ok. 22 nt (LLT1 i LLT2) z mniejszą wydajnością niż preparat hDicer, jednak produkty te charakteryzowały się większą jednorodnością niż produkty cięcia preparatu hDicer. Prawdopodobnie wynikało to z obecności w lizatach innych RNaz, docinających niespecyficzne produkty reakcji (widoczne w ścieżkach z hDicer w postaci tzw. „drabinki”), lub – ze względu na niską wydajność generowania miRNA – te produkty były poza progiem detekcji. Ponadto, można zauważyć, że obróbka syntetycznych prekursorów LLT1 i LLT2 skutkowało powstaniem miRNA różniących się długością 1 nt (tzw. izomiRy [Tomasello i in. 2021]), w zależności od zastosowanego preparatu (hDicer wygenerowała LLT1 o długości 21 nt i LLT2 o długości 23 nt; sDicer generowała LLT1 o długości 22 nt oraz dwa produkty LLT2, o długości 22 nt i 23 nt; **Ryc. 4.24**). Podobne różnice były obserwowane także dla innych układów badawczych – zaobserwowano np., że żabia Dicer (z modelu badawczego *Xenopus laevis*) może generować produkty miRNA o innej długości niż te wycięte przez hDicer z tego samego prekursora [Corradi i in. 2023]. Różne izomiRy wirusowych miRNA obserwowano także w zainfekowanych PRV komórkach świńskich różnego typu [Wu i in. 2012]. Spośród trzech analizowanych miRNA, produkcja LLT2 była najwydajniejsza zarówno w reakcjach z sDicer, jak i hDicer. Niski poziom obróbki pre-prv-LLT1 i pre-prv-LLT3 mógł być efektem poddania tych cząsteczek reakcji fosforylacji <sup>32</sup>P na końcach 3' (w celu ich wizualizacji), przez co nie stanowiły one kanonicznych substratów dla Dicer.

Generowane przez oba preparaty produkty LLT3 były jednakowej długości, jednak wydajność ich powstawania była najniższa, w porównaniu do LLT1 i LLT2. Sytuacja ta prawdopodobnie była związana z obecnością dwóch niesparowanych nukleotydów na końcu 5' prekursora prv-miR-LLT3. Co ciekawe, miRNA-5p był wydajnie wycinany z tej cząsteczki prekursorowej (widoczny produkt oznaczony gwiazdką na **Ryc. 4.24**, stanowiący pozostałość po wycięciu miRNA-5p). Badania prowadzone nad niekanonicznymi substratami Dicer dowodzą jednak, że rybonukleaza ta potrafi przetwarzać pre-miRNA zawierające niesparowane nt na końcu 5' i generować funkcjonalne miRNA-3p [Sheng i in. 2018]. Należy także zwrócić uwagę, że wydajność generowania prv-miR-LLT3-3p była nieznacznie wyższa w reakcjach zawierających frakcję cytoplazmatyczną komórek ST, co mogło wynikać z obecności białek wspierających aktywność Dicer, jak TRBP i PACT [Kok i in. 2007].

Kolejnym krokiem w moich badaniach było zaprojektowanie oligomerów RNA i analiza ich potencjału inhibitorowego. Jak to już zostało omówione, zaprojektowane w programie EvOligo oligorybonukleotydy cechowały się długością 12-15 nt i hybridowały do rejonu apikalnego prekursorów miRNA PRV, a także do miejsca cięcia rozpoznawanego przez rybonukleazę Dicer (3p lub



5p, w zależności od pożądanego efektu inhibicji, **Ryc. 4.25**). Wyjątek stanowiły dwa oligomery zaprojektowane dla pre-prv-LLT1 – 2'OMe-LLT1-P był komplementarny do samej pętli apikalnej, a 2'OMe-LLT1-T do rejonu samego trzonu prekursora. Konieczność zaprojektowania dwóch inhibitorów wycinania LLT1 wynikała z sekwencji i struktury prekursora pre-prv-LLT1. W przypadku oligomerów 2'OMe projektowanych w programie EvOligo kluczowa jest długość nieprzekraczająca 15 nt, dzięki czemu inhibitory cechują się wysoką selektywnością działania (ograniczenie tzw. „*off-target effects*”, czyli hybrydyzacji nie tylko do dedykowanego celu, lecz także do innych, częściowo komplementarnych komórkowych RNA). Dla pre-prv-LLT1 nie było możliwości wytypowania jednego oligomeru hybrydującego jednocześnie do rejonu pętli i miejsca rozpoznawanego przez Dicer, wystarczająco krótkiego, aby zapewnić selektywność inhibicji (<15 nt) i o satysfakcjonującej wartości  $\Delta G_0$  (wartości zapewniającej stabilność kompleksu pre-miRNA-inhibitor w ustalonych warunkach reakcyjnych). Oligonukleotydy 2'OMe-LLT1-P i 2'OMe-LLT1-T były testowane w reakcjach hydrolizy prowadzonej przez sDicer indywidualnie oraz w duecie.

Wyniki inhibicji uzyskane dla obu oligonukleotydów 2'OMe zaprojektowanych wobec pre-prv-LLT1 (**Ryc. 4.28**) wyraźnie wskazują na większą skuteczność oligomeru 2'OMe-LLT1-P, komplementarnego do pętli apikalnej prekursora. Obserwacja ta jest spójna z analizą oddziaływania pre-prv-LLT1 z oligonukleotydami 2'OMe (test EMSA, **Ryc. 4.27.A**), świadczącą o wydajnym tworzeniu kompleksu tego prekursora z 2'OMe-LLT1-P, podczas gdy kompleks z 2'OMe-LLT1-T był ledwo wykrywalny. Przypuszczalnie, w zastosowanych warunkach reakcyjnych, oligomer 2'OMe-LLT1-T nie był w stanie hybryduować do pre-prv-LLT1 (brak możliwości rozplecenia struktury trzonu pre-prv-LLT1 przez 2'OMe-LLT1-T). Efektywna inhibicja cięcia pre-prv-LLT3 przez 2'OMe-LLT3 (**Ryc. 4.30**) także znajduje swoje potwierdzenie w teście EMSA – oligomer 2'OMe-LLT3 tworzył stabilny kompleks z pre-prv-LLT3 (**Ryc. 4.27.C**).

W kontekście odniesienia efektywności inhibitorowej danego oligomeru do jego oddziaływania z komplementarnym pre-miRNA, zaskakujący jest wynik testu EMSA uzyskany dla 2'OMe-LLT2 (**Ryc. 4.27.B**), gdyż nie zaobserwowałam tworzenia się kompleksu tego inhibitora z pre-prv-LLT2. Testy cięcia prekursora pre-prv-LLT2 prowadzone w obecności 2'OMe-LLT2 wykazały jednak skuteczność tego oligomeru (**Ryc. 4.29**), mimo że spośród analizowanych oligonukleotydów 2'-O-metylowanych wykazywał on najniższą aktywnością inhibitorową. Wyjaśnieniem braku widocznych kompleksów 2'OMe-LLT2 z pre-prv-LLT2 może być ich niska stabilność – rozpad kompleksów podczas rozdzielania w żelu. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że koniec 3' oligomeru 2'OMe-LLT2 był komplementarny do dwuniciowego fragmentu trzonu prekursora na długości aż 8 pz (**Ryc. 4.25**). Tak zwarta struktura trzonu mogła utrudniać jego rozluźnianie w zastosowanych warunkach testu EMSA, czego efektem mogła być niemożność obserwacji oddziaływań pomiędzy 2'OMe-LLT2 (a także 2'OMe-LLT1-T) z dedykowanym mu prekursorem. Ponadto, brak efektywnej hybrydyzacji 2'OMe-LLT2 do pre-prv-LLT2

mógł skutkować brakiem ochrony prekursora przed innymi rybonukleazami obecnymi w lizatach komórkowych. Na **Ryc. 4.29** można zauważyć ubytek substratu w reakcjach z 2'OMe-LLT2, pomimo zahamowania generowania prv-miR-LLT2-5p. Co ciekawe, kontrolne oligonukleotydy 2'OMe działały ochronnie wobec substratu, który po cięciu przez sDicer nie ulegał degradacji.

Wyniki analiz wiązania prekursorów miRNA oraz hamowania procesowania tychże przez sDicer, uzyskane dla oligonukleotydów 2'OMe, można skorelować z wartościami energii swobodnej  $\Delta G_0$  wyliczonymi dla kompleksów tworzonych przez te cząsteczki z dedykowanymi pre-miRNA (im niższa wartość, tym stabilniejsze kompleksy, **Ryc. 4.25**). Przykładowo, wartość  $\Delta G_0$  wyliczona dla najskuteczniejszego spośród inhibitorów 2'OMe (2'OMe-LLT1-P) wynosiła -26,0 kcal/mol, podczas gdy wartość  $\Delta G_0$  wyliczona dla mniej skutecznego inhibitora cięcia pre-prv-LLT1 (2'OMe-LLT1-T) wynosiła -15,6 kcal/mol. Mając to na uwadze nie jest zaskoczeniem, że najslabiej działającym inhibitorem 2'OMe był 2'OMe-LLT2, którego wartość oddziaływania z pre-miRNA była najwyższa i wynosiła -14,7 kcal/mol. Ze względu na brak dostępnego oprogramowania pozwalającego na wyliczenie wartości  $\Delta G_0$  dla kompleksów Morpholino z komplementarnymi pre-miRNA, nie miałam możliwości porównania tych wartości pomiędzy oligomerami Morpholino i 2'OMe. Oligomery Morpholino, podobnie jak oligomery 2'OMe, również oddziaływały z rejonami apikalnymi prekursorów miRNA, co znalazło potwierdzenie w testach EMSA (**Ryc. 4.27**). Ponadto, wyniki testu EMSA oraz radiogramy prezentujące rozdział elektroforetyczny produktów reakcji cięcia z udziałem oligomerów (**Ryc. 4.28**, **Ryc. 4.29**, **Ryc. 4.30**) wskazują, że Morpholino, o długości 21-25 nt, tworzyły bardziej stabilne kompleksy z docelowymi pre-miRNA niż 2'OMe, tym samym wydajniej blokując innym rybonukleazom dostęp do tych prekursorów i chroniąc je przed degradacją [Sheng i in. 2023]. Podsumowując, Morpholino okazały się nieznacznie bardziej efektywnymi inhibitorami cięcia syntetycznych pre-miRNA PRV w porównaniu do oligonukleotydów 2'OMe.

Zwraca uwagę fakt, że sekwencje wszystkich trzech inhibitorów MO pokrywały kompletnie lub niemal kompletnie, sekwencje pętli apikalnych pre-miRNA wobec których zostały zaprojektowane. Jak można zauważyć na **Ryc. 4.26**, MO-LLT1 hybrydyzował do 11 z 13 nt pętli pre-prv-LLT1, a MO-LLT2 i MO-LLT3 pokrywały całe pętle prekursorów, odpowiednio pre-prv-LLT2 i pre-prv-LLT3. Spośród oligonukleotydów 2'OMe (**Ryc. 4.25**), 2'OMe-LLT1-P jako jedyny oddziaływał z całą pętlą i tworzył także najstabilniejsze kompleksy z docelowym prekursorem, 2'OMe-LLT1-T hybrydyzował jedynie do trzonu, 2'OMe-LLT2 pokrywał 4 z 11 nt pętli, a 2'OMe-LLT3 7 z 12 nt. Na podstawie powyższych obserwacji można wywnioskować, że na efektywność inhibicji cięcia pre-miRNA wywołanej przez badany oligomer największy wpływ ma sekwencja i struktura rejonu, do którego zaprojektowany inhibitor ma hybrydyzować. Korzystniejsza jest sytuacja, w której oligomer nie musi pokonywać bariery energetycznej, co przekłada się na jak najmniejszą ilość rejonów dwuniciowych w obrębie docelowego rejonu.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły także, że rejon apikalny prekursorów miRNA jest ważnym elementem w procesie rozpoznawania substratu przez Dicer. Wniosek ten jest spójny z doniesieniami literaturowymi wskazującymi, że pętla apikalna pre-miRNA stanowi istotny element decydujący o interakcji z Dicer [Gu i in. 2012], a także pełni rolę potencjalnego miejsca wiązania czynników regulatorowych [Trabucchi i in. 2009, Shang i in. 2022].

Analizy potencjału inhibitorowego zaprojektowanych oligomerów 2'OMe i MO prowadzone w warunkach *in vitro* potwierdziły ich skuteczność. Następnie inhibitory te zostały skierowane do testów weryfikujących ich użyteczność w badaniach typu *loss of function*, z myślą o ich wykorzystaniu w analizie roli wybranych miRNA w infekcji wirusowej w warunkach *in cellulo*.

Podstawę układu badawczego stanowiły skonstruowane w systemie retrowirusowym komórki linii stabilnej ST\_LL1[1-3], o funkcjonalności potwierdzonej w badaniach nad rolą klastra LL1[1-3] w infekcji wirusem PRV (rozdział **Wyniki 4.2**). Najczęściej wykorzystywaną metodą służącą do uzyskania aktywności obcych miRNA w komórkach jest ich transfekcja mimikami miRNA [Liu i in. 2019, Diener i in. 2022], jednak metoda ta nie pozwala na stabilną produkcję miRNA, poza tym na powtarzalność wyników wpływa efektywność transfekcji. Wykorzystanie linii stabilnie produkujących miRNA, mimo konieczności opracowania i wdrożenia techniki ich otrzymania, wydaje się bardziej praktycznym podejściem, znajdującym zastosowanie w badaniach funkcjonalnych i aplikacyjnych [Jadhav i in. 2014, Weis i in. 2018, Fan i in. 2020 b]. Badania analizujące okres półtrwania miRNA w komórkach wskazują, że wynosi on od 4 do 24 godzin, oczywiście czas ten jest różny dla poszczególnych miRNA [Marzi i in. 2016, Xiao i in. 2019]. Nie znając wymienionej wartości cechującej prv-miR-LL1-3p, prv-miR-LL2-5p i prv-miR-LL3-3p eksprymowanych w świńskich komórkach ST, zadałam pytanie o to, kiedy możliwa będzie do zaobserwowania zmiana poziomu tych miRNA po podaniu inhibitorów, oraz jak długo utrzyma się ten efekt. Informacja ta była istotna dla dalszego planowania badań nad spodziewanym efektem fenotypowym w infekcji PRV.

Testowanie potencjału inhibitorowego oligomerów ingerujących w biogenezę miRNA w systemie komórkowym rozpoczęłam od badań z wykorzystaniem oligonukleotydów 2'OMe, jednak obserwowany spadek ilości miRNA nie wynikał z selektywnego działania tych inhibitorów. 2'OMe-LL3 ingerował w poziom każdego z trzech badanych miRNA, ponadto oligonukleotyd kontrolny wykazywał podobne działanie (**Ryc. 4.31** i **Ryc. 4.32**). Transfekcja komórek oligonukleotydami 2'OMe nie była dla nich toksyczna (**Ryc. 4.33**), więc obserwowany efekt prawdopodobnie nie wynikał z potencjalnych zmian w aktywności metabolicznej komórek. Jak już wspomniano, ten sam typ oligonukleotydów (o długości 13 nt) – również zawierających modyfikacje 2'OMe oraz celujących w rejony apikalne docelowych pre-miRNA – był testowany przez zespół prof. Anny Kurzyńskiej-Kokorniak pod kątem potencjału inhibitorowego w warunkach *in vivo*, a także selektywności działania wobec miRNA o zbliżonej sekwencji (rodziny miRNA) [Corradi i in. 2023]. Badania były prowadzone w

embrionach żab z rodzaju *Xenopus*, do których na etapie 8-komórkowych blastomerów wprowadzono ww. inhibitory, po czym inkubowano je do 40. etapu podziału, a następnie pobrano materiał do analiz poziomu miRNA. Wyniki w tym przypadku również wskazały na brak toksyczności tego rodzaju oligomerów, a ponadto potwierdziły ich wysoki potencjał inhibitorowy oraz selektywność działania wobec komplementarnych prekursorów.

W komórkach linii ST\_LLT[1-3] dochodzi do stabilnej produkcji miRNA PRV, których ilość była od dwóch do 50 razy wyższa niż w komórkach ST infekowanych PRV (**Ryc. 5.1**). Jest to przyjęty rząd wielkości dla układów badawczych wprowadzających obce miRNA [Jin i in. 2015]. W zarodkach żab (na wczesnym etapie rozwoju) dostępna ilość prekursorów miRNA w momencie podania inhibitorów mogła być ograniczona (poziomu miRNA na tym etapie nie oznaczono), po czym zaczynała wzrastać w trakcie inkubacji, co umożliwiało dokładną analizę zmian poziomu badanych miRNA. Natomiast obecność miRNA PRV w transfekowanych komórkach ST\_LLT[1-3] utrudniała prawdopodobnie zarówno oszacowanie stopnia wysycenia pre-miRNA przez inhibitory, jak i ocenę efektywności tych ostatnich. Ponadto, ze względu na nieznaną czas półtrwania dojrzałych LLT1, LLT2 i LLT3, a także ich obecność w transfekowanych komórkach, technicznym wyzwaniem byłaby próba obniżenia ilości tych miRNA do poziomu tła za pomocą inhibitorów ich biogenezy. Ograniczenie to z kolei utrudniałoby obserwację efektu fenotypowego w infekcji PRV.

Użycie drugiego rodzaju inhibitorów wycinania miRNA z prekursorów – Morpholino – także wywołało nieselektywne obniżanie poziomu miRNA z klastra LLT[1-3] wirusa PRV. Efekt działania MO-LLT1 był nieco silniejszy niż oligonukleotydów 2'OMe-LLT1-P i 2'OMe-LLT3 (**Ryc. 4.31**, **Ryc. 4.32** i **Ryc. 4.34**), co mogło mieć związek z silniejszym oddziaływaniem Morpholino z prekursorami miRNA PRV, wykazany w warunkach *in vitro* (**Ryc. 4.27**). Na rycinie tej można również zauważyć, że oligomery kontrolne obu rodzajów inhibitorów nie oddziaływały z pre-miRNA, co było oczekiwanym wynikiem ze względu na brak komplementarnych sekwencji pomiędzy tymi oligomerami a prekursorami miRNA. W tym kontekście zastanawiająca jest zmiana poziomu miRNA PRV w komórkach ST\_LLT[1-3] po podaniu oligomerów 2'OMe-ctrl-1 i MO-ctrl (**Ryc. 4.31**, **Ryc. 4.32** i **Ryc. 4.34**; 2'OMe-ctrl-2 wywoływał podobny efekt – dane niezłączone). Otrzymane wyniki sugerują, że wprowadzenie do komórek oligomerów 2'OMe i Morpholino mogło spowodować rozległe zmiany ilości miRNA. Wskazuje na to również fakt, że transfekcja komórek zarówno MO-LLT1, jak i MO-ctrl, spowodowała obniżenie świńskiego ssc-miR-21-5p w analizowanych warunkach. Założenie to jest spójne z obserwacją, że użycie krótkich RNA, jak np. siRNA, może wywoływać niespecyficzne efekty, jak obniżenie poziomu miRNA komórkowych, zwłaszcza miRNA o wysokim poziomie ekspresji [Liang i in. 2013, Olejniczak i in. 2016]. Wprowadzone do komórek nadprodukcujących miRNA PRV oligonukleotydy 2'OMe i Morpholino mogły interferować nie tylko z pre-miRNA, lecz także z białkowymi elementami maszynerii biogenezy miRNA i zaburzać jej pracę. Przykładem białka, którego

działanie mogło zostać zakłócone przez wprowadzone oligomery, może być białko TRBP. Jak już wspomniano, jest to partner białkowy Dicer wspierający rekrutację substratów i zwiększający procesywność enzymu, który dzięki zdolności wiązania oligomerów ssRNA [Gredell i in. 2010] mógł oddziaływać z oligonukleotydami 2'OMe. Poza tym sama rybonukleaza Dicer wykazuje zdolność wiązania ssDNA [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2016], co wskazuje na potencjalną możliwość wiązania oligomerów Morpholino. Wprowadzone do komórek inhibitory mogły zostać związane, m.in., przez ww. białka, co z kolei mogło wpłynąć na dostępność tych enzymów dla pre-miRNA PRV, a w konsekwencji prowadzić do zmiany profilu ekspresji miRNA, interpretowanej jako brak selektywnego działania analizowanych oligomerów.

Rozważając przyczyny obserwowanego braku selektywnego działania oligomerów należy także zwrócić uwagę na możliwość wejścia inhibitorów cięcia pre-miRNA do przestrzeni jądrowej, skutkującą ewentualnym oddziaływaniem oligomerów z pri-miRNA. Badania pokazują, że wprowadzone do komórek oligomery Morpholino, jak i nukleotydy 2'-O-metylowane, mogą zostać przetransportowane do jądra, przy czym Morpholino łatwiej przekraczają błonę jądrową [Sazani i in. 2001, Moulton 2007]. 11 miRNA PRV, kodowanych w intronie transkryptu LLT, jest upakowane w policistronową jednostkę organizacyjną zawierającą ich pierwotne prekursorzy (pri-miRNA) [Wu i in. 2012]. Dla prawidłowego dojrzewania miRNA, których prekursorzy są kotranskrybowane w postaci długich RNA, szczególne znaczenie wydaje się mieć zwarta, globularna struktura trzeciorzędowa pri-miRNA, determinująca tempo dojrzewania poszczególnych miRNA [Pratt i in. 2009, Chaulk i in. 2011]. W tym kontekście nie można wykluczyć scenariusza, w którym oligomer komplementarny do któregośkolwiek z trzech pre-miRNA z klastra, po hybrydyzacji do docelowego prekursora modyfikuje organizację przestrzenną transkryptu LLT[1-3] i przyczynia się tym samym do zmian w profilu ekspresji pozostałych miRNA z klastra. Podobny mechanizm został zaobserwowany w przypadku klastra 10 miRNA wirusa KSHV, gdzie oligonukleotyd komplementarny do prekursora pierwszego z nich (pre-miR-K1) redukowało poziom pozostałych miRNA z klastra [Vilimova i in. 2021]. Ponadto, wyjaśnienie to jest spójne z obserwacją, że niekontrolowane zaburzenia poziomu LLT1, LLT2 i LLT3 w większym stopniu były wywołane podaniem oligomerów 2'OMe i Morpholino komplementarnych do pre-miRNA, niż oligomerów kontrolnych (**Ryc. 4.31, Ryc.4.32 i Ryc. 4.34**).

W warunkach *in vitro* oligomery 2'OMe-ctrl-1 i -2 oraz MO-ctrl nie oddziaływały z prekursorami, a także nie ingerowały w proces wycinania miRNA PRV, i obserwacje te były podstawą do założenia, że oligomery zostały prawidłowo dobrane w badanym układzie. Z tego też względu (a także z powodu ograniczeń czasowych) nie przeprowadziłam badań selektywności inhibitorów w warunkach *in vitro*, których pozytywne wyniki potwierdziłyby poprawność działania zaprojektowanych oligomerów, a także stanowiłyby przesłankę dla ich funkcjonalności w systemie komórkowym. W analizach *in cellulo* oligonukleotydy 2'OMe były używane w stężeniu 10 nM, co jest wartością powszechnie stosowaną

dla tego typu odczynników [Mie i in. 2018, Abdelhady i in. 2021]. W pierwszych doświadczeniach z Morpholino także używałam tych oligomerów w stężeniu 10 nM (dla analiz komórkowych producent rekomenduje stężenie 1  $\mu$ M), a podniesienie tej wartości do 100 nM spowodowało drastyczny spadek poziomu wszystkich wykrywanych miRNA, w związku z czym nie widziałam zasadności w dalszym podnoszeniu stężenia tych inhibitorów.

Strategia obniżania poziomu miRNA, polegająca na celowaniu w ich prekursory, wydaje się słusznym podejściem w badaniach typu LOF ze względu na możliwość zablokowania procesu ich biogenezy, dzięki czemu nie dochodzi do generowania dojrzałych miRNA w komórce. Ponadto, pre-miRNA zawierają słabiej konserwowane ewolucyjnie sekwencje niewystępujące w dojrzałych miRNA, dzięki czemu oligomery hybrydujące do tych prekursorów mogą umożliwiać lepszą dyskryminację między miRNA, które posiadają podobne (lub identyczne) dojrzałe sekwencje, i wywoływać selektywną inhibicję wybranych miRNA [Li i in. 2014, Corradi i in. 2023]. Mimo prób optymalizacji protokołu, inhibitory wycinania miRNA wykazały się jednak nieselektywnym działaniem, co uniemożliwiło kontynuowanie badań. Model badawczy, opierający się o stabilną produkcję badanych miRNA w komórkach i o inhibitory ich dojrzewania, nie znalazł zastosowania w badaniach nad rolą poszczególnych miRNA z klastra LLT[1-3] wirusa PRV.

W celu kontynuowania badań w ww. tematyce, zdecydowałam się na uproszczenie modelu badawczego. Modyfikacja metody hamowania wybranych miRNA PRV polegała na zastosowaniu oligomerów *mirVana*, hybrydujących do dojrzałych miRNA (AMO, ang. *anti-miRNA oligonucleotides*), co jest klasyczną strategią w badaniach typu LOF [Esau 2008, Mie i in. 2018, Pagoni i in. 2023]. W dalszych badaniach zrezygnowałam również z linii ST\_LL[1-3], gdyż nie można wykluczyć, że wysoka ilość miRNA w komórkach mogła kolidować z efektywnością inhibitorów 2'OMe i Morpholino. Komórkami wybranymi do badań były niemodyfikowane komórki ST, więc jedynym źródłem miRNA PRV była infekcja wirusowa. Podejście to, jak również niska wartość współczynnika MOI (wynosząca 0,2), miały na celu zwiększenie wydajności blokowania miRNA powstających z klastra LLT[1-3] za pomocą inhibitorów *mirVana*. Inhibitory typu AMO tworzą stabilne kompleksy z komplementarnymi miRNA, co z jednej strony ogranicza degradację tych ostatnich przez komórkowe RNazy, z drugiej zaś strony blokuje ich aktywność [Lennox i in. 2017, Mie i in. 2018]. Silne oddziaływanie pomiędzy *mirVana* a miRNA powinny także umożliwić obserwację spadku ilości wolnych miRNA metodą RT-qPCR, mimo że inhibitory te nie powinny wpływać na sam proces produkcji miRNA.

Oligomery *mirVana* były testowane w dwóch stężeniach (10 nM i 50 nM) w celu sprawdzenia, które z nich wywoła efekt wysycający (producent sugeruje przeprowadzenie optymalizacji w zakresie 1-100 nM). Wyniki badań nad selektywnością działania *mirVana*, prowadzone za pomocą RT-qPCR wykazały jednak, że każdy z inhibitorów wpływał na poziom wszystkich trzech miRNA z klastra LLT[1-

3], a efekt ten był niezależny od stężenia (**Ryc. 4.36**). W przeciwieństwie do oligomerów 2'OMe i Morpholino, *mirVana* w głównej mierze powodowały podniesienie poziomu wykrywanych miRNA. Należy natomiast zwrócić uwagę, że problem pomiaru efektywności działania inhibitorów AMO o wysokim powinowactwie do miRNA stanowi wyzwanie [Esau 2008], gdyż inhibitory takie mogą przyczynić się do generowania niemiernodajnych odczytów poziomu miRNA w przypadku analiz RT-qPCR [Thomson i in. 2013, Okumura i in. 2021]. W tej sytuacji zasadne wydawało się kontynuowanie badań, polegających na infekowaniu PRV transfekowanych komórek i analizowaniu wpływu inhibitorów mV-LLT1, mV-LLT2, mV-LLT3, a także oligomeru kontrolnego mV-ctrl nie na ilość miRNA, lecz na poziom mRNA i białek wirusa (potencjalnie regulowanych przez te wirusowe miRNA), co stanowiło obserwację pośredniego efektu działania inhibitorów.

Układ doświadczalny dla ww. badań został racjonalnie zaprojektowany w oparciu o dane uzyskane podczas przeprowadzania analiz funkcji klastra LLT[1-3] PRV (rozdział **Wyniki 4.2**). Badania wykazały, że detekcja miRNA PRV, jak również białka IE180, jest możliwa w 3 hpi, a białka gE w 5 hpi, w związku z czym próby były zbierane 4 hpi (dane niezłączone) oraz 6 hpi (**Ryc. 4.37**). Analiza poziomu mRNA IE180 (**Ryc. 4.37.A**) wykazała, że jedynym inhibitorem wpływającym w wysoce istotny statystycznie sposób na poziom tego transkryptu po infekcji PRV był mV-LLT3 w stężeniu 50 nM (mogło to być stężenie wysycające powstający w komórkach LLT3). Obserwacja ta nie znalazła potwierdzenia w analizie Western blotting (**Ryc. 4.37.B**), jednak na korzyść inhibitorów *mirVana* przemawia fakt, że oligomer kontrolny jako jedyny nie wpłynął na poziom mRNA IE180. Jest to istotna obserwacja mogąca świadczyć o specyficzności działania inhibitorów *mirVana*.

Ze względu na ograniczenie czasu trwania projektu nie kontynuowałam badań w kierunku wytypowania miRNA odpowiedzialnego w głównej mierze za efekt wywoływany przez klastery LLT[1-3] PRV. Omówiony wyżej wynik sugeruje jednak, że to domniemany brak dostępności prv-miR-LLT3-3p skutkowało podniesieniem poziomu transkryptu IE180, co wskazywałoby na dominującą rolę LLT3 spośród miRNA PRV z klastra LLT[1-3]. Wynik ten nie jest jednak jednoznaczny, gdyż za pomocą RT-qPCR (**Ryc. 4.36**) nie udało mi się zaobserwować specyficznego spadku poziomu LLT3 (jest to spójne z badaniami opisanymi w [Okumura i in. 2021], gdzie po wprowadzeniu inhibitorów AMO zaobserwowano podniesienie poziomu docelowego transkryptu, mimo niemożności potwierdzenia obniżenia ilości celującego w niego miRNA). Warto jednak zwrócić uwagę na wyniki predykcji bioinformatycznych sugerujące, że spośród miRNA PRV to prv-miR-LLT1-3p najprawdopodobniej reguluje ekspresję genu kodującego IE180 [Wu i in. 2012, Timoneda i in. 2015]. Ponadto, wiele analiz wskazuje, że LLT1 jest produkowany w największej ilości podczas infekcji w systemach komórkowych [Timoneda i in. 2015, Liu i in. 2016, Li i in. 2017]. Informacja ta może sygnalizować istotność biologiczną LLT1, gdyż przyjmuje się, że najliczniejsze miRNA mogą wywierać najsilniejszy efekt na transkryptom [Svoboda 2015].

Przeprowadzone doświadczenia pokazały, jak złożonym zagadnieniem jest próba kontroli poziomu miRNA wirusowych w układzie komórkowym. Kontynuacja rozpoczętych badań typu LOF, związanych z ustaleniem, który z miRNA LLT[1-3] odpowiada za przebieg infekcji PRV, wymagałaby po pierwsze wyboru linii komórkowej pozwalającej na obiektywne obserwowanie efektu zastosowanych inhibitorów podczas infekcji. W tym kontekście linia ST\_LL[1-3] nie wydaje się być optymalna, gdyż eksprymowane z policistronowej jednostki transkrypcyjnej miRNA LLT[1-3] mogłyby uniemożliwić selektywne działanie inhibitorów i stanowić dodatkową zmienną utrudniającą przeprowadzenie optymalizacji układu badawczego. Słusznym wyborem mogłaby być niemodyfikowana linia ST, pozwalająca na zachowanie fizjologicznych ilości miRNA w infekcji PRV. Drugim kluczowym zagadnieniem byłby wybór rodzaju inhibitorów do dalszej pracy. Na podstawie wyżej omówionych wyników można przypuszczać, że kontynuowanie badań z wykorzystaniem inhibitorów dojrzałych miRNA (*mirVana*) mogłoby pozwolić na miarodajną weryfikację efektu fenotypowego, polegającą na obserwacji poziomu docelowego transkryptu. Prosty mechanizm działania może przekładać się na selektywność oligonukleotydów *mirVana* oraz wskazywać na zasadność stosowania inhibitorów tego typu w badaniach LOF w infekcji wirusowej. Niemniej jednak, warto byłoby także podjąć próbę kontroli ilości miRNA PRV w zainfekowanych komórkach ST za pomocą inhibitorów cięcia pre-miRNA. Potencjanie, w niemodyfikowanych komórkach oligomery 2'OMe i Morpholino mogłyby efektywnie hamować biogenezę wybranych miRNA, co umożliwiłoby obserwację efektu fenotypowego. Ponadto, selektywne hamowanie wycinania miRNA pozwoliłoby uniknąć redukcji poziomu komórkowych miRNA, prowadzącej do niezależnych od infekcji zmian metabolicznych komórek. Niezależnie od typu inhibitorów, należałoby przeprowadzić optymalizacje pod kątem, m.in., ich stężenia oraz metody wprowadzenia, a w przypadku inhibitorów wycinania dojrzałych miRNA potwierdzić także selektywność ich działania w warunkach *in vitro*.

W badaniach wirusologicznych powszechnie stosowanym podejściem jest badanie funkcji miRNA za pomocą analiz bioinformatycznych, które służą do prognozowania celów wybranych miRNA. Jednak ze względu na niekompletną wiedzę dotyczącą zasad kontrolujących interakcje między miRNA a docelowymi transkryptami, tego rodzaju predykcje często generują znaczną liczbę fałszywie pozytywnych wyników [Mohebbi i in. 2021]. Co więcej, większość algorytmów opiera się głównie na regułach „seed” oraz ewolucyjnej konserwacji sekwencji mRNA, pomijając przy tym niestandardowe miejsca docelowe, co przekłada się na niską skuteczność tych analiz [Pfeffer i in. 2005, Dai i in. 2022]. Z kolei systemy reporterowe (jak test lucyferazy), służące do walidacji oddziaływań pomiędzy badanym miRNA a sekwencją 3'UTR domniemanego docelowego transkryptu, również nie dają jednoznacznych wyników, ponieważ zdolność miRNA do związania się z mRNA niekoniecznie oznacza, że miRNA może regulować jego ekspresję [Quévillon Huberdeau i in. 2019]. W zawiązku z powyższym, w obszarze badań nad wirusowymi miRNA tak ważne jest opracowywanie



eksperymentalnych modeli badawczych pozwalających na prowadzenie funkcjonalnych analiz nad biogenezą i aktywnością miRNA.

Zadanie to jest realizowane, podobnie jak w innych obszarach badań, poprzez efektywną manipulację poziomem miRNA, co umożliwi uzyskanie wglądu w ich funkcje biologiczne. System komórkowy stanowi powszechny wybór jako model do analiz miRNA wirusowych ze względu na możliwość manipulacji ich poziomem oraz łatwość monitorowania zmian fenotypowych po infekcji, jak pomiar ekspresji genów czy kinetyki wzrostu wirusa. Ponadto, korzystanie z systemu komórkowego pomaga w rozwiązaniu kwestii etycznych i praktycznych związanych z badaniami na zwierzętach. Najpowszechniej stosowaną strategią podnoszenia ilości miRNA wirusowych w komórkach (ang. *gain-of-function*, GOF) jest ich transfekcja mimikami danego miRNA [Liu i in. 2019, Cao i in. 2020]. Z kolei zdecydowanie rzadziej stosowaną metodą jest użycie wektorów, np. lentiwirusowych, do stabilnej produkcji wirusowych miRNA [Hsu i in. 2014]. Okazuje się jednak, że w celu wydajnego hamowania ekspresji docelowego genu, mimiki miRNA powinny być stosowane w bardzo wysokich stężeniach (różnica dwóch rzędów wielkości w porównaniu do fizjologicznych ilości), co z kolei może prowadzić do niespecyficznych zmian w profilu ekspresji genów [Jin i in. 2015]. Wykazano także, że mimiki miRNA, jako cząsteczki dsRNA, mają zdolność do nieswoistego indukowania interferonowej odpowiedzi przeciwwirusowej, czego efektem są zmiany fenotypowe utrudniające obserwację funkcji miRNA [Prinz i in. 2022]. Z tego względu można przyjąć, że system endogennej ekspresji wirusowych miRNA jest lepszym podejściem badawczym, mniej podatnym na błędy w interpretacji wyników. Analizy typu GOF, poprzez podniesienie poziomu danego miRNA, pozwalają na uwydatnienie jego biologicznego znaczenia, które w innym układzie mogłoby być trudne do zaobserwowania.

Alternatywą dla analiz typu GOF są analizy oceniające efekty redukcji poziomu danego miRNA (LOF), które w badaniach wirusologicznych często są realizowane za pomocą mutantów delecyjnych. Mutacje mogą obejmować usunięcie genu kodującego określony miRNA (albo klaster) lub jego promotor, czy delecję miejsca wiązania miRNA [Tang i in. 2009, Mahjoub i in. 2015, Wang i in. 2018]. Główną zaletą stosowania mutantów wirusowych jest pełne wykluczenie analizowanego miRNA z układu badawczego. Jednakże, istnieją pewne ograniczenia tego systemu, w tym trudności techniczne związane z wprowadzaniem mutacji oraz potencjalne, trudne do przewidzenia efekty wprowadzonej delecji na inne obszary genomu wirusa. Z tego względu stosowanie inhibitorów AMO, celujących w wybrany miRNA, wydaje się być rozsądną strategią, także stosowaną w badaniach wirusologicznych [Wang i in. 2018, Huang i in. 2019]. Podejście to posiada jednak pewne restrykcje, wynikające z opisanych wcześniej problemów z pomiarem efektywności tego typu inhibitorów, a także z możliwości wpływania inhibitorów typu AMO na ekspresję genów poprzez różnorodne pośrednie mechanizmy [Kilikevicius i in. 2022].

Ze względu na ograniczenia powszechnie stosowanych modeli, istnieje ciągła potrzeba udoskonalania metodologii doświadczalnej związanej z analizą funkcji wirusowych miRNA. Opisane w niniejszej rozprawie badania funkcjonalne nad hamowaniem biogenezy miRNA wirusa PRV za pomocą inhibitorów cięcia pre-miRNA stanowią podstawę dla dalszych prac mających na celu rozwój tej metody i wprowadzenie jej do badań wirusologicznych. Kontynuowanie badań nad opracowaniem niezawodnych modeli doświadczalnych, służących do wybiórczej kontroli poziomu miRNA wirusowych, jest kluczowe dla uzyskiwania wiarygodnych wyników analiz i może przyczynić się do weryfikacji celi wirusowych miRNA, a także do głębszego zbadania ich wpływu na przebieg infekcji.

## 6. Wnioski

- Przeprowadzone badania wykazały hamujący wpływ miRNA z klastra LLT[1-3] na ekspresję genów kodujących IE180, EPO i gE w komórkach ST\_LL[1-3] na wczesnym etapie infekcji PRV, czego skutkiem było subtelne zaburzenie transmisji i zdolności wirusa do proliferacji. Wyniki te sugerują, że miRNA LLT[1-3] posiadają potencjał do modulowania odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez opóźnianie pojawiania się glikoprotein PRV na powierzchni zainfekowanych komórek, a także poprzez kontrolę składania wirionów i uwalniania wirusów potomnych.
- Do analizy roli klastra LLT[1-3] PRV została wykorzystana strategia typu *gain-of-function*, która umożliwiła obserwację zmian fenotypowych w przebiegu infekcji. Uzyskane wyniki są zgodne z częścią predykcji bioinformatycznych wskazujących na funkcję miRNA kodowanych w klastrze LLT[1-3] w dostrajaniu poziomu transaktywatorów PRV.
- Otrzymany w systemie bakulowirusowym preparat hDicer pozwolił na zgłębienie mechanizmów inhibicji cięcia prekursorów miRNA za pomocą oligomerów RNA, co dało podstawy do opracowania podejścia typu *loss-of-function* do badania roli poszczególnych miRNA PRV. Analizy *in vitro* wykazały, że decydujący wpływ na efektywność inhibitorową oligomerów mają sekwencja i struktura rejonów pre-miRNA, wobec których zaprojektowane są inhibitory. Korzystnie jest, aby rejony, na które nacelowany jest inhibitor, nie tworzyły stabilnych struktur drugorzędowych (w takiej sytuacji oligomery nie muszą pokonywać bariery energetycznej).
- Wykorzystanie inhibitorów cięcia pre-miRNA PRV przez Dicer reprezentuje innowacyjne podejście w badaniach typu LOF nad biologicznym znaczeniem miRNA kodowanych przez wirusy. Analiza potencjału inhibitorowego dwóch rodzajów oligomerów stanowi unikalną ocenę porównawczą ich aktywności w systemie komórkowym.
- Wirusowe miRNA zyskują coraz większą uwagę w obszarze badań podstawowych, analizujących ich wpływ na przebieg infekcji, interakcje z komórką gospodarza czy udział w reaktywacji z latencji. Ponadto, rośnie zainteresowanie wirusowymi miRNA na polu aplikacyjnych badań nad opracowaniem nowatorskich strategii przeciwwirusowych. W związku z tym konieczne jest kontynuowanie prac nad opracowaniem wiarygodnych modeli doświadczalnych, umożliwiających kontrolę nad ilością analizowanych miRNA i minimalizujących ryzyko wystąpienia efektów pośrednich, wpływających na metabolizm komórki.

## 7. Metody

### 7.1. Techniki pracy z DNA

#### 7.1.1. Przygotowanie komórek kompetentnych

Z konserwy komórek *Escherichia coli*, szczep TOP10, zakładano hodowle nocne w 10 ml pożywki LB. Następnego dnia hodowle odmładzono 1:50 i wytrząsano do uzyskania wartości OD<sub>575</sub> pomiędzy 0,4 a 0,6. Komórki wirowano przez 10 min w 4 °C przy 4000 rpm, następnie delikatnie zawieszano w 20 ml schłodzonego, jałowego 0,1 M CaCl<sub>2</sub> i inkubowano w lodzie przez 1 h. Po tym czasie zawiesinę wirowano jak wyżej. Osad zawieszano w 2 ml schłodzonego 0,1 M CaCl<sub>2</sub> z 5% glicerolem. Komórki porcjowano po 200 µl i przechowywano w -80 °C.

#### 7.1.2. Transformacja komórek kompetentnych

Do 100 µl komórek kompetentnych *E. coli* TOP10 dodawano po 50 ng DNA plazmidowego zawieszonego w wodzie. Mieszaninę inkubowano przez 30 min w lodzie, po tym czasie komórki poddano szokowi cieplnemu – 60 sekund w 42 °C. Następnie inkubowano w lodzie przez 3 minuty i dodano 0,5 ml pożywki LB. Komórki hodowano przez 30 min w 37 °C. Po tym czasie 100 µl hodowli wysiewano na płytkę z podłożem LA wzbogaconym odpowiednim antybiotykiem. W przypadku transformacji plazmidem po ligacji do komórek dodawana była całość mieszaniny reakcyjnej. Po półgodzinnej inkubacji w 37 °C komórki były odwirowywane (3000 rpm, 3 min), a osad zawieszany w 200 µl pożywki LB i w tej objętości wysiewany na płytkę. Następnego dnia z pojedynczych kolonii zakładano hodowle nocne w pożywce LB wzbogaconej odpowiednim antybiotykiem. Po parunastogodzinnej inkubacji z wytrząsaniem w 37 °C oczyszczano DNA plazmidowy.

#### 7.1.3. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Rozdział DNA przeprowadzano w żelach o stężeniach agarozy 0,7-2% (w zależności od wielkości analizowanych fragmentów) w buforze TAE, z dodatkiem odczynnika Simply Safe (5 µl w 100 ml żelu), pozwalającego na obserwację prążków DNA w świetle UV. Na żel nakładano próbki DNA z buforem obciążającym razem ze wzorcem Gene Ruler DNA Ladder Mix i prowadzono rozdział w buforze TAE przy stałym napięciu prądu, wynoszącym 7,5 V/cm.

#### 7.1.4. Izolacja DNA na kolumnkach

Izolacja oparta na zdolności wiązania DNA do złóż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych była prowadzona według protokołów dołączonych przez producenta (A&A

Biotechnology). Odpowiednie zestawy były używane do izolacji DNA plazmidowego, fragmentów DNA wyciętych z żeli agarozowych czy do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych.

### **7.1.5. Klonowanie**

Przygotowanie fragmentów DNA do klonowania, obejmujące trawienia enzymami restrykcyjnymi, wytępienie „lepkich końców”, defosforylację wektorów oraz ligację, przeprowadzano zgodnie z powszechnie przyjętymi zasadami, zebranymi w [Sambrook i in. 2001], oraz w warunkach rekomendowanych przez producentów używanych odczynników.

### **7.1.6. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)**

W celu amplifikacji wybranych sekwencji DNA przeprowadzano reakcję PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), zgodnie z powszechnie przyjętymi wytycznymi. Reakcje prowadzono z użyciem polimerazy DNA KAPA HiFi HotStart posiadającej aktywność korektorską, obecnej w 2× stężonej gotowej mieszaninie reakcyjnej zawierającej również dNTPs, bufor reakcyjny i MgCl<sub>2</sub>. Do reakcji PCR dodawano DMSO do 5% stężenia końcowego w celu podniesienia wierności amplifikacji sekwencji bogatych w pary G-C. Warunki, tj. czas trwania reakcji oraz temperatury dla poszczególnych cykli były ustalane w oparciu o wartości temperatur topnienia wybranych starterów oraz długości amplikonów. Sekwencje używanych starterów przedstawiono w **Tabeli 1**. Produkty reakcji PCR były rozdzielane w żelu agarozowym, wycinane i oczyszczane z żelu, po czym były klonowane do wektora pJET1.2/blunt w celu dalszych analiz.

### **7.1.7. Analiza ilościowa i jakościowa DNA**

Stężenie i czystość plazmidowego DNA analizowano za pomocą spektrofotometru DS-11 (DeNovix). Oczyszczony plazmidowy DNA wysyłano do firmy Genomed S.A. w celu przeprowadzenia sekwencjonowania metodą Sanger [Sanger i in. 1975] z użyciem komercyjnych starterów pJET1.2 Forward Sequencing Primer i pJET1.2 Reverse Sequencing Primer (wchodzących w skład zestawu CloneJET PCR Cloning Kit), lub innych starterów dedykowanych analizowanym sekwencjom. Do analizowania otrzymanych chromatogramów wykorzystywano program Geneious.

## **7.2. Techniki pracy z komórkami owadzimi i bakulowirusami**

### **7.2.1. Hodowla komórek owadzich**

Komórki owadzie linii Sf9 i Sf9 ET hodowano w pożywce HyQ SFX. Pożywkę dla komórek Sf9 suplementowano mieszaniną antybiotyków AA, a dla komórek Sf9 ET genetyczną (G418). Hodowle

prowadzono w temperaturze 27 °C, w formie płynnej (w wytrząsarce powietrznej) lub stacjonarnej (w cieplarni), w zależności od potrzeb. Wyjściową formą hodowli była hodowla płynna prowadzona w szklanych kolbach w celu podtrzymania hodowli komórek. Hodowle rozcieńczano w pożywce w stosunku 1:5 – 1:8 do końcowych objętości 10-30 ml co ok. 4 dni.

## 7.2.2. Otrzymywanie rekombinantów bakulowirusowych (system Bac-to-Bac)

Bakulowirusowy system ekspresji genów Bac-to-Bac (Invitrogen) to narzędzie służące do generowania rekombinowanych bakulowirusów wykorzystywanych do produkcji białek heterologicznych w komórkach owadzych, oparte na transpozycji miejscowo specyficznej genów heterologicznych z wektora transferowego na bakmid, zachodzącej w komórkach bakteryjnych.

### 7.2.2.1. Transpozycja miejscowo-specyficzna

Komórki kompetentne *Escherichia coli* DH10Bac zawierają tzw. bakmid, czyli bakulowirusowy wektor wahadłowy, kodujący genom bakulowirusa AcMNPV (ang. *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) oraz bakteryjny replikon niskokopijny mini-F (w miejscu usuniętego genu kodującego polihedrynę), gen oporności na kanamycynę, sekwencję kodującą peptyd lacZ $\alpha$ , a także sekwencję zawierającą miejsce włączenia się bakteryjnego transpozonu Tn7 (mini-att Tn7). Szczep DH10Bac zawiera również plazmid pomocniczy kodujący transpozazę oraz gen oporności na tetracyklinę. Plazmidy transferowe systemu Bac-to-Bac zawierają kasetę z promotorem bakulowirusowym polihedryny (umożliwiającym ekspresję genów heterologicznych w komórkach owadzych) i genem oporności na gentamycynę, otoczoną ramionami transpozonu Tn7.

Do 100  $\mu$ l komórek kompetentnych DH10Bac dodawano 10 ng rekombinowanego plazmidu transferowego pFastBac1 lub pFastBacHtB i inkubowano je w lodzie przez 30 min. Po tym czasie przeprowadzano szok termiczny w 42 °C przez 1 min, dodawano 900  $\mu$ l pożywki LB i hodowano z wytrząsaniem przez 4 godziny w 37 °C. Po tym czasie 50  $\mu$ l hodowli wysiewano na płytki Bac z podłożem LA zawierającym: kanamycynę (50  $\mu$ g/ml), tetracyklinę (10  $\mu$ g/ml), gentamycynę (7  $\mu$ g/ml), IPTG (40  $\mu$ g/ml) i X-gal (150  $\mu$ g/ml). Płytki inkubowano w 37 °C do momentu pojawienia się rozróżnialnych, białych i niebieskich kolonii (ok. dwie doby). Kolonie zawierające rekombinowany DNA bakmidowy wybarwiają się na biało, ze względu na niezdolność do rozkładu substratu dla  $\beta$ -galaktozydazy, wynikającą z transpozycji kasety transferowej w miejsce mini-att Tn7. Białe kolonie poddawano posiewowi redukcyjnemu na płytkach Bac, po czym wybierano pojedyncze białe kolonie potomne i z nich zakładano hodowle płynne (4 ml pożywki LB z kanamycyną i gentamycyną), które hodowano z wytrząsaniem przez noc w 37 °C. DNA bakmidowy oczyszczano wykorzystując zestaw do izolacji DNA PureLink HighPure Plasmid Miniprep Kit, zgodnie z protokołem producenta.

### **7.2.2.2. Transfekcja komórek owadzych**

W celu otrzymania pierwszego pokolenia rekombinowanych bakulowirusów (P1), komórki Sf9 transfekowano rekombinowanym DNA bakulowirusowym, przy użyciu odczynnika Cellfectin. Komórki Sf9 wysiewano do dołka płytki M6 do ok. 70% pokrycia dołka i pozostawiono na 45 min w celu adhezji komórek do płytki. Kompleksy DNA : Cellfectin otrzymywano poprzez mieszanie zawartości dwóch probówek zawierających: i) 100 µl HyQ SFX z 1 µg DNA bakmidowego + ii) 100 µl HyQ SFX z 8 µl Cellfectin. Inkubacja wynosiła 30 min w temperaturze pokojowej. Bezpośrednio przed dodaniem kompleksów wymieniano pożywkę nad komórek na 800 µl świeżej pożywki HyQ SFX, po czym dodawano po 200 µl kompleksów. Komórki inkubowano przez 5 godzin w 27°C, po czym usuwano pożywkę z kompleksami i dodawano po 2 ml świeżej pożywki HyQ SFX. Komórki hodowano przez 5-7 dni, do momentu zaobserwowania efektu cytopatycznego. Po tym czasie zbierano P1, które służyło następnie do namnażania bakulowirusów do wyższego miana. Lizaty wirusowe przechowywano w 4°C, w probówkach zabezpieczonych przed dostępem światła.

### **7.2.2.3. Namnażanie bakulowirusów**

Namnażanie bakulowirusów do wysokiego miana to proces etapowy, prowadzony w stacjonarnych hodowlach komórek Sf9 wysianych do konfluencji ok. 80%. Bakulowirusy namnażane były zgodnie ze schematem:

P2 – 1 ml P1 w butli T25, końcowa objętość 4 ml HyQ SFX z AA

P3 – 2 ml P2 w butli T175, końcowa objętość 30 ml HyQ SFX z AA

Hodowle prowadzono przez 5-7 dni, do momentu całkowitej lizy zainfekowanych komórek Sf9. Zebrane lizaty wirusowe przechowywano w 4 °C bez dostępu światła. W celu ograniczenia ryzyka powstania mutacji, P3 było ostatnim namnażanym pokoleniem, i służyło do produkcji rekombinowanych białek w komórkach Sf9.

### **7.2.3. Miareczkowanie bakulowirusów z wykorzystaniem komórek Sf9 ET**

W celu oznaczenia miana wirusów, lizaty bakulowirusowe miareczkowano przy pomocy komórek Sf9 ET (ang. *easy titer*). Komórki linii Sf9 ET zawierają plazmid DNA niosący gen kodujący białko zielonej fluorescencji (eGFP) pod kontrolą bakulowirusowego promotora polihedryny. Zainfekowana bakulowirusem komórka Sf9 ET świeci na zielono w świetle UV, ponieważ produkty genów bakulowirusowych aktywują w komórce kompleks promotor polihedryny : eGFP. Test przeprowadzany jest na 96-dołkowej płytce (M96), w której wykonuje się seryjne rozcieńczenia lizatów bakulowirusowych w stosunku 1:5, w ośmiu powtórzeniach dla każdego rozcieńczenia.

Pierwszym krokiem jest przygotowanie rozcieńczenia wstępnego 1:500, poprzez dodanie 10  $\mu\text{l}$  lizatu bakulowirusowego do 5 ml pożywki HyQ SFX. Tak przygotowane rozcieńczenie nanosi się do dołków A-H kolumny 1 płytki M96 w ilości 125  $\mu\text{l}$ . Do dołków A-H kolumn 2-10 nanosi się po 100  $\mu\text{l}$  pożywki HyQ SFX, po czym przeprowadza się seryjne rozcieńczenia badanego lizatu wirusowego. Przy pomocy pipety typu multichannel przenosi się po 25  $\mu\text{l}$  rozcieńczonego lizatu z dołków kolumny 1. do dołków kolumny 2., z kolumny 2. do kolumny 3. itd., aż do kolumny 9. Kontrolna kolumna 10 nie zawiera rozcieńczeń wirusa. Na tak przygotowane rozcieńczenia lizatu bakulowirusowego nanosi się komórki Sf9 ET w ilości  $7,5 \times 10^4$ /dołek. Tak przygotowane płytki umieszczano w 27 °C i prowadzono hodowlę 5-6 dni. Po tym czasie przeprowadzano obserwację mikroskopową komórek w świetle UV i liczono ilość GFP-pozytywnych dołków (tzn. takich, w których przynajmniej jedna komórka świeci na zielono). Uzyskane dane wprowadzano do kalkulatora infekcyjności (ang. *infectivity calculator*) w celu wyliczenia miana bakulowirusów (kalkulator opracowany przez dr Brett'a D. Lindenbach'a, dostępny online; opis metody w [Hopkins i in. 2009]).

#### **7.2.4. Produkcja białek w komórkach owadzych**

W celu produkcji rekombinowanych białek w komórkach Sf9 zakładano płynne hodowle w pożywce HyQ SFX, z dodatkiem antybiotyków AA, w szklanych kolbach o objętości 250 lub 500 ml. Odpowiednią ilość komórek w stężeniu  $2 \times 10^6$ /ml infekowano rekombinowanymi bakulowirusami przy współczynniku MOI (ang. *multiplicity of infection*) wynoszącym 1-5. Hodowle prowadzono ok. 48 godzin w 27 °C z wytrząsaniem.

### **7.3. Techniki pracy z komórkami ssaczymi i wirusem PRV**

#### **7.3.1. Hodowla komórek ssaczyc**

Stacjonarne hodowle komórek ssaczyc prowadzono w butlach polistyrenowych (o powierzchni 25, 75, 175 lub 225  $\text{cm}^2$ ) oraz na płytkach wielodołkowych, umożliwiającą adhezję komórek do podłoża. W zależności od linii komórkowej stosowano odpowiednie pożywki z dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej (FBS, ang. *fetal bovine serum*) w stężeniu końcowym 10% oraz antybiotyków AA. Hodowle komórek prowadzono w temperaturze 37 °C i atmosferze zawierającej 5%  $\text{CO}_2$ . Komórki hodowano do momentu osiągnięcia przez nie 80-100% konfluencji (miara ilości komórek w kulturze komórkowej – stopień pokrycia naczynia hodowlanego), po czym komórki pasażowano w rozcieńczeniach od 1:4 do 1:10. W tym celu komórki płukano dwukrotnie buforem PBS, poddawano trypsynizacji poprzez dodanie roztworu trypsyny (aby oddzielić komórki od podłoża), zawieszano w świeżej pożywce i wyznaczoną ilość komórek przenoszono do nowej butli ze świeżą pożywką.



### 7.3.2. Namnażanie i miareczkowanie wirusa PRV

Wirus PRV namnażano i miareczkowano w komórkach ST. Do propagacji wirusa wykorzystywano w pełni konfluentne hodowle komórkowe. Przed infekcją płukano komórki buforem PBS, po czym dodawano określoną ilość wirusa (dla MOI 1), zawieszoną w połowie końcowej objętości pożywki bez FBS. Po godzinnej inkubacji dodawano drugą porcję pożywki z FBS. Infekcję prowadzono do obserwacji lizy komórek (pełen efekt cytopatyczny), po czym oddzielano lizaty wirusowe od komórek poprzez wirowanie 4000 rpm przez 5 min. Lizaty porcjowano i mrożono w -80 °C.

Miano wirusów wyznaczano poprzez infekowanie jednowarstwowych hodowli komórkowych seryjnymi, dziesiętnymi rozcieńczeniami badanego lizatu do momentu obserwacji efektu cytopatycznego w postaci tzw. łysinek (ang. *plaque assay*). Na komórki w pełnej konfluencji, wysiane do dołków płytki M6, наносzono po 0,7 ml rozcieńczeń lizatów (od  $10^{-4}$  do  $10^{-9}$ ), inkubowano godzinę, po czym usuwano rozcieńczone lizaty, komórki płukano buforem PBS i przykrywano pożywką zawierającą 1% metylocelulozę. Po 3-4 dniach liczono łysinki wirusowe pod mikroskopem świetlnym. Miano wirusa wyliczano wg wzoru:

$$\text{PFU/ml} = \text{liczba łysinek} \times \text{rozcieńczenie}^{-1} \times 0,7 \text{ [ml] lizatu}^{-1}.$$

### 7.3.3. Izolacja DNA wirusowego z supernatantu

Komórki linii ST wysiewano do trzech butli o powierzchni 175 cm<sup>2</sup>. Następnego dnia w pełni konfluentne komórki infekowano wirusem PRV przy współczynniku MOI równym 1 i prowadzono hodowlę 24-48 godzin. Pożywkę zawierającą wirusa zbierano i usuwano pozostałości komórkowe poprzez wirowanie 4000 rpm przez 5 min. Zebrany supernatant ultrawirovano w rotorze Beckman SW28 w 8 °C przy 28000 rpm przez 2 godziny. Osad składający się z wirionów zawieszano w 0,6 ml buforu TE i oczyszczano przy użyciu zestawu Virus Mini AX Transfect, służącego do izolacji wirusowego DNA, zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta.

### 7.3.4. Konstrukcja linii komórkowych stabilnie ekspresujących miRNA PRV

Retrowirusowy system transferu i ekspresji genów (RES, ang. *retroviral expression system*) jest powszechnie stosowanym narzędziem służącym do konstruowania linii komórkowych stabilnie ekspresujących geny heterologiczne. Technologia ta jest oparta na kotransfekcji komórek pakujących, zawierających sekwencje kodujące retrowirusowe białko rdzenia (Gag) i odwrotną transkryptazę, integrazę i proteazę (Pol), za pomocą wektora retrowirusowego zawierającego geny heterologiczne i sygnał pakujący  $\Psi$  oraz plazmidu kodującego glikoproteiny powierzchniowe wybranego wirusa (w zależności od tego, jaki tropizm ma posiadać retrowirus, tzw.

pseudotypowanie). Po kotransfekcji komórki pakujące produkują rekombinanty retrowirusowe, które po zebraniu wykorzystywane są do transdukcji komórek docelowych.

#### **7.3.4.1. Otrzymywanie rekombinowanych retrowirusów**

Komórki linii GP2-293 w ilości  $2,2 \times 10^6$  wysiewano do polistyrenowej płytki o średnicy 10 cm, w 10 ml pożywki IMDM. Następnego dnia wprowadzano do komórek metodą transfekcji fosforanem wapnia (zestaw CalPhos, zgodnie z protokołem producenta) wektor retrowirusowy pLZRS-IRES-GFP zawierający sekwencje genów heterologicznych oraz plazmid pCMV-VSV-G kodujący glikoproteinę G wirusa ospy wietrznej i półpaśca (VSV). Mieszaninę transfekcyjną przygotowano w następujący sposób: mieszano 10  $\mu$ g pLZRS-IRES-GFP, 5  $\mu$ g pCMV-VSV-G i 62  $\mu$ l 2 M  $\text{CaCl}_2$ , uzupełniano  $\text{H}_2\text{O}$  do 500  $\mu$ l i powoli kroplami dodawano do 500  $\mu$ l bufor 2 $\times$  HBS. Po 15-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej nakrapiano mieszaninę na komórki i mieszano. Kolejnego dnia wymieniano pożywkę na 9 ml świeżej IMDM. 48 godzin później zbierano supernatant z nad komórek, następnie wirowano go 2500 rpm przez 8 min, przepuszczano przez filtr o średnicy 0,45  $\mu$ m i koncentrowano retrowirusy przy użyciu odczynnika Retro-Concentin. Do ok. 9 ml zebranego supernatantu dodawano 2 ml odczynnika, mieszano i inkubowano przez noc w 4 °C. Następnie wirowano 2000 $\times$ g przez 30 min w 4 °C, usuwano supernatant a osad zawierający retrowirusy zawieszano w 3 ml pożywki do hodowli komórek docelowych. Zawiesiny retrowirusów używano na świeżo lub porcjowano po 1 ml i mrożono w -80 °C.

#### **7.3.4.2. Transdukcja komórek docelowych**

Komórki docelowe w ilości  $2 \times 10^5$  mieszano w zakręcannej probówce 15 ml z 1 ml zawiesiny retrowirusów do końcowej objętości 2 ml, dodawano 40  $\mu$ l polibrenu 0,5 mg/ml (zwiększa adsorpcję wirusa do błony komórkowej) i wsiewano do dołka płytki M6. Następnego dnia zmieniano pożywkę na świeżą. Gdy transdukowane komórki osiągały w dołku pełną konfluencję były przenoszone do butli T75 i stanowiły pokolenie 1.

#### **7.3.4.3. Sortowanie komórek**

Wektor retrowirusowy pLZRS-IRES-GFP zawiera sekwencję kodującą białko zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*), dzięki któremu komórki które je produkują świecą na zielono w świetle UV. Właściwość ta jest wykorzystywana do pozytywnej selekcji transdukowanych rekombinowanymi retrowirusami komórek za pośrednictwem cytometrii przepływowej. Po namnożeniu transdukowanych komórek do pokolenia 2., zebraniu ich poprzez trypsynizację i zawieszeniu w buforze PBS w stężeniu  $10^7$  kom./3 ml, komórki przenoszono do zakręcanych

szklanych probówek i poddawano sortowaniu na obecność GFP przy pomocy cytometru FACSCalibur do otrzymania stabilnej linii komórkowej, przynajmniej w 98% GFP-pozytywnej.

### **7.3.5. Infekcja wirusowa**

Dzień przed infekcją komórki linii ST wysiewano na płytki wielodołkowe (M6, M12 lub M24) w ilości zapewniającej 60-80% konfluencji w dniu infekcji. Pożywkę znad komórek usuwano i zastępowano świeżą pożywką zawierającą określoną ilość wirusa PRV (MOI od 0,2 do 1). Zainfekowane komórki hodowano od 3 do 24 godzin. W przypadku infekcji komórek prowadzonych od 12 do 24 godzin, po dwóch godzinach od rozpoczęcia infekcji pożywka znad komórek była usuwana i zastępowana świeżą pożywką bez wirusa. Krótsze infekcje komórek prowadzono bez zmiany pożywki. Po upływie wyznaczonego czasu infekcji pożywkę usuwano, a komórki zbierano do dalszych analiz.

### **7.3.6. Pomiar wielkości łysinek PRV**

Jednowarstwowe, subkonfluentne hodowle komórek linii ST hodowano w dołkach płytki M6, po czym infekowano je za pomocą 100 pfu (jednostek formujących łysinki) wirusa PRV. Komórki inkubowano z wirusem przez 2 godziny, po czym lizaty zbierano i przykrywano komórki 1% roztworem metylocelulozy. Po 48-godzinnej inkubacji łysinki wirusowe wizualizowano przeprowadzając barwienie białek *in situ* (inaczej IPMA, ang. *immunoperoxidase monolayer assay*). Najpierw płukano komórki buforem PBS, po czym suszono je pod komorą z przepływem powietrza i mrożono w -20 °C przez minimum 1 godzinę. Następnie utrwalano komórki zimnym 4% roztworem paraformaldehydu w PBS przez 20 min, płukano dwukrotnie buforem PBS z 0,5% Tween 20, po czym dodawano roztwór przeciwciał pierwszorzędowych anti-gE (w rozcieńczeniu 1:100) w buforze A z 5% FBS i inkubowano przez 1 godzinę. Niezwiązane przeciwciała usuwano poprzez trzykrotne płukanie buforem PBS z 0,5% Tween 20, po czym dodawano roztwór przeciwciał drugorzędowych z HRP (w rozcieńczeniu 1:2000) w buforze B z 5% FBS. Po godzinnej inkubacji płukano komórki jw., a następnie dodawano odczynnik NovaRED. Łysinki oglądano pod mikroskopem przy powiększeniu 200×, a ich powierzchnie wyliczano za pomocą oprogramowania LUCIA Image (Laboratory Imaging).

### **7.3.7. Krzywa wzrostu wirusa**

Komórki linii ST wysiewano na płytki M12, następnego dnia infekowano je PRV przy współczynniku MOI równym 1. Po dwugodzinnej inkubacji lizaty zbierano, komórki płukano buforem PBS i inkubowano 2 min z buforem cytrynianowym (do inaktywacji wirionów które nie weszły do komórki). Następnie płukano komórki trzykrotnie buforem PBS w celu usunięcia wirionów z ich

powierzchni i dodawano 1 ml świeżej pożywki. Miana wirusa zewnątrzkomórkowego wyznaczano poprzez zbieranie w odpowiednich czasach po infekcji pożywki znad komórek i miareczkowanie lizatów. W celu ustalenia miana wirusa wewnątrzkomórkowego usuwano pożywkę znad komórek i dodawano 1 ml pożywki, płytki dwukrotnie zamrażano w -70 °C i rozmrażano, po czym pożywkę zbierano, pozostałości komórkowe odwirowywano i przeprowadzano miareczkowanie.

### **7.3.8. Przygotowanie frakcji cytoplazmatycznych zawierających sDicer**

Komórki świńskiej linii ST lizowano w celu wydzielenia frakcji cytoplazmatycznej zawierającej świńską Dicer. Komórki hodowano w butlach T175 do momentu uzyskania przez nie pełnej konfluencji, po czym zbierano je poprzez trypsynizację. Do osadów komórkowych dodawano po 500 µl buforu Prot S-100 z inhibitorami proteaz i inkubowano na lodzie przez 30 min. Po tym czasie lizaty przepuszczano 10 razy przez strzykawkę tuberkulinową 1 ml z igłą 0,4×13 mm, a następnie wirowano je 13000 rpm przez 5 min w 4 °C. Supernatanty przenoszono do nowych probówek 1,5 ml i mrożono w -20 °C.

### **7.3.9. Transfekcja**

Komórki linii ST i ST\_LLT[1-3] wysiewano do dołków płytek M12 i następnego dnia przeprowadzono transfekcję za pomocą wybranych oligomerów (oligonukleotydów 2'-O-metylowanych, Morpholino lub *mirVana*) i odczynnika RNAiMAX, postępując zgodnie z zaleceniami producentów (chyba że zaznaczono inaczej). Komórki zbierano w czasie od 3 do 24 godzin po transfekcji (hpt) do dalszych analiz, albo inkubowano je do 24 hpt, a następnie infekowano PRV i zbierano w określonym czasie po infekcji.

### **7.3.10. Test żywotności komórek**

W celu oceny żywotności komórek wykonywano kolorymetryczny test MTS oceniający aktywność dehydrogenaz mitochondrialnych. Analizy prowadzono wykorzystując zestaw CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, zgodnie z protokołem producenta. Pomiar absorbancji wykonywano za pomocą czytnika płytek Infinite M200 (Tecan), przy długości fali wynoszącej 490 nm.

## **7.4. Techniki pracy z białkami**

### **7.4.1. Przygotowania lizatów komórkowych**

Zainfekowane rekombinantami bakulowirusowymi komórki Sf9 lizowano przez ok. 30 min w lodzie, przy użyciu buforu Ni100 z dodatkiem inhibitorów proteaz. Po tym czasie próbki

odwirowywano (13000 rpm przez 15 min) w 4 °C. Supernatanty przenoszono do świeżych probówek Eppendorf 1,5 ml i przechowywano w -80 °C do czasu dalszej pracy. Komórki ssące lizowano przy pomocy odczynnika CellLytic M z dodatkiem inhibitorów proteaz. Lizę prowadzono przez 30 min w lodzie, po czym lizaty odwirowywano 13000 rpm w 4 °C przez 15 min, supernatanty zbierano do nowych probówek i przechowywano w -80 °C do dalszych analiz.

#### **7.4.2. Elektroforeza poliakrylamidowa białek w obecności SDS (SDS-PAGE)**

Lizaty komórkowe mieszano z buforem obciążająco-redukującym w stosunku 3:1 i denaturowano w temperaturze 95 °C przez 5 min (komórki ssące), lub w 65 °C przez 20 min (komórki Sf9), następnie próbki wirowano i наносzono na żel. Z poszczególnych frakcji oczyszczania hDicer pobierano 50 µl próbki, obciążano je ww. buforem i inkubowano w 65 °C przez 20 min. Rozdział białek prowadzono w aparatach płytowych o wymiarach 100×80 mm, używając własnoręcznie przygotowanych żeli poliakrylamidowych o stężeniach 8% (żel rozdzielający) i 5% (żel zagęszczający). Wykorzystywano także komercyjnie dostępne żele gradientowe. Rozdział prowadzono w buforze elektrodowym SDS-PAGE przy stałym napięciu prądu.

#### **7.4.3. Barwienie żeli poliakrylamidowych roztworem Coomassie**

W celu wybarwienia rozdzielonych w żelach PAA białek, po zakończonej elektroforezie żele umieszczano w roztworze Coomassie Brilliant Blue R-250 i inkubowano z bujaniem przez 2 godziny. Po tym czasie żel wytrząsano w roztworze odbarwacza przez noc.

#### **7.4.4. Elektrotransfer białek z żelu na błonę PVDF**

Transfer białek z żeli PAA na błonę PVDF przeprowadzano stosując metodę elektrotransferu mokrego. Żel przenoszono na zaktywowaną metanolem błonę PVDF, następnie żel i błonę przykrywano z dwóch stron trzema arkuszami bibuły filtracyjnej Whatmann 3MM, po czym całość umieszczano w aparacie do elektrotransferu mokrego wypełnionego buforem Tris-glicyna. Elektrotransfer prowadzono przez noc przy stałym napięciu prądu, wynoszącym 20 V.

#### **7.4.5. Western blotting**

Po przeprowadzonym elektrotransferze błonę inkubowano w 5% roztworze mleka odtłuszczonego lub 3% roztworze BSA w TBS-T przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie błonę umieszczono w roztworze specyficznych dla wykrywanego białka przeciwciał pierwszorzędowych w buforze TBS-T z 5% mlekiem odtłuszczonym lub 3% BSA. Po tym czasie

trzykrotnie płukano błonę w roztworze TBS-T w celu odpłukania niezwiązanych przeciwciał. Kolejnym krokiem była inkubacja błony w roztworze przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1:3000 w TBS-T przez 45 min. W celu usunięcia niezwiązanych koniugatów, płukano błonę 5 razy w roztworze TBS-T, po czym prowadzono detekcję immunoreaktywnych kompleksów z wykorzystaniem substratów ECL według protokołów producentów.

#### **7.4.6. Test IPMA na komórkach owadzych**

Test immunodetekcji białek *in situ* metodą IPMA prowadzono w celu detekcji białka hDicer, produkowanego w jednowarstwowych hodowlach komórek Sf9. Po infekcji rekombinowanymi bakulowirusami i odpowiednim czasie inkubacji, pożywkę z nad zainfekowanych komórek owadzych usuwano, a komórki płukano buforem PBS. Następnie komórki utrwalano zimnym 70% metanolem przez 10 min, po tym czasie metanol usuwano a komórki suszono. Po utrwaleniu komórki płukano przez 5 min buforem PBS z 1% Tween 20 (PBS-T), a następnie inkubowane przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi 1:1000 w buforze PBS-T. Niezwiązane przeciwciała odpłukiwano trzy razy buforem PBS-T. Następnie prowadzono jednogodzinną inkubację z koniugatem drugorzędowych przeciwciał sprzężonych z HRP, rozcieńczonych w buforze PBS-T 1:1000. Po inkubacji komórki płukano jak poprzednio i dodawano roztwór substratu NovaRED, po czym obserwowano wybarwione komórki pod mikroskopem w świetle przechodzącym.

#### **7.4.7. Barwienie immunofluorescencyjne**

Komórki ssące przeznaczone do barwienia immunofluorescencyjnego były wysiewane dzień przed infekcją wirusową do dołków płytek M12 z umieszczonymi jałowymi szkiełkami nakrywkowymi na dnie dołków. Po wyznaczonym czasie od infekcji, komórki płukano buforem PBS, po czym utrwalano przez 20 minut zimnym 4% paraformaldehydem, a następnie permeabilizowano przez 7 min roztworem 0,2% Triton X-100. Komórki inkubowano przez 1 godzinę z roztworem przeciwciał pierwszorzędowych anty-gE (rozcieńczonych 1:500 w PBS) w temperaturze pokojowej. Po tym czasie niezwiązane przeciwciała usuwano poprzez trzykrotne płukanie buforem PBS, po czym do komórek dodawano roztwór przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fluorochromem (Alexa Fluor 546), w rozcieńczeniu 1:2000. Po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał zamykano preparaty za pomocą ProLong Diamond Antifade Mountant DAPI. Analizę prowadzono we fluorescencyjnym mikroskopie konfokalnym Leica TCS SP8X.

#### **7.4.8. Cytometria przepływowa**

Komórki ssące przeznaczone do badania cytometrycznego wysiewano dzień przed infekcją PRV do dołków płytek M12. Po wyznaczonym czasie od infekcji, komórki płukano buforem PBS, poddawano trypsynizacji, zawieszano w buforze PBA i przenoszono do 96-dołkowych V-kształtnych płytek FACS. Następnie do zawiesiny komórek dodawano roztwór przeciwciał pierwszorzędowych anti-gE, rozcieńczonych w buforze PBA 1:100, i inkubowano przez godzinę. Po tym czasie przeciwciała usuwano poprzez wirowanie płytki z komórkami (1400 rpm, 3 min) i dwukrotne płukanie buforem PBA. Następnie dodawano do komórek roztwór przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z fluorochromem (Alexa Fluor 633) w rozcieńczeniu 1:2000 i prowadzono inkubację przez 45 min bez dostępu światła. Po zakończonej inkubacji komórki płukano jak wyżej, zawieszano w 300-400 µl buforu PBA i przenoszono do probówek FACS. Analizę cytometryczną wybarwionych komórek prowadzono przy użyciu cytometru Guava easyCyte oraz dedykowanego mu oprogramowania InCyte.

#### **7.4.9. Chromatografia powinowactwa IMAC**

Do oczyszczania białek zawierających znacznik His<sub>6</sub>-tag metodą chromatografii powinowactwowej używano agarozy Ni-NTA wiążącej reszty histydynowe. Przed oczyszczaniem złożę równoważono w buforze lizująco-płuczającym Ni100. Tak przygotowane złożę inkubowano z lizatami komórek owadzych, uprzednio infekowanymi rekombinantami bakulowirusowymi. Proporcja złoża do całości mieszaniny wynosiła 1:5. Inkubację prowadzono przez noc na rotatorze w chłodni. Następnego dnia formowano złożę poprzez przeniesienie mieszaniny do kolumny chromatograficznej. W celu usunięcia białek związanych niespecyficznie przeprowadzono sukcesywne płukanie złoża. Pierwszym buforem płuczającym był bufor Ni100 dodany w 10 objętościach złoża, kolejnym – bufor Ni100 z dodatkiem 10 mM imidazolu (również 10 objętości złoża). W celu elucji białek specyficznie związanych ze złożem, na złożę наносzono bufor elucyjny (Ni100 z dodatkiem 250 mM imidazolu) w ilości 3,33 objętości złoża, po czym zbierano frakcje elucyjne. Po każdym użyciu złożę płukano pięcioma objętościami buforu Ni100 z 1 M imidazolem (w celu usunięcia pozostałych w nim białek), 10 objętościami wody i trzema objętościami 20% etanolu, w którym złożę przechowywano.

#### **7.4.10. Chromatografia jonowymienna IEC**

Do oczyszczania białek metodą chromatografii jonowymienną IEC (ang. *ion exchange chromatography*) używano gotowe kolumny HiTrap Q HP wypełnione wymiennicem anionowym, których użycie wymaga podłączenia do pompy perystaltycznej, umożliwiającej stabilny i powtarzalny

przepływ (używano pompa Pharmacia Biotech P-1). Oczyszczanie miało miejsce w chłodni. Przed użyciem równoważono kolumnę w buforze Q100. Do tak przygotowanej kolumny wtłaczano mieszaninę 1:1 eluatu po oczyszczeniu na kolumnie Ni-NTA i buforu Q100. Następnie płukano kolumnę, najpierw buforem Q100 (pięć objętości kolumny), później buforem Q200 (pięć objętości kolumny). Związane do kolumny białka eluowano przy pomocy buforu Q450 (pięć objętości kolumny) i zbierano we frakcjach elucyjnych po 0,5 ml. Po każdym użyciu kolumny płukano pięcioma objętościami buforu Q1000 (w celu usunięcia pozostałych w nim białek), pięcioma objętościami wody i trzema objętościami 20% etanolu, w którym kolumny były przechowywane.

#### **7.4.11. Zagęszczanie preparatów białkowych**

Wyznaczone do dalszej pracy frakcje białek po oczyszczeniu chromatograficznym łączono i nanoszono na filtry Amicon Ultra 100 kDa w celu zmniejszenia końcowej objętości preparatu, zwiększenia stężenia białka oraz wymiany buforu na bufor docelowy, w którym można było mrozić preparat. Procedura obejmowała trzykrotną wymianę buforu z wirowaniem, zgodnie z protokołem dołączonym przez producenta. Zagęszczone preparaty hDicer przechowywano w -80 °C.

### **7.5. Techniki pracy z RNA**

Doświadczenia z RNA były prowadzone w warunkach pozbawionych kontaminacji enzymami degradującymi RNA, takimi jak RNazy A.

#### **7.5.1. Izolacja frakcji całkowitego RNA**

Komórki lizowano w dołkach za pomocą odczynnika TRI Reagent (1 ml odczynnika na dołek płytki M12) a lizaty przenoszono do 1,5 ml probówek Eppendorf i mrożono w -80 °C. Po rozmrożeniu i inkubacji 5 min w temperaturze pokojowej do lizatów dodawano chloroform (0,2 ml na 1 ml TRI Reagent) i wstrząsano w ręce przez 15 sec w celu rozdzielenia faz, po czym inkubowano 3 min w temperaturze pokojowej i wirowano 12000×g przez 15 min w 4 °C. Tak przygotowana mieszanina rozdziela się na trzy fazy - w górnej, wodnej znajduje się RNA, który ostrożnie przenoszono do nowych probówek 1,5 ml. W celu precypitacji RNA, do probówek dodawano izopropanol (0,8 ml na 1 ml TRI Reagent) i inkubowano 20 min w -20 °C, po czym probówki wirowano 13000 rpm przez 20 min w 4 °C. Supernatant usuwano, a znajdujący się na dnie osad RNA płukano 85% EtOH (1 ml EtOH na 1 ml TRI Reagent), wortexowano i wirowano 13000 rpm przez 5 min w 4 °C, po czym płukanie powtarzano. Osad RNA suszono na powietrzu przez 10 min, po czym RNA inkubowano przez 5 min w 37 °C w 10-30 µl wody wolnej od RNaz. Rozpuszczony RNA przechowywano w -80 °C.



### 7.5.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

W reakcji odwrotnej transkrypcji (RT, ang. *reverse transcription*), przeprowadzanej w celu przygotowania matrycy cDNA do ilościowej reakcji PCR, wykorzystywano frakcje całkowitego RNA. W zależności od rodzaju analizowanego RNA używano różnych odczynników. W celu przepisania miRNA na cDNA wykorzystywano zestaw Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit, zawierający odwrotną transkryptazę oraz polimerazę poli(A). W pierwszej kolejności do cząsteczek RNA od strony 3' dodawany jest ogon poliadenylowany, po czym przyłącza się do niego starter oligo(dT) i zachodzi reakcja odwrotnej transkrypcji. Do reakcji używano ok. 0,5 µg RNA i postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. Do przepisania mRNA na cDNA wykorzystywano odwrotną transkryptazę SuperScript IV. Reakcje prowadzono zgodnie z protokołem producenta z wykorzystaniem ok. 1 µg RNA.

### 7.5.3. Ilościowa reakcja PCR

Do przeprowadzenia ilościowej reakcji PCR (qPCR, ang. *quantitative PCR*) wykorzystywano zestawy odczynników zawierające barwnik SYBR Green. Reakcje prowadzono w termocyklerze LightCycler 2.0 lub LightCycler 480. Do wyznaczania poziomu zarówno miRNA, jak i mRNA, wykorzystywano po 50 ng przygotowanych matryc cDNA. Do analizy ilości dojrzałych miRNA używano starterów początkowych (F) o sekwencjach analizowanych miRNA i uniwersalnego startera końcowego (R) mRQ (z zestawu Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit, komplementarnego do adaptera poli(T)). Do amplifikacji używano zestawu do qPCR SYBR Premix Ex Taq II. Reakcje przeprowadzano w następujących warunkach: 1× (95 °C, 30 s) i (95 °C, 5 s; 62 °C, 20 s) przez 45 cykli. Normalizację ilości całkowitego RNA prowadzono w odniesieniu do poziomu genu U6 (startery również pochodziły z zestawu Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit). W celu analizy poziomu mRNA używano zestawu SG/ROX qPCR Master Mix oraz startery specyficzne przeciwko wybranym genom. Warunki reakcji: 1× (95 °C, 5 min) i (94 °C, 15 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) przez 45 cykli. Wewnętrzną kontrolę normalizującą ilość całkowitego RNA w każdej próbce stanowił gen rybosomalnej podjednostki 28S. Względne poziomy miRNA i mRNA wyliczano metodą  $\Delta\Delta Ct$ . Sekwencje użytych starterów przedstawiono w **Tabeli 2**.

### 7.5.4. Znakowanie radioizotopowe prekursorów miRNA PRV

Syntetyczne pre-miRNA znakowano radioizotopowo przez fosforylację końców przy użyciu radioaktywnego nuklidu [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Prekursor pre-prv-LLT2-5p znakowano na końcu 5', a prekursor pre-prv-LLT1-3p i pre-prv-LLT3-3p na końcach 3'.

#### **7.5.4.1. Znakowanie końca 5'**

Do 6  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz dodano 1  $\mu\text{l}$  pre-miRNA o stężeniu 10 pmol/ $\mu\text{l}$  i denaturowano cząsteczki przez 3 min w 90 °C, po czym inkubowano je w lodzie przez 2 min. Następnie do RNA dodano po 1  $\mu\text{l}$ : buforu A do kinazy T4 (10× stężonego), kinazy polinukleotydowej T4 (10U/ $\mu\text{l}$ ) i nuklidu [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP. Mieszaninę inkubowano w 37 °C przez 15 min, po czym dodano 20  $\mu\text{l}$  wody. Całość denaturowano w 90 °C przez 2 min, po czym inkubowano 2 min w lodzie.

#### **7.5.4.2. Znakowanie końca 3'**

Znakowanie końca 3' przeprowadzano dwuetapowo. Pierwszy etap obejmował znakowanie difosforanu cytydyny (Cp). Mieszanina reakcyjna zawierała 2  $\mu\text{l}$  Cp o stężeniu 100 pmol/ $\mu\text{l}$ , 3  $\mu\text{l}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 10  $\mu\text{l}$  buforu A (10× stężonego), 1,5  $\mu\text{l}$  kinazy T4 (10U/ $\mu\text{l}$ ) i 4,3  $\mu\text{l}$  wody. Całość inkubowano w 37 °C przez 30 min, następnie denaturowano w 95 °C przez 5 min. Otrzymana cząsteczka [5'- $^{32}\text{P}$ ]pCp posłużyła do znakowania pre-miRNA w drugim etapie. Przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z 12  $\mu\text{l}$  [5'- $^{32}\text{P}$ ]pCp, 1  $\mu\text{l}$  RNA (o stężeniu 100 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  buforu do ligacji, 1  $\mu\text{l}$  ATP (o stężeniu 100 mM), 1  $\mu\text{l}$  ligazy T4 (5 U/ $\mu\text{l}$ ) i 3  $\mu\text{l}$  wody. Mieszaninę inkubowano przez noc w 4 °C.

#### **7.5.5. Oczyszczanie RNA wyznakowanego radioizotopowo**

Po przeprowadzonym znakowaniu pre-miRNA oczyszczano na kolumnkach NucAway zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Stężenie materiału znakowanego radioizotopowo doprowadzono do 10000 cpm/ $\mu\text{l}$  (ok. 1  $\mu\text{M}$ ). Homogenność otrzymanych prekursorów po oczyszczaniu na kolumnkach sprawdzano poprzez rozdział elektroforetyczny w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących.

#### **7.5.6. Elektroforeza RNA w żelach PAA w warunkach denaturujących**

Rozdział elektroforetyczny RNA w warunkach denaturujących prowadzono w żelach poliakrylamidowych zawierających 7 M mocznik. Do celów analitycznych stosowano 15% żełe o wymiarach 39×33 cm. Analizowany materiał przed nałożeniem na żel denaturowano. W tym celu mieszano go z równą objętością buforu obciążającego LB I i inkubowano przez 3 min w 90°C, po czym umieszczano w lodzie na 5 min. Rozdział prowadzono w buforze TBE. Przed nałożeniem próbek, żel poddawano pre-elektroforezie w warunkach: 1500 V, 50 W, 10 mA przez 15 min. Rozdział prowadzono w następujących warunkach: 1500 V, 50 W, 40 mA przez 2 h. Rozdzielone w żelu, znakowane radioizotopowo oligorybonukleotydy wizualizowano za pomocą skanera FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer. Do analizy uzyskanych danych wykorzystywano oprogramowanie Multi Gauge 3.0 (Fujifilm).

### 7.5.7. Badanie oddziaływań RNA – RNA

Do badań oddziaływań pomiędzy syntetycznymi prekursorami miRNA PRV a oligomerami o potencjale inhibitorowym wykorzystywano metodę spowolnienia migracji RNA w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych (EMSA, ang. *electrophoretic mobility shift assay*). Wyznakowany radioizotopowo prekursor inkubowano ze 100-krotnym molowym nadmiarem analizowanego oligomeru w buforze EMSA. Mieszaniny reakcyjne zawierały: 1 µl pre-miRNA (o stężeniu 10000 cpm/µl, 1 µM), 1 µl oligomeru (100 µM), 2 µl buforu EMSA (5× stężonego) i wodę do 10 µl. Całość inkubowano w 37 °C przez 15 min. Mieszaniny reakcyjne rozdzielano metodą elektroforezy w 12% niedenaturujących żelach poliakrylamidowych.

### 7.5.8. Elektroforeza RNA w żelach PAA w warunkach natywnych

Rozdział elektroforetyczny kompleksów znakowanych prekursorów z oligomerami w warunkach natywnych prowadzono w 12% żelach PAA o wymiarach 19×18,5 cm. Analizowane próbki RNA przed nałożeniem na żel mieszano z równą objętością buforu obciążającego LB II. Rozdział prowadzono w buforze TBE z dodatkiem 5% glicerolu. Przed nałożeniem próbek, żel poddawano pre-elektroforezie pod napięciem 120 V. Rozdział prowadzono w następujących warunkach: 180 V, 30 mA, 25 W przez noc w 4 °C. Rozdzielone w żelu, znakowane radioizotopowo kwasy nukleinowe wizualizowano za pomocą skanera FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer. Do analizy uzyskanych danych wykorzystywano oprogramowanie Multi Gauge 3.0.

### 7.5.9. Cięcie RNA przez Dicer

Reakcje hydrolizy znakowanego radioizotopowo substratu RNA prowadzono w obecności jonów Mg<sup>2+</sup>. Skład mieszanin, nastawione kontrole i czas prowadzenia reakcji różniły się w zależności od preparatu i celu prowadzenia analizy (szczegóły w rozdziałach **Wyniki 4.1** i **Wyniki 4.3**). Testowano preparaty hDicerN i hDicerC oczyszczane jednoetapowo (1-5 µl), preparat hDicerN oczyszczany dwuetapowo (80-400 nM) oraz lizaty komórek ST zawierające sDicer (4 µl). Podstawowy skład mieszanin reakcyjnych zawierających hDicer: 1 µl pre-hsa-miR-21 (10000 cpm/µl, 1 µM), 2 µl buforu do cięcia RNA (5× stężonego), preparat hDicer (w żądanej ilości) i H<sub>2</sub>O do 10 µl. Podstawowy skład mieszanin reakcyjnych zawierających sDicer: 1 µl pre-miRNA PRV (10000 cpm/µl, 1 µM), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 µl inhibitorów RNaz A (40 U/µl), 4 µl lizatów komórek ST i H<sub>2</sub>O do 10 µl. Dla każdego doświadczenia nastawiano reakcje kontrolne prowadzone w obecności 50 mM EDTA lub bez dodatku Dicer. Reakcje cięcia zatrzymywano poprzez dodanie 1 objętości buforu obciążającego LB I i inkubację w 90 °C przez 3 min. Produkty reakcji rozdzielano metodą elektroforezy w 15% żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących.

### 7.5.10. Ocena potencjału inhibitorowego oligomerów

Potencjał inhibitorowy oligomerów 2'OMe i Morpholino analizowano przeprowadzając standardowe reakcje hydrolizy pre-miRNA przez Dicer. Ilość dodawanego substratu RNA była stała (10000 cpm), podobnie jak objętość lizatów komórkowych zawierających sDicer (4  $\mu$ l). Zmieniało się natomiast stężenie testowanego oligomeru tak, aby stosunek molowy pre-miRNA : oligomer wynosił odpowiednio: 1:1, 1:10 i 1:100. W pierwszym etapie przeprowadzano pre-inkubację substratu RNA i oligomeru przez 15 min na lodzie. Reakcje inicjowano przez dodanie lizatów i przeniesienie prób do 37 °C. Reakcje kontrolne prowadzono bez dodatku Dicer i testowanego oligomeru (K-) lub jedynie bez dodatku oligomeru (K+). Skład mieszanin reakcyjnych: 1  $\mu$ l pre-miRNA PRV (10000 cpm/ $\mu$ l, 1  $\mu$ M), 1  $\mu$ l oligomeru (1  $\mu$ M/ 10  $\mu$ M/ 100  $\mu$ M), 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25  $\mu$ l inhibitorów RNaz A (40 U/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l lizatów komórek ST i H<sub>2</sub>O do 10  $\mu$ l. Wszystkie próby inkubowano w 37 °C przez 1 godzinę. 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% denaturujących żelach poliakrylamidowych i analizowano je przy użyciu skanera FLA-5100. Za pomocą oprogramowania Multi Gauge 3.0 określano ilość powstającego miRNA dla każdej z prób, a wartości otrzymane dla reakcji z testowanymi oligomerami normalizowano względem K+ (poziom miRNA uwalnianego przez sDicer 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 trzech powtórzeń eksperymentu.

### 7.5.11. Analiza statystyczna

Zebrane dane analizowano i wizualizowano posługując się programem GraphPad Prism (GraphPad Software). Dla każdego doświadczenia w opisie pod ryciną podano rodzaj użytego testu statystycznego.

## 8. Materiały

### 8.1. Szczepy bakteryjne

#### *Escherichia coli* TOP10

mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80 $\Delta$ lacZDM15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139,  $\Delta$ (ara,leu)7697, galU, galK,  $\Gamma$ , rpsL, endA1, nupG (Invitrogen).

#### *Escherichia coli* DH10Bac

F<sup>-</sup>, mcrA,  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80 $\Delta$ lacZDM15,  $\Delta$ lacX74, endA1, deoR, recA1,  $\Delta$ (ara,leu)7697, ara  $\Delta$ 139, galU, galK, rpsL, nupG, Kan<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>, LacZ $\alpha$ <sup>+</sup>. Element systemu Bac-to-Bac (Invitrogen).

### 8.2. Odczynniki do hodowli bakteryjnych

#### Pożywki i podłoża wzrostowe:

**LB** (Luria-Broth); płynna pożywka do hodowli bakteryjnych o pH 7,0. Bacto-Trypton 10g, ekstrakt drożdżowy 5g i NaCl 10g rozpuszczono w 1 litrze wody destylowanej i jałowiono w autoklawie

**LA** (Luria Agar); stałe podłoże do hodowli komórek bakteryjnych o pH 7,0. Bacto-Trypton 10g, ekstrakt drożdżowy 5g, NaCl 10g i Bacto-agar 15g rozpuszczono w 1 litrze wody destylowanej i jałowiono w autoklawie

#### Antybiotyki:

**Ampicylina** roztwór 100 mg/ml, stężenie robocze 100  $\mu$ g/ml (Sigma)

**Kanamycyna** roztwór 50 mg/ml, stężenie robocze 50  $\mu$ g/ml (Fluka)

**Gentamycyna** roztwór 10 mg/ml, stężenie robocze 7  $\mu$ g/ml (Sigma)

**Tetracyklina** roztwór 10 mg/ml, stężenie robocze 10  $\mu$ g/ml (Fluka)

### 8.3. Linie komórek eukariotycznych

**Sf9** ciągła linia komórek owadzych wyprowadzona z tkanki jajnika larw motyla *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen)

**Sf9 ET** zmodyfikowana linia komórek Sf9 służąca do miareczkowania bakulowirusów (ang. *easy titer*). Genom komórek Sf9 ET zawiera gen kodujący GFP pod promotorem bakulowirusowym (ATCC)

**ST** ciągła linia komórkowa, wyprowadzona z tkanki jądra świńskiego (ang. *swine testis*), otrzymana z Department of Virology, Parasitology, and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium

- GP2-293** linia komórek pakujących systemu retrowirusowego, pochodna linii HEK 293T, utrzymująca stabilną ekspresję genów *gag-pol* retrowirusa MMLV (Clontech)
- MJS** linia komórkowa ciągła pochodząca z komórek ludzkiego czerniaka (ang. *human melanoma cell*), otrzymana z Leiden University Medical Centre, Holandia

## 8.4. Odczynniki do pracy z komórkami eukariotycznymi

### Pożywki:

- HyQ SFX** syntetyczna pożywka do hodowli komórek owadzich, niewymagająca dodatku FBS (Thermo Scientific)
- EMEM** (ang. *Minimum Essential Medium Eagle*); podłoże wzrostowe do hodowli komórek ST, uzupełnione antybiotykami AA (zgodnie z zaleceniami producenta) i FBS do 10% (Corning)
- RPMI-1640** (ang. *Roswell Park Memorial Institute*); podłoże wzrostowe do hodowli komórek MJS, uzupełnione antybiotykami AA i L-glutaminą (zgodnie z zaleceniami producenta), a także FBS do 10% (Sigma)
- IMDM** (ang. *Iscove's Modified Dulbecco Medium*); podłoże wzrostowe wykorzystywane do hodowli komórek GP2-293, uzupełnione antybiotykami AA (zgodnie z zaleceniami producenta) i FBS do 10% (Lonza)
- OptiMEM** modyfikowana pożywka EMEM, stosowana podczas transfekcji komórek ssaczych (Gibco)
- DMEM 10×** (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*); podłoże wzrostowe wykorzystywane do hodowli komórek ssaczych, uzupełnione 4% FBS, antybiotykami AA (zgodnie z zaleceniami producenta) oraz 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Stosowane do przygotowywania 1% roztworu metylocelulozy (Gibco)

### Antybiotyki:

- AA** roztwór antybiotyków i antymykotyków zawierający penicylinę (10000 U/ml), streptomycynę (1000 µg/ml) i amfoterycynę B (25 µg/ml). 100× stężony, do hodowli komórek ssaczych i owadzich (Gibco)
- Genetycyna** (G418); roztwór 100 mg/ml, stężenie robocze 100 µg/ml, do hodowli komórek Sf9 ET (Merck)

### Odczynniki transfekcyjne:

- Cellfectin** odczynnik służący do transfekcji liposomalnej komórek owadzich bakmidowym DNA (Invitrogen)
- CalPhos Mammalian Transfection Kit**  
zestaw do transfekcji komórek ssaczych, wykorzystywany podczas produkcji rekombinantów retrowirusowych (Clontech)

**RNAiMAX** odczynnik służący do transfekcji liposomalnej komórek ssaczych oligomerami kwasów nukleinowych i siRNA (Thermo Scientific)

Inne:

**CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay**

test żywotności (proliferaacji) komórek metodą MTS (Promega)

## 8.5. Wirusy

**Bac-WT** pochodna wirusa AcNPV (ang. *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) typu dzikiego (kolekcja Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed)

**PRV NIA-3** wirus pseudowścieklizny typu dzikiego (ang. *Pseudorabies Virus*), szczep Northern Ireland Aujeszky-3 (otrzymany z Institute for Animal Science and Health, Lelystad, Holandia)

## 8.6. Plazmidy

**pJET1.2/blunt** wektor liniowy służący do klonowania i analizy produktów PCR (Thermo Scientific)

**pBlueScriptSK(+)-Dicer1**

standardowy wektor do klonowania, zawierający pełnej długości gen *DICER1* kodujący ludzką rybonukleazę Dicer1 (PubMed accession number NM\_030621), zamówiony z GeneCopoeia

**pFastBac1** wektor transferowy bakulowirusowego systemu ekspresji genów Bac-to-Bac pozwalający na ekspresję genu heterologicznego pod kontrolą bakulowirusowego promotora polihedryny (Invitrogen)

**pFastBacHtB** wektor transferowy bakulowirusowego systemu ekspresji genów Bac-to-Bac, dodający sekwencję kodującą znacznik histydynowy (His<sub>6</sub>-tag) i odtwarzający kodon start genu heterologicznego, pod kontrolą bakulowirusowego promotora polihedryny (Invitrogen)

**pLZRS-IRES-GFP**

wektor transferowy retrowirusowego systemu ekspresji genów pozwalający na ekspresję genów heterologicznych pod kontrolą retrowirusowego promotora 5'LTR. Zawiera sekwencje pochodzące z genomu wirusa mysiej białaczki Moloney'a (MMLV), sekwencję IRES oraz znajdujący się za nią gen kodujący GFP (ze zbioru Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów MWB UG-GUMed )

**pCMV-VSV-G** plazmid kodujący glikoproteinę G wirusa pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (VSV), służący do pseudotypowania rekombinowanych retrowirusów (Clontech)

## 8.7. Przeciwciała

### Przeciwciała pierwszorzędowe:

- anty-Dicer** królicze przeciwciała poliklonalne (Sigma)  
mysie przeciwciała monoklonalne 13D6 (Novus Biologicals)
- anty-His<sub>6</sub>-tag** królicze przeciwciała poliklonalne (Sigma)
- anty-IE180** kozia surowica poliklonalna B1B2 anty-PRV (otrzymana z Federal Research Institute for Animal Health, Tübingen, Niemcy)
- anty-gE PRV** mysie przeciwciała monoklonalne (otrzymane z Federal Research Institute for Animal Health, Tübingen, Niemcy)
- anty-β-aktyna** mysie przeciwciała monoklonalne (Novus Biologicals)

### Przeciwciała drugorzędowe:

- anty-królicze** koniugat kozich przeciwciał IgG sprzężonych z HRP (Jackson Immuno-Research)
- anty-mysie** koniugat kozich przeciwciał IgG sprzężonych z HRP (Jackson Immuno-Research)  
koniugat kozich przeciwciał IgG sprzężonych z Alexa Fluor 546 (Thermo Scientific)  
koniugat kozich przeciwciał IgG sprzężonych z Alexa Fluor 633 (Thermo Scientific)
- anty-kozie** koniugat oślich przeciwciał IgG sprzężonych z HRP (Jackson Immuno-Research)

## 8.8. Startery

Wszystkie startery wykorzystywane w reakcjach PCR i qPCR zaprojektowano wykorzystując program Geneious i zamówiono w firmie Genomed.

**Tabela 1.** Sekwencje starterów użytych w reakcjach PCR podczas realizacji niniejszej pracy:

konstrukt	starter	sekwencja 5'→3'	pozycja w genomie PRV [Mathijs i in. 2016]
pHtB-hDicerN i pFB-hDicerC	Δ5'UTR-F	GGGGTACCGTCGACATGAAAAGCCCTGCTTTG	
	Δ5'UTR-R	GGCGACATAGCAAGTCATAATGAGAACCTGGTG	
	ΔATG-F	ACGCGTCGACGAAAAGCCCTGCTTTG	nie dotyczy
	H6T-F	GCCAGTTCACGCTCTTCTGTATTGAAAGACTCG	
	H6T-R	TTTAGCGGCCGCTCAATGATGATGATGATGGCTATTGGGAAC	
klaster	miR1-3-F	AATGGATCCAGTCCATGACGGTGAGTG	97,486–97,503
LLT[1-3]	miR1-3-R	GACGAATTCACGCTGATACTCTTGGCC	98,670–98,687



**Tabela 2.** Sekwencje starterów wykorzystywanych w reakcjach qPCR:

detekcja	starter	sekwencja 5' → 3'	pozycja w genomie PRV [Mathijs i in. 2016]
miRNA	F-miR-1	TCTCACCCCTGGGTCCGTCGCAA	97,837–97,857
	F-miR-2	CTCATCCCGTCAGACCTGCGAA	98,298–98,317
	F-miR-3	CGCACACGCCCTCTCGGCACAA	98,398–98,419
mRNA [Tombáč i in. 2016]	F-ie180	CATCGTGCTGGACACCATCGAG	103,891–103,912
	R-ie180	ACGTAGACGTGGTAGTCCCCCA	103,844–103,865
	F-ep0	GGGTGTGAACTATATCGACACGTC	96,891–96,914
	R-ep0	TCAGAGTCAGAGTGTGCCTCG	96,864–96,884
	F-us8	CTTCGACGTCTGGTTCCGC	124,454–124,472
	R-us8	GGTCACGCCATAGTTGGGC	124,502–124,520
	F-28s	GGGCCGAAACGATCTCAACC	nie dotyczy
	R-28s	GCCGGGCTTCTTACCCATT	

## 8.9. Odczynniki do pracy z DNA

**PCR** KAPA HiFi HotStart ReadyMix – zestaw do amplifikacji DNA zawierający polimerazę DNA umożliwiającą wierną amplifikację matryc bogatych w pary G-C (Kapa Biosystems)

### Zestaw do klonowania produktów PCR

CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)

### Enzymy

enzymy restrykcyjne w formie Fast Digest  
alkaliczna fosfataza FastAP  
DNA polimeraza I (fragment Klenowa)  
ligaza faga T4 5 U/μl (Fermentas)

### Zestawy do oczyszczania DNA

zestawy do izolacji plazmidowego DNA – Plasmid Mini i Plasmid Midi AX  
zestaw do izolacji DNA z żeli agarozowych – Gel-Out Concentrator  
zestaw do czyszczenia DNA po reakcja enzymatycznych – Clean-Up Concentrator  
zestaw do izolacji DNA wirusowego – Virus Mini AX Transfect (A&A Biotechnology)  
zestaw do izolacji DNA bakmidowego – PureLink HighPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)

### Wzorzec masowy do elektroforezy agarozowej

GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas)

### Bufor obciążający do elektroforezy agarozowej

DNA Gel Loading Dye 6× stężony (Fermentas)

## 8.10. Odczynniki i materiały do pracy z białkami

### Substrat do testu IMPA

NovaRED (Vector Laboratories)

### Złoże chromatograficzne

Ni-NTA – złożo niklowe do chromatografii powinowactwowej (Qiagen)

HiTrap Q HP – gotowe kolumny zawierające złożo do chromatografii jonowymiennej (GE Healthcare)

### Filtry zagęszczające

Amicon Ultra 100 kDa – filtry do zagęszczania próbek i wymiany buforów (Millipore)

### Wzorce masowe do elektroforezy SDS-PAGE

PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

### Substraty do chemiluminescencji

Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad)

## 8.11. Odczynniki i materiały do pracy z RNA

### Odczynnik do izolacji całkowitego RNA

TRI Reagent – zawiera fenol i tiocyjanin guanidyny (Molecular Research Center)

### Zestawy do odwrotnej transkrypcji

Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit – zestaw do odwrotnej transkrypcji miRNA (Clontech)

SuperScript IV – zestaw używany do przepisywania mRNA na cDNA (Thermo Scientific)

### Odczynniki do ilościowej reakcji PCR (qPCR)

SYBR Premix Ex Taq II Tli RNase H Plus (Clontech)

SG/ROX qPCR Master Mix (EURx)

### Enzymy

kinaza polinukleotydowa T4 (Thermo Scientific)

RNaza T1 (Thermo Scientific)

Turbo Dicer (Genlantis)

### Znakowanie radioizotopowe

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 5000 Ci/mmol (Hartmann Analytics)

difosforan cytydyny (Sigma)

### Kolumny wykorzystywane do oczyszczania radioaktywnego RNA

NucAway Spin Columns (Thermo Scientific)

## 8.12. Oligomery

W badaniach wykorzystano syntetyczne pre-miRNA zamówione w firmie Future Synthesis (**Tabela 3**). Zamówiono następujące oligomery o potencjale inhibitorowym: oligorybonukleotydy 2'-O-metylowane (Future Synthesis), oligomery Morpholino (Gene Tools) i *mirVana* (Thermo Scientific) – **Tabela 4**.

**Tabela 3.** Sekwencje syntetycznych prekursorów miRNA wykorzystanych podczas badań. Pogrubiono sekwencje miRNA.

nazwa	sekwencja 5' → 3'	długość
pre-prv-LLT1	GACGGCUCCUGGGGCUGAAAGCGGCGCUGCGGAUCCCCGC <b>UCUCACCCCU</b> <b>GGGUCCGUCGC</b>	62 nt
pre-prv-LLT2	<b>CUCAUCCCGUCAGACCUGCG</b> CCAUGGAGUUCGAGGACGGGCGCGGGGCAAC GGUGGUGAGAG	62 nt
pre-prv-LLT3	GAGCCGGGGGGGUCGAGUGGGCCUCGCACUUUAC <b>GCGCACACGCCCCUCUC</b> <b>GCGCAC</b>	57 nt

W badaniach wykorzystano także wyznakowany pre-hsa-miR-21 (kolekcja Zakładu Biochemii Rybonukleoprotein IChB PAN).

**Tabela 4.** Sekwencje oligomerów o potencjale inhibitorowym:

nazwa	sekwencja 5' → 3'	długość
2'OMe-LLT1-P	GGGAUCCGCAGCG	13 nt
2'OMe-LLT1-T	GGGUGAGAGCGG	12 nt
2'OMe-LLT2	ACUCCAUGGCGCAGG	15 nt
2'OMe-LLT3	GUGCGCGUAAAGU	13 nt
MO-LLT1	GATCCGCAGCGCCGCTTTCAG	21 nt
MO-LLT2	CGCCCGTCCTGAACTCCATG	21 nt
MO-LLT3	GTAAAGTGCGAGGCCCACTCGACCC	25 nt
mV-LLT1	GCGACGGACCCAGGGGTGAGA	21 nt
mV-LLT2	CGCAGGUCUGACGGGAUGAG	20 nt
mV-LLT3	GUGCGCGAGAGGGGCGUGUGCG	22 nt

## 8.13. Żele poliakrylamidowe

### Żel PAA 8% do elektroforezy SDS-PAGE rozdzielający

4,0 ml 30% mieszaniny akrylamidów + 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 + 0,15 ml 10% SDS + 0,15 ml 10% APS + 9 µl TEMED, dopełnione H<sub>2</sub>O do 15 ml

### Żel PAA 5% do elektroforezy SDS-PAGE zagęszczający

0,83 ml 30% mieszaniny akrylamidów + 0,63 ml 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 + 0,05 ml 10% SDS + 0,05 ml 10% APS + 5 µl TEMED, dopełnione H<sub>2</sub>O do 5 ml

### Żel PAA 15% do elektroforezy RNA w warunkach denaturujących

15% mieszaniny akrylamidów 30%, 7 M mocznik, 1× TBE, katalizatory polimeryzacji: 1 ml 10% APS i 100 µl TEMED na 100 ml żelu

### **Żel PAA 12% do elektroforezy RNA w warunkach natywnych**

12% mieszaniny akrylamidów 30%, 5% glicerol, 1× TBE, katalizatory polimeryzacji: 1 ml 10% APS i 100 µl TEMED na 100 ml żelu

## **8.14. Bufory i roztwory**

**0,1 M CaCl<sub>2</sub>** 1,1 g CaCl<sub>2</sub> rozpuszczono w 100 ml wody destylowanej i jałowiono w autoklawie

### **0,1 M CaCl<sub>2</sub> z 5% glicerolem**

0,11 g CaCl<sub>2</sub> i 500 µl glicerolu rozpuszczono w 10 ml wody destylowanej i jałowiono w autoklawie

### **1% metyloceluloza**

4 g metylocelulozy rozpuszczono w 320ml H<sub>2</sub>O, jałowiono 0,5 h w 121 °C, po czym dodano 40 ml pożywki DMEM 10× stężonej, 25 ml FBS, 12ml NaHCO<sub>4</sub> i 2,8 ml AA

**2 M CaCl<sub>2</sub>** roztwór jałowiono za pomocą filtra 0,22 µm

### **10× stężony bufor elektrodowy do SDS-PAGE**

0,25 M Tris, 1,92 M glicyna, 1% SDS; pH 8,3

### **Bufor A do IPMY**

0,66 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tween 80, 0,1% NaN<sub>3</sub> w PBS; pH 6,8

### **Bufor B do IPMY**

0,66 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tween 80 w PBS; pH 6,8

### **Bufor do elektrotransferu mokrego białek z żelu na membranę**

25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna

### **Bufor do cięcia RNA**

50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl; pH 7,5

### **Bufor do inaktywacji wirusa zewnątrzkomórkowego**

40 mM cytrynian sodu, 10 mM KCl, 135 mM NaCl; pH 3,0

### **Bufor do lizy komórek owadzich Ni100**

50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 0.5% Triton X-100 z inhibitorami proteaz bez EDTA; pH 7,5

### **Bufor do mrożenia komórek ssaczy**

10% DMSO w pożywce EMEM

### **Bufor do mrożenia preparatu hDicer**

30% glicerol, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl; pH 7,5

### **Bufor EMSA (5× stężony)**

250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl; pH 7,5

**Bufor HBS (2× stężony)**

1,63% NaCl, 1,2% HEPES, 0,2% glukoza, 0,0027% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O; pH=7,5; roztwór jałowiono za pomocą filtra 0,22 μm

**Bufor LB I** 10 M mocznik, 0,05% błękit bromofenolowy, 0,05% ksylencyjanol

**Bufor LB II** 50% glicerol, 0,05% błękit bromofenolowy, 0,05% ksylencyjanol

**Bufor lizująco-płuczający Ni100**

50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 0,5% Triton X-100; pH 7,5

**Bufor obciążająco-redukujący SDS-PAGE 4× stężony**

0,25 M Tris-HCl, 8% SDS, 40% glicerol, 0,02% błękit bromofenolowy, 10% β-merkaptoetanol; pH 6,8

**Bufor PBA** bufor PBS + 1% BSA + 0,02% azydek sodu

**Bufor PBS** 137 mM NaCl, 15 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

**Bufor PBS-T** bufor PBS + 1% Tween 20

**Bufor Prot S-100**

100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol, 0,5 mM DTT, 0,2% NP-40, 30 mM HEPES; pH 7,4

**Bufor Q100** 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10% glicerol

**Bufor Q200** 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 10% glicerol

**Bufor Q450** 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 450 mM NaCl, 10% glicerol

**Bufor Q1000** 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1M NaCl, 10% glicerol

**Bufor TAE 50× stężony**

242 g Tris, 100 ml EDTA 0,5 M, 57,1 ml lodowatego kwasu octowego, uzupełniono wodą dejonizowaną do objętości 1 l; pH 8,0

**Bufor TBE** 90 mM Tris, 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA

**Bufor TBS** 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7,4

**Bufor TBS-T** bufor TBS + 0,1% Tween 20

**Bufor TE** 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7,5

**Odbarwiacz do Coomassie**

40% woda, 50% metanol, 10% kwas octowy

**Roztwór 0,1% Coomassie Brilliant Blue**

39,75% wody, 50% metanolu, 10% kwasu octowego, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250

## 8.15. Odczynniki chemiczne i inne materiały

β-merkaptoetanol (POCh)  
Agaroza (Sigma)  
Akrylamid i bis-akrylamid 29:1 (Serva)  
APS (Sigma)  
ATP 100 mM (Thermo)  
Bibuła Whatmanna 3MM (Sigma)  
Błękit bromofenolowy (POCh)  
Błona PVDF (Sigma)  
BSA (Sigma)  
CaCl<sub>2</sub> (POCh)  
CellLytic M (Sigma)  
Chloroform (POCh)  
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)  
DMSO (Sigma)  
EDTA (Sigma)  
Etanol bezwodny 99,8% (POCh)  
FBS (Sigma)  
Glicerol (Sigma)  
Glicyna (Sigma)  
HEPES (Sigma)  
Imidazol (POCh)  
IPTG (Sigma)  
Izopropanol (POCh)  
L-glutamina (Sigma)  
Metanol (POCh)  
Metyloceluloza (Sigma)  
MgCl<sub>2</sub> (Sigma)  
Novex Wedge-Well, żele PAA 4-20% (Thermo Scientific)  
Paraformaldehyd (POCh)  
ProLong Diamond Antifade Mountant DAPI (Life Technologies)  
Retro-Concentin (SBI)  
RNaseOUT (Invitrogen)  
SDS (Sigma)  
Simply Safe (EURx)  
TEMED (Roche)  
Tris (Sigma)  
Triton X-100 (Sigma)  
Trypsyna-EDTA, roztwór 0,25% (Thermo Scientific)  
Tween 20 (POCh)  
Tween 80 (POCh)  
X-gal (Sigma)

## **8.16. Aparatura specjalistyczna**

### **Cytometry przepływowe**

FACSCalibur (Becton Dickinson), z oprogramowaniem CellQuest Pro wersja 5.2.1

Guava easyCyte (Merck), z oprogramowaniem GuavaSoft 3.1.1

### **Fluorescencyjny mikroskop konfokalny**

Leica TCS SP8X z oprogramowaniem Leica Software LasX

### **Skaner materiałów promieniotwórczych**

FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer (FujiFilm)

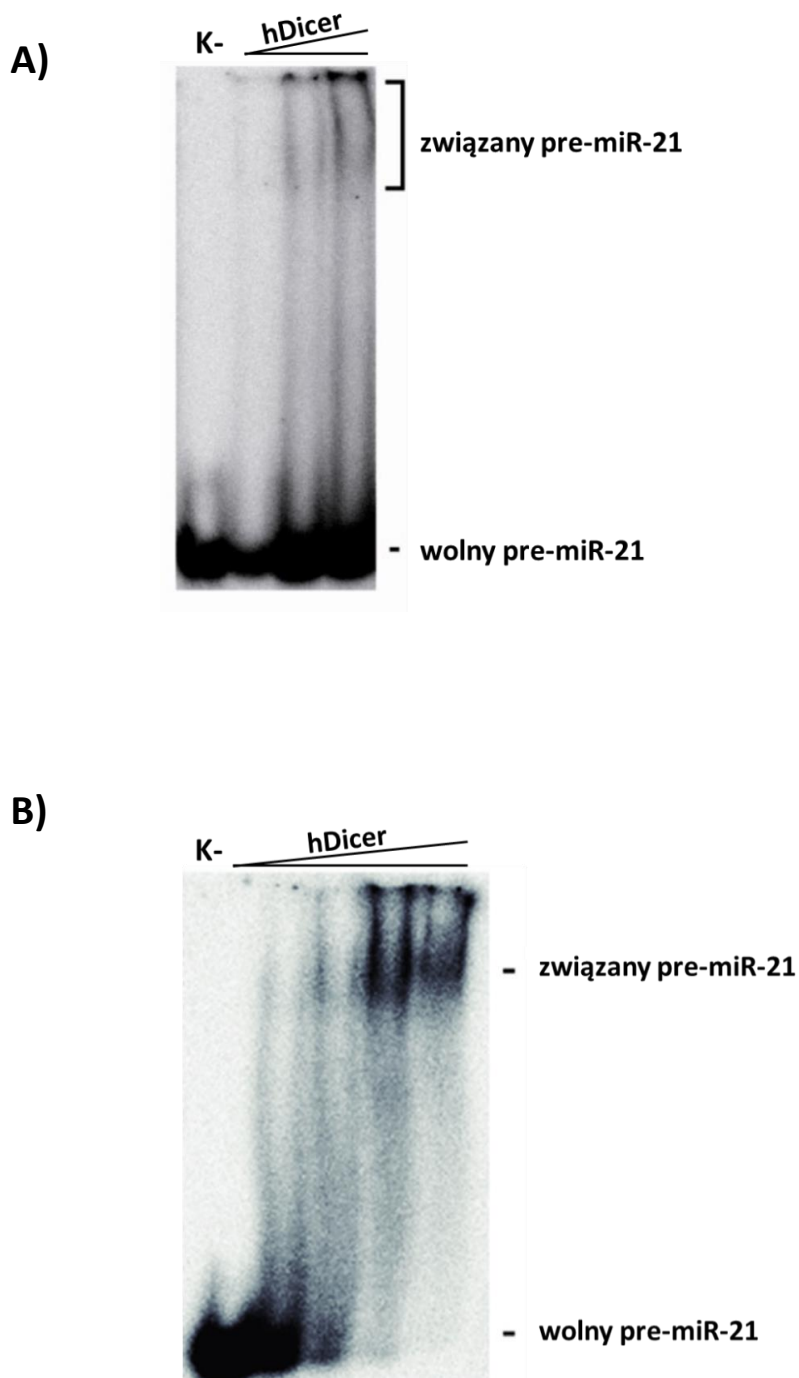
### **Termocyklery do reakcji qPCR**

LightCycler II (Roche)

LightCycler 480 (Roche)

**Ultrawirówka** Beckman Optima (z użyciem rotora uchylnego SW28)

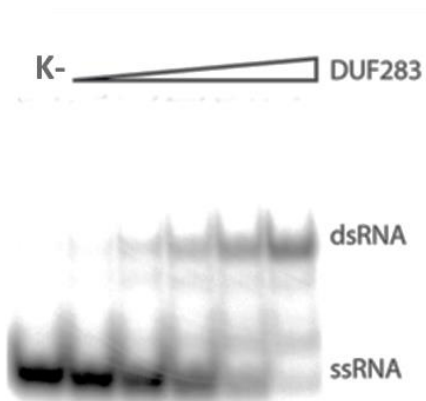
## 9. Załączniki



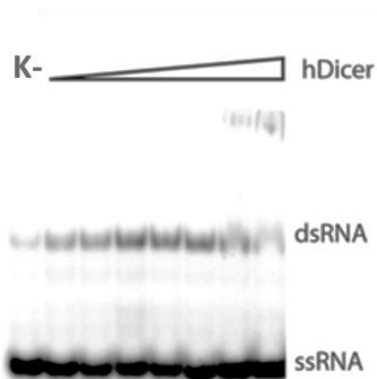
**Załącznik 1. Badanie zdolności preparatów hDicer do wiązania RNA, wykonane metodą EMSA.** pre-hsa-miR-21 został wyznakowany za pomocą radioizotopu  $^{32}\text{P}$ , po czym był inkubowany ze wzrastającą ilością preparatu hDicer: **A)** oczyszczanego jednoetapowo (1, 2,5 i 5  $\mu\text{l}$ ), lub **B)** oczyszczanego dwuetapowo (20, 40, 80, 160 i 650 nM). Mieszaniny reakcyjne rozdzielane były w 5% natywnych żelach PAA. (K-) – kontrole bez enzymu. Na podstawie [Koralewska i in. 2016].



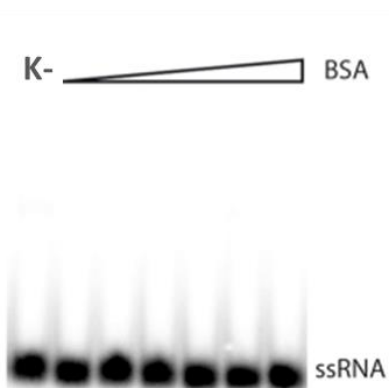
**A)**



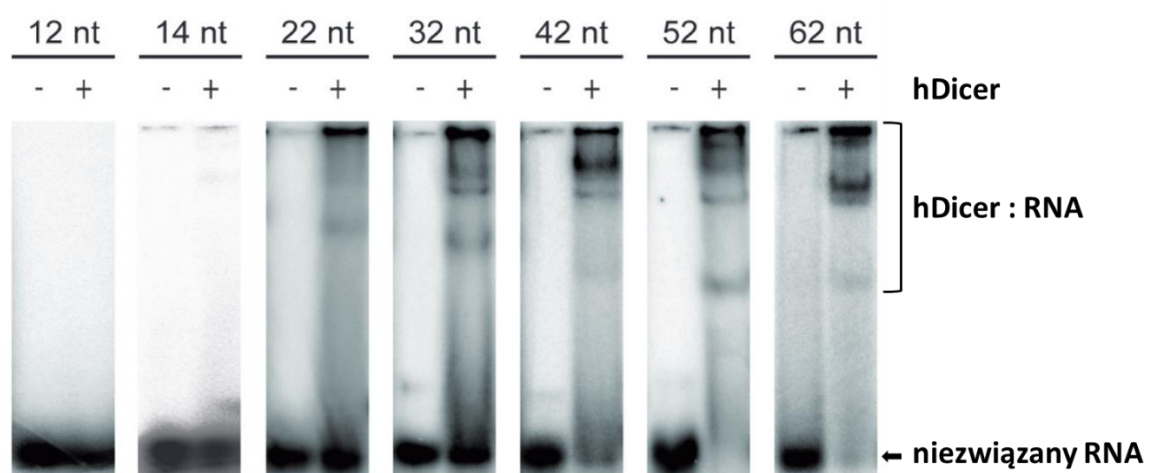
**B)**



**C)**



**Załącznik 2. Domena DUF283 i pełnej długości hDicer wspierają parowanie pomiędzy oligonukleotydami RNA a komplementarnymi sekwencjami obecnymi w dłuższych RNA o strukturze drugorzędowej.** Skany natywnych żeli PAGE obrazujące wyniki reakcji parowania równomolarnych ilości cząsteczek RNA długości 21 i 58 nt w obecności rosnących ilości: **A)** DUF283, **B)** hDicer i **C)** BSA (kontrola negatywna). (K-) – reakcje bez białka. Na podstawie [Kurzyńska-Kokorniak i in. 2016].



**Załącznik 3. Wiązanie pomiędzy hDicer a cząsteczkami ssRNA różnej długości.** Zdolność hDicer do wiązania ssRNA była analizowana za pomocą testu EMSA. Oligorybonukleotydy długości 12 nt, 14 nt, 22 nt, 32 nt, 42 nt, 52 nt i 62 nt zostały wyznakowane radioaktywnym izotopem  $^{32}\text{P}$ , po czym były inkubowane z (+) albo bez (-) hDicer. Na podstawie [Koralewska i in. 2016].

## 10. Bibliografia

1. Abdelhady, A. M., Hirano, Y., Onizuka, K., Okamura, H., Komatsu, Y., & Nagatsugi, F. (2021). Synthesis of crosslinked 2'-OMe RNA duplexes and their application for effective inhibition of miRNA function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 48, 128257.
2. Aderounmu, A. M., Aruscavage, P. J., Kolaczowski, B., & Bass, B. L. (2023). Ancestral protein reconstruction reveals evolutionary events governing variation in Dicer helicase function. *eLife*, 12, e85120. <https://doi.org/10.7554/eLife.85120>
3. Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., & Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 67(4), 657–685. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003>
4. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, 4, e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
5. Akhtar, M. M., Micolucci, L., Islam, M. S., Olivieri, F., & Procopio, A. D. (2016). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic acids research*, 44(1), 24–44. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1221>
6. Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B., & März, L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate journal*, 16(2), 109–123. <https://doi.org/10.1023/a:1026488408951>
7. Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M. J., Tuschl, T., & Margalit, H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic acids research*, 33(8), 2697–2706. <https://doi.org/10.1093/nar/gki567>
8. Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(3), 277–279. <https://doi.org/10.1261/rna.2183803>
9. Anselmo, A., Flori, L., Jaffrezic, F., Rutigliano, T., Cecere, M., Cortes-Perez, N., Lefèvre, F., Rogel-Gaillard, C., & Giuffra, E. (2011). Co-expression of host and viral microRNAs in porcine dendritic cells infected by the pseudorabies virus. *PloS one*, 6(3), e17374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017374>
10. Ban, E., & Song, E. J. (2022). Considerations and Suggestions for the Reliable Analysis of miRNA in Plasma Using qRT-PCR. *Genes*, 13(2), 328. <https://doi.org/10.3390/genes13020328>
11. Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
12. Bartel D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
13. Baumjohann, D., Kageyama, R., Clingan, J. M., Morar, M. M., Patel, S., de Kouchkovsky, D., Bannard, O., Bluestone, J. A., Matloubian, M., Ansel, K. M., & Jeker, L. T. (2013). The microRNA cluster miR-17~92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression. *Nature immunology*, 14(8), 840–848. <https://doi.org/10.1038/ni.2642>
14. Bernier, A., & Sagan, S. M. (2018). The Diverse Roles of microRNAs at the Host-Virus Interface. *Viruses*, 10(8), 440. <https://doi.org/10.3390/v10080440>
15. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
16. Bi, H., Fei, Q., Li, R., Liu, B., Xia, R., Char, S. N., Meyers, B. C., & Yang, B. (2020). Disruption of miRNA sequences by TALENs and CRISPR/Cas9 induces varied lengths of miRNA production. *Plant biotechnology journal*, 18(7), 1526–1536. <https://doi.org/10.1111/pbi.13315>
17. Bloom D. C. (2016). Alphaherpesvirus Latency: A Dynamic State of Transcription and Reactivation. *Advances in virus research*, 94, 53–80. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.10.001>
18. Bogerd, H. P., Karnowski, H. W., Cai, X., Shin, J., Pohlers, M., & Cullen, B. R. (2010). A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs. *Molecular cell*, 37(1), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.016>

19. Boldogkői, Z., Braun, A., & Fodor, I. (2000). Replication and virulence of early protein 0 and long latency transcript deficient mutants of the Aujeszky's disease (pseudorabies) virus. *Microbes Infect.* (2), 1321–1328
20. Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1097–1101.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
21. Brack, A. R., Dijkstra, J. M., Granzow, H., Klupp, B. G., & Mettenleiter, T. C. (1999). Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *Journal of virology*, 73(7), 5364–5372. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.7.5364-5372.1999>
22. Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C. T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., & Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature structural & molecular biology*, 19(12), 1324–1331.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2413>
23. Briskin, D., Wang, P. Y., & Bartel, D. P. (2020). The biochemical basis for the cooperative action of microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(30), 17764–17774. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920404117>
24. Brockmeier, S. L., Lager, K. M., & Mengeling, W. L. (1993). Comparison of in vivo reactivation, in vitro reactivation, and polymerase chain reaction for detection of latent pseudorabies virus infection in swine. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 5(4), 505–509.  
<https://doi.org/10.1177/104063879300500401>
25. Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., & Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular cell*, 64(2), 320–333.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004>
26. Bukhari, S. I. A., Truesdell, S. S., Lee, S., Kollu, S., Classon, A., Boukhali, M., Jain, E., Mortensen, R. D., Yanagiya, A., Sadreyev, R. I., Haas, W., & Vasudevan, S. (2016). A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-Associated MicroRNP in Cellular Quiescence. *Molecular cell*, 61(5), 760–773.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.013>
27. Byrd, A. K., & Raney, K. D. (2012). Superfamily 2 helicases. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17(6), 2070–2088. <https://doi.org/10.2741/4038>
28. Calvo, S. E., Pagliarini, D. J., & Mootha, V. K. (2009). Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7507–7512.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810916106>
29. Cao, W., Stricker, E., Hotz-Wagenblatt, A., Heit-Mondrzyk, A., Pougialis, G., Hugo, A., Kuźmak, J., Materniak-Kornas, M., & Löchelt, M. (2020). Functional Analyses of Bovine Foamy Virus-Encoded miRNAs Reveal the Importance of a Defined miRNA for Virus Replication and Host-Virus Interaction. *Viruses*, 12(11), 1250. <https://doi.org/10.3390/v12111250>
30. Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., & Delucas, L. J. (2007). His-tag impact on structure. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 63(Pt 3), 295–301.  
<https://doi.org/10.1107/S0907444906052024>
31. Ch'ng, T. H., & Enquist, L. W. (2005). Efficient axonal localization of alphaherpesvirus structural proteins in cultured sympathetic neurons requires viral glycoprotein E. *Journal of virology*, 79(14), 8835–8846. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.8835-8846.2005>
32. Chai, C., Zhang, J., Zhou, Y., Yin, H., Zhang, F., Diao, Y., Zan, X., Ma, Y., Wang, Y., Wu, Y., & Wang, W. (2022). The Effects of Oncolytic Pseudorabies Virus Vaccine Strain Inhibited the Growth of Colorectal Cancer HCT-8 Cells In Vitro and In Vivo. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(18), 2416.  
<https://doi.org/10.3390/ani12182416>
33. Chakravarthy, S., Sternberg, S. H., Kellenberger, C. A., & Doudna, J. A. (2010). Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *Journal of molecular biology*, 404(3), 392–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.030>

34. Chang, H., Yi, B., Ma, R., Zhang, X., Zhao, H., & Xi, Y. (2016). CRISPR/cas9, a novel genomic tool to knock down microRNA in vitro and in vivo. *Scientific reports*, 6, 22312. <https://doi.org/10.1038/srep22312>
35. Chang, K. Y., & Ramos, A. (2005). The double-stranded RNA-binding motif, a versatile macromolecular docking platform. *The FEBS journal*, 272(9), 2109–2117. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04652.x>
36. Chaulk, S. G., Thede, G. L., Kent, O. A., Xu, Z., Gesner, E. M., Veldhoen, R. A., Khanna, S. K., Goping, I. S., MacMillan, A. M., Mendell, J. T., Young, H. S., Fahlman, R. P., & Glover, J. N. (2011). Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA biology*, 8(6), 1105–1114. <https://doi.org/10.4161/rna.8.6.17410>
37. Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M., & Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298), 584–589. <https://doi.org/10.1038/nature09092>
38. Chen, J., Li, G., Wan, C., Li, Y., Peng, L., Fang, R., Peng, Y., & Ye, C. (2022). A Comparison of Pseudorabies Virus Latency to Other  $\alpha$ -Herpesvirinae Subfamily Members. *Viruses*, 14(7), 1386. <https://doi.org/10.3390/v14071386>
39. Chen, L., Heikkinen, L., Wang, C., Yang, Y., Sun, H., & Wong, G. (2019). Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Briefings in bioinformatics*, 20(5), 1836–1852. <https://doi.org/10.1093/bib/bby054>
40. Cheng, J. T., Wang, L., Wang, H., Tang, F. R., Cai, W. Q., Sethi, G., Xin, H. W., & Ma, Z. (2019). Insights into Biological Role of LncRNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells*, 8(10), 1178. <https://doi.org/10.3390/cells8101178>
41. Cheung A. K. (1991). Cloning of the latency gene and the early protein 0 gene of pseudorabies virus. *Journal of virology*, 65(10), 5260–5271. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.10.5260-5271.1991>
42. Cheung A. K. (1996). Latency characteristics of an EPO and LLT mutant of pseudorabies virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 8(1), 112–115. <https://doi.org/10.1177/104063879600800119>
43. Cheung, A. K., & Smith, T. A. (1999). Analysis of the latency-associated transcript/UL1-3.5 gene cluster promoter complex of pseudorabies virus. *Archives of virology*, 144(2), 381–391. <https://doi.org/10.1007/s007050050511>
44. Chung, K. H., Hart, C. C., Al-Bassam, S., Avery, A., Taylor, J., Patel, P. D., Vojtek, A. B., & Turner, D. L. (2006). Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic acids research*, 34(7), e53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl143>
45. Churko, J. M., Mantalas, G. L., Snyder, M. P., & Wu, J. C. (2013). Overview of high throughput sequencing technologies to elucidate molecular pathways in cardiovascular diseases. *Circulation research*, 112(12), 1613–1623. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300939>
46. Ciechanowska, K., Pokornowska, M., & Kurzyńska-Kokorniak, A. (2021). Genetic Insight into the Domain Structure and Functions of Dicer-Type Ribonucleases. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 616. <https://doi.org/10.3390/ijms22020616>
47. Cifuentes-Munoz, N., El Najjar, F., & Dutch, R. E. (2020). Viral cell-to-cell spread: Conventional and non-conventional ways. *Advances in virus research*, 108, 85–125. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.09.002>
48. Cliffe, A. R., Garber, D. A., & Knipe, D. M. (2009). Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *Journal of virology*, 83(16), 8182–8190. <https://doi.org/10.1128/JVI.00712-09>
49. Cliffe, A. R., & Wilson, A. C. (2017). Restarting Lytic Gene Transcription at the Onset of Herpes Simplex Virus Reactivation. *Journal of virology*, 91(2), e01419-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01419-16>
50. Contrant, M., Fender, A., Chane-Woon-Ming, B., Randrianjafy, R., Vivet-Boudou, V., Richer, D., & Pfeffer, S. (2014). Importance of the RNA secondary structure for the relative accumulation of clustered viral microRNAs. *Nucleic acids research*, 42(12), 7981–7996. <https://doi.org/10.1093/nar/gku424>

51. Corradi, E., Koralewska, N., Milewski, M., Masante, L., Kierzek, R., Figlerowicz, M., Baudet, M. A. & Kurzyńska-Kokorniak, A. (2023). Short 2'-O-methyl/LNA oligomers as highly-selective inhibitors of miRNA production in vitro and in vivo. *10.1101/2023.06.28.546821*.
52. Crick F. H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 12, 138–163.
53. Cui, C., Griffiths, A., Li, G., Silva, L. M., Kramer, M. F., Gaasterland, T., Wang, X. J., & Coen, D. M. (2006). Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *Journal of virology*, 80(11), 5499–5508. <https://doi.org/10.1128/JVI.00200-06>
54. da Silva, L. F., & Jones, C. (2013). Small non-coding RNAs encoded within the herpes simplex virus type 1 latency associated transcript (LAT) cooperate with the retinoic acid inducible gene I (RIG-I) to induce beta-interferon promoter activity and promote cell survival. *Virus research*, 175(2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.04.005>
55. Dai, W., Su, X., Zhang, B., Wu, K., Zhao, P., & Yan, Z. (2022). An Alternative Class of Targets for microRNAs Containing CG Dinucleotide. *Biology*, 11(3), 478. <https://doi.org/10.3390/biology11030478>
56. Dass, D., Dhotre, K., Chakraborty, M., Nath, A., Banerjee, A., Bagchi, P., & Mukherjee, A. (2023). miRNAs in Herpesvirus Infection: Powerful Regulators in Small Packages. *Viruses*, 15(2), 429. <https://doi.org/10.3390/v15020429>
57. Davison A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Veterinary microbiology*, 143(1), 52–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
58. De Regge, N., Van Opendenbosch, N., Nauwynck, H. J., Efstathiou, S., & Favoreel, H. W. (2010). Interferon alpha induces establishment of alphaherpesvirus latency in sensory neurons in vitro. *PLoS one*, 5(9), e13076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013076>
59. Decman, V., Freeman, M. L., Kinchington, P. R., & Hendricks, R. L. (2005). Immune control of HSV-1 latency. *Viral immunology*, 18(3), 466–473. <https://doi.org/10.1089/vim.2005.18.466>
60. Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
61. Deo, M., Yu, J. Y., Chung, K. H., Tippens, M., & Turner, D. L. (2006). Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(9), 2538–2548. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20847>
62. Deruelle, M. J., Van den Broeke, C., Nauwynck, H. J., Mettenleiter, T. C., & Favoreel, H. W. (2009). Pseudorabies virus US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types. *Virology*, 395(2), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.019>
63. Desvignes, T., Batzel, P., Berezikov, E., Eilbeck, K., Eppig, J. T., McAndrews, M. S., Singer, A., & Postlethwait, J. H. (2015). miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends in genetics : TIG*, 31(11), 613–626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.09.002>
64. Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends in genetics : TIG*, 38(6), 613–626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.02.006>
65. Dingwell, K. S., & Johnson, D. C. (1998). The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *Journal of virology*, 72(11), 8933–8942. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8933-8942.1998>
66. Duan, F., Liao, J., Huang, Q., Nie, Y., & Wu, K. (2012). HSV-1 miR-H6 inhibits HSV-1 replication and IL-6 expression in human corneal epithelial cells in vitro. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 192791. <https://doi.org/10.1155/2012/192791>
67. Dunn J. J. (1976). RNase III cleavage of single-stranded RNA. Effect of ionic strength on the fidelity of cleavage. *The Journal of biological chemistry*, 251(12), 3807–3814.
68. DuRaine, G., & Johnson, D. C. (2021). Anterograde transport of  $\alpha$ -herpesviruses in neuronal axons. *Virology*, 559, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.02.011>
69. Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2010). MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(11), 2043–2050. <https://doi.org/10.1261/rna.2414110>

70. Esau C. C. (2008). Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.001>
71. Fabian, M. R., Cieplak, M. K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T. F., & Sonenberg, N. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature structural & molecular biology*, 18(11), 1211–1217. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2149>
72. Fan, J., Feng, Y., Zhang, R., Zhang, W., Shu, Y., Zeng, Z., Huang, S., Zhang, L., Huang, B., Wu, D., Zhang, B., Wang, X., Lei, Y., Ye, Z., Zhao, L., Cao, D., Yang, L., Chen, X., Liu, B., Wagstaff, W., ... Yan, S. (2020 b). A simplified system for the effective expression and delivery of functional mature microRNAs in mammalian cells. *Cancer gene therapy*, 27(6), 424–437. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0113-y>
73. Fan, D., Wang, M., Cheng, A., Jia, R., Yang, Q., Wu, Y., Zhu, D., Zhao, X., Chen, S., Liu, M., Zhang, S., Ou, X., Mao, S., Gao, Q., Sun, D., Wen, X., Liu, Y., Yu, Y., Zhang, L., Tian, B., ... Chen, X. (2020 a). The Role of VP16 in the Life Cycle of Alphaherpesviruses. *Frontiers in microbiology*, 11, 1910. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01910>
74. Favoreel, H. W., Van Minnebruggen, G., Adriaensen, D., & Nauwynck, H. J. (2005). Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8990–8995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409099102>
75. Feng, Y., Zhang, X., Graves, P., & Zeng, Y. (2012). A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA (New York, N.Y.)*, 18(11), 2083–2092. <https://doi.org/10.1261/rna.033688.112>
76. Ferrari, M., Mettenleiter, T. C., Romanelli, M. G., Cabassi, E., Corradi, A., Dal Mas, N., & Silini, R. (2000). A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. *Journal of comparative pathology*, 123(2-3), 152–163. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0406>
77. Ficinska, J., Van Minnebruggen, G., Nauwynck, H. J., Bienkowska-Szewczyk, K., & Favoreel, H. W. (2005). Pseudorabies virus glycoprotein gD contains a functional endocytosis motif that acts in concert with an endocytosis motif in gB to drive internalization of antibody-antigen complexes from the surface of infected monocytes. *Journal of virology*, 79(11), 7248–7254. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7248-7254.2005>
78. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
79. Fjose, A., Ellingsen, S., Wargelius, A., & Seo, H. C. (2001). RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnology annual review*, 7, 31–57. [https://doi.org/10.1016/s1387-2656\(01\)07032-6](https://doi.org/10.1016/s1387-2656(01)07032-6)
80. Flynn, R. L., & Zou, L. (2010). Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(4), 266–275. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.488216>
81. Friedländer, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W., & Rajewsky, N. (2012). miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic acids research*, 40(1), 37–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr688>
82. Fuchs, W., Klupp, B. G., Granzow, H., Osterrieder, N., & Mettenleiter, T. C. (2002). The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *Journal of virology*, 76(1), 364–378. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.1.364-378.2002>
83. Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C., & Fujiwara, T. (2014). MicroRNAs trigger dissociation of eIF4A1 and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Molecular cell*, 56(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.005>
84. Gebert, L. F. R., & MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(1), 21–37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
85. Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews. Genetics*, 10(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>

86. Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P., & Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5723), 833–838. <https://doi.org/10.1126/science.1109020>
87. Gómez-Sebastián, S., & Tabarés, E. (2004). Negative regulation of herpes simplex virus type 1 ICP4 promoter by IE180 protein of pseudorabies virus. *The Journal of general virology*, 85(Pt 8), 2125–2130. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80119-0>
88. Grabowska, A. K., Lipińska, A. D., Rohde, J., Szewczyk, B., Bienkowska-Szewczyk, K., & Rziha, H. J. (2009). New baculovirus recombinants expressing Pseudorabies virus (PRV) glycoproteins protect mice against lethal challenge infection. *Vaccine*, 27(27), 3584–3591. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.067>
89. Granzow, H., Klupp, B. G., & Mettenleiter, T. C. (2005). Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J Virol*. 79(5):3200-5. doi: 10.1128/JVI.79.5.3200-3205.2005. PMID: 15709042; PMCID: PMC548466.
90. Grauwet, K., Cantoni, C., Parodi, M., De Maria, A., Devriendt, B., Pende, D., Moretta, L., Vitale, M., & Favoreel, H. W. (2014). Modulation of CD112 by the alphaherpesvirus gD protein suppresses DNAM-1-dependent NK cell-mediated lysis of infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16118–16123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409485111>
91. Gredell, J. A., Dittmer, M. J., Wu, M., Chan, C., & Walton, S. P. (2010). Recognition of siRNA asymmetry by TAR RNA binding protein. *Biochemistry*, 49(14), 3148–3155. <https://doi.org/10.1021/bi902189s>
92. Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.022>
93. Griffiths-Jones, S., Hui, J. H., Marco, A., & Ronshaugen, M. (2011). MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO reports*, 12(2), 172–177. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.191>
94. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., & Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7)
95. Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P. N., & Kay, M. A. (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell*, 151(4), 900–911. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.042>
96. Hackenberg, M., Rodríguez-Ezpeleta, N., & Aransay, A. M. (2011). miRanalyzer: an update on the detection and analysis of microRNAs in high-throughput sequencing experiments. *Nucleic acids research*, 39(Web Server issue), W132–W138. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr247>
97. Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*, 18(24), 3016–3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
98. Han, R., Yan, Y., Zhou, P., & Zhao, H. X. (2014). Comparison of Two MicroRNA Quantification Methods for Assaying MicroRNA Expression Profiles in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Integrative Agriculture*, 13(4), 733-740. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60362-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60362-7)
99. Han, X., Sun, J., Lv, X., Tang, X., Zheng, Y., Ma, J., & Sun, Y. (2023). A Recombinant Oncolytic Pseudorabies Virus Expressing Interleukin-18, Interferon-Gamma and PH20 Genes Promotes Systemic Antitumor Immunity. *Microorganisms*, 11(7), 1850. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071850>
100. Harold, C., Cox, D., & Riley, K. J. (2016). Epstein-Barr viral microRNAs target caspase 3. *Virology journal*, 13(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0602-7>
101. Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M. J., Park, J. E., Kwon, S. C., Chang, H., & Kim, V. N. (2012). Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell*, 151(3), 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.022>
102. Herrera-Carrillo, E., Liu, Y. P., & Berkhout, B. (2017). Improving miRNA Delivery by Optimizing miRNA Expression Cassettes in Diverse Virus Vectors. *Human gene therapy methods*, 28(4), 177–190. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2017.036>



103. Hogue, I. B., Bosse, J. B., Hu, J. R., Thiberge, S. Y., & Enquist, L. W. (2014). Cellular mechanisms of alpha herpesvirus egress: live cell fluorescence microscopy of pseudorabies virus exocytosis. *PLoS pathogens*, 10(12), e1004535. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004535>
104. Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. (2012). Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 35(20), 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>
105. Hopkins, R., & Esposito, D. (2009). A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. *BioTechniques*, 47(3), 785–788. <https://doi.org/10.2144/000113238>
106. Hsu, C. Y., Yi, Y. H., Chang, K. P., Chang, Y. S., Chen, S. J., & Chen, H. C. (2014). The Epstein-Barr virus-encoded microRNA MiR-BART9 promotes tumor metastasis by targeting E-cadherin in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS pathogens*, 10(2), e1003974. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003974>
107. <https://www.bachem.com/knowledge-center/peptide-calculator/>
108. Huang, R., Zhou, X., Ren, S., Liu, X., Han, Z., & Zhou, G. G. (2019). Effect of Loss-of-function of the Herpes Simplex Virus-1 microRNA H6-5p on Virus Replication. *Virologica Sinica*, 34(4), 386–396. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00111-6>
109. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
110. Hutvagner, G., Simard, M. J., Mello, C. C., & Zamore, P. D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS biology*, 2(4), E98. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020098>
111. Ibáñez, F. J., Farías, M. A., Gonzalez-Troncoso, M. P., Corrales, N., Duarte, L. F., Retamal-Díaz, A., & González, P. A. (2018). Experimental Dissection of the Lytic Replication Cycles of Herpes Simplex Viruses in vitro. *Frontiers in microbiology*, 9, 2406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02406>
112. Jaber, T., Workman, A., & Jones, C. (2010). Small noncoding RNAs encoded within the bovine herpesvirus 1 latency-related gene can reduce steady-state levels of infected cell protein 0 (bICP0). *Journal of virology*, 84(13), 6297–6307. <https://doi.org/10.1128/JVI.02639-09>
113. Jacobs L. (1994). Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. *Archives of virology*, 137(3-4), 209–228. <https://doi.org/10.1007/BF01309470>
114. Jadhav, V., Hackl, M., Klanert, G., Hernandez Bort, J. A., Kunert, R., Grillari, J., & Borth, N. (2014). Stable overexpression of miR-17 enhances recombinant protein production of CHO cells. *Journal of biotechnology*, 175(100), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.01.032>
115. Javier, R. T., Stevens, J. G., Dissette, V. B., & Wagner, E. K. (1988). A herpes simplex virus transcript abundant in latently infected neurons is dispensable for establishment of the latent state. *Virology*, 166(1), 254–257. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90169-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90169-9)
116. Jha, A., & Shankar, R. (2013). miReader: Discovering Novel miRNAs in Species without Sequenced Genome. *PloS one*, 8(6), e66857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066857>
117. Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S. R., Macauley, M. S., Rickert, R. C., & Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA Mimics Should Be Used with Caution. *Frontiers in genetics*, 6, 340. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00340>
118. Jin, L., Schnitzlein, W. M., & Scherba, G. (2000). Identification of the pseudorabies virus promoter required for latency-associated transcript gene expression in the natural host. *Journal of virology*, 74(14), 6333–6338. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6333-6338.2000>
119. Jo, M. H., Shin, S., Jung, S. R., Kim, E., Song, J. J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular cell*, 59(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.027>
120. Johnson, D. C., & Huber, M. T. (2002). Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *Journal of virology*, 76(1), 1–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.1.1-8.2002>
121. Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5740), 1577–1581. <https://doi.org/10.1126/science.1113329>
122. Jungbauer, A., & Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography. *Methods in enzymology*, 463, 349–371. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63022-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63022-6)

123. Kaneko, H., Dridi, S., Tarallo, V., Gelfand, B. D., Fowler, B. J., Cho, W. G., Kleinman, M. E., Ponicsan, S. L., Hauswirth, W. W., Chiodo, V. A., Karikó, K., Yoo, J. W., Lee, D. K., Hadziahmetovic, M., Song, Y., Misra, S., Chaudhuri, G., Buas, F. W., Braun, R. E., Hinton, D. R., ... Ambati, J. (2011). DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*, 471(7338), 325–330. <https://doi.org/10.1038/nature09830>
124. Kaur, H., Arora, A., Wengel, J., & Maiti, S. (2006). Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry*, 45(23), 7347–7355. <https://doi.org/10.1021/bi060307w>
125. Kennedy, E. M., Whisnant, A. W., Kornepati, A. V., Marshall, J. B., Bogerd, H. P., & Cullen, B. R. (2015). Production of functional small interfering RNAs by an amino-terminal deletion mutant of human Dicer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(50), E6945–E6954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513421112>
126. Kent, J. R., Zeng, P. Y., Atanasiu, D., Gardner, J., Fraser, N. W., & Berger, S. L. (2004). During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *Journal of virology*, 78(18), 10178–10186. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10178-10186.2004>
127. Ketting R. F. (2011). The many faces of RNAi. *Developmental cell*, 20(2), 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.012>
128. Kilikevicius, A., Meister, G., & Corey, D. R. (2022). Reexamining assumptions about miRNA-guided gene silencing. *Nucleic acids research*, 50(2), 617–634. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1256>
129. Kim, B., Jeong, K., & Kim, V. N. (2017). Genome-wide Mapping of DROSHA Cleavage Sites on Primary MicroRNAs and Noncanonical Substrates. *Molecular cell*, 66(2), 258–269.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.013>
130. Kim, Y. K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*, 26(3), 775–783. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512>
131. Kloosterman, W. P., Lagendijk, A. K., Ketting, R. F., Moulton, J. D., & Plasterk, R. H. (2007). Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS biology*, 5(8), e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050203>
132. Klopfeisch, R., Teifke, J. P., Fuchs, W., Kopp, M., Klupp, B. G., & Mettenleiter, T. C. (2004). Influence of tegument proteins of pseudorabies virus on neuroinvasion and transneuronal spread in the nervous system of adult mice after intranasal inoculation. *Journal of virology*, 78(6), 2956–2966. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.6.2956-2966.2004>
133. Klupp, B. G., Hengartner, C. J., Mettenleiter, T. C., & Enquist, L. W. (2004). Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *Journal of virology*, 78(1), 424–440. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.1.424-440.2004>
134. Kok, K. H., Ng, M. H., Ching, Y. P., & Jin, D. Y. (2007). Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *The Journal of biological chemistry*, 282(24), 17649–17657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611768200>
135. Koralewska, N., Ciechanowska, K., Pokornowska, M., Figlerowicz, M., & Kurzyńska-Kokorniak, A. (2019). Ludzka rybonukleaza Dicer – struktura i funkcje biologiczne [Human ribonuclease Dicer – structure and functions]. *Postepy biochemii*, 65(3), 173–182. [https://doi.org/10.18388/pb.2019\\_267](https://doi.org/10.18388/pb.2019_267)
136. Koralewska, N., Hoffmann, W., Pokornowska, M., Milewski, M., Lipinska, A., Bienkowska-Szewczyk, K., Figlerowicz, M., & Kurzyńska-Kokorniak, A. (2016). How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing. *Acta biochimica Polonica*, 63(4), 773–783. [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1339](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1339)
137. Koyuncu, O. O., Perlman, D. H., & Enquist, L. W. (2013). Efficient retrograde transport of pseudorabies virus within neurons requires local protein synthesis in axons. *Cell host & microbe*, 13(1), 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.021>
138. Kramer, T., Greco, T. M., Enquist, L. W., & Cristea, I. M. (2011). Proteomic characterization of pseudorabies virus extracellular virions. *Journal of virology*, 85(13), 6427–6441. <https://doi.org/10.1128/JVI.02253-10>

139. Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438(7068), 685–689. <https://doi.org/10.1038/nature04303>
140. Kurzynska-Kokorniak, A., Koralewska, N., Tyczewska, A., Twardowski, T., & Figlerowicz, M. (2013). A new short oligonucleotide-based strategy for the precursor-specific regulation of microRNA processing by dicer. *PloS one*, 8(10), e77703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077703>
141. Kurzynska-Kokorniak, A., Pokornowska, M., Koralewska, N., Hoffmann, W., Bienkowska-Szewczyk, K., & Figlerowicz, M. (2016). Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro. *Scientific reports*, 6, 23989. <https://doi.org/10.1038/srep23989>
142. Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bhandari, D., Huntzinger, E., Fauser, M., Helms, S., & Izaurralde, E. (2016). miRISC and the CCR4-NOT complex silence mRNA targets independently of 43S ribosomal scanning. *The EMBO journal*, 35(11), 1186–1203. <https://doi.org/10.15252/embj.201592901>
143. Laval, K., & Enquist, L. W. (2020). The Neuropathic Itch Caused by Pseudorabies Virus. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(4), 254. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040254>
144. Laval, K., Van Cleemput, J., Vernejoul, J. B., & Enquist, L. W. (2019). Alpha herpesvirus infection of mice primes PNS neurons to an inflammatory state regulated by TLR2 and type I IFN signaling. *PLoS pathogens*, 15(11), e1008087. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008087>
145. Lee, H. Y., Zhou, K., Smith, A. M., Noland, C. L., & Doudna, J. A. (2013). Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic acids research*, 41(13), 6568–6576. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt361>
146. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
147. Lee, Y. Y., Lee, H., Kim, H., Kim, V. N., & Roh, S. H. (2023). Structure of the human DICER-pre-miRNA complex in a dicing state. *Nature*, 615(7951), 331–338. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05723-3>
148. Lennox, K. A., Vakulskas, C. A., & Behlke, M. A. (2017). Non-nucleotide Modification of Anti-miRNA Oligonucleotides. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1517, 51–69. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6563-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6563-2_3)
149. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7), 787–798. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01018-3)
150. Li, Y., Zheng, G., Zhang, Y., Yang, X., Liu, H., Chang, H., Wang, X., Zhao, J., Wang, C., & Chen, L. (2017). MicroRNA analysis in mouse neuro-2a cells after pseudorabies virus infection. *Journal of neurovirology*, 23(3), 430–440. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0511-y>
151. Li, Z., & Rana, T. M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(8), 622–638. <https://doi.org/10.1038/nrd4359>
152. Liang, X. H., Hart, C. E., & Crooke, S. T. (2013). Transfection of siRNAs can alter miRNA levels and trigger non-specific protein degradation in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(5), 455–468. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.011>
153. Licari, P., & Bailey, J. E. (1991). Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: multiplicity of infection and intracellular protein degradation. *Biotechnology and bioengineering*, 37(3), 238–246. <https://doi.org/10.1002/bit.260370306>
154. Lim, K. H., Han, Z., Jeon, H. Y., Kach, J., Jing, E., Weyn-Vanhentenryck, S., Downs, M., Corriero, A., Oh, R., Scharner, J., Venkatesh, A., Ji, S., Liao, G., Ticho, B., Nash, H., & Aznarez, I. (2020). Antisense oligonucleotide modulation of non-productive alternative splicing upregulates gene expression. *Nature communications*, 11(1), 3501. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17093-9>
155. Lima, W. F., Murray, H., Nichols, J. G., Wu, H., Sun, H., Prakash, T. P., Berdeja, A. R., Gaus, H. J., & Crooke, S. T. (2009). Human Dicer binds short single-strand and double-strand RNA with high affinity and interacts with different regions of the nucleic acids. *The Journal of biological chemistry*, 284(4), 2535–2548. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803748200>
156. Lin, H. W., Hsu, W. L., Chang, Y. Y., Jan, M. S., Wong, M. L., & Chang, T. J. (2010). Role of the UL41 protein of pseudorabies virus in host shutoff, pathogenesis and induction of TNF- $\alpha$  expression. *The Journal of veterinary medical science*, 72(9), 1179–1187. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0059>

157. Lin, X., Liang, D., He, Z., Deng, Q., Robertson, E. S., & Lan, K. (2011). miR-K12-7-5p encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stabilizes the latent state by targeting viral ORF50/RTA. *PLoS one*, 6(1), e16224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016224>
158. Liu, C. G., Calin, G. A., Meloon, B., Gamiel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., Alder, H., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C. M. (2004 b). An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9740–9744. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403293101>
159. Liu, F., Zheng, H., Tong, W., Li, G. X., Tian, Q., Liang, C., Li, L. W., Zheng, X. C., & Tong, G. Z. (2016). Identification and Analysis of Novel Viral and Host Dysregulated MicroRNAs in Variant Pseudorabies Virus-Infected PK15 Cells. *PLoS one*, 11(3), e0151546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151546>
160. Liu, G., Yang, D., Rupaimoole, R., Pecot, C. V., Sun, Y., Mangala, L. S., Li, X., Ji, P., Cogdell, D., Hu, L., Wang, Y., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Shmulevich, I., De Cecco, L., Chen, K., Mezzanzanica, D., Xue, F., Sood, A. K., & Zhang, W. (2015). Augmentation of response to chemotherapy by microRNA-506 through regulation of RAD51 in serous ovarian cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), djv108. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv108>
161. Liu, H., Yang, L., Shi, Z., Lv, R., Yang, X., Wang, C., Chen, L., & Chang, H. (2019). Functional analysis of prv-miR-LLT11a encoded by pseudorabies virus. *Journal of veterinary science*, 20(6), e68. <https://doi.org/10.4142/jvs.2019.20.e68>
162. Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004 a). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689), 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
163. Liu, Y. P., & Berkhout, B. (2011). miRNA cassettes in viral vectors: problems and solutions. *Biochimica et biophysica acta*, 1809(11-12), 732–745. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.05.014>
164. Liu, Z., Wang, J., Cheng, H., Ke, X., Sun, L., Zhang, Q. C., & Wang, H. W. (2018). Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate. *Cell*, 173(5), 1191–1203.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.080>
165. Lodge, R., Ferreira Barbosa, J. A., Lombard-Vadnais, F., Gilmore, J. C., Deshiere, A., Gosselin, A., Wiche Salinas, T. R., Bego, M. G., Power, C., Routy, J. P., Ancuta, P., Tremblay, M. J., & Cohen, É. A. (2017). Host MicroRNAs-221 and -222 Inhibit HIV-1 Entry in Macrophages by Targeting the CD4 Viral Receptor. *Cell reports*, 21(1), 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.030>
166. Lopes, C., & Rego, A. C. (2017). Revisiting Mitochondrial Function and Metabolism in Pluripotent Stem Cells: Where Do We Stand in Neurological Diseases?. *Molecular neurobiology*, 54(3), 1858–1873. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9714-8>
167. Loughran, S. T., Bree, R. T., & Walls, D. (2017). Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins. *Methods Mol Biol*, 1485:275-303. doi:10.1007/978-1-4939-6412-3\_14
168. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), 95–98. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>
169. Ma, C., Song, H., Guan, K., Zhou, J., Xia, X., & Li, F. (2016). Characterization of swine testicular cell line as immature porcine Sertoli cell line. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 52(4), 427–433. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9994-8>
170. Ma, E., MacRae, I. J., Kirsch, J. F., & Doudna, J. A. (2008). Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *Journal of molecular biology*, 380(1), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.005>
171. Mahjoub, N., Dhorne-Pollet, S., Fuchs, W., Endale Ahanda, M. L., Lange, E., Klupp, B., Arya, A., Loveland, J. E., Lefevre, F., Mettenleiter, T. C., & Giuffra, E. (2015). A 2.5-kilobase deletion containing a cluster of nine microRNAs in the latency-associated-transcript locus of the pseudorabies virus affects the host response of porcine trigeminal ganglia during established latency. *Journal of virology*, 89(1), 428–442. <https://doi.org/10.1128/JVI.02181-14>
172. Maroui, M. A., Callé, A., Cohen, C., Streichenberger, N., Texier, P., Takissian, J., Rousseau, A., Pocard, N., Welsch, J., Corpet, A., Schaeffer, L., Labetoulle, M., & Lomonte, P. (2016). Latency Entry of Herpes Simplex Virus 1 Is Determined by the Interaction of Its Genome with the Nuclear Environment. *PLoS pathogens*, 12(9), e1005834. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005834>

173. Marquitz, A. R., Mathur, A., Nam, C. S., & Raab-Traub, N. (2011). The Epstein-Barr Virus BART microRNAs target the pro-apoptotic protein Bim. *Virology*, 412(2), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.028>
174. Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T., Parenti, A. R., Daidone, M. G., Bicciato, S., & Piccolo, S. (2010). A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*, 141(7), 1195–1207. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.017>
175. Marzi, M. J., Ghini, F., Cerruti, B., de Pretis, S., Bonetti, P., Giacomelli, C., Gorski, M. M., Kress, T., Pelizzola, M., Muller, H., Amati, B., & Nicassio, F. (2016). Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome research*, 26(4), 554–565. <https://doi.org/10.1101/gr.198788.115>
176. Masliah, G., Barraud, P., & Allain, F. H. (2013). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(11), 1875–1895. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1119-x>
177. Mathijs, E., Vandenbussche, F., Verpoest, S., De Regge, N., & Van Borm, S. (2016). Complete Genome Sequence of Pseudorabies Virus Reference Strain NIA3 Using Single-Molecule Real-Time Sequencing. *Genome announcements*, 4(3), e00440-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00440-16>
178. Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., & Sonenberg, N. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5845), 1764–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1146067>
179. Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., & Filipowicz, W. (2014). Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Molecular cell*, 54(5), 751–765. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.036>
180. McGregor, S., Easterday, B. C., Kaplan, A. S., & Ben-Porat, T. (1985). Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus. *American journal of veterinary research*, 46(7), 1494–1497.
181. Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 12(3), e1627. <https://doi.org/10.1002/wrna.1627>
182. Meijer, H. A., Smith, E. M., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?. *Biochemical Society transactions*, 42(4), 1135–1140. <https://doi.org/10.1042/BST20140142>
183. Mendell, J. T., & Olson, E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148(6), 1172–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.005>
184. Mestdagh, P., Boström, A. K., Impens, F., Fredlund, E., Van Peer, G., De Antonellis, P., von Stedingk, K., Ghesquière, B., Schulte, S., Dews, M., Thomas-Tikhonenko, A., Schulte, J. H., Zollo, M., Schramm, A., Gevaert, K., Axelson, H., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2010). The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- $\beta$  pathway in neuroblastoma. *Molecular cell*, 40(5), 762–773. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.038>
185. Metpally, R. P., Nasser, S., Malenica, I., Courtright, A., Carlson, E., Ghaffari, L., Villa, S., Tembe, W., & Van Keuren-Jensen, K. (2013). Comparison of Analysis Tools for miRNA High Throughput Sequencing Using Nerve Crush as a Model. *Frontiers in genetics*, 4, 20. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00020>
186. Mettenleiter T. C. (1991). Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 14(2), 151–163. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(91\)90128-z](https://doi.org/10.1016/0147-9571(91)90128-z)
187. Mettenleiter T. C. (2000). Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Veterinary research*, 31(1), 99–115. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000110>
188. Mie, Y., Hirano, Y., Kowata, K., Nakamura, A., Yasunaga, M., Nakajima, Y., & Komatsu, Y. (2018). Function Control of Anti-microRNA Oligonucleotides Using Interstrand Cross-Linked Duplexes. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 10, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.11.003>
189. Milewski, M. C., Kamel, K., Kurzynska-Kokorniak, A., Chmielewski, M. K., & Figlerowicz, M. (2017). EvOligo: A Novel Software to Design and Group Libraries of Oligonucleotides Applicable for Nucleic

- Acid-Based Experiments. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 24(10), 1014–1028. <https://doi.org/10.1089/cmb.2016.0154>
190. Mishra, R., Kumar, A., Ingle, H., & Kumar, H. (2020). The Interplay Between Viral-Derived miRNAs and Host Immunity During Infection. *Frontiers in immunology*, 10, 3079. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03079>
191. Mohebbi, M., Ding, L., Malmberg, R. L., & Cai, L. (2021). Human MicroRNA Target Prediction via Multi-Hypotheses Learning. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 28(2), 117–132. <https://doi.org/10.1089/cmb.2020.0227>
192. Moriuchi, H., Moriuchi, M., Dean, H., Cheung, A. K., & Cohen, J. I. (1995). Pseudorabies virus EPO is functionally homologous to varicella-zoster virus ORF61 protein and herpes simplex virus type 1 ICPO. *Virology*, 209(1), 281–283. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1256>
193. Morin, R. D., O'Connor, M. D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A. L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., Eaves, C. J., & Marra, M. A. (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome research*, 18(4), 610–621. <https://doi.org/10.1101/gr.7179508>
194. Moulton J. D. (2007). Using morpholinos to control gene expression. *Current protocols in nucleic acid chemistry*, Chapter 4(1), 4301–4.30. <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0430s27>
195. Moumné, L., Marie, A. C., & Crouvezier, N. (2022). Oligonucleotide Therapeutics: From Discovery and Development to Patentability. *Pharmaceutics*, 14(2), 260. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020260>
196. Mu, P., Han, Y. C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogrodowski, P., de Stanchina, E., D'Andrea, A., Sander, C., & Ventura, A. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes & development*, 23(24), 2806–2811. <https://doi.org/10.1101/gad.1872909>
197. Müller, T., Hahn, E. C., Tottewitz, F., Kramer, M., Klupp, B. G., Mettenleiter, T. C., & Freuling, C. (2011). Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective. *Archives of virology*, 156(10), 1691–1705. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1080-2>
198. Murchison, E. P., Partridge, J. F., Tam, O. H., Cheloufi, S., & Hannon, G. J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12135–12140. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505479102>
199. Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., & Mandelboim, O. (2009). Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell host & microbe*, 5(4), 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.003>
200. Nanbo, A., Furuyama, W., & Lin, Z. (2021). RNA Virus-Encoded miRNAs: Current Insights and Future Challenges. *Frontiers in microbiology*, 12, 679210. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679210>
201. Nguyen, T. A., Jo, M. H., Choi, Y. G., Park, J., Kwon, S. C., Hohng, S., Kim, V. N., & Woo, J. S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*, 161(6), 1374–1387. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.010>
202. Nicholson A. W. (2014). Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 5(1), 31–48. <https://doi.org/10.1002/wrna.1195>
203. Nielsen, C. T., Goodall, G. J., & Bracken, C. P. (2012). IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends in genetics : TIG*, 28(11), 544–549. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.07.005>
204. Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., & Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5957), 1275–1279. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>
205. Okumura, S., Hirano, Y., & Komatsu, Y. (2021). Stable duplex-linked antisense targeting miR-148a inhibits breast cancer cell proliferation. *Scientific reports*, 11(1), 11467. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90972-3>
206. Olejniczak, M., Urbanek, M. O., Jaworska, E., Witucki, L., Szczesniak, M. W., Makalowska, I., & Krzyzosiak, W. J. (2016). Sequence-non-specific effects generated by various types of RNA interference triggers. *Biochimica et biophysica acta*, 1859(2), 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.11.005>

207. Ono, E., Watanabe, S., Nikami, H., Tasaki, T., & Kida, H. (1998). Pseudorabies virus (PRV) early protein 0 activates PRV gene transcription in combination with the immediate-early protein IE180 and enhances the infectivity of PRV genomic DNA. *Veterinary microbiology*, 63(2-4), 99–107. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00236-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00236-3)
208. Ota, H., Sakurai, M., Gupta, R., Valente, L., Wulff, B. E., Ariyoshi, K., Iizasa, H., Davuluri, R. V., & Nishikura, K. (2013). ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing. *Cell*, 153(3), 575–589. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.024>
209. Ou, C. J., Wong, M. L., Huang, C., & Chang, T. J. (2002). Suppression of promoter activity of the LAT gene by IE180 of pseudorabies virus. *Virus genes*, 25(3), 227–239. <https://doi.org/10.1023/a:1020959521745>
210. Owen, D. J., Crump, C. M., & Graham, S. C. (2015). Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses*, 7(9), 5084–5114. <https://doi.org/10.3390/v7092861>
211. Pagoni, M., Cava, C., Sideris, D. C., Avgeris, M., Zoumpourlis, V., Michalopoulos, I., & Drakoulis, N. (2023). miRNA-Based Technologies in Cancer Therapy. *Journal of personalized medicine*, 13(11), 1586. <https://doi.org/10.3390/jpm13111586>
212. Pan, L., Li, M., Zhang, X., Xia, Y., Mian, A. M., Wu, H., Sun, Y., & Qiu, H. J. (2023). Establishment of an In Vitro Model of Pseudorabies Virus Latency and Reactivation and Identification of Key Viral Latency-Associated Genes. *Viruses*, 15(3), 808. <https://doi.org/10.3390/v15030808>
213. Park, T. S., Abate-Daga, D., Zhang, L., Zheng, Z., & Morgan, R. A. (2014). Gamma-retroviral vector design for the co-expression of artificial microRNAs and therapeutic proteins. *Nucleic acid therapeutics*, 24(5), 356–363. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0486>
214. Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R. S., Malakar, A. K., & Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2007–2018. <https://doi.org/10.1002/jcp.25854>
215. Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B. D., Rice, C. M., Simon, V., Ho, D. D., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods*, 2(4), 269–276. <https://doi.org/10.1038/nmeth746>
216. Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., & Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5671), 734–736. <https://doi.org/10.1126/science.1096781>
217. Pokornowska, M., Milewski, M. C., Ciechanowska, K., Szczepańska, A., Wojnicka, M., Radogostowicz, Z., Figlerowicz, M., & Kurzynska-Kokorniak, A. (2020). The RNA-RNA base pairing potential of human Dicer and Ago2 proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 77(16), 3231–3244. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03344-6>
218. Pomeranz, L. E., Reynolds, A. E., & Hengartner, C. J. (2005). Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 69(3), 462–500. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.3.462-500.2005>
219. Pong, S. K., & Gullerova, M. (2018). Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes - Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins. *FEBS letters*, 592(17), 2973–2986. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13196>
220. Pratt, Z. L., Kuzembayeva, M., Sengupta, S., & Sugden, B. (2009). The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology*, 386(2), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.006>
221. Prinz, F., Jonas, K., Balihodzic, A., Klec, C., Reicher, A., Barth, D. A., Riedl, J., Gerger, A., Kiesslich, T., Mayr, C., Rinner, B., Kargl, J., & Pichler, M. (2022). MicroRNA mimics can distort physiological microRNA effects on immune checkpoints by triggering an antiviral interferon response. *RNA biology*, 19(1), 1305–1315. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2152978>
222. Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B., & Rådmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *The EMBO journal*, 21(21), 5864–5874. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf578>
223. Quévillon Huberdeau, M., & Simard, M. J. (2019). A guide to microRNA-mediated gene silencing. *The FEBS journal*, 286(4), 642–652. <https://doi.org/10.1111/febs.14666>

224. Quint, W., Gielkens, A., Van Oirschot, J., Berns, A., & Cuypers, H. T. (1987). Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of 'live' vaccines. *The Journal of general virology*, 68 ( Pt 2), 523–534. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-2-523>
225. Raja, P., Lee, J. S., Pan, D., Pesola, J. M., Coen, D. M., & Knipe, D. M. (2016). A Herpesviral Lytic Protein Regulates the Structure of Latent Viral Chromatin. *mBio*, 7(3), e00633-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00633-16>
226. Rajkowitsch, L., Chen, D., Stampfl, S., Semrad, K., Waldsich, C., Mayer, O., Jantsch, M. F., Konrat, R., Bläsi, U., & Schroeder, R. (2007). RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA biology*, 4(3), 118–130. <https://doi.org/10.4161/rna.4.3.5445>
227. Reuter, J. S., Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, 11:129.
228. Riolo, G., Cantara, S., Marzocchi, C., & Ricci, C. (2020). miRNA Targets: From Prediction Tools to Experimental Validation. *Methods and protocols*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.3390/mps4010001>
229. Ritchie, W., Legendre, M., & Gautheret, D. (2007). RNA stem-loops: to be or not to be cleaved by RNase III. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(4), 457–462. <https://doi.org/10.1261/rna.366507>
230. Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature structural & molecular biology*, 12(4), 340–349. <https://doi.org/10.1038/nsmb918>
231. Robb, G. B., & Rana, T. M. (2007). RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Molecular cell*, 26(4), 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.016>
232. Romero, N., Van Waesberghe, C., & Favoreel, H. W. (2020). Pseudorabies Virus Infection of Epithelial Cells Leads to Persistent but Aberrant Activation of the NF-κB Pathway, Inhibiting Hallmark NF-κB-Induced Proinflammatory Gene Expression. *Journal of virology*, 94(10), e00196-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00196-20>
233. Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), 83–86. <https://doi.org/10.1038/nature05983>
234. Sainz, B., Jr, & Halford, W. P. (2002). Alpha/Beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *Journal of virology*, 76(22), 11541–11550. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11541-11550.2002>
235. Salem, O., Erdem, N., Jung, J., Münstermann, E., Wörner, A., Wilhelm, H., Wiemann, S., & Körner, C. (2016). The highly expressed 5'isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration. *BMC genomics*, 17, 566. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2869-x>
236. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
237. Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
238. Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
239. Sazani, P., Kang, S. H., Maier, M. A., Wei, C., Dillman, J., Summerton, J., Manoharan, M., & Kole, R. (2001). Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic acids research*, 29(19), 3965–3974. <https://doi.org/10.1093/nar/29.19.3965>
240. Scott, M. S., Avolio, F., Ono, M., Lamond, A. I., & Barton, G. J. (2009). Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features. *PLoS computational biology*, 5(9), e1000507. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000507>
241. Sehl, J., Hölper, J. E., Klupp, B. G., Baumbach, C., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2020). An improved animal model for herpesvirus encephalitis in humans. *PLoS pathogens*, 16(3), e1008445. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008445>
242. Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), 58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>



243. Shang, R., Kretov, D. A., Adamson, S. I., Treiber, T., Treiber, N., Vedanayagam, J., Chuang, J. H., Meister, G., Cifuentes, D., & Lai, E. C. (2022). Regulated dicing of pre-mir-144 via reshaping of its terminal loop. *Nucleic acids research*, 50(13), 7637–7654. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac568>
244. Sheng, P., Fields, C., Aadland, K., Wei, T., Kolaczowski, O., Gu, T., Kolaczowski, B., & Xie, M. (2018). Dicer cleaves 5'-extended microRNA precursors originating from RNA polymerase II transcription start sites. *Nucleic acids research*, 46(11), 5737–5752. <https://doi.org/10.1093/nar/gky306>
245. Sheng, P., Li, L., Li, T., Wang, Y., Hiers, N. M., Mejia, J. S., Sanchez, J. S., Zhou, L., & Xie, M. (2023). Screening of *Drosophila* microRNA-degradation sequences reveals Argonaute1 mRNA's role in regulating miR-999. *Nature communications*, 14(1), 2108. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37819-9>
246. Shi, R., & Chiang, V. L. (2005). Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques*, 39(4), 519–525. <https://doi.org/10.2144/000112010>
247. Shin, K. J., Wall, E. A., Zavzavadjian, J. R., Santat, L. A., Liu, J., Hwang, J. I., Rebres, R., Roach, T., Seaman, W., Simon, M. I., & Fraser, I. D. (2006). A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(37), 13759–13764. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606179103>
248. Singh, N., & Tschärke, D. C. (2020). Herpes Simplex Virus Latency Is Noisier the Closer We Look. *Journal of virology*, 94(4), e01701-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01701-19>
249. Skalsky, R. L., & Cullen, B. R. (2010). Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annual review of microbiology*, 64, 123–141. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134243>
250. Spear, P. G. (1976). Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. I. Identification of four glycoprotein precursors and their products in type 1-infected cells. *Journal of virology*, 17(3), 991–1008. <https://doi.org/10.1128/JVI.17.3.991-1008.1976>
251. Stowe, H. M., Curry, E., Calcaterra, S. M., Krisher, R. L., Paczkowski, M., & Pratt, S. L. (2012). Cloning and expression of porcine Dicer and the impact of developmental stage and culture conditions on MicroRNA expression in porcine embryos. *Gene*, 501(2), 198–205. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.058>
252. Sun, W., Pertzov, A., & Nicholson, A. W. (2005). Catalytic mechanism of *Escherichia coli* ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis. *Nucleic acids research*, 33(3), 807–815. <https://doi.org/10.1093/nar/gki197>
253. Svoboda, P. (2015). A toolbox for miRNA analysis. *FEBS letters*, 589(14), 1694–1701. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.054>
254. Szczepańska, A., Wojnicka, M., & Kurzyńska-Kokorniak, A. (2021). The Significance of the DUF283 Domain for the Activity of Human Ribonuclease Dicer. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8690. <https://doi.org/10.3390/ijms22168690>
255. Szpara, M. L., Kobiler, O., & Enquist, L. W. (2010). A common neuronal response to alphaherpesvirus infection. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 5(3), 418–427. <https://doi.org/10.1007/s11481-010-9212-0>
256. Taharaguchi, S., Inoue, H., Ono, E., Kida, H., Yamada, S., & Shimizu, Y. (1994). Mapping of transcriptional regulatory domains of pseudorabies virus immediate-early protein. *Archives of virology*, 137(3-4), 289–302. <https://doi.org/10.1007/BF01309476>
257. Tanaka, S., & Mannen, K. (2003). Effect of mild stress in mice latently infected pseudorabies virus. *Experimental animals*, 52(5), 383–386. <https://doi.org/10.1538/expanim.52.383>
258. Tang, R., Li, L., Zhu, D., Hou, D., Cao, T., Gu, H., Zhang, J., Chen, J., Zhang, C. Y., & Zen, K. (2012). Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell research*, 22(3), 504–515. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.137>
259. Tang, S., Patel, A., & Krause, P. R. (2009). Novel less-abundant viral microRNAs encoded by herpes simplex virus 2 latency-associated transcript and their roles in regulating ICP34.5 and ICP0 mRNAs. *Journal of virology*, 83(3), 1433–1442. <https://doi.org/10.1128/JVI.01723-08>
260. Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., & Hermeking, H. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel



- sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell cycle* (Georgetown, Tex.), 6(13), 1586–1593. <https://doi.org/10.4161/cc.6.13.4436>
261. Telonis, A. G., Loher, P., Jing, Y., Londin, E., & Rigoutsos, I. (2015). Beyond the one-locus-one-miRNA paradigm: microRNA isoforms enable deeper insights into breast cancer heterogeneity. *Nucleic acids research*, 43(19), 9158–9175. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv922>
262. Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., & Goodall, G. J. (2013). On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. *PloS one*, 8(1), e55214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055214>
263. Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J. B., Park, J. E., Heo, I., Kim, V. N., & Patel, D. J. (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Molecular cell*, 53(4), 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.003>
264. Timoneda, O., Núñez-Hernández, F., Balcells, I., Muñoz, M., Castelló, A., Vera, G., Pérez, L. J., Egea, R., Mir, G., Córdoba, S., Rosell, R., Segalés, J., Tomàs, A., Sánchez, A., & Núñez, J. I. (2014). The role of viral and host microRNAs in the Aujeszky's disease virus during the infection process. *PloS one*, 9(1), e86965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086965>
265. Tomasello, L., Distefano, R., Nigita, G., & Croce, C. M. (2021). The MicroRNA Family Gets Wider: The IsomiRs Classification and Role. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 668648. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.668648>
266. Tombácz, D., Balázs, Z., Csabai, Z., Moldován, N., Szűcs, A., Sharon, D., Snyder, M., & Boldogkői, Z. (2017). Characterization of the Dynamic Transcriptome of a Herpesvirus with Long-read Single Molecule Real-Time Sequencing. *Scientific reports*, 7, 43751. <https://doi.org/10.1038/srep43751>
267. Tombácz, D., Csabai, Z., Oláh, P., Balázs, Z., Likó, I., Zsigmond, L., Sharon, D., Snyder, M., & Boldogkői, Z. (2016). Full-Length Isoform Sequencing Reveals Novel Transcripts and Substantial Transcriptional Overlaps in a Herpesvirus. *PloS one*, 11(9), e0162868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162868>
268. Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A. D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., & Rosenfeld, M. G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*, 459(7249), 1010–1014. <https://doi.org/10.1038/nature08025>
269. Tyborowska, J., Reszka, N., Kochan, G., & Szewczyk, B. (2006). Formation of Pseudorabies virus glycoprotein E/I complex in baculovirus recombinant system. *Acta virologica*, 50(3), 169–174.
270. Tyczewska, A., Kurzyńska-Kokorniak, A., Koralewska, N., Szopa, A., Kietrys, A. M., Wrzesiński, J., Twardowski, T., & Figlerowicz, M. (2011). Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human dicer activity in vitro. *Nucleic acid therapeutics*, 21(5), 333–346. <https://doi.org/10.1089/nat.2011.0304>
271. Umbach, J. L., Kramer, M. F., Jurak, I., Karnowski, H. W., Coen, D. M., & Cullen, B. R. (2008). MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*, 454(7205), 780–783. <https://doi.org/10.1038/nature07103>
272. Van Oirschot J. T. (1999). Diva vaccines that reduce virus transmission. *Journal of biotechnology*, 73(2-3), 195–205. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00121-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00121-2)
273. Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods*, 3, 12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
274. Vasquez-Rifo, A., Jannot, G., Armisen, J., Labouesse, M., Bukhari, S. I., Rondeau, E. L., Miska, E. A., & Simard, M. J. (2012). Developmental characterization of the microRNA-specific *C. elegans* Argonautes alg-1 and alg-2. *PloS one*, 7(3), e33750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033750>
275. Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128(6), 1105–1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.038>
276. Verweij, M. C., Lipinska, A. D., Koppers-Lalic, D., van Leeuwen, W. F., Cohen, J. I., Kinchington, P. R., Messaoudi, I., Bienkowska-Szewczyk, K., Rensing, M. E., Rijsewijk, F. A., & Wiertz, E. J. (2011). The capacity of UL49.5 proteins to inhibit TAP is widely distributed among members of the genus Varicellovirus. *Journal of virology*, 85(5), 2351–2363. <https://doi.org/10.1128/JVI.01621-10>
277. Viejo-Borbolla, A., Muñoz, A., Tabarés, E., & Alcamí, A. (2010). Glycoprotein G from pseudorabies virus binds to chemokines with high affinity and inhibits their function. *The Journal of general virology*, 91(Pt 1), 23–31. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011940-0>

278. Vilimova, M., Contrant, M., Randrianjafy, R., Dumas, P., Elbasani, E., Ojala, P. M., Pfeffer, S., & Fender, A. (2021). Cis regulation within a cluster of viral microRNAs. *Nucleic acids research*, 49(17), 10018–10033. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab731>
279. Wang, C. H., Yuan, J., Qin, H. Y., Luo, Y., Cong, X., Li, Y., Chen, J., Li, S., Sun, Y., & Qiu, H. J. (2014). A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China. *Vaccine*, 32(27), 3379–3385. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.035>
280. Wang, H. H., Liu, J., Li, L. T., Chen, H. C., Zhang, W. P., & Liu, Z. F. (2020). Typical gene expression profile of pseudorabies virus reactivation from latency in swine trigeminal ganglion. *Journal of neurovirology*, 26(5), 687–695. <https://doi.org/10.1007/s13365-020-00866-9>
281. Wang, X., Zhang, M. M., Yan, K., Tang, Q., Wu, Y. Q., He, W. B., Chen, H. C., & Liu, Z. F. (2018). The full-length microRNA cluster in the intron of large latency transcript is associated with the virulence of pseudorabies virus. *Virology*, 520, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.05.004>
282. Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Belloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*, 39(3), 380–385. <https://doi.org/10.1038/ng1969>
283. Wang Z. (2011). The guideline of the design and validation of MiRNA mimics. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 676, 211–223. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-863-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-863-8_15)
284. Weis, B. L., Guth, N., Fischer, S., Wissing, S., Fradin, S., Holzmann, K. H., Handrick, R., & Otte, K. (2018). Stable miRNA overexpression in human CAP cells: Engineering alternative production systems for advanced manufacturing of biologics using miR-136 and miR-3074. *Biotechnology and bioengineering*, 115(8), 2027–2038. <https://doi.org/10.1002/bit.26715>
285. Wen, M., Cong, P., Zhang, Z., Lu, H., & Li, T. (2018). DeepMirTar: a deep-learning approach for predicting human miRNA targets. *Bioinformatics* (Oxford, England), 34(22), 3781–3787. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty424>
286. Wesley, R. D., & Cheung, A. K. (1996). A pseudorabies virus mutant with deletions in the latency and early protein O genes: replication, virulence, and immunity in neonatal piglets. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 8(1), 21–24. <https://doi.org/10.1177/104063879600800104>
287. Wheeler, B. M., Heimberg, A. M., Moy, V. N., Sperling, E. A., Holstein, T. W., Heber, S., & Peterson, K. J. (2009). The deep evolution of metazoan microRNAs. *Evolution & development*, 11(1), 50–68. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2008.00302.x>
288. Wittmann, G., Rziha, H. J. (1989). Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. In: G. Wittmann (Ed.), *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass. p.230-325.
289. Wong, G., Lu, J., Zhang, W., & Gao, G. F. (2019). Pseudorabies virus: a neglected zoonotic pathogen in humans?. *Emerging microbes & infections*, 8(1), 150–154. <https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1563459>
290. Wu, B. W., Engel, E. A., & Enquist, L. W. (2014). Characterization of a replication-incompetent pseudorabies virus mutant lacking the sole immediate early gene IE180. *mBio*, 5(6), e01850. <https://doi.org/10.1128/mBio.01850-14>
291. Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., & He, X. (2010). Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene*, 29(15), 2302–2308. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.34>
292. Wu, W., Guo, Z., Zhang, X., Guo, L., Liu, L., Liao, Y., Wang, J., Wang, L., & Li, Q. (2013). A microRNA encoded by HSV-1 inhibits a cellular transcriptional repressor of viral immediate early and early genes. *Science China. Life sciences*, 56(4), 373–383. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4458-4>
293. Wu, Y. Q., Chen, D. J., He, H. B., Chen, D. S., Chen, L. L., Chen, H. C., & Liu, Z. F. (2012). Pseudorabies virus infected porcine epithelial cell line generates a diverse set of host microRNAs and a special cluster of viral microRNAs. *PloS one*, 7(1), e30988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030988>
294. Xhemalce, B., Robson, S. C., & Kouzarides, T. (2012). Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing. *Cell*, 151(2), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.041>

295. Xiao, J., Luo, X., Lin, H., Zhang, Y., Lu, Y., Wang, N., Zhang, Y., Yang, B., & Wang, Z. (2007). MicroRNA miR-133 represses HERG K<sup>+</sup> channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. *The Journal of biological chemistry*, 282(17), 12363–12367. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700015200> (Retraction published *J Biol Chem.* 2011 Aug 12;286(32):28656)
296. Xiao, Y., & MacRae, I. J. (2019). Toward a Comprehensive View of MicroRNA Biology. *Molecular cell*, 75(4), 666–668. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.001>
297. Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M. D., Yartseva, V., Šestan, N., & Steitz, J. A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*, 155(7), 1568–1580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>
298. Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z., & Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC bioinformatics*, 15 Suppl 7(Suppl 7), S4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S7-S4>
299. Yan, Z., Chen, M., Tang, D., Wu, X., Ren, X., Pan, H., Li, Y., Ji, Q., Luo, Y., Fan, H., & Ju, C. (2021). Better immune efficacy triggered by the inactivated gl/gE-deleted pseudorabies virus with the additional insertion of gC gene in mice and weaned pigs. *Virus research*, 296, 198353. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198353>
300. Yang, J. S., Phillips, M. D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A. C., Chen, K. C., & Lai, E. C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(2), 312–326. <https://doi.org/10.1261/rna.2537911>
301. Ye, C., Guo, J. C., Gao, J. C., Wang, T. Y., Zhao, K., Chang, X. B., Wang, Q., Peng, J. M., Tian, Z. J., Cai, X. H., Tong, G. Z., & An, T. Q. (2016). Genomic analyses reveal that partial sequence of an earlier pseudorabies virus in China is originated from a Bartha-vaccine-like strain. *Virology*, 491, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.016>
302. Ye, X., & Liu, Q. (2008). Expression, purification, and analysis of recombinant *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 enzymes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 442, 11–27. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-191-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-191-8_2)
303. Zamudio, J. R., Kelly, T. J., & Sharp, P. A. (2014). Argonaute-bound small RNAs from promoter-proximal RNA polymerase II. *Cell*, 156(5), 920–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.041>
304. Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E., & Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO journal*, 21(21), 5875–5885. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf582>
305. Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118(1), 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.017>
306. Zhang, R., & Tang, J. (2021 b). Evasion of I Interferon-Mediated Innate Immunity by Pseudorabies Virus. *Frontiers in microbiology*, 12, 801257. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.801257>
307. Zhang, Y., Xu, Y., Dai, Y., Li, Z., Wang, J., Ye, Z., Ren, Y., Wang, H., Li, W. X., Lu, J., Ding, S. W., & Li, Y. (2021 a). Efficient Dicer processing of virus-derived double-stranded RNAs and its modulation by RIG-I-like receptor LGP2. *PLoS pathogens*, 17(8), e1009790. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009790>
308. Zheng, H. H., Fu, P. F., Chen, H. Y., & Wang, Z. Y. (2022). Pseudorabies Virus: From Pathogenesis to Prevention Strategies. *Viruses*, 14(8), 1638. <https://doi.org/10.3390/v14081638>

## Dorobek naukowy

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przedstawione w dwóch publikacjach naukowych:

- Hoffmann, W., Lipińska, A. D., & Bieńkowska-Szewczyk, K. (2022). Functional Analysis of a Frontal miRNA Cluster Located in the Large Latency Transcript of Pseudorabies Virus. *Viruses*, 14(6), 1147. <https://doi.org/10.3390/v14061147>;
- Koralewska, N. , Hoffmann, W. , Pokornowska, M., Milewski, M., Lipinska, A., Bieńkowska-Szewczyk, K., Figlerowicz, M., & Kurzynska-Kokorniak, A. (2016). How short RNAs impact the human ribonuclease Dicer activity: putative regulatory feedback-loops and other RNA-mediated mechanisms controlling microRNA processing. *Acta biochimica Polonica*, 63(4), 773–783. [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1339](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1339).

Oraz w jednym doniesieniu konferencyjnym:

- 43rd Annual International Herpesvirus Workshop IHW 2018, *Kanada 21-25.07.2018*  
*In vitro* analysis of the potential of Pseudorabies Virus-encoded microRNAs to regulate virus gene expression and replication. Hoffmann, W., Rychłowski, M., Bieńkowska-Szewczyk, K., Lipińska, A. D.

Autorka brała udział w następujących szkoleniach międzynarodowych:

- Analysis of Non-Coding RNAs: quae rite et invenietis – EMBL Practical Course, *Niemcy 9-15.09.2017*
- RNA Structure and Function – ICGEB Course, *Włochy 21-24.04.2016*

Autorka uzyskała środki finansowe na realizację projektu zatytułowanego „Analiza roli cząsteczek mikroRNA wirusa pseudowścieklizny w infekcji wirusowej przy użyciu inhibitorów RNA”, w ramach konkursu PRELUDIUM 13, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.



NARODOWE CENTRUM NAUKI