



Politechnika  
Śląska

**Politechnika Śląska**

**Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki**

Różne mechanizmy działania microRNA w procesie translacji

mgr inż. Dorota Hudy

Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem  
prof. dr hab. Joanny Rzeszowskiej

Gliwice, 2023



Pragnę serdecznie podziękować prof. dr hab. Joannie Rzeszowskiej za pomoc i cenne rady otrzymane przy realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Dziękuję również współpracownikom z Katedry Inżynierii i Biologii Systemów Politechniki Śląskiej oraz współpracownikom z Katedry Biologii Medycznej i Molekularnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego za życzliwość i wsparcie okazane podczas realizacji zadań związanych z pracą doktorską.

Pragnę również podziękować rodzinie, zwłaszcza Rodzicom i Rodzeństwu, którzy cały czas wierzyli i wspierali mnie w trakcie realizacji badań i pisania pracy doktorskiej.



|  |           |
|--|-----------|
| Spis treści  |           |
| Streszczenie w języku polskim .....  | 6         |
| Streszczenie w języku angielskim.....  | 8         |
| Spis tabel .....   | 12        |
| <b>1 WSTĘP TEORETYCZNY .....</b>   | <b>14</b> |
| 1.1 Proces translacji i jego regulacja .....   | 14        |
| 1.2 Mechanizmy działania miRNA .....   | 19        |
| <b>2 CEL PRACY .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>3 MATERIAŁY I METODY.....</b>   | <b>24</b> |
| 3.1 Linie komórkowe i ich warunki hodowli.....   | 24        |
| 3.2 Geny reporterowe i plazmidy .....  | 24        |
| 3.3 Warunki transfekcji.....   | 25        |
| 3.4 Oznaczenie poziomu białka .....  | 26        |
| 3.5 Oznaczenie poziomu mRNA .....  | 26        |
| 3.6 Oznaczanie poziomu miRNA.....  | 28        |
| 3.7 Oligonukleotydy anty-miR .....   | 29        |
| 3.8 Izolacja kompleksów RNA-białko metodą wirowania w gradiencie sacharozy .....                     | 29        |
| 3.9 Szacowanie liczby komórek służących do izolacji RNA i białka genów reporterowych                 | 30        |
| 3.10 Mikromacierze.....  | 30        |
| 3.11 Modelowanie .....   | 30        |
| 3.12 Statystyka .....  | 31        |
| <b>4 WYNIKI.....</b>   | <b>32</b> |
| 4.1 Ekspresja genów reporterowych w komórkach HCT116 i Me45 .....                                    | 32        |
| 4.2 Wpływ miRNA na ekspresję genów reporterowych .....   | 33        |
| 4.2.1 Wybór miRNA do badań .....   | 33        |
| 4.2.2 Wpływ miRNA-21 na ekspresję lucyferazy <i>Renilla</i> i firefly .....                          | 34        |
| 4.2.3 Wpływ miRNA-24 na ekspresję lucyferazy <i>Renilla</i> i firefly .....                          | 36        |
| 4.2.4 Wpływ miRNA z rodziny let-7 na ekspresję lucyferazy <i>Renilla</i> i firefly .....             | 38        |
| 4.3 Wydajność translacji.....  | 39        |
| 4.4 Różnice między komórkami HCT i Me45 w ekspresji czynników regulujących inicjację translacji..... | 40        |
| 4.5 Różnice w działaniu miR-21, miR-24 i let-7 .....   | 44        |
| 4.5.1 Inhibicja przez miR-21.....  | 44        |
| 4.5.2 Inhibicja przez miR-24.....  | 45        |
| 4.5.3 Porównanie działania różnych anty-miRNA dla grupy let-7 .....                                  | 46        |
| 4.6 Kompleksy mRNA-białko tworzone przez geny reporterowe.....                                       | 49        |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.7 | Rozkład RNA komórkowych w gradiencie sacharozy .....   | 53 |
| 4.8 | Struktura cząsteczek mRNA .....  | 56 |
| 4.9 | Modele wpływu miRNA na proces translacji genów reporterowych .....   | 58 |
| 5   | DYSKUSJA .....   | 68 |
| 5.1 | Czy obecność transkryptów regulowanych przez miRNA może wpływać na los innych transkryptów z założenia nie posiadających miejsc regulacji przez miRNA? .....                               | 68 |
| 5.2 | Dlaczego w obecności tych samych białek w jednym typie komórki różne miRNA tworzące RISC mają różne działania i skąd się biorą różnice w działaniu tych samych miRNA między komórkami..... | 70 |
| 5.3 | Czy modelowanie matematyczne może nam ułatwić rozpoznawanie mechanizmów regulacji translacji?.....   | 73 |
| 6   | PODSUMOWANIE.....  | 76 |
| 7   | BIBLIOGRAFIA .....   | 78 |

## Streszczenie w języku polskim

Translacja jest złożonym procesem syntezy białek na podstawie informacji zawartej w sekwencji mRNA. Na jej przebieg wpływa szereg czynników białkowych poczynając od rozpoczęcia procesu aż do jego zakończenia i utworzenia nowego łańcucha polipeptydowego. Wpływ na nią mogą mieć również microRNA czyli krótkie niekodujące cząsteczki RNA m.in. poprzez działanie destabilizujące cząsteczkę mRNA lub przez blokowanie dostępności tej cząsteczki dla czynników inicjujących proces syntezy białka. W pracy doktorskiej poruszono zagadnienia związane z mechanizmami oddziaływań microRNA w procesie translacji i zbadano je z wykorzystaniem genów reporterowych. Główny cel pracy obejmował badanie wpływu różnych microRNA na proces translacji, degradację mRNA oraz zbadanie różnic międzykomórkowych w tym zakresie. Oznaczono poziomy ekspresji genów i ich zmian pod wpływem działania microRNA 21, 24 i Let-7 na poziomie mRNA i białka. Przeanalizowano również wpływ obecności transkryptów zawierających miejsca wiązania microRNA na ekspresję genów nie regulowanych przez miRNA. Zbadano także jak kompleksy zawierające transkrypty regulowane i nieregulowane przez miRNA rozkładają się podczas wirowania w gradiencie sacharozy oraz jak zmieniają się poziomy ekspresji badanych genów reporterowych, na poziomie mRNA i białka, po dodaniu oligonukleotydów anty-miR hamujących działanie badanych microRNA. W końcowym etapie zaprojektowano model matematyczny pozwalający na przewidywanie obecności niepolisomalnych kompleksów mRNA-białko i ich właściwości. W efekcie zaobserwowano, że różne microRNA w obrębie jednego typu komórek wykazywały zróżnicowane działania na poziomy mRNA i białek, ale również te same microRNA dawały inny efekt w innych typach komórek. W przypadku wirowania w gradiencie sacharozy zauważono akumulację transkryptów w różnych frakcjach w zależności od typu występowania miejsc wiązania microRNA. Wpływ microRNA na ekspresję badanych genów na poziomie mRNA i białka sprawdzono również po dodaniu oligonukleotydów anty-miR, takie działanie wykazało klasyczny mechanizm działania microRNA oraz możliwe inne działania w tym ochronny wpływ microRNA na mRNA lub podniesienie wydajności procesu translacji przez ułatwienie inicjacji translacji. Poszukiwanie innych niż polisomalne kompleksy za pomocą tworzenia modeli matematycznych wykazało możliwość istnienia takich kompleksów zarówno w lekkich i ciężkich frakcjach charakteryzujących się różnymi stopniami kondensacji i w gradientach sacharozy wędrujących z różnymi frakcjami polisomalnymi.





## **Streszczenie w języku angielskim**

Protein synthesis by translation is a very complex process based on the information found in the mRNA. The process is influenced by several protein factors from the initiation to the termination phase. It can also be affected by microRNAs, i.e. short non-coding RNAs, which work by destabilization of the mRNA or by blocking the translation initiation. The dissertation discusses issues related to the mechanisms of microRNA interactions in the translation process and examines them using reporter genes. The main aim of the work was to study the influence of various microRNAs on the translation process, and mRNA degradation and to examine intercellular differences in this regard. In the process the levels of reporter gene expression and their changes under the influence of microRNA 21, 24, and let-7 were determined at the mRNA and protein levels. The impact of the presence of transcripts containing microRNA binding sites on the expression of genes not regulated by miRNAs was also analyzed. It also examined how complexes containing transcripts regulated and unregulated by miRNAs sediment during centrifugation in a sucrose gradient and how expression levels of the studied reporter genes change, at the mRNA and protein level, after the addition of anti-miR oligonucleotides that inhibit the activity of the tested microRNAs. Finally, a mathematical model was designed to predict the presence of non-polysomal mRNA-protein complexes and their properties. As a result, it was observed that different microRNAs within one cell type had different effects on mRNA and protein levels, but the same microRNAs had different effects within other cell types. In the case of sucrose gradient centrifugation, the accumulation of transcripts in different fractions was observed depending on the type of occurrence of microRNA binding sites. The effect of microRNA on the expression of the studied genes at the mRNA and protein level was also checked after the addition of anti-miR oligonucleotides, such action showed the classic mechanism of action of microRNA and possible other actions, including the protective effect of miRNA on mRNA or increasing the efficiency of the translation process by facilitating translation initiation. The search for complexes other than polysomal by creating mathematical models showed the possibility of such complexes in both light and heavy fractions characterized by different degrees of condensation and in sucrose gradients traveling with different polysomal fractions.



## Spis rycin

|  |    |
|--|----|
| Rycina 1 Schemat łączenia mRNA z czynnikami eIF4 (eucaryotic initiation factor 4) .....  | 14 |
| Rycina 2 Schemat tworzenia TC (ternary complex, kompleks trójskładnikowy) oraz schemat aktywacji eIF2 (eucaryotic initiation factor 2).....            | 15 |
| Rycina 3 Schemat kompleksu pre-inicjującego translację 43S .....   | 16 |
| Rycina 4 Schemat dojrzewania dużej podjednostki rybosomalnej.....  | 17 |
| Rycina 5 Schemat powstawania monosomu (80S) w trakcie inicjacji translacji.....  | 19 |
| Rycina 6 Schemat plazmidu psiCHECK-2.....  | 24 |
| Rycina 7 Ekspresja genów reporterowych.....  | 32 |
| Rycina 8 Ekspresja microRNA .....  | 33 |
| Rycina 9 Ekspresja genów reporterowych pod wpływem działania miR-21 w komórkach HCT116 i Me45.....   | 34 |
| Rycina 10 Aktywność białek reporterowych przy regulacji przez miR-21.....  | 35 |
| Rycina 11 Ekspresja genów reporterowych pod wpływem działania miR-24 w komórkach HCT116 i Me45.....  | 36 |
| Rycina 12 Aktywność białek reporterowych przy regulacji przez miR-24.....  | 37 |
| Rycina 13 Poziomy białka lucyferazy firefly w komórkach HCT116 i Me45 .....  | 37 |
| Rycina 14 Ekspresja genów reporterowych pod wpływem działania Let-7 w komórkach HCT116 i Me45. ....  | 38 |
| Rycina 15 Aktywność białek reporterowych przy regulacji przez Let-7 .....  | 39 |
| Rycina 16 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF1 .....                                       | 40 |
| Rycina 17 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF2 .....                                       | 41 |
| Rycina 18 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF3 .....                                       | 42 |
| Rycina 19 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF4 .....                                       | 43 |
| Rycina 20 Poziomy transkryptów eIFG1 i G2 .....  | 43 |
| Rycina 21 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF5 i eIF6 .....                                | 44 |
| Rycina 22 Zmiany poziomów (fold change) mRNA (A) i białka (B) kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu miR-21 .....                           | 45 |
| Rycina 23 Zmiany poziomów (fold change) mRNA (A) i białka (B) kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu miR-24 .....                           | 46 |
| Rycina 24 Zmiany poziomów (fold change) transkryptów genów reporterowych po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach HCT116..... | 47 |

|  |    |
|--|----|
| Rycina 25 Zmiany poziomów (fold change) transkryptów genów reporterowych po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach Me45.....           | 47 |
| Rycina 26 Zmiany poziomów (fold change) białka kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach HCT116..... | 48 |
| Rycina 27 Zmiany poziomów (fold change) białka kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach Me45.....   | 48 |
| Rycina 28 Przykład rozdziału kompleksów RNA-białko poprzez wirowanie w gradiencie sacharozy .....  | 49 |
| Rycina 29 Rozkład mRNA lucyferazy <i>Renilla</i> i firefly w gradiencie sacharozy; A - komórki HCT116; B - komórki Me45.....                                   | 50 |
| Rycina 30 Rozkład mRNA lucyferazy <i>Renilla</i> zawierającej miejsca wiązania miRNA-21 i lucyferazy firefly w gradiencie sacharozy .....                      | 51 |
| Rycina 31 Rozkład mRNA lucyferazy <i>Renilla</i> zawierającej miejsca wiązania miRNA-24 i lucyferazy firefly w gradiencie sacharozy .....                      | 52 |
| Rycina 32 Rozkład mRNA lucyferazy <i>Renilla</i> zawierającej miejsca wiązania let-7 i lucyferazy firefly w gradiencie sacharozy .....                         | 53 |
| Rycina 33 Rozkład rRNA malej i dużej podjednostki rybosomalnej w gradiencie sacharozy ....   | 54 |
| Rycina 34 Rozkład mRNA genów „housekeeping” GAPDH i RPL41 w kolejnych frakcjach w komórkach HCT116 (zielone słupki) i Me45 (żółte słupki). .....               | 55 |
| Rycina 35 Struktury cząsteczek mRNA lucyferazy <i>Renilla</i> zawierające wstawki z miejscami wiązania dla miRNA .....   | 56 |
| Rycina 36 Struktury końców 3' badanych genów lucyferazy <i>Renilla</i> . .....   | 57 |
| Rycina 37 Schematy przedstawiające warianty modelu .....   | 61 |
| Rycina 38 Porównanie wyników eksperymentalnych (czerwony kolor) z wynikami otrzymanymi z modelowania (niebieski kolor) wg modelu numer 1 .....                 | 62 |
| Rycina 39 Porównanie wyników eksperymentalnych (czerwony kolor) z wynikami otrzymanymi z modelowania (niebieski kolor) wg modelu numer 2 .....                 | 65 |

## Spis tabel

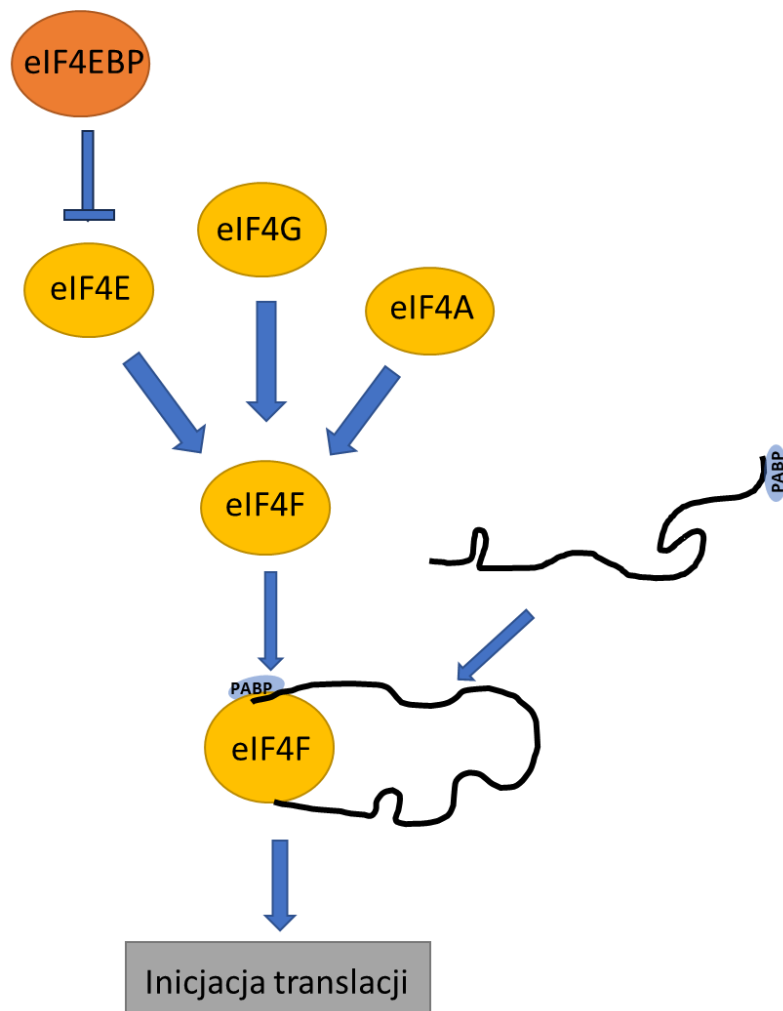
|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 Spis użytych starterów dla sekwencji mRNA i miRNA .....                                  | 27 |
| Tabela 2 Etapy reakcji PCR.....   | 28 |
| Tabela 3 Liczbowa reprezentacja wydajności procesu translacji.....                                | 39 |
| Tabela 4 Współczynniki przejść kolejnych etapów translacji dla modelu nr 1 .....                  | 63 |
| Tabela 5 Współczynniki przejść kolejnych etapów translacji dla modelu nr 2 .....                  | 64 |
| Tabela 6 Wartości współczynników dopasowania do wyników eksperymentalnych dla trzech modeli ..... | 66 |



# 1 WSTĘP TEORETYCZNY

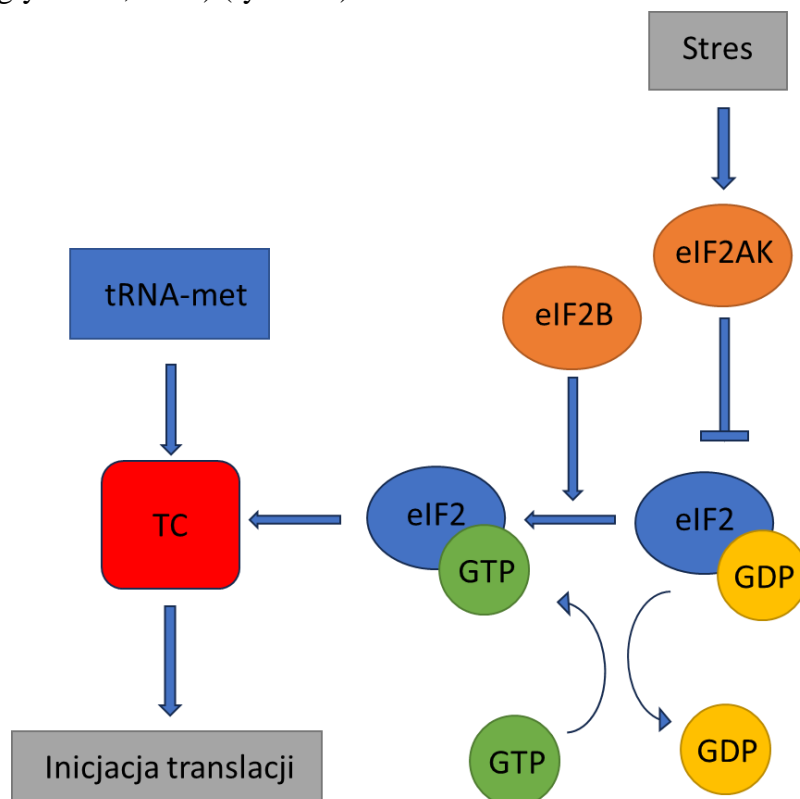
## 1.1 Proces translacji i jego regulacja

Procesem translacji nazywamy mechanizm w trakcie którego, na podstawie sekwencji cząsteczki mRNA powstaje cząsteczka białka. Proces ten jest regulowany przez szereg czynników głównie na etapie inicjacji. Sama inicjacja może przebiegać w sposób kanoniczny (Jackson et al., 2010) lub wykorzystywać specyficzne struktury pozwalające ominąć etap skanowania i poszukiwania kodonu START (kodon AUG) m. in. wykorzystując struktury zawarte w cząsteczce mRNA takie jak IRES (internal ribosome entry site) (Godet et al., 2019; Kwan & Thompson, 2019) i CITE (cap-independent translation element) (Kwan & Thompson,



Rycina 1 Schemat łączenia mRNA z czynnikami eIF4 (eucaryotic initiation factor 4). Przedstawienie czynników inicjujących translację łączących się bezpośrednio z mRNA eIF4E – rozpoznawanie czapeczki, eIF4A rozplątywanie podwójnoniciowej struktury mRNA, eIF4G – platforma dla pozostałych czynników i innych białek, eIF4EBP – białko blokujące czynnik eIF4E, PABP – poly(A)-binding protein.

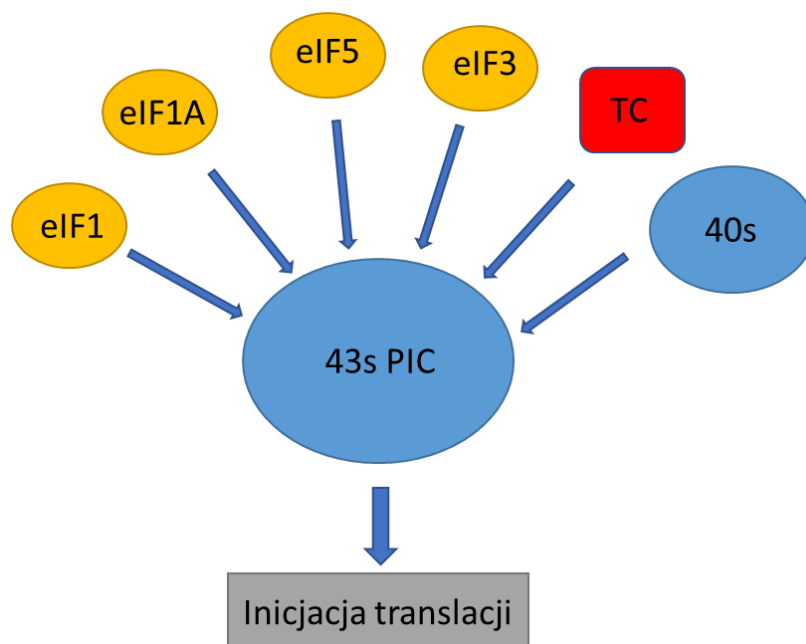
2019). W kanonicznej wersji translacji do cząsteczki mRNA przyłącza się kompleks eIF4F zawierający czynniki eIF4A, eIF4G i eIF4E (Kats & Klann, 2019). Czynniki eIF4E odpowiedzialny jest za rozpoznanie i związanie czapeczki na końcu 5' mRNA (Jackson et al., 2010). Białko eIF4G jest dużym białkiem służącym za rusztowanie dla pozostałych czynników. Znane są trzy formy tego białka z czego dwie, eIF4G1 i eIF4G2, występują najczęściej. Wersja G1 bierze udział w najczęściej występującej wersji translacji (Jackson et al., 2010) podczas gdy G2 na ogół pojawia się w procesach związanych z apoptozą, stąd pierwsza wersja nazwy tego białka DAP (death associated protein) (Y. Liu et al., 2023; Shestakova et al., 2023). Czynniki eIF4G1 wiąże się z czapeczką mRNA, poprzez eIF4E oraz z białkami znajdującymi się na końcu 3' mRNA (Park et al., 2011). Helikaza eIF4A ma za zadanie dysocjację podwójnoniciowych fragmentów łańcucha mRNA i ułatwiać przesuwanie się kompleksu odczytującego sekwencję RNA (O'Sullivan & Fraser, 2023). Białko eIF4E może być blokowane przez inhibitory eIF4EBP uniemożliwiające interakcję pomiędzy czynnikami eIF4E i eIF4G (Yanagiya et al., 2012) (ryc. nr 1).



**Rycina 2 Schemat tworzenia TC (ternary complex, kompleks trójskładnikowy) oraz schemat aktywacji eIF2 (eucaryotic initiation factor 2).** Kompleks trójskładnikowy (TC) składa się z tRNA z przyłączoną metioniną, aminokwasem rozpoczynającym syntezę białka oraz czynnika inicjującego eIF2 z trójfosforanem guanozyny. Czynniki eIF2B katalizuje wymianę dwufosforanu guanozyny związanego z eIF2 na trójfosforan guanozyny. Znane są mechanizmy blokowania funkcji eIF2B pod wpływem stresu np. stresu siateczki endoplazmatycznej poprzez kinazę eIF2AK, która fosforyluje podjednostkę alfa czynnika eIF2.

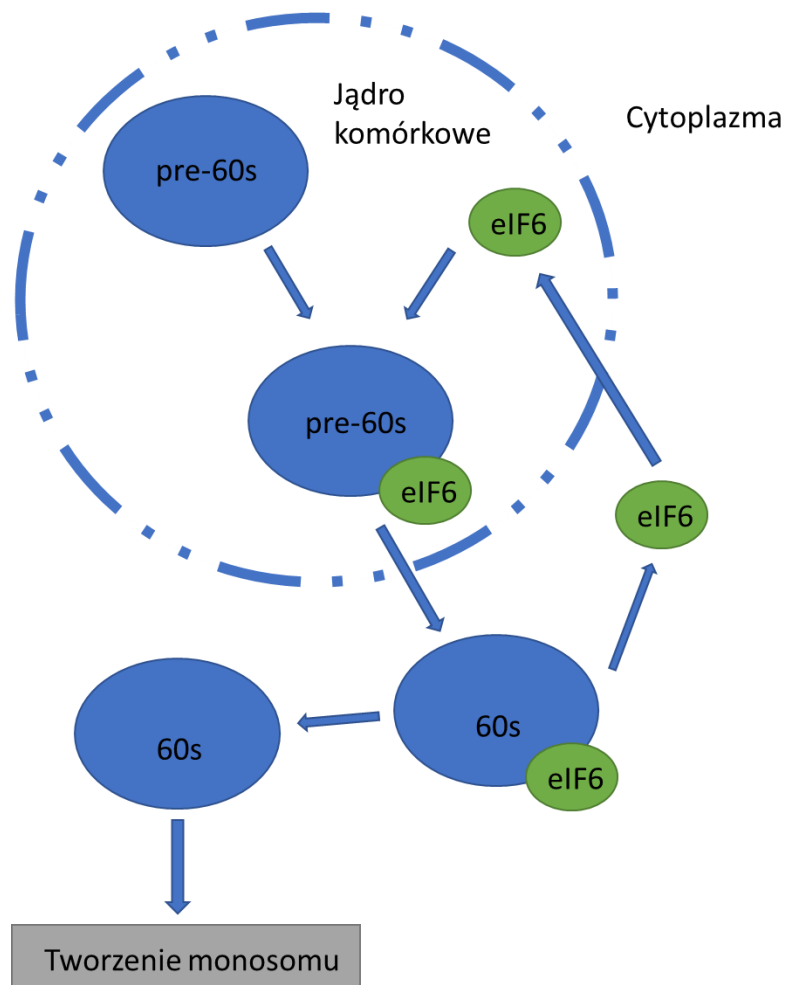


Kolejnymi czynnikami biorącymi udział w translacji są czynniki z rodziny eIF2 odpowiedzialne za stworzenie, nie zawierającego jeszcze mRNA, kompleksu trójskładnikowego (ternary complex, TC) składającego się z eIF2, GTP (guanozotrifosforan) i tRNA-met (tRNA z metioniną) (Jackson et al., 2010). Kompleks ten dostarcza później metioninę, pierwszy aminokwas łańcucha peptydowego (Jackson et al., 2010). „Ternary complex” łączy się z małą podjednostką rybosomalną (Jackson et al., 2010). Po przyłączeniu tRNA-met do kodonu startowego (AUG) następuje hydroliza GTP poprzez eIF5 i odłączenie czynnika eIF2 związanego z GDP (guanozodwufosforan) (Conte et al., 2006). Następnie może być ono ponownie wykorzystane w procesie translacji po aktywacji przez eIF2B, które wymienia GDP na GTP (Bogorad et al., 2018; Marintchev & Ito, 2020). Proces wymiany GDP na GTP może być zahamowany przez kinazy eIF2AK w odpowiedzi na stres komórkowy (Bogorad et al., 2018; Marintchev & Ito, 2020). Kinazy te fosforylują podjednostkę alfa eIF2 i blokują w ten sposób działanie tego czynnika co w efekcie prowadzi też do zmniejszenia liczby powstających nowych białek w komórce (ryc. nr 2).



**Rycina 3 Schemat kompleksu pre-inicjującego translację 43S.** W skład kompleksu wchodzi kompleks trójskładnikowy (TC), czynniki eIF1, eIF1A promujące skanowanie i rozpoznanie kodonu START, czynnik eIF5 odpowiedzialny za hydrolizę GTP z czynnika eIF2, czynnik eIF3 odpowiadający za rekrutację pozostałych czynników oraz mała podjednostka rybosomalna 40S.

Kolejną częścią inicjacji jest stworzenie kompleksu pre-inicjującego 43S (43S pre-initiation complex, 43S PIC). W jego skład wchodzi mała podjednostka rybosomalna 40S, TC oraz czynniki inicjujące translację takie jak eIF1, eIF1A, eIF5 i eIF3 (Jackson et al., 2010). EIF1 i eIF1A promują skanowanie sekwencji oraz odpowiadają za poprawne rozpoznanie kodonu startowego translacji AUG i promują przyłączenie pierwszego aminokwasu pilnując aby nie doszło do przedwczesnego odłączenia eIF2·GDP (Mitchell & Lorsch, 2008; Thakur et al., 2019). EIF5 odpowiada za hydrolizę fosforanu z GTP połączonego z eIF2 w momencie przyłączenia metioniny do kodonu start (Saini et al., 2014). Czynniki eIF3 składa się z kilku podjednostek (eIF3a - eIF3m) i pełni funkcję czynnika rekrutującego poszczególne białka do kompleksu 43S jak i również rekrutuje mRNA związane z kompleksem eIF4F (Valášek et al., 2017). Skład czynnika eIF3 może się różnić poszczególnymi podjednostkami ale składa się on zawsze z co najmniej 8 podjednostek (ryc. nr 3) (Valášek et al., 2017).



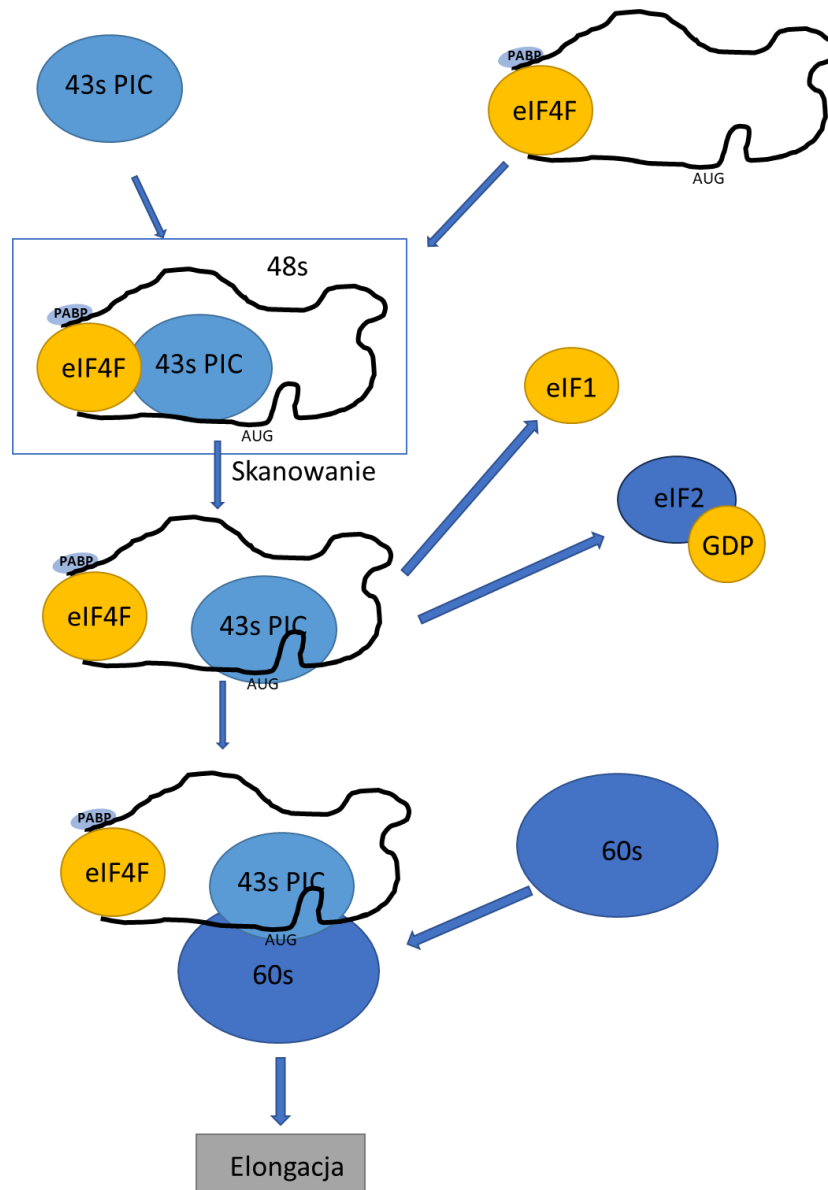
**Rycina 4 Schemat dojrzewania dużej podjednostki rybosomalnej.** Czynniki eIF6 odpowiada za przemieszczenie dużej podjednostki rybosomalnej z jądra do cytoplazmy oraz zapobiega przedwczesnemu łączeniu się podjednostek rybosomalnych w rybosom.

W momencie odnalezienia kodonu startowego do małej podjednostki rybosomalnej zostaje zrekrutowana duża podjednostka rybosomalna (60S) przy pomocy czynnika eIF6, który również transportuje niedojrzałą dużą podjednostkę (pre-60S) z jądra i zapobiega tworzeniu się „pustych” rybosomów – nie powstających na cząsteczce mRNA (ryc. nr 4) (Jaako et al., 2022). Podsumowując, w procesie inicjacji powstaje zatem kompleks zawierający pierwszy aminokwas złączony z małą podjednostką i kilkoma czynnikami inicjującymi (43S PIC, ryc. nr 2 i 3) oraz mRNA związane z kompleksem eIF4F. Powstaje kompleks 48S, który umożliwia skanowanie końca 5' cząsteczki mRNA, aż do momentu rozpoznania kodonu start. Następuje wtedy przyłączenie tRNA z cząsteczką metioniny i rekrutacja dużej podjednostki rybosomalnej (ryc. nr 5).

Kolejnym etapem translacji jest elongacja łańcucha aminokwasowego. Do mRNA z pełnym rybosomem po przyłączeniu tRNA-met przyłącza się kolejny aminokwas za pomocą czynnika elongacji eEF1A i następuje wiązanie aminokwasów wiązaniem peptydowym. W kolejnym etapie po hydrolizie fosforanu czynnik eEF1A odłącza się od kompleksu translacyjnego (Xu et al., 2022), dzięki czemu następuje translacja rybosomu na cząsteczce mRNA przy pomocy czynnika eEF2. Jeśli rybosom nie rozpoznał kodonu STOP następuje usunięcie tRNA z wcześniejszego cyklu elongacji i powtórzenie wszystkich kroków. Na początku drugiego cyklu elongacji usuwane jest tRNA, które było związane z rozpoczynającą proces metioniną (Dever & Green, 2012).

Po dotarciu rybosomu do kodonu STOP (UAA, UGA lub UAG) rozpoczyna się etap terminacji syntezy białka. Biorą w nim udział dwa czynniki kończące translację – eRF1 i eRF3 (eukaryotic release factor 1 i 3) (Beißel et al., 2019). W komórkach ludzkich czynnikiem eRF1 jest czynnik ETF1 (eukaryotic translation termination factor 1), którego budowa przypomina strukturę tRNA. Wykazuje on również możliwość tworzenia wiązania z kodonem STOP imitując wiązania kodon-antykodon. Natomiast czynnikiem eRF3 są czynniki GSPT1/2 (G1 to S phase transition 1/2), które w przypadku terminacji translacji dostarczają czynnik ETF1 do kodonu STOP. Czynniki te oddziałują w formie kompleksu trójskładnikowego z GTP podobnie do kompleksu trójskładnikowego biorącego udział w inicjacji translacji czy też do kompleksu biorącego udział w elongacji łańcucha peptydowego (Bulygin et al., 2017). Do przeprowadzenia procesu terminacji wystarczy samo działanie ETF1 ale wydajność procesu może być zwiększona poprzez działanie czynnika ABCE1, który stymuluje rozłączenie podjednostek rybosomalnych (Young et al., 2015). Po terminacji procesu translacji możliwe jest ponowne wykorzystanie kompleksów niektórych czynników inicjujących translację, w tym wykorzystanie małej podjednostki rybosomalnej do inicjacji procesu. Takie ponowne

wykorzystanie skompleksowanych czynników skraca czas potrzebny do rekrutacji nowej podjednostki i pozwala na zwiększenie efektywności procesu.



*Rycina 5 Schemat powstawania monosomu (80S) w trakcie inicjacji translacji. 43S PIC po przyłączeniu się do mRNA z eIF4F tworzą kompleks 48S. Następuje skanowanie sekwencji w poszukiwaniu kodonu START do której przypasowany jest aminokwas rozpoczynający łańcuch peptydowy – metionina. Po przyłączeniu aminokwasu część czynników inicjujących oddysocjuje z kompleksu 48S m.in. eIF1, eIF2, następnie zachodzi rekrutacja i przyłączenie dużej podjednostki rybosomalnej w efekcie czego tworzy się pierwszy rybosom (80S) na cząsteczce mRNA.*

## 1.2 Mechanizmy działania miRNA

MicroRNA to krótkie 18-25 nukleotydowe sekwencje RNA regulujące ekspresję genów na różnych poziomach kontroli procesów transkrypcji i translacji. Mogą one powstawać z sekwencji intronów, sekwencji genów kodujących białka oraz jako transkrypt dla kilku

odrębnych miRNA (de Rie et al., 2017; B. Liu et al., 2019; Zeidler et al., 2020). MiRNA działa w połączeniu z białkami Ago (Argonauta) w tzw. kompleksie RISC (RNA-induced silencing complex). Kompleks ten zawiera jedno z czterech białek Ago i miRNA (Zhang et al., 2018). Ludzkie białka Ago posiadają tylko jeden wariant zdolny do przecinania nici RNA, Ago2 (Zhang et al., 2018). Dodatkowo można wyróżnić udział białek ładujących miRNA do kompleksu RISC takich jak DICER czy TARBP, które tworzą tak zwany kompleks ładujący RISC (RISC-loading complex, RLC) (Nakanishi, 2016). Działający RISC wykorzystuje miRNA jako cząsteczkę pozwalającą rozpoznać mRNA poprzez komplementarność do sekwencji co najmniej „seeda” czyli 6 nukleotydów w końcu 5’ miRNA na pozycjach 2-7. Znanych jest co najmniej dziewięć ścieżek działania z udziałem miRNA (Zinovyev et al., 2013).

Pierwsza z nich polega na blokowaniu inicjacji translacji poprzez blokadę rozpoznawania czapeczki przez małą podjednostkę rybosomalną (40S). Ścieżka ta została po raz pierwszy zaproponowana przez grupę Filipowicza (Pillai et al., 2005). Ścieżka ta, jest najczęściej proponowaną próbą wyjaśnienia mechanizmu działania miRNA. Istnienie tego mechanizmu wykazano w badaniach przeprowadzonych przy użyciu modyfikacji czapeczki mRNA oraz tzw. IRES czyli wewnętrznych miejsc wiązania się rybosomów (internal ribosome entry site). Badania te pokazują, że RISC powoduje przyłączenie się białka GW182 (TNRC6A-C u człowieka), które uczestniczy w blokowaniu przyłączenia się małej podjednostki rybosomu do mRNA (Zipprich et al., 2009). Białko to może również powodować degradację mRNA poprzez przyłączanie się do białka łączącego się z końcem polyA i deadenylację końca 3’ (Fabian et al., 2011; Pfaff & Meister, 2013).

Druga ścieżka związana jest z zahamowaniem przyłączania się drugiej podjednostki rybosomalnej (60S). Hipoteza wyjaśniająca ten mechanizm została zaproponowana przez Chendrimadę i wsp. (Chendrimada et al., 2007) w 2007 roku. W późniejszych badaniach *in vitro* udowodniono większą ilość małych podjednostek związanych z transkryptem w porównaniu do ilości dużych podjednostek (Wang et al., 2008). Przy czym nie udowodniono, że zablokowane zostało skanowanie końca 5’ przez małą podjednostkę. Badanie sekwencji związanej z małą podjednostką wykazało natomiast, że jest ona zatrzymana na kodonie start, AUG (Wang et al., 2008).

Trzeci mechanizm działania miRNA opiera się na inhibicji elongacji. Jest to działanie, które historycznie zostało zaproponowane jako pierwsze (1999) (Olsen & Ambros, 1999) i było związane z obecnością inhibowanego mRNA we frakcjach polisomalnych.

Czwartą ścieżką działania miRNA jest przedwczesne odłączanie się rybosomów z transkryptu (Petersen et al., 2006). Mechanizm ten był postulowany na podstawie braku zmian w profilu polisomalnym mRNA w przypadku braku i występowaniu inhibicji przez miRNA. Dodatkowo nie wykryto powstającego polipeptydu w przypadku występowania inhibicji.

Piątą możliwością działania miRNA jest równoczesna degradacja powstającego łańcucha peptydowego. Pomimo możliwości strącania niedokończonych polipeptydów wraz z matrycą mRNA nie udało się odkryć takich peptydów w momencie występowania blokady przez miRNA. Dlatego też zaproponowano hipotezę, która zakłada, że proces ten musi przebiegać z dużą szybkością. Dodatkowo Pillai i wsp. wykazali, że jeżeli takie działanie występuje to musi być niezależne od proteasomu (Pillai et al., 2004).

Kolejną możliwością jest gromadzenie się blokowanego mRNA w tzw. ciałkach P (tzw. „p-body”) (Pillai et al., 2004). Występujące tam mRNA może ulegać degradacji, ale może też po jakimś czasie wrócić do obiegu i aktywnie uczestniczyć w procesie translacji. Występowanie ciałek P nie jest warunkiem koniecznym do blokady translacji, a raczej mogą one być konsekwencją występowania blokady przez miRNA.

Kolejne dwie ścieżki związane są z degradacją mRNA. Jedna działająca poprzez destabilizację mRNA bez cięcia w miejscu działania miRNA i druga powodująca cięcie w miejscu związania z miRNA. Inhibicja translacji powoduje tylko niewielkie zmniejszenie ilości powstającego białka. Natomiast destabilizacja mRNA może spowodować ponad 30% spadek ilości białka. Nie stwierdzono jednak jednoznacznie w jaki sposób miRNA powoduje degradację mRNA. Istnieją wyniki pokazujące, że do działania miRNA wymagane jest rozpoczęcie translacji i związane z tym rozplecenie nici RNA (Ruijtenberg et al., 2020). W przypadku cięcia mRNA w miejscu połączenia z miRNA wymagana jest stu procentowa komplementarność sekwencji. Taki mechanizm charakterystyczny jest dla komórek roślinnych, rzadziej zwierzęcych (Li et al., 2018).

Ostatnią możliwością działania miRNA jest zdolność do reorganizacji chromatyny co w konsekwencji może prowadzić do wyciszenia genu (Abernathy et al., 2017).

Wydaje się zatem zasadne podejmowanie prób projektowania analiz, których celem jest wyjaśnienie mechanizmów regulacji translacji z udziałem miRNA.

## 2 CEL PRACY

Dokładne mechanizmy działania miRNA nie zostały wystarczająco wyjaśnione mimo przeprowadzenia licznych badań trwających od lat 90. ubiegłego wieku, kiedy to zostało odkryte pierwsze miRNA (Lee et al., 1993). Obecnie znane są miejsca wiązania kompleksu RISC z mRNA oraz część możliwych mechanizmów działania miRNA.

Celem niniejszej pracy było zbadanie różnych mechanizmów działania miRNA w procesie translacji genów reporterowych i różnic międzykomórkowych.

Cele szczegółowe:

- Ustalenie warunków transfekcji plazmidem zawierającym geny reporterowe z obecnymi miejscami lub brakiem miejsc wiązania dla miRNA w dwóch liniach komórkowych Me45 i HCT116.
- Określenie ekspresji genów reporterowych i zmian pod wpływem wiązania trzech typów miRNA (miR-21, miR-24, let-7) na poziomie mRNA.
- Określenie ekspresji genów reporterowych i zmian pod wpływem wiązania trzech typów miRNA (miR-21, miR-24, let-7) na poziomie białka.
- Analiza wpływu obecności transkryptów zawierających miejsca wiązania miRNA na ekspresję genów nie regulowanych przez miRNA.
- Stworzenie modelu matematycznego działania miRNA i regulacji translacji.





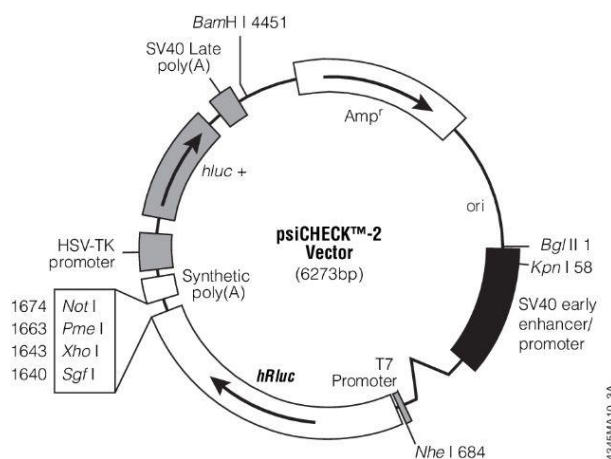
### 3 MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 Linie komórkowe i ich warunki hodowli

W części eksperymentalnej wykorzystano dwie adherentne linie komórkowe, Me45 (linia czerniaka wyizolowana w Instytucie Onkologii im Mari Curie-Skłodowskiej w Gliwicach (Kramer-Marek et al., 2006)) oraz HCT116 (linia CCL-247 z kolekcji ATCC, American Type Culture Collection). Obie były hodowane w obecności medium DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) firmy PAN Biotech z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS – Fetal Bovine Serum, Eurx) i mieszanki antybiotyków penicylina/ streptomycyna (Sigma Aldrich) w temperaturze 37 °C w wilgotnej atmosferze z dodatkiem 5% CO<sub>2</sub>. Zmiana medium i pasaż komórek były wykonywane średnio co dwa dni.

#### 3.2 Geny reporterowe i plazmidy

Jako geny reporterowe wykorzystano lucyferazę *Renilla* i lucyferazę firefly. Oba geny znajdowały się na jednym plazmidzie psiCHECK-2 firmy Promega (ryc. nr 6). Wykorzystano również plazmid psiCHECK-2 z modyfikacjami w końcu 3' UTR genu lucyferaza *Renilla* zawierającymi 8 razy powtórzone miejsca wiązania dla miR-21, miR-24 lub let-7 wstawionymi pomiędzy miejscami restrykcyjnymi dla enzymów NotI i XhoI. Modyfikacje dla wariantów z miR-21 i miR-24 zostały wprowadzone przez firmę Blirt. Plazmid z modyfikacjami dla let-7 został uzyskany dzięki pomocy prof. Martina Simarda z Uniwersytetu Laval z Kanady.



Rycina 6 Schemat plazmidu psiCHECK-2

Sekwencja wstawki dla miR21

GCGAT CGCTCGAGTC

AACATCAGTC TGATAAGCTA AATCAACATC AGTCTGATAA GCTAAATCAA  
CATCAGTCTG ATAAGCTAAA TCAACATCAG TCTGATAAGC TAAATCAACA  
TCAGTCTGAT AAGCTAAATC AACATCAGTC TGATAAGCTA AATCAACATC  
AGTCTGATAA GCTAAATCAA CATCAGTCTG ATAAGCTAAA GCGGCCGC

Sekwencja wstawki dla miR24

GCGAT CGCTCGAGAT

ACGACTGGTG AACTGAGCCG ATACGACTGG TGAAGTGAAGC CGATACGACT  
GGTGAAGTGA GCCGATACGA CTGGTGAAGT GAGCCGATAC GACTGGTGAA  
CTGAGCCGAT ACGACTGGTG AACTGAGCCG ATACGACTGG TGAAGTGAAGC  
CGATACGACT GGTGAAGTGA GCCGGCGGCC GC

Sekwencja wstawki dla let7

GCGAT CGCTCGAGAC

TATACAAGGA TCTACCTCAG TCGAGACTAT ACAAGGATCT ACCTCAGTCG  
AGACTATACA AGGATCTACC TCAGTCGAGA CTATACAAGG ATCTACCTCA  
GTCGAGACTA TACAAGGATC TACCTCAGTC GAGACTATAC AAGGATCTAC  
CTCAGTCGAG ACTATACAAG GATCTACCTC AGTCGAGACT ATACAAGGAT  
CTACCTCAGT CGACGCGGCC GC

### **3.3 Warunki transfekcji**

Dzień przed transfekcją komórki były pasażowane i wysiewane do butelki lub na dołki w konfluencji 70-80%. Następnego dnia przeprowadzano transfekcję z użyciem rozgałęzionego PEI (polyetylenimine, Sigma Aldrich) 1mg/ml. Do transfekcji komórek w butelkach T75 wykorzystano 8 µg plazmidu na butelkę lub 1 µg plazmidu na dołek w płycie 12-dołkowej. DNA plazmidowe połączono z 1 ml (na butelkę) lub 0,2 ml (na dołek) DMEM bez dodatku surowicy. Następnie dodano 20 µl (na butelkę) lub 2,5 µl (na dołek) PEI. Mieszaninę worteksowano przez 15 sekund, a następnie inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. W tym czasie wymieniono medium w przygotowanych do transfekcji butelkach lub dołkach na świeże medium suplementowane surowicą (9 ml na butelkę i 1,8 ml na dołek). Po inkubacji wprowadzono mieszaninę transfekcyjną kroplami do butelek (1 ml) lub do dołków (0,2 ml). Po 24 godzinach inkubacji komórek, w standardowych warunkach, transfekowane komórki przeznaczone na oznaczenie poziomu białka i mRNA (dołki) zebrano przy użyciu trypsyny i zamrożono w -80 °C lub przeprowadzono od razu izolację RNA i lizę komórek pod oznaczenie aktywności białek reporterowych. Komórki

z butelek T75 przesiano następnie na szalki o średnicy 15 cm w celu zapobiegnięcia inhibicji translacji, ze względu na inhibicję kontaktową komórek. Jedna butelka była przesiana na jedną szalkę. Kolejnego dnia trzy godziny przed zbieraniem materiału wymieniono medium na wszystkich szalkach w celu pobudzenia procesu translacji.

### **3.4 Oznaczenie poziomu białka**

Aktywność białek reporterowych była wyznaczana za pomocą zestawu Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) przy użyciu czytnika płytek Infinite F200 Pro (Tecan). W tym celu po zebraniu transfekowanych komórek przeprowadzono lizę przy użyciu odczynnika PLB pochodzącego z zestawu Dual-Luciferase Reporter Assay System przez 30 minut w temperaturze 37 °C. Następnie próbki albo zamrożono w -20 °C lub przeprowadzono odczyt aktywności białek. Na białą płytkę 96 dołkową nałożono po 20 µl lizatu i po dodaniu substratu odczytano wartość reakcji świetlnej przeprowadzonej przez lucyferazę firefly, po czym dodano drugi odczynnik, który blokował pierwszą reakcję i był substratem dla drugiej reakcji świetlnej przeprowadzanej przez lucyferazę *Renilla*.

### **3.5 Oznaczenie poziomu mRNA**

Całkowite RNA było izolowane z zebranych próbek za pomocą zestawu Total RNA Mini (A&A Biotechnology). Stężenie RNA oraz czystość były oznaczane za pomocą spektrofotometru Nanodrop 2000c/2000 (ThermoScientific). Następnie RNA zostało przepisane na cDNA za pomocą zestawu do odwrotnej transkrypcji NG dART RT (Eurx) przy wykorzystaniu zarówno OligodT jak i randomowych hexamerów. Wybrana metoda pozwoliła przepisać całkowite RNA, również to, które nie posiadało sekwencji polyA w końcu 3'. Następnie poziom ekspresji genów był wyznaczany za pomocą qPCR przy wykorzystaniu zestawu RT PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology) z wykorzystaniem barwnika SYBR® Green. W tabeli nr 1 przedstawiono sekwencje starterów wykorzystywanych w reakcjach qPCR. Startery dla których podane są tylko sekwencje, bez numerów referencyjnych, zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed.

**Tabela 1 Spis użytych starterów dla sekwencji mRNA i miRNA**

| Lp. | Nazwa genu                | Starter „forward”               | Starter „reverse”  |
|-----|---------------------------|---------------------------------|--|
| 1   | Lucyferaza firefly        | GCTAAGAGCACCTGATCG              | CCTCTGGGGTAATCAGAATGG  |
| 2   | Lucyferaza <i>Renilla</i> | ACAAGTACCTCACCGCTTGG            | GACTCTCAGCATGGACGA   |
| 3   | GAPDH                     | TTTGGCTACAGCAACAGGGTG           | TTCCTCTTGTGCTCTTGCTGG  |
| 4   | RPL41                     | TCCTGCGTTGGGATTCCGTG            | ACGGTGCAACAAGCTAGCGG   |
| 5   | 18s rRNA                  | AAACGGCTACCACATCCAAG            | CCTCCAATGGATCCTCGTTA   |
| 6   | 5.8s rRNA                 | CTCTTAGCGGTGGATCACTC            | GACGCTCAGACAGGCGTAG  |
| 7   | eIF4G1                    | CAGAATCCCAGCCTTCGTCG            | TCCACTGTGTGAGATGCCAA   |
| 8   | eIF4G2                    | TAAGGACCGCATGTTGGAGA            | GGAAGGAGCAGAGGATGAATCT   |
| 9   | hsa-let-7i-5p             | GTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT         | Uniwersalny starter z zestawu miRNA<br>1st-Strand cDNA Synthesis |
| 10  | hsa-miR-24-3p             | TGGCTCAGTTCAGCAGGAACA           | Uniwersalny starter z zestawu miRNA<br>1st-Strand cDNA Synthesis |
| 11  | U75                       | AGCCTGTGATGCTTTAAGAGTAG         | Uniwersalny starter z zestawu miRNA<br>1st-Strand cDNA Synthesis |
| 12  | hsa-miR-21-5p             | TaqMan miRNA assay numer 000397 |  |
| 13  | hsa-let-7a-5p             | TaqMan miRNA assay numer 000377 |  |
| 14  | hsa-let-7f-5p             | TaqMan miRNA assay numer 000382 |  |
| 15  | U75                       | TaqMan miRNA assay numer 001219 |  |
| 16  | U6                        | TaqMan miRNA assay numer 001093 |  |

Mieszanina reakcyjna składała się z 10 µl buforu, 4 µl starterów i 6 µl mieszaniny RNA i wody. Do oznaczania ekspresji lucyferaz w hodowli komórkowej używano 100 pg cDNA natomiast do oznaczenia ekspresji pozostałych genów w hodowli lub w rozkładzie polisomalnym (również lucyferazy) wykorzystano 500 pg cDNA. Warunki reakcji przedstawiono w tabeli nr 2. Ekspresja genów lucyferazy *Renilla* i firefly została przedstawiona jako ilość cząsteczek

mRNA wyliczona na podstawie krzywej stworzonej ze znanych ilości plazmidu psiCHECK-2. Ekspresja pozostałych genów była wyliczona na podstawie wzoru  $\Delta\Delta CT$ .

**Tabela 2 Etapy reakcji PCR**

| RT-qPCR dla ekspresji genów   |             |           |             |
|---|-------------|-----------|-------------|
|   | Temperatura | Czas      | Powtórzenia |
| 1   | 50°C        | 2 minuty  | 1x          |
| 2   | 95°C        | 4 minuty  | 1x          |
| 3   | 95°C        | 15 sekund | 45 x        |
| 4   | 56,7°C      | 1 minuta  |             |
| RT-qPCR dla ekspresji miRNA let-7a-5p, let-7f-5p, miR-21-5p oraz referencji U6 i U75 (TaqMan) |             |           |             |
|   | Temperatura | Czas      | Powtórzenia |
| 1   | 50°C        | 2 minuty  | 1x          |
| 2   | 95°C        | 3 minuty  | 1x          |
| 3   | 95°C        | 10 sekund | 45x         |
| 4   | 60°C        | 1 minuta  |             |
| RT-qPCR dla ekspresji miRNA let-7i-5p, miR-24-3p oraz referencji U75                          |             |           |             |
|   | Temperatura | Czas      | Powtórzenia |
| 1   | 95°C        | 10 minut  | 1x          |
| 2   | 95°C        | 10 sekund | 40x         |
| 3   | 60°C        | 15 sekund |             |
| 4   | 72°C        | 20 sekund |             |

### 3.6 Oznaczanie poziomu miRNA

Poziom miRNA był wyznaczony za pomocą dwóch metod, przy wykorzystaniu sond typu TaqMan albo przy wykorzystaniu metody wydłużenia krótkich sekwencji za pomocą poli(A) polimerazy. Poziom hsa-miR-21-5p, hsa-let7a-5p, hsa-let7f-5p był wyznaczony za pomocą sond TaqMan, w tym celu całkowite RNA przepisano na cDNA za pomocą zestawu TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) przy wykorzystaniu specyficznych sond (numery wykorzystanych sond przedstawiono w tabeli nr 1), następnie przeprowadzono qPCR przy wykorzystaniu TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Jako referencję wykorzystano małe RNA U6 (dla miRNA let7a i let7f) oraz U75 (dla miR-21) – numery sond przedstawiono w tabeli nr 1. Warunki reakcji przedstawiono w tabeli nr 2.

Poziom hsa-let7i-5p oraz hsa-miR-24-3p wyznaczony był za pomocą metody wykorzystującej poliadenylację RNA. W tym celu użyto zestawu miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis kit (Agilent), za pomocą którego, w pierwszym etapie, dołączono sekwencję poli(A) do krótkich sekwencji RNA, a następnie, w drugim etapie, przepisano RNA na cDNA. Potem przeprowadzono reakcję qPCR z wykorzystaniem starterów zsyntetyzowanych przez Genomed (tabela nr 1) i uniwersalnego startera z zestawu do odwrotnej transkrypcji. Reakcję przeprowadzono przy użyciu miRNA QPCR Master Mix (Agilent). Warunki reakcji przedstawiono w tabeli nr 2.

### **3.7 Oligonukleotydy anty-miR**

W pracy wykorzystano siedem oligonukleotydów anty-miR zakupionych w firmie Integrated DNA Technologies. Sekwencje tych oligonukleotydów były komplementarne do sekwencji miRNA znajdujących się w bazie miRbase. Były to następujące sekwencje: hsa-miR-21-5p: MIMAT0000076; hsa-miR-24-3p: MIMAT0000080; hsa-let7a-5p: MIMAT0000062; hsa-let7d-5p: MIMAT0000065; hsa-let7f-5p: MIMAT0000067; hsa-let7g-5p: MIMAT0000414; hsa-let7i-5p: MIMAT0000415. W transfekcji komórek znajdujących się w dołkach na 12 dołkowej płytce wykorzystano 12 pmoli odpowiedniego oligonukleotydu przeprowadzając transfekcję jak opisaną wyżej, wraz z plazmidem zawierającym pasujące miejsca wiązania dla miRNA.

### **3.8 Izolacja kompleksów RNA-białko metodą wirowania w gradiencie sacharozy**

Trzy godziny przed zebraniem komórek wymieniono medium na świeże. Następnie przed samym zebraniem inkubowano komórki 5 minut w medium zawierającym cykloheksymid (Sigma-Aldrich) w stężeniu 100ng/ml. W kolejnym kroku przemyto komórki lodowatym PBSem również zawierającym cykloheksymid w stężeniu 100 ng/ml i zeskrobano komórki z płytek skrobaczką. Zeskrobane komórki zebrano za pomocą pipety i odwirowano w 4°C, ściągnięto nadsącz, a probówkę z osadem zanurzono w ciekłym azocie. Tak zamrożony materiał przechowywano w -80°C, aż do momentu przeprowadzenia izolacji polisomów. Dzień przed izolacją polisomów przygotowano 10ml gradient sacharozy 15%-45% w buforze 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM DTT, 100 ng/mL cykloheksymid (bufor używany do izolacji polisomów – bufor polisomalny). Gradient był przechowywany w 4°C. Osad komórkowy poddano lizie w buforze polisomalnym z dodatkiem 0,5% Tritonu-X100 i 2,5% glicerolu. Wszystkie operacje wykonywano na lodzie oraz użyto schłodzonych wcześniej buforów zawierających cykloheksymid (100ng/ml). Po 10 minutowej lizie preparaty

zwirowano przez 10 minut przy przyspieszeniu 16 000 xg, następnie supernatant nawarstwiono na przygotowany gradient sacharozy i wirowano przez 4 godziny przy przyspieszeniu 1 700 000 xg (40 000 rpm) przy użyciu rotora SW41ti i ultrawirówki Optima XPN-100 (Beckman Coulter Inc.). Po zwirowaniu zebrano około 100 frakcji metodą kropelkową rozpoczynając od dołu probówki i zmierzono ich absorbancję przy fali 260 nm na urządzeniu NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Na podstawie wyznaczonego profilu absorbancji podzielono zebrane frakcje na 5 kolejnych części, które powinny zawierać (od góry probówki): frakcja 1: wolne RNA i kompleksy z białkami o małej gęstości; frakcja 2: mała podjednostka rybosomalna i kompleksy RNA-białko o podobnej gęstości; frakcja 3: monosomy z dużą podjednostką rybosomalną i cięższe kompleksy; frakcja 4: lekkie polisomy i gęste kompleksy białko-RNA-RNA; frakcja 5: cząsteczki z większą liczbą rybosomów i ciężkie kompleksy. Tak podzielony materiał był wykorzystany w dalszych analizach.

### **3.9 Szacowanie liczby komórek służących do izolacji RNA i białka genów reporterowych**

Liczba komórek w eksperymentach została oszacowana na podstawie ilości RNA całkowitego i przeliczona na komórkę. W tym celu sprawdzono ile całkowitego RNA z danej linii komórkowej można wyizolować z 10 000 komórek. Do wyznaczenia liczby komórek poddanych izolacji wykorzystano komorę Bürkera. Dla komórek HCT116 średnia z trzech powtórzeń wynosiła  $20,97 \pm 5,66$  pg/komórkę, natomiast dla Me45 było to  $35,27 \pm 5,78$  pg/komórkę.

### **3.10 Mikromacierze**

Do wyznaczenia różnic w poziomach transkryptów czynników translacyjnych oraz innych genów uczestniczących w procesach związanych z mRNA wykorzystano wyniki wcześniej wykonanych oznaczeń za pomocą mikromacierzy firmy Affymetrix i Agilent, zamieszczonych w repozytorium ArrayExpress pod numerami E-MEXP-2623 i E-MTAB-5197. Wyniki zostały znormalizowane do poziomu mRNA w jednej komórce na podstawie ilości nałożonego RNA i wyznaczonej wartości RNA w komórce z poszczególnej linii komórkowej – jak w punkcie 3.8.

### **3.11 Modelowanie**

Na potrzeby stworzenia modelu założono, że transkrypty genów reporterowych tworzą kompleksy prowadzące do różnych etapów translacji lub kondensatów blokujących translację i uczestniczących w procesach degradacji mRNA. Model zaprojektowano i zaimplementowano w programie Matlab 2015. Wykorzystano metodę iteracyjną do wyznaczenia kolejnych kroków

modelu oraz metodę najmniejszych kwadratów do uzyskania najlepszego dopasowania do danych eksperymentalnych.

### **3.12 Statystyka**

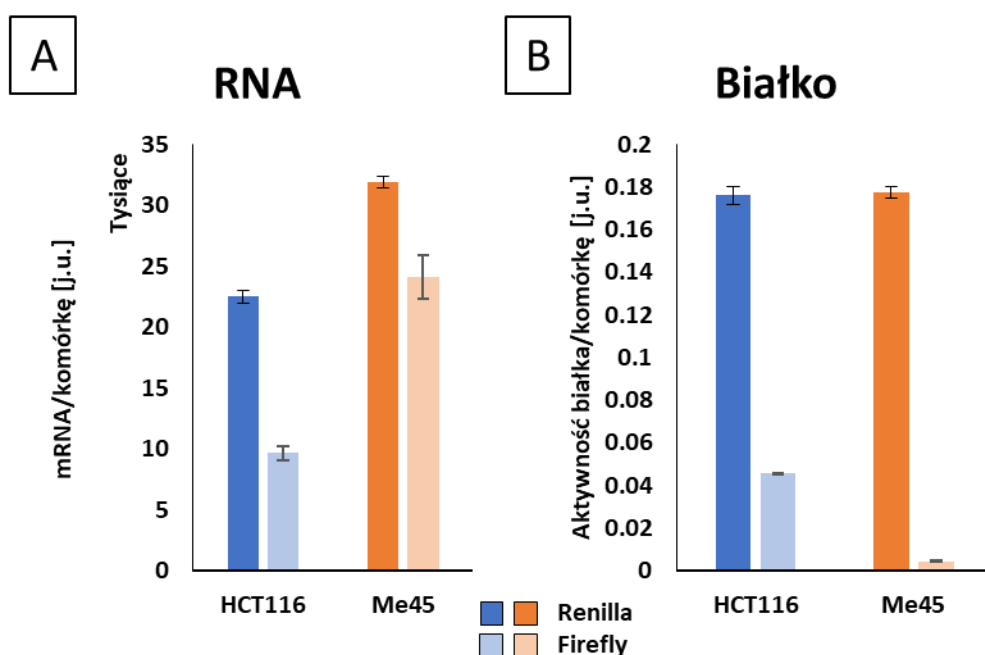
Wykorzystano test Shapiro-Wilka do zbadania normalności rozkładów oraz test t Studenta do zbadania istotności różnic pomiędzy grupami dla danych pochodzących z mikromacierzy. Istotność przy wartościach  $p < 0.05$  na wykresach zaznaczono symbolem \*.



## 4 WYNIKI

### 4.1 Ekspresja genów reporterowych w komórkach HCT116 i Me45

Linie komórkowe HCT116 (rak jelita grubego) i Me45 (czerniak) poddałam transfekcji przejściowej z wykorzystaniem PEI i plazmidów psiCHECK-2. Zebrałam materiał do badań i oznaczyłam poziom mRNA oraz aktywność luminescencyjną białek reporterowych. Uzyskane wyniki przeliczyłam na komórkę. Linia HCT116 jest nabłonkową linią komórkową wyizolowaną z nowotworu jelita grubego pochodzącego od dorosłego pacjenta płci męskiej. Charakteryzuje się dość szybkim wzrostem z podziałem komórkowym co 8 godzin. Linia Me45 również jest linią nabłonkową, wyizolowaną z komórek czerniaka z przerzutu do węzła chłonnego dorosłego pacjenta płci męskiej potwierdzonych immunocytochemią (Kramer-Marek et al., 2006). Komórki te charakteryzowały się dłuższym czasem podziału wynoszącym 16 godzin.



Rycina 7 **Ekspresja genów reporterowych.** (A) - lucyferazy *Renilla* (ciemniejsze barwy słupków) i lucyferazy *firefly* (jaśniejsze barwy słupków) oraz aktywność białek reporterowych (B) w komórkach HCT116 (niebieskie słupki) i Me45 (pomarańczowe słupki) przeliczone na komórkę.

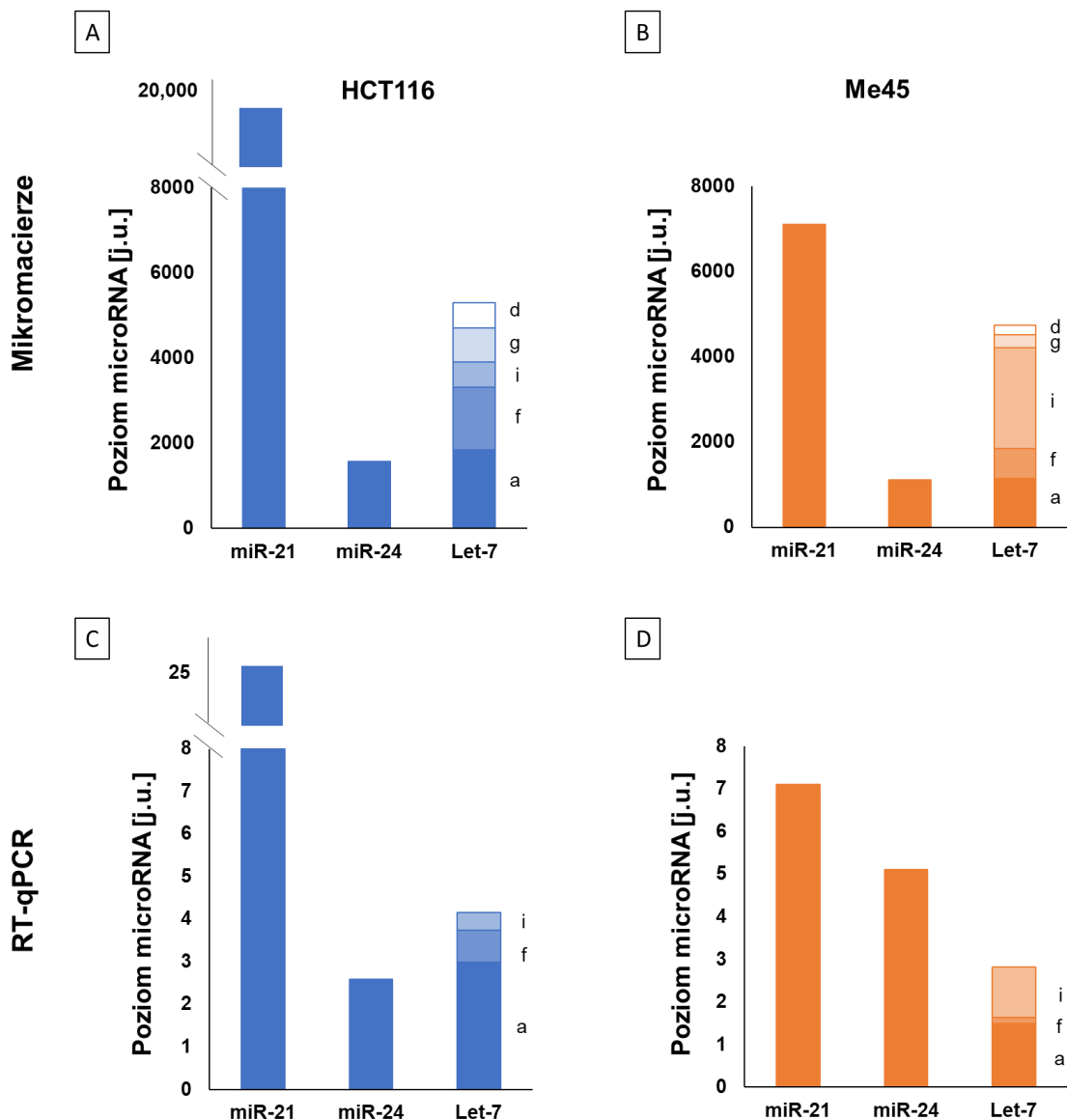
Geny reporterowe znajdujące się na wybranym plazmidzie charakteryzowały się silnymi promotorami co sprawiało, że ich ekspresja była prawie 100-krotnie wyższa niż ekspresja genów „housekeeping” przy czym promotor przy lucyferazie *Renilla* wykazywał silniejsze działanie, stąd jej ekspresja była wyższa niż ekspresja genu lucyferazy *firefly*. Na rycinie nr 7 przedstawiłam jak wyglądała ekspresja genów reporterowych w badanych liniach

komórkowych. Poziomy ekspresji genów reporterowych, regulowanych i nieregulowanych przez miRNA, przedstawiam w ilości cząsteczek mRNA i aktywności białek przypadających na pojedynczą komórkę. Poziom mRNA obu genów reporterowych był wyższy w komórkach Me45, natomiast w HCT116 występowała większa różnica pomiędzy transkryptami lucyferazy *Renilla* i firefly. Poziomy aktywności białka lucyferazy *Renilla* w obu liniach komórkowych były podobne. Lucyferaza firefly wykazywała wyższą aktywność w komórkach HCT116.

## 4.2 Wpływ miRNA na ekspresję genów reporterowych

### 4.2.1 Wybór miRNA do badań

Do badań wybrałam zestaw miRNA, które rozpoznają trzy rodzaje sekwencji docelowych w mRNA, były to miR-21-5p, miR-24-3p oraz miRNA z rodziny let-7. Głównym kryterium

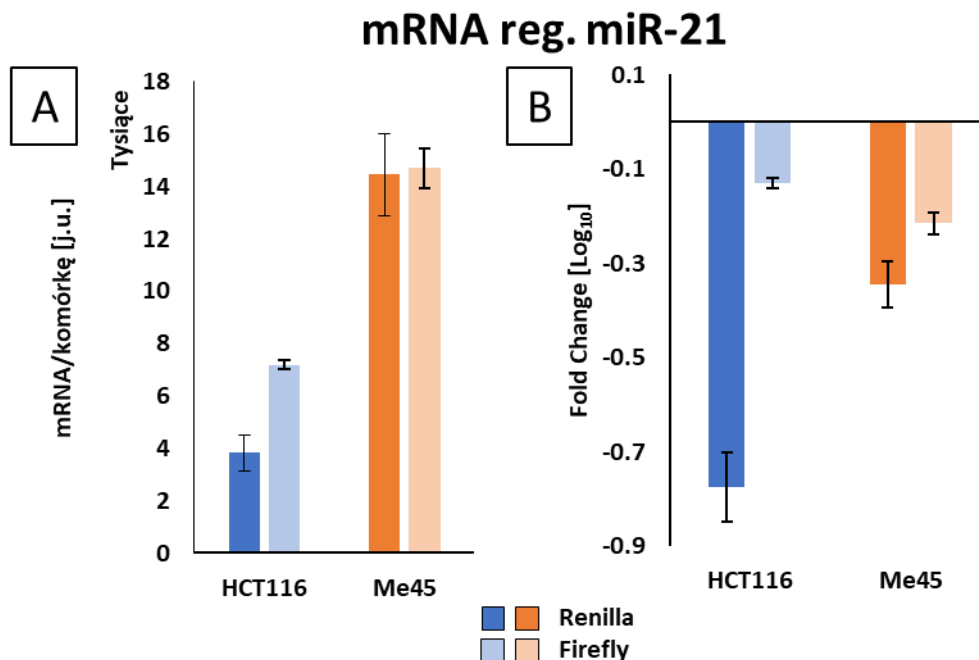


Rycina 8 **Ekspresja microRNA.** Poziomy ekspresji miRNA wyznaczone za pomocą mikromacierzy Agilent (A,B) oraz przy pomocy RT-qPCR (C,D), wykonane dla komórek HCT116 (A,C, niebieskie słupki) i Me45 (B,D, pomarańczowe słupki)

wyboru była stosunkowo wysoka ekspresja tych miRNA oraz to, że często były one opisywane w literaturze. Do określenia ekspresji tych miRNA w badanych komórkach wykorzystałam eksperymenty mikromacierzowe (E-MTAB-5197) oraz wyniki otrzymane z reakcji ilościowego PCRu. Ekspresja tych miRNA w komórkach HCT116 i Me45 została przedstawiona na rycinie nr 8. Najwyższą ekspresją charakteryzowało się miRNA-21 w obu liniach komórkowych, co też zostało potwierdzone za pomocą RT-qPCR, przy czym poziom był wyższy w linii komórkowej HCT116.

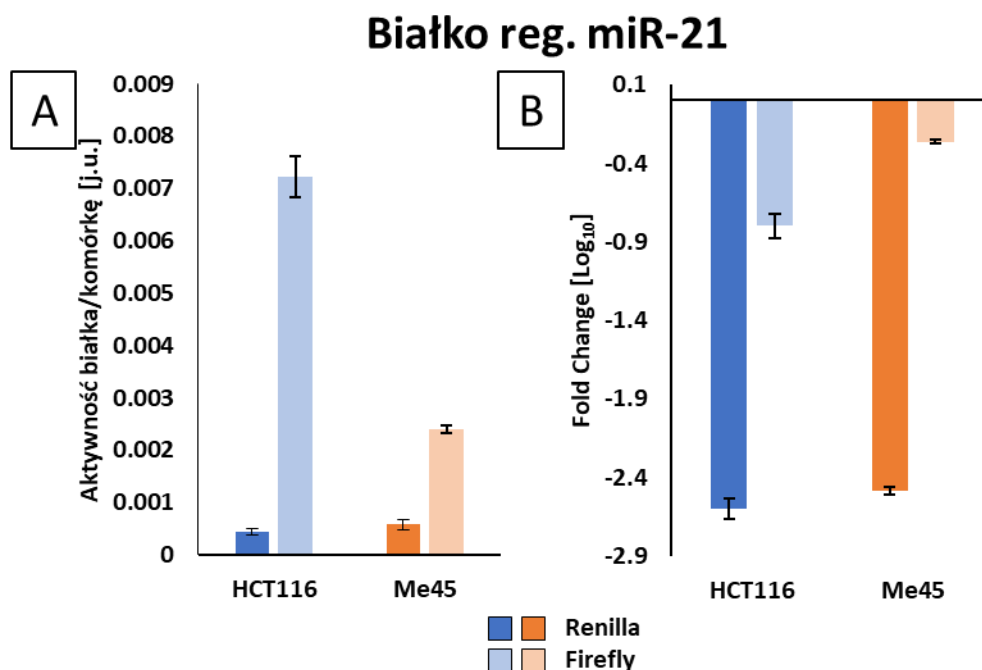
Szczególnym badaniem przeze mnie miRNA jest let-7, rodzina różnych miRNA rozpoznających tę samą sekwencję docelową. W obu typach badanych komórek wykazałam ekspresję różnych miRNA należących do grupy let-7 (ryc. nr 8). Suma ekspresji tych miRNA z rodziny let-7 w obu typach komórek była podobna w przypadku wyznaczenia ekspresji za pomocą mikromacierzy. W przypadku oznaczeń metodą PCR suma ta była nieco wyższa w komórkach HCT116. Wyznaczony poziom miR-24 był porównywalny między liniami, w przypadku mikromacierzy, natomiast zbadany za pomocą RT-qPCR wykazywał wyższą ekspresję w komórkach Me45.

#### 4.2.2 Wpływ miRNA-21 na ekspresję lucyferaz *Renilla* i firefly



**Rycina 9 Ekspresja genów reporterowych pod wpływem działania miR-21 w komórkach HCT116 i Me45.** (A) poziomy mRNA lucyferazy *Renilla* posiadającej miejsca wiązania dla miR-21 (ciemniejsze barwy słupków) i kotransfekowanej lucyferazy firefly nieregulowanej przez miRNA (jaśniejsze barwy słupków); (B) zmiana (fold change) ekspresji względem genów reporterowych bez miejsc wiązania.

W końcu 3' genu lucyferazy *Renilla* wstawiono sekwencję komplementarną do miRNA-21. Gen z taką sekwencją transfekowany do komórek HCT116 ulega ekspresji ze znacznie mniejszą wydajnością niż gen nie posiadający sekwencji regulatorowych w końcu 3' (w tym przypadku poziom lucyferazy *Renilla* był podobny jak lucyferazy firefly bądź niższy) co przedstawiono na rycinie nr 9A. Ponadto poziomy transkryptów kotransfekowanego genu lucyferazy firefly były niższe od poziomów uzyskanych przy braku regulacji przez miR-21 na genie lucyferazy *Renilla* (zmiana pokazana na rycinie nr 9B). W przypadku białka reporterowego lucyferazy *Renilla* zaobserwowano niski poziom, w obu liniach komórkowych był on niższy niż poziom lucyferazy firefly (ryc. nr 10A). Podobnie jak mRNA białko również było na niższym poziomie niż poziomy uzyskane przy braku regulacji genów reporterowych przez miRNA-21 (ryc. nr 10B). Pomimo podobnego poziomu mRNA, zaobserwowano wyższy poziom białka lucyferazy firefly, zarówno w HCT116 jak i w Me45 (ryc. nr 9A, 10A). Porównując poziomy mRNA i białek w tych liniach komórkowych można zauważyć, że komórki te różniły się wydajnością procesu translacji i pomimo niższego poziomu mRNA lucyferazy firefly w komórkach HCT116 wykazywały one wyższy poziom białka lucyferazy firefly w porównaniu do komórek Me45 (ryc. nr 9A, 10A).

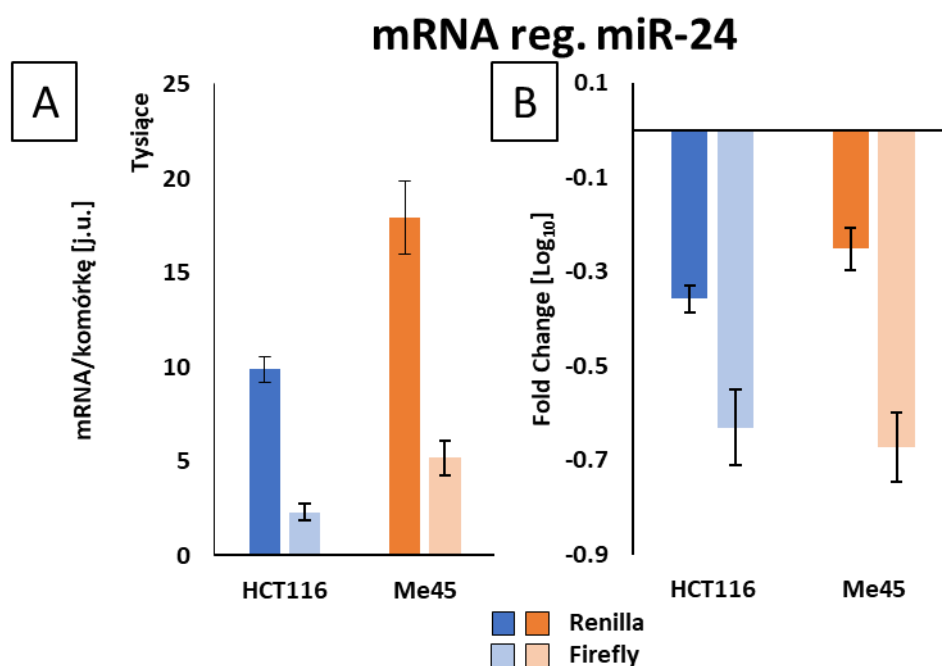


*Rycina 10 Aktywność białek reporterowych przy regulacji przez miR-21. (A) – lucyferazy Renilla, której transkrypt posiadał miejsca wiązania dla miR-21 (ciemniejsze barwy słupków) i lucyferazy firefly której transkrypt nie był regulowany przez miRNA; (B) - zmiana (fold change) aktywności względem białek reporterowych, których transkrypty były bez miejsc wiązania w komórkach HCT116 (niebieskie słupki) i Me45 (pomarańczowe słupki).*

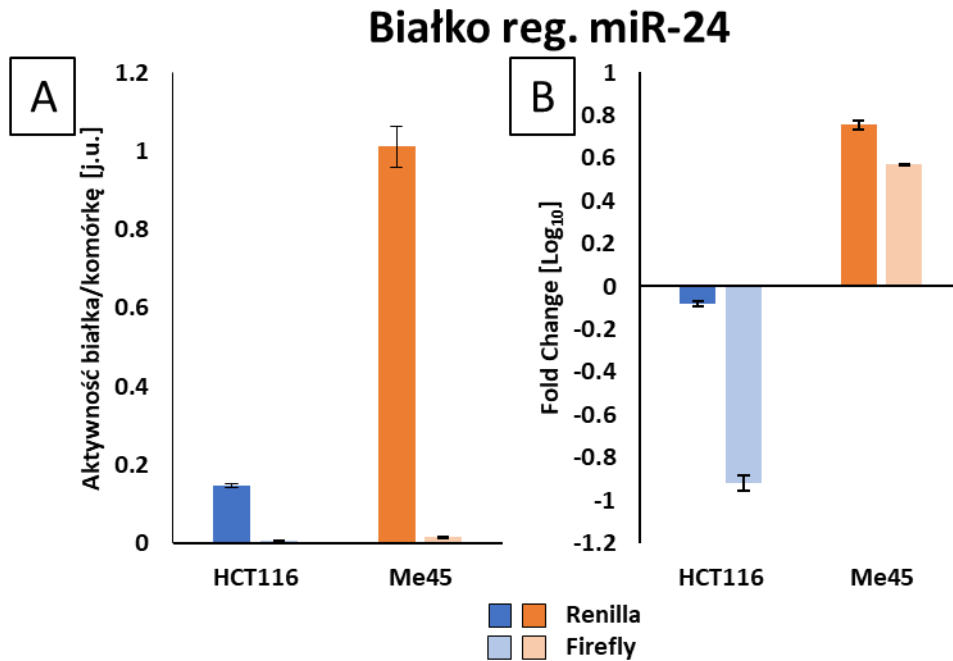
### 4.2.3 Wpływ miR-24 na ekspresję lucyferazy *Renilla* i firefly

W przypadku gdy gen reporterowy (lucyferaza *Renilla*) posiadał w końcu 3' miejsca docelowe dla miR-24 transkrypty lucyferaz *Renilla* i firefly kotransfekowane na plazmidzie psiCHECK-2 wykazywały wyższy poziom ekspresji w komórkach Me45 niż w komórkach HCT116 (ryc. nr 11A). Ponadto gen lucyferazy *Renilla* wykazywał się wyższym poziomem transkryptów niż lucyferazy firefly w obu typach komórek (ryc. nr 11A). Podobnie jak w przypadku genów przy regulacji przez miR-21 i w tym przypadku poziomy mRNA genów reporterowych były niższe niż gdy nie występowały w modelu eksperymentalnym dodatkowe miejsca wiązania dla miRNA (ryc. nr 11B). Poziom białka lucyferazy *Renilla* i firefly był proporcjonalny do poziomów mRNA między liniami komórkowymi tzn. wyższy poziom białka występował tam gdzie był też wyższy poziom mRNA (ryc. nr 11A, 12A).

Aktywność białka lucyferazy *Renilla* była wyższa w komórkach Me45 oraz wykazywała się też wyższym poziomem niż, gdy transkrypt tego genu nie posiadał dodatkowych miejsc

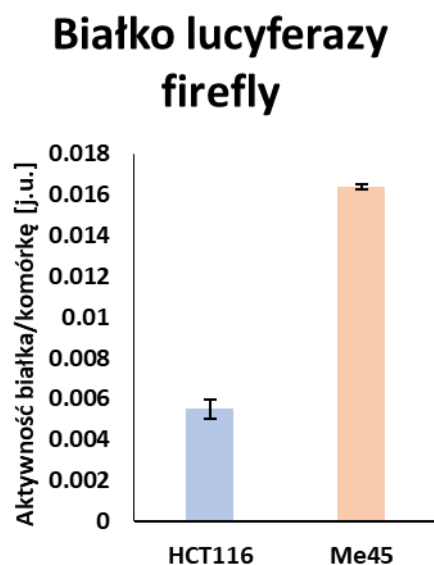


Rycina 11 Ekspresja genów reporterowych pod wpływem działania miR-24 w komórkach HCT116 i Me45. (A) poziomy mRNA lucyferazy *Renilla* posiadającej miejsca wiązania dla miR-24 (ciemniejsze barwy słupków) i kotransfekowanej lucyferazy firefly nieregulowanej przez miRNA (jaśniejsze barwy słupków); (B) zmiana (fold change) ekspresji względem genów reporterowych bez miejsc wiązania.



*Rycina 12 Aktywność białek reporterowych przy regulacji przez miR-24. (A) – lucyferazy Renilla, której transkrypt posiadał miejsca wiązania dla miR-24 (ciemniejsze barwy słupków) i lucyferazy firefly której transkrypt nie był regulowany przez miRNA; (B) - zmiana (fold change) aktywności względem białek reporterowych, których transkrypty były bez miejsc wiązania w komórkach HCT116 (niebieskie słupki) i Me45 (pomarańczowe słupki).*

wiązania dla miRNA (ryc. nr 12AB). Ekspresja białka z genu lucyferazy *Renilla* regulowanego przez miR-24 w komórkach HCT116 była podobna do ekspresji tego białka z genu bez miejsc wiązania (ryc. nr 12B). Aktywności białka lucyferazy firefly były znacznie niższe w obu liniach komórkowych dlatego ich poziomy zaprezentowano na rycinie nr 13 w zmienionej skali. W linii komórkowej HCT116 poziom białka lucyferazy firefly z genu kotransfekowanego

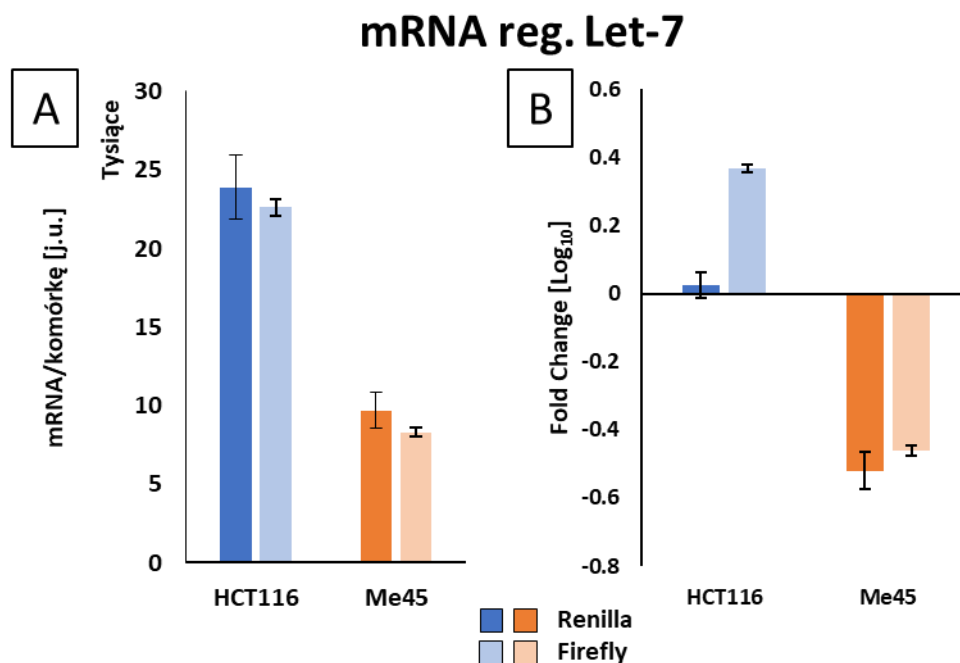


*Rycina 13 Poziom białka lucyferazy firefly w komórkach HCT116 i Me45. Gen lucyferazy firefly kotransfekowany z genem Renilla posiadającym miejsca wiązania miRNA-24.*

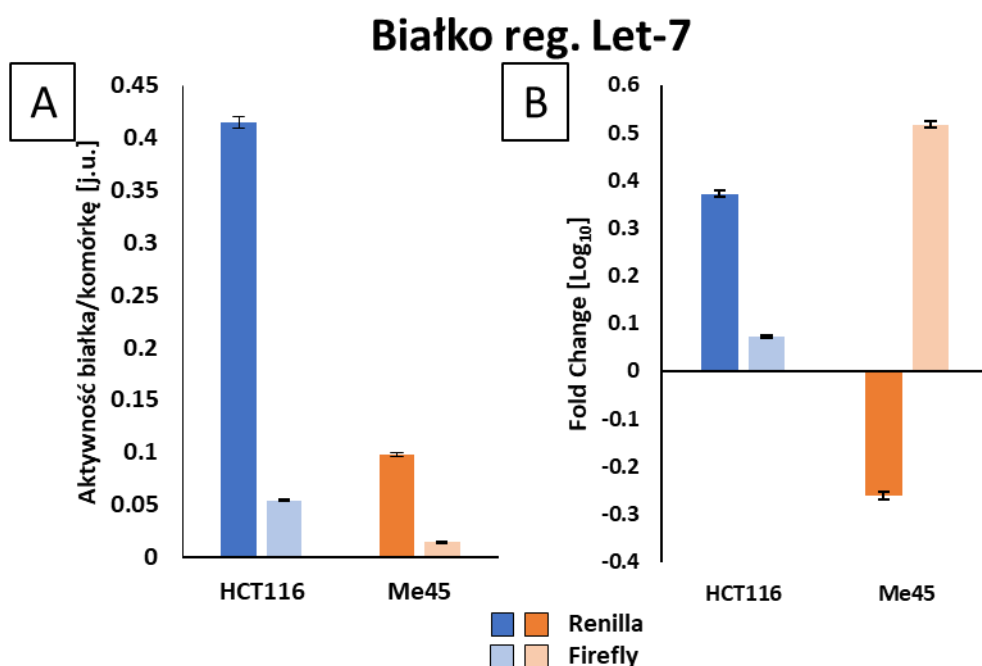
z genem lucyferazy *Renilla* regulowanym przez miR-24, był niższy niż w przypadku kiedy gen lucyferazy *Renilla* nie posiadał regulacji przez miRNA (ryc. nr 12B). Poziom białka lucyferazy firefly w komórkach Me45 był wyższy niż w komórkach HCT116 (ryc. nr 13) i wyższy niż gdy gen lucyferazy firefly był kotransfekowany z genem lucyferazy *Renilla* bez modyfikacji końca 3' (ryc. nr 12B).

#### 4.2.4 Wpływ miRNA z rodziny let-7 na ekspresję lucyferazy *Renilla* i firefly

Dla lucyferazy *Renilla*, która posiadała miejsca wiązania dla miRNA z rodziny let-7, oraz dla lucyferazy firefly pochodzącej z tego samego plazmidu otrzymano wyniki przedstawione na rycinie nr 14A. Poziom mRNA obu lucyferaz był podobny w obrębie linii komórkowej, ale wyższy w komórkach HCT116 niż w komórkach Me45. Poziom białka był wyższy dla lucyferazy *Renilla* w obu liniach komórkowych oraz podobnie jak RNA wyższy w komórkach HCT116. Co ciekawe poziom ten był również wyższy niż w przypadku genu lucyferazy *Renilla* nie posiadającej miejsc wiązania dla wybranych miRNA i genu towarzyszącej jej lucyferazy firefly (ryc. nr 15B). Pomimo podobnego poziomu mRNA lucyferazy *Renilla* i firefly (ryc. nr 14A), ilość białka jest wyższa dla lucyferazy *Renilla* niż dla lucyferazy firefly (ryc. nr 15A).



**Rycina 14 Ekspresja genów reporterowych pod wpływem działania let-7 w komórkach HCT116 i Me45.** (A) poziomy mRNA lucyferazy *Renilla* posiadającej miejsca wiązania dla let-7 (ciemniejsze barwy słupków) i kotransfekowanej lucyferazy firefly nieregulowanej przez miRNA (jaśniejsze barwy słupków); (B) zmiana (fold change) ekspresji względem genów reporterowych bez miejsc wiązania.



Rycina 15 **Aktywność białek reporterowych przy regulacji przez let-7.** (A) – lucyferazy Renilla, której transkrypt posiadał miejsca wiązania dla let-7 (ciemniejsze barwy słupków) i lucyferazy firefly której transkrypt nie był regulowany przez miRNA; (B) - zmiana (fold change) aktywności względem białek reporterowych, których transkrypty były bez miejsc wiązania w komórkach HCT116 (niebieskie słupki) i Me45 (pomarańczowe słupki).

### 4.3 Wydajność translacji

Podjęłam próbę oszacowania ilości białka powstającego z pojedynczej cząsteczki mRNA. Warunki eksperymentu nie pozwoliły na wyznaczenie określonej ilości cząsteczek białka powstającego z pojedynczej cząsteczki mRNA ze względu na użytą metodę polegającą na oznaczeniu aktywności enzymu. W związku z tym wydajność translacji w przeliczeniu na cząsteczkę mRNA została przedstawiona w jednostkach umownych. Porównanie wyników przedstawiono w tabeli nr 3.

**Tabela 3 Liczbowa reprezentacja wydajności procesu translacji.** Liczona wg schematu: poziom białka x 10<sup>6</sup>/poziom mRNA

|        |                | Kontrola    | Regulacja miR-21 | Regulacja miR-24 | Regulacja let-7 |
|--------|----------------|-------------|------------------|------------------|-----------------|
| HCT116 | <i>Renilla</i> | 7.82 ± 0.21 | 0.12 ± 0.02      | 14.88 ± 0.94     | 17.45 ± 1.40    |
|        | firefly        | 4.71 ± 0.25 | 1.01 ± 0.05      | 2.46 ± 0.42      | 2.39 ± 0.05     |
| Me45   | <i>Renilla</i> | 5.56 ± 0.10 | 0.04 ± 0.01      | 56.82 ± 5.62     | 10.15 ± 1.15    |
|        | firefly        | 0.18 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01      | 3.23 ± 0.46      | 1.75 ± 0.06     |

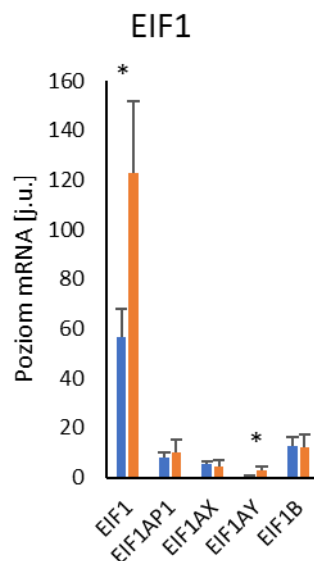


Wydajność translacji dla kontroli bez wprowadzonych miejsc wiązania dla miRNA była wyższa w komórkach HCT116 zarówno dla lucyferazy *Renilla* jak i firefly. Dołożenie regulacji przez miR-21 powodowało spadek wydajności procesu translacji zarówno w transkrypcie regulowanym jak i dla transkryptu kotransfekowanego bez regulacji. Regulacja poprzez miR-24 w komórkach HCT116 powodowała dwukrotny wzrost wydajności translacji i jedenastokrotny wzrost w komórkach Me45 natomiast dla kotransfekowanego transkryptu bez dodatkowej regulacji w tym układzie obserwowano spadek wydajności w komórkach HCT116 i wzrost w komórkach Me45. Podobna zależność wystąpiła w przypadku regulacji przez miRNA z rodziny let-7 choć w przypadku komórek Me45 był tu obserwowany niższy wzrost wydajności.

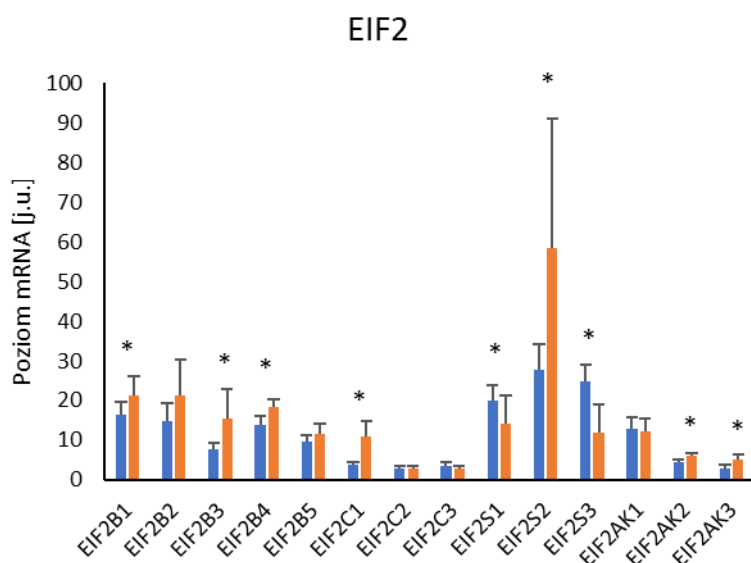
#### 4.4 Różnice między komórkami HCT i Me45 w ekspresji czynników regulujących inicjację translacji

Różnice w wydajności translacji pomiędzy komórkami mogą wynikać z różnego składu komórkowego czynników translacyjnych związanych z procesem inicjacji translacji.

Różnice na poziomie mRNA zaobserwowano m.in. dla czynnika eIF1 oraz eIF1AY (ryc. nr 16) gdzie dla tego drugiego czynnika różnica ta głównie będzie zależeć od tego, że linia HCT116 wykazuje się utratą w 50% komórek chromosomu Y. EIF1AY oraz EIF1AX odpowiadają za wzmocnienie przyłączania się Met-tRNA do małej podjednostki rybosomu (40S) (Lapointe et al., 2022). Czynniki eIF1 zaangażowany jest w skanowanie i wybieranie miejsca początku translacji (Thakur et al., 2019).



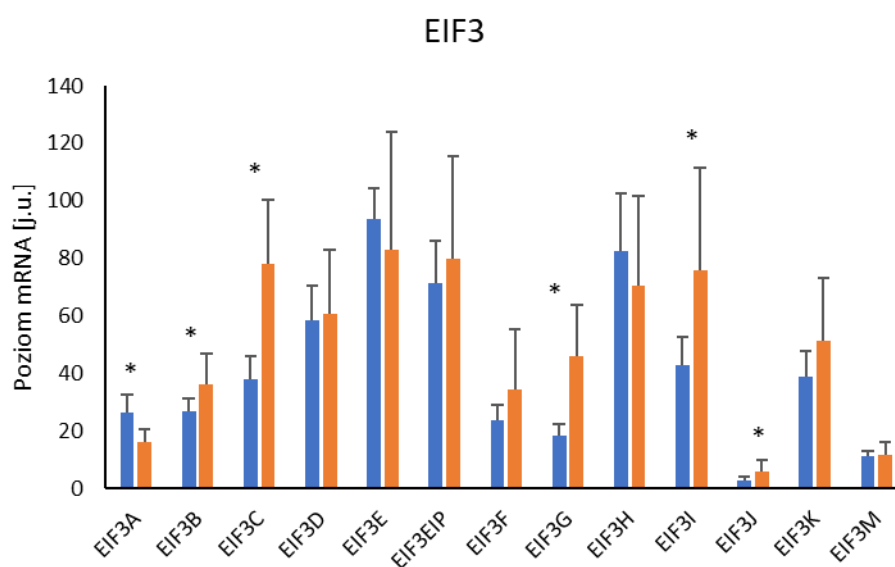
Rycina 16 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF1. Mierzone za pomocą mikromacierzy.



**Rycina 17 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF2. Mierzone za pomocą mikromacierzy.**

W przypadku czynników eIF2 można podzielić je na kilka grup AK, B, C i S. Białka eIF2AK to kinazy odpowiedzialne za fosforylację białka eIF2S1 i jego blokadę w momencie wystąpienia w komórkach różnych warunków stresowych m.in. zakażenie wirusowe, stres metaboliczny czy szok temperaturowy (Krishna & Kumar, 2018). Wyższą obecność transkryptu zaobserwowałam w komórkach Me45 w porównaniu do HCT116, natomiast poziom ten jest stosunkowo niski (ryc. nr 17). Piątka białek eIF2B tworzy kompleks katalizujący wymianę GDP na GTP w kompleksie eIF2S (Bogorad et al., 2018). Tu również obserwowany poziom transkryptu jest wyższy w komórkach Me45 (ryc. nr 17). Najczęściej przyjmuje się, że grupa białek eIF2C, szerzej znanych jako białka Ago, bierze udział w procesach blokujących proces translacji (Wu et al., 2020). W przypadku wykorzystanych linii komórkowych wyższy poziom transkryptu eIF2C1 (Ago1) był w komórkach Me45. Pozostałe dwa transkrypty, eIF2C2 i eIF2C3, były na podobnym poziomie między badanymi liniami komórkowymi (ryc. nr 17). Kolejną grupę stanowiły białka eIF2S odpowiedzialne za tworzenie tzw. kompleksu trójskładnikowego zawierającego małą podjednostkę rybosomalną 40S, GTP i met-tRNA (tzw. kompleks preinicjacyjny 43S). Tu poziomy dwóch transkryptów białek składających się na kompleks czynnika eIF2S były wyższe w komórkach HCT116 (eIF2S1 i eIF2S3), a poziom trzeciego (eIF2S2) przeważał w komórkach Me45 (ryc. nr 17). Czynniki eukariotycznej inicjacji translacji eIF3 stanowią szeroką rodzinę białek posiadającą szereg różnych funkcji m.in. stymulują poszukiwanie miejsca sekwencji początkowej (AUG) procesu translacji bądź stymulują przyłączanie się kompleksu preinicjacyjnego 43S do

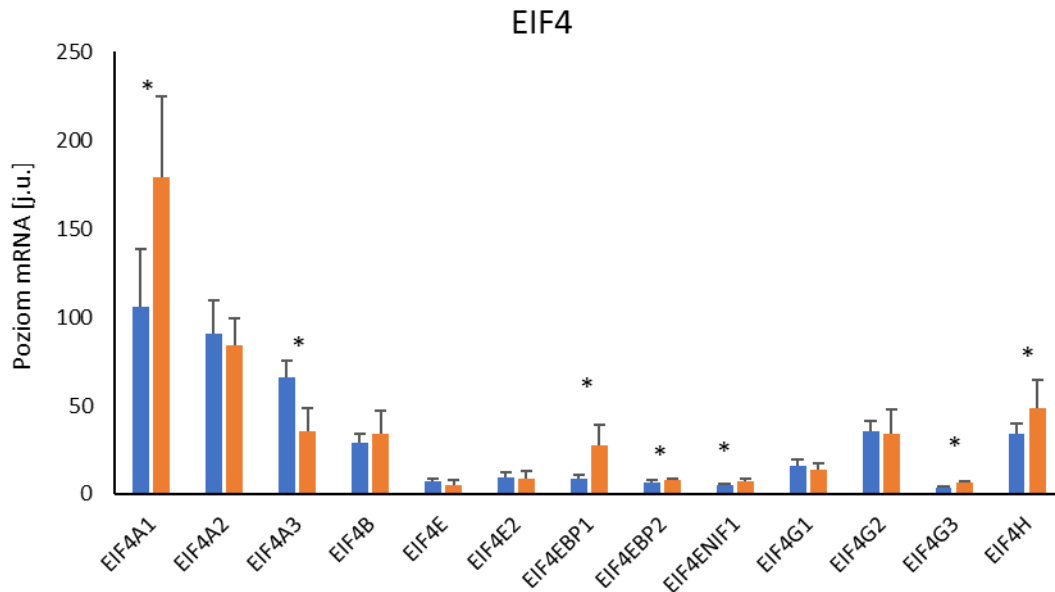
cząsteczki RNA. Co ciekawe nie wszystkie podjednostki kompleksu eIF3 występują czy biorą udział w procesie translacji w różnych liniach komórkowych. Nawet ilość tych podjednostek wykorzystywanych w konkretnym procesie translacji może ulegać zmianie. Analizy wykazały ponadto wyższy poziom transkryptów w komórkach Me45 takich podjednostek czynnika eIF3 jak eIF3B, eIF3C, eIF3G, eIF3I czy J (ryc. nr 18). Przy czym transkrypt czynnika eIF3J występował w obu typach komórek na niskim poziomie (ryc. nr 18). W komórkach HCT116 jedynym czynnikiem o poziomie wyższym niż w komórkach Me45 był czynnik eIF3A (ryc. nr 18).



**Rycina 18 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF3. Mierzone za pomocą mikromacierzy.**

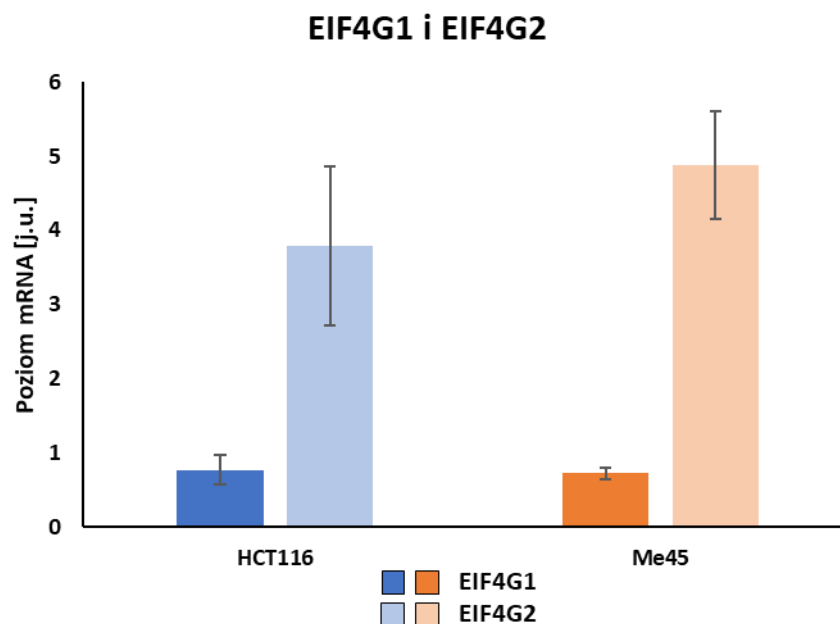
Kolejnymi czynnikami były czynniki eIF4. W badanych liniach komórkowych obserwowałam różnicę w poziomach transkryptów helikaz rozplatających mRNA. Obserwowałam wyższy poziom eIF4A1 w komórkach Me45 w porównaniu do HCT116 oraz wyższy poziom eIF4A3 w komórkach HCT116. Poziomy transkryptów czynnika eIF4E odpowiedzialnych za rozpoznawanie sekwencji czapeczki mRNA i przyłączanie kompleksu 4F do mRNA były w obu liniach komórkowych na stosunkowo niskim poziomie, natomiast poziom inhibitora czynników eIF4E był wyższy w komórkach Me45 (eIF4EBP1 i 2, ryc. nr 19). Poziom transkryptu czynnika eIF4ENIF1 zaangażowanego w różne procesy dążące do represji procesu translacji m.in. poprzez kierowanie mRNA do p-bodies bądź promowanie akcji miRNA był stosunkowo niski w wybranych liniach komórkowych z wyższym poziomem w Me45. Transkrypt czynnika eIF4G3 był również na niskim poziomie z przewagą w komórkach Me45. Kolejną różnicę zaobserwowano przy czynniku eIF4H, również na korzyść komórek z linii

Me45 – białko to wspomaga działanie helikaz rozplatających cząsteczkę mRNA w procesie translacji.



*Rycina 19 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF4. Mierzone za pomocą mikromacierzy.*

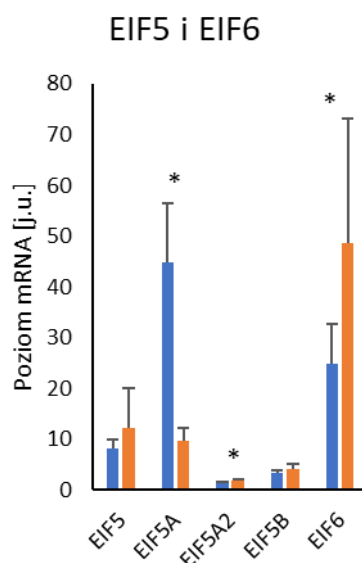
Wybrane wyniki przedstawione na rycinie 19 potwierdziłam metodą RT-qPCR. Wynik uzyskany metodą PCR dla transkryptów eIF4G1 i G2, głównie odpowiedzialnych za możliwość stworzenia cząsteczki cyrkularnej w trakcie translacji, przedstawiam na rycinie nr 20. W wykorzystanych liniach komórkowych, w obu przypadkach obserwowałam wyższy poziom



*Rycina 20 Poziomy transkryptów eIFG1 i G2. Mierzone za pomocą RT-qPCR.*

eIF4G2, czyli czynnika, który wiąże się z końcem 5' cząsteczki mRNA ale nie ma zdolności do łączenia końca 3'.

W przypadku czynników eIF5 i czynnika eIF6 widać różnicę w transkrypcie czynnika eIF5A na korzyść komórek HCT116 (ryc. nr 21). Czynniki te posiadają szereg funkcji m.in. może przywrócić proces translacji w przypadku zatrzymania rybosomów. Natomiast dla czynnika eIF6, odpowiedzialnego za transport prekursora dużej podjednostki rybosomalnej (60S) z jądra do cytoplazmy oraz za blokadę przedwczesnego tworzenia się rybosomu, obserwowałam wyższy poziom transkryptu w komórkach Me45 (ryc. nr 21).



Rycina 21 Poziomy transkryptów genów kodujących białka uczestniczące w inicjacji translacji z rodziny eIF5 i eIF6. Mierzone za pomocą mikromacierzy.

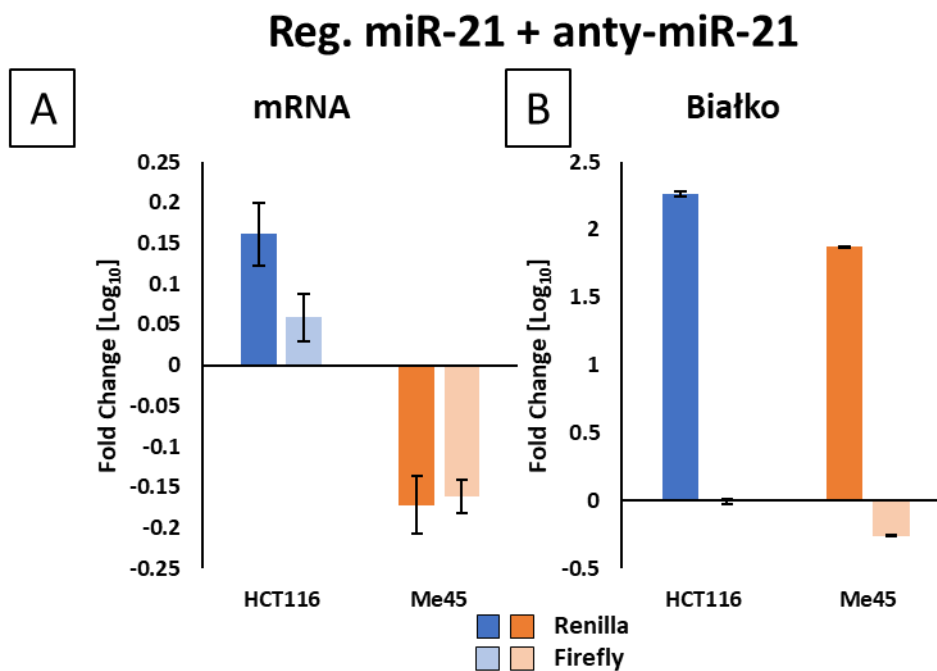
#### 4.5 Różnice w działaniu miR-21, miR-24 i let-7

Różne miRNA w przeprowadzonych eksperymentach dawały różne efekty, jeżeli chodzi o zmiany poziomów białka i mRNA genów reporterowych. Zwracając uwagę na te pokazane wcześniej różnice zdecydowałam się sprawdzić na ile efekt ten, jest wynikiem działania miRNA. W tym celu wykorzystałam oligonukleotydy o sekwencji komplementarnej do badanych cząsteczek miRNA, które poprzez wiązanie się z cząsteczkami miRNA mają działanie hamujące efekt interferencji RNA. Wykorzystane oligonukleotydy anty-miRNA były w 100% komplementarne do wybranych miRNA.

##### 4.5.1 Inhibicja przez miR-21

W przypadku inhibicji miRNA miR-21 w komórkach HCT116 zaobserwowano wzrost poziomów transkryptów lucyferazy *Renilla* posiadającej miejsca wiązania dla miRNA-21. Zaskakującym wynikiem były zmiany poziomów lucyferazy firefly bez miejsc wiązania

w porównaniu do tych samych transkryptów przy braku blokady miRNA (ryc. nr 22A). W komórkach Me45 blokada miRNA-21 spowodowała spadek poziomu mRNA tych genów (ryc. nr 22A). Natomiast w obu liniach komórkowych zaobserwowano niewielki wpływ na poziom białka lucyferazy firefly (ryc. nr 22B) i mocny, ponad 100-krotny, wzrost poziomu białka lucyferazy *Renilla* (ryc. nr 22B, skala  $\log_{10}$ ).

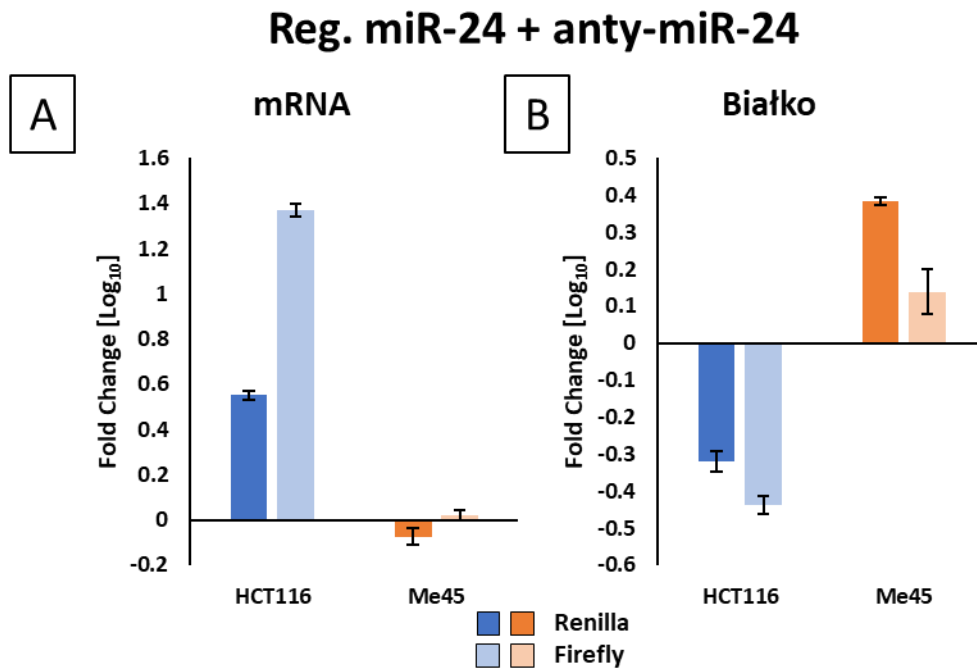


*Rycina 22 Zmiany poziomów (fold change) mRNA (A) i białka (B) kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu miR-21. Zmiana ekspresji lucyferazy Renilla posiadającej miejsca wiązania dla miR-21 po zablokowaniu miRNA-21 w porównaniu do tych samych genów reporterowych ale bez blokady miRNA w obu liniach komórkowych*

#### 4.5.2 Inhibicja przez miR-24

Podobnie jak przy blokadzie miRNA-21 w przypadku inhibicji miR-24 zaobserwowałam wzrost poziomów mRNA genów reporterowych w momencie gdy gen lucyferazy *Renilla* posiadał miejsca wiązania miR-24, w komórkach HCT116 (ryc. nr 23A). Natomiast w linii komórkowej czerniaka, Me45, poziom mRNA prawie nie uległ zmianie (ryc. nr 23A). Lucyferaza *Renilla* z miejscami wiązania dla miR-24 i lucyferaza firefly w komórkach HCT116 przy blokadzie miRNA-24 wykazywały spadek poziomu aktywności w porównaniu do tych samych białek przy braku inhibicji miRNA (ryc. nr 23B). W komórkach Me45 zaobserwowałam przeciwną zmianę poziomu białek reporterowych (ryc. nr 23B). Te

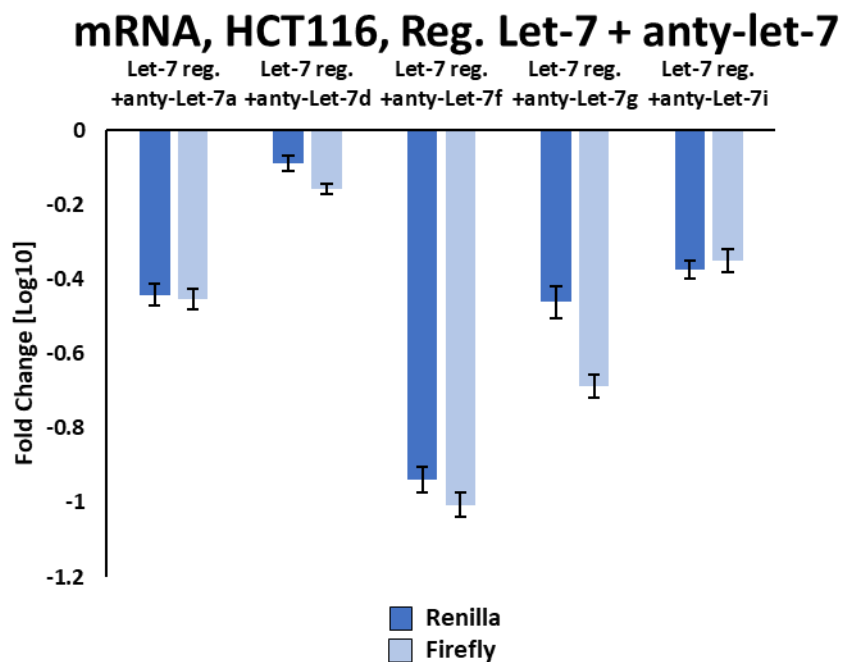
przeciwstawne rezultaty mogą sugerować inne mechanizmy działania miRNA-24 w tych liniach komórkowych (ryc. nr 23B).



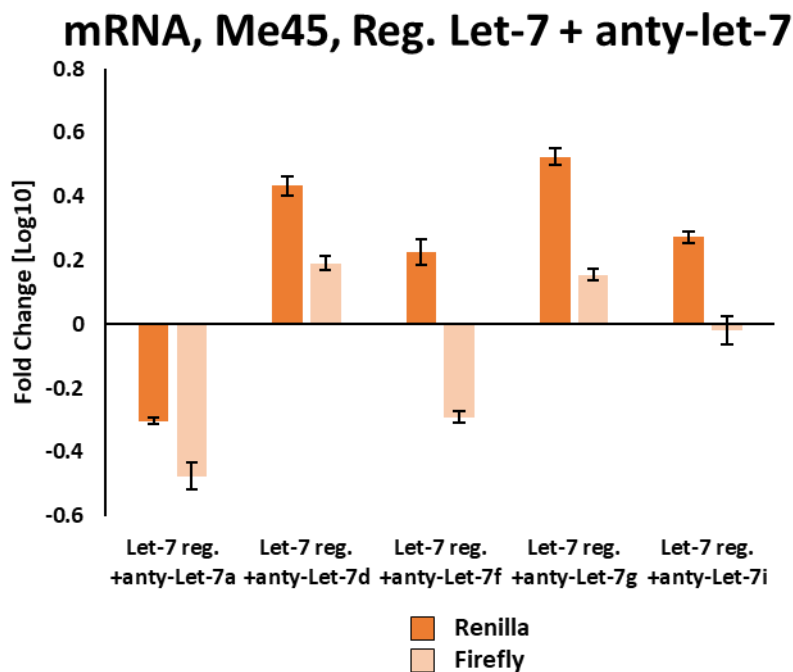
*Rycina 23 Zmiany poziomów (fold change) mRNA (A) i białka (B) kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu miR-24. Zmiana ekspresji lucyferazy Renilla posiadającej miejsca wiązania dla miR-24 po zablokowaniu miRNA 24 w porównaniu do tych samych genów reporterowych ale bez blokady miRNA w obu liniach komórkowych*

#### 4.5.3 Porównanie działania różnych anty-miRNA dla grupy let-7

Poziom poszczególnych miRNA należących do rodziny let-7 (posiadających tę samą sekwencję komplementarną do mRNA (seed)) w wybranych liniach komórkowych był różny, w związku z czym do sprawdzenia wpływu miRNA zdecydowałam się na zablokowanie pięciu miRNA o największych stężeniach w tych liniach komórkowych, były to let-7a,d,f,g,i. W komórkach HCT116 najwięcej było wariantu let-7a (oznaczenia mikromacierzowe i PCR) oraz let-f (oznaczenia mikromacierzowe), a w komórkach Me45 let-7a (oznaczenia mikromacierzowe i PCR) i let-7i (oznaczenia mikromacierzowe) (por. ryc. nr 8). Działając inhibitorami oligonukleotydowymi skierowanymi przeciwko różnym członkom rodziny let-7 w linii komórkowej HCT116, obserwowałam spadek poziomów mRNA, najmniejszy po blokadzie let-7d, a największy w przypadku let-7f, co mogłoby korelować z różnicami w poziomach między miRNA. Działając tymi samymi inhibitorami, w linii czerniaka (Me45) obserwowano różne działanie blokady poszczególnych członków rodziny miRNA z rodziny let-7. Dla blokady miRNA let-7a oraz f zaobserwowano spadek poziomu mRNA lucyferazy firefly oraz lucyferazy Renilla w przypadku blokady let-7a. W pozostałych przypadkach poziom transkrypcji wzrósł (ryc. nr 25).



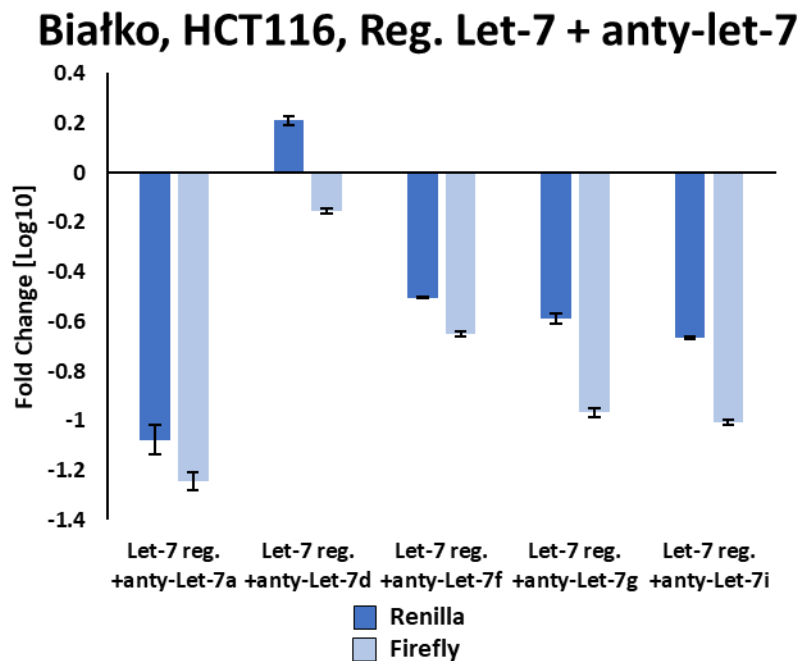
Rycina 24 Zmiany poziomów (fold change) transkryptów genów reporterowych po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach HCT116.



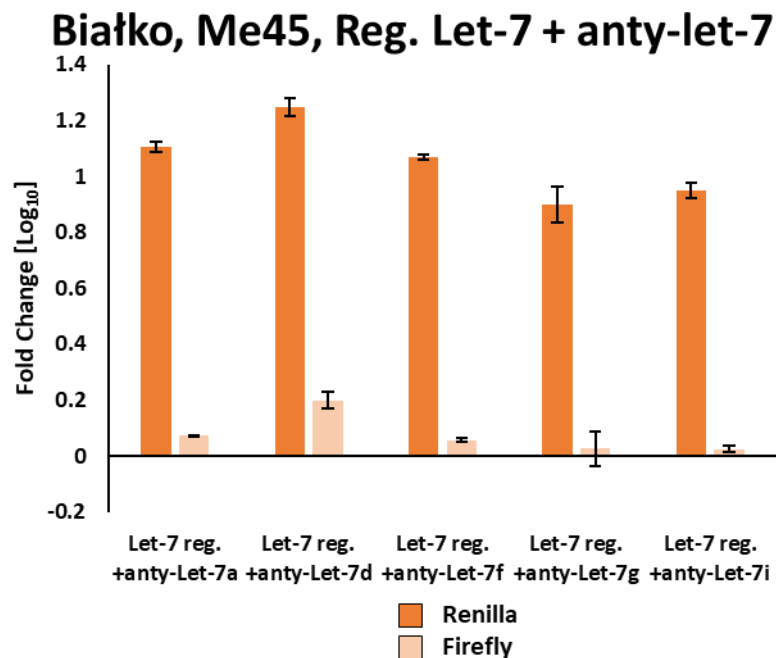
Rycina 25 Zmiany poziomów (fold change) transkryptów genów reporterowych po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach Me45.



Porównując zmiany w poziomach białka można zauważyć odwrotne działanie inhibitorów pomiędzy liniami komórkowymi. Dla HCT116 obserwujemy spadek białka dla obu genów



Rycina 27 Zmiany poziomów (fold change) białka kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach HCT116. Zmiana poziomu lucyferazy Renilla której mRNA posiada miejsca wiązania dla let-7 i poziomu nieregulowanej lucyferazy firefly, po zablokowaniu pojedynczych miRNA z rodziny let-7 (-a,-d,-f,-g,-i).



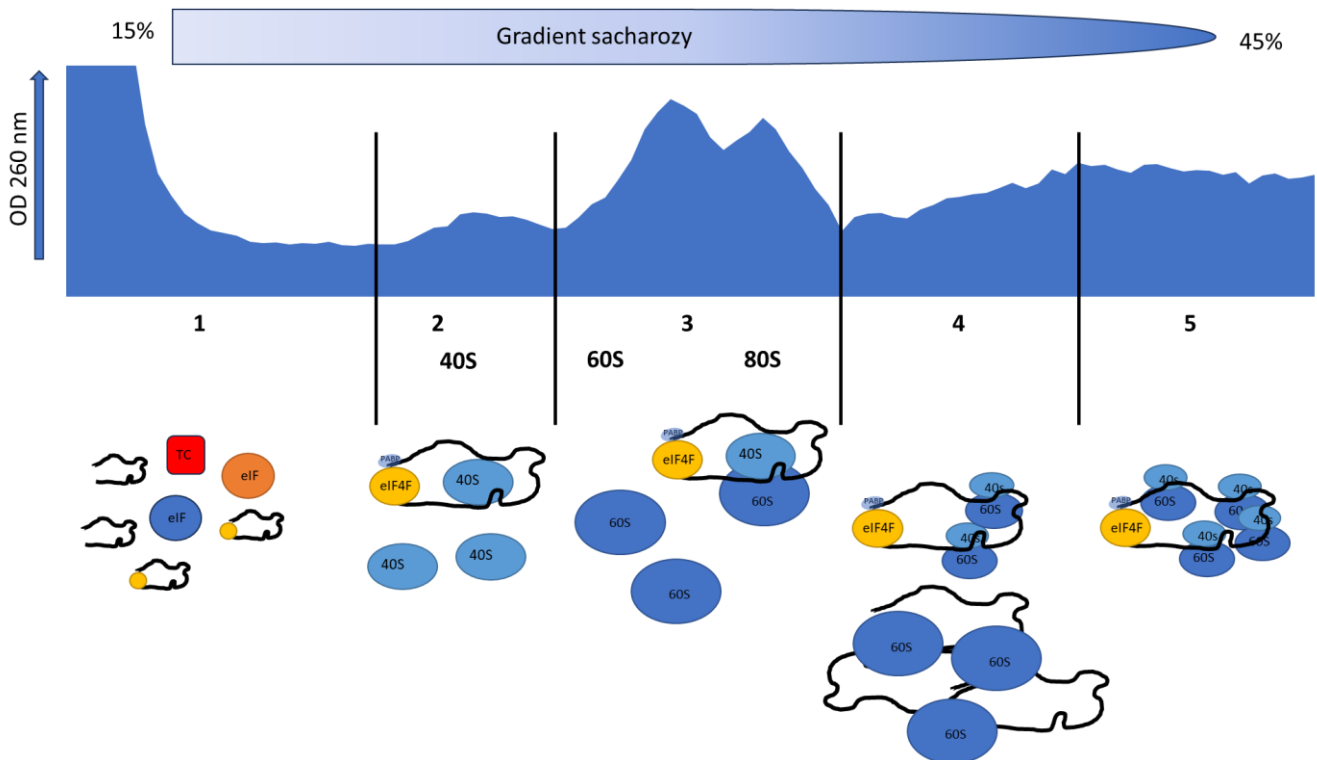
Rycina 26 Zmiany poziomów (fold change) białka kodowanych przez geny reporterowe po zablokowaniu poszczególnych członków rodziny let-7 w komórkach Me45. Zmiana poziomu lucyferazy Renilla której mRNA posiada miejsca wiązania dla let-7 i poziomu nieregulowanej lucyferazy firefly, po zablokowaniu pojedynczych miRNA z rodziny let-7 (-a,-d,-f,-g,-i).

reporterowych, w każdym przypadku blokady, oprócz inhibicji przez let-7d (ryc. nr 26).

W linii komórkowej Me45 zaobserwowano tylko podobny wzrost poziomu białka lucyferazy *Renilla* we wszystkich wersjach użytych inhibitorów, niezależnie od wyjściowego poziomu miRNA komórkowego (ryc. nr 27). Poziom białka kotransfekowanej lucyferazy firefly nie zmienił się po dodaniu inhibitorów miRNA z rodziny let-7 (ryc. nr 27).

#### 4.6 Kompleksy mRNA-białko tworzone przez geny reporterowe

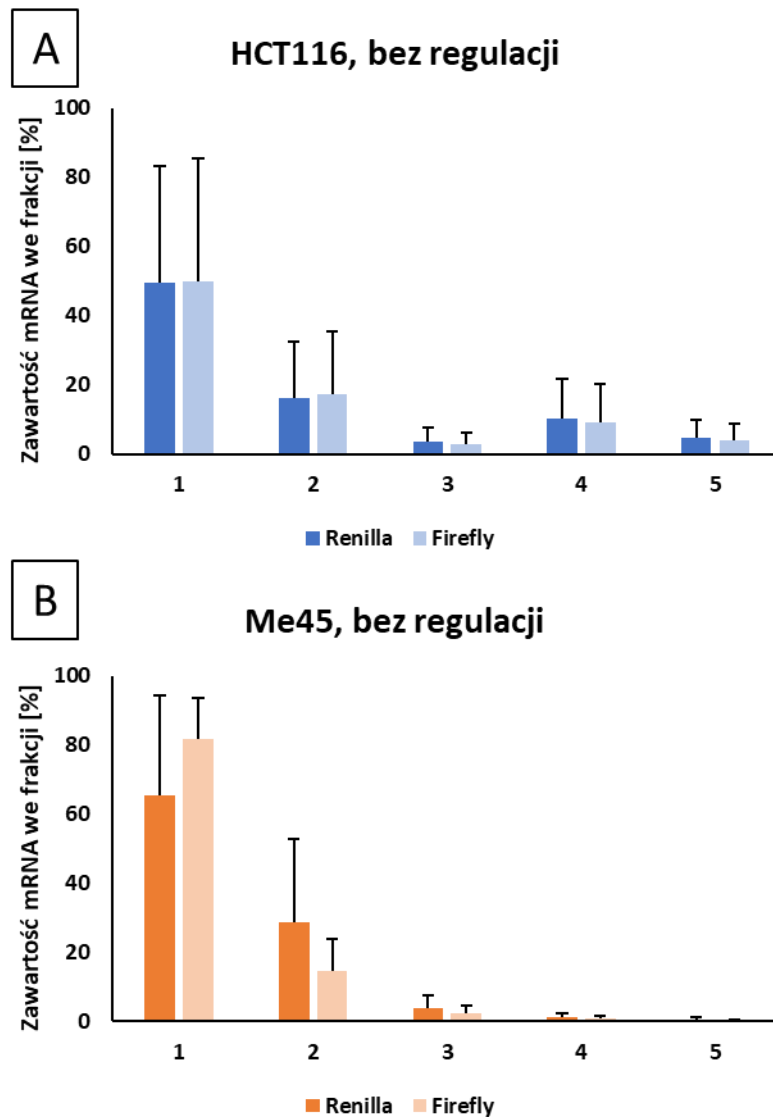
W kolejnym etapie postanowiłam przyjrzeć się sedymentacji kompleksów badanych transkryptów genów reporterowych podczas wirowania w gradiencie sacharozy. Cząsteczki pod wpływem sił odśrodkowych wędrowały w gradiencie sacharozy i układały się w otoczeniu o podobnej stałej sedymentacji (S-jednostka Svedberga). Frakcja nr 1 – tzw. wolne RNA czyli frakcja zawierająca cząsteczki RNA nie związane z białkami lub związane z niewielkimi białkami. Frakcja nr 2 – frakcja zawierające w sobie głównie małą podjednostkę rybosomalną nie związaną z RNA lub związaną np. w trakcie inicjacji translacji. Frakcja nr 3 – ze względu na sposób zbierania materiału frakcja ta zawiera zarówno monosomy jak i dużą podjednostkę rybosomalną. Frakcja nr 4 – zawiera zarówno tzw. lekkie polisomy czyli RNA związane z dwoma do czterech rybosomów oraz kompleksy białkowe lub białko-RNA o podobnej masie i objętości. Frakcja nr 5 – zawiera głównie ciężkie polisomy czyli RNA związane z większą



Rycina 28 **Przykład rozdziału kompleksów RNA-białko poprzez wirowanie w gradiencie sacharozy.** Materiał po wirowaniu był zbierany w 5 frakcjach. Pod wykresem graficzne przedstawienie składu poszczególnych frakcji.

ilością rybosomów jak 4 oraz duże kompleksy białkowe np. tzw. p-bodies czy granule stresu (ryc. nr 28).

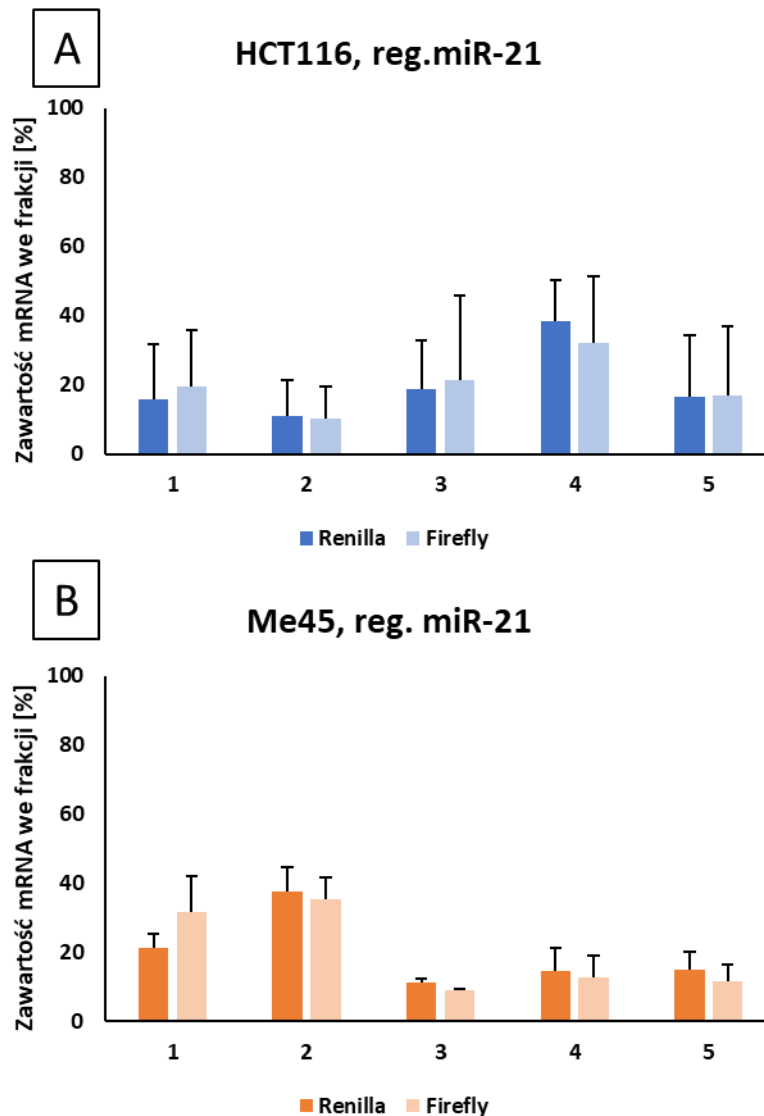
W przypadku genów reporterowych bez regulacji przez miRNA większość transkryptów znajdowała się we frakcjach tzw. wolnego RNA. Można również zaobserwować pewną akumulację transkryptów we frakcji zawierającej lekkie polisomy w komórkach HCT116 (ryc. nr 29). Co ciekawe w badanych przypadkach transkrypt lucyferazy firefly wędrował w trakcie wirowania w gradiencie sacharozy podobnie do transkryptu lucyferazy *Renilla*.



**Rycina 29 Rozkład mRNA lucyferazy *Renilla* i *firefly* w gradiencie sacharozy; A - komórki HCT116; B - komórki Me45**

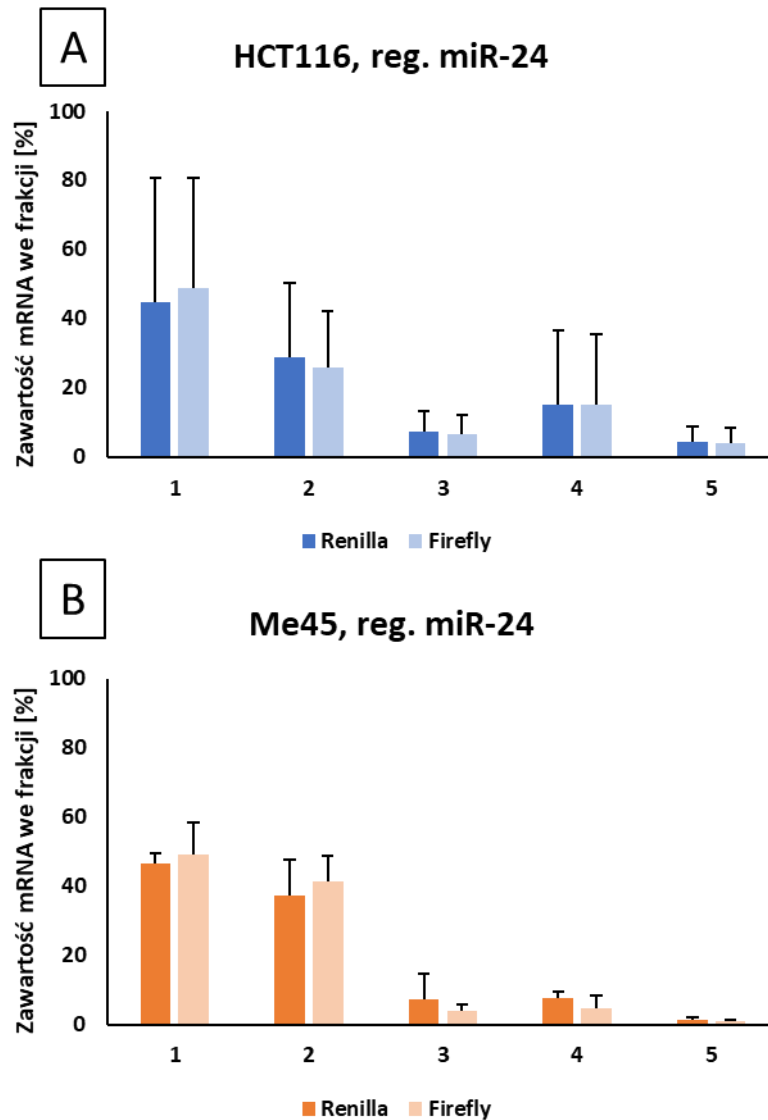
W momencie dołożenia regulacji poprzez miR-21 w genie lucyferazy *Renilla* zauważyłam akumulację transkryptów we frakcjach lekkich polisomów w komórkach HCT116 oraz głównie we frakcji z małą podjednostką w komórkach Me45 (ryc. nr 30). Porównując to z silnym

wyciszeniem powstawania białka lucyferazy *Renilla* w obu liniach komórkowych można wnioskować o różnym mechanizmie zablokowania procesu translacji dla tego transkryptu (ryc. nr 9, 10, 30).



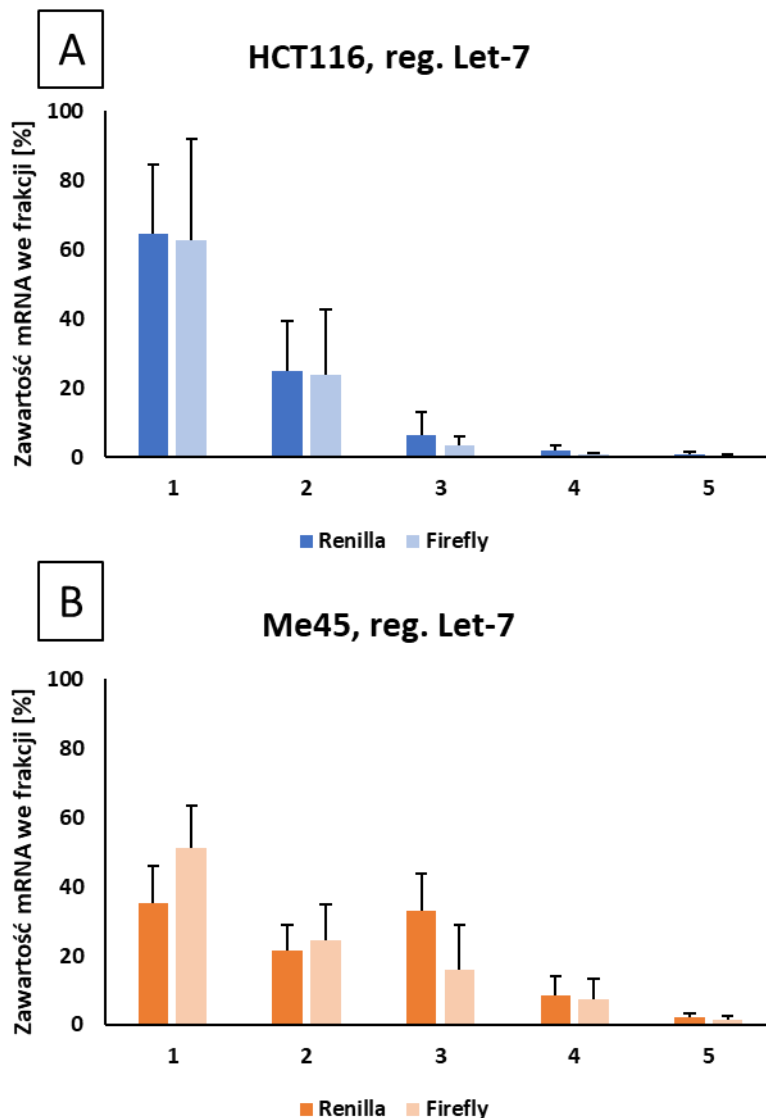
**Rycina 30 Rozkład mRNA lucyferazy *Renilla* zawierającej miejsca wiązania *miRNA-21* i lucyferazy *firefly* w gradiencie sacharozy; A- komórki HCT116; B - komórki Me45.**

Również w przypadku regulacji przez miR-24 w komórkach Me45 widać akumulację mRNA we frakcji z małą podjednostką (ryc. nr 31). W przypadku linii komórkowej HCT116 rozkład ten jest bardzo podobny do rozkładu polisomalnego genów reporterowych bez wprowadzonych modyfikacji (ryc. nr 29, 31). Zarówno w tej jak i w regulacji przez miR-21 mRNA lucyferazy *firefly* zachowuje się podobnie do transkryptu lucyferazy *Renilla* w procesie translacji.



**Rycina 31 Rozkład mRNA lucyferazy *Renilla* zawierającej miejsca wiązania miRNA-24 i lucyferazy *firefly* w gradiencie sacharozy; A- komórki HCT116; B - komórki Me45.**

Po dodaniu miejsc regulatorowych w genie lucyferazy *Renilla* dla miRNA z rodziny let-7, w przypadku linii komórkowej HCT116 zaobserwowano spadek akumulacji mRNA we frakcjach zawierających materiał wędrujący z lekkimi polisomami, głównie transkrypt znajdował się we frakcji z wolnym RNA lub był związany z małą podjednostką rybosomalną (ryc. nr 32). W komórkach Me45 główne nagromadzenie się transkryptów występowało we frakcji zawierającej monosomy, małą podjednostkę i wolne RNA (ryc. nr 32).

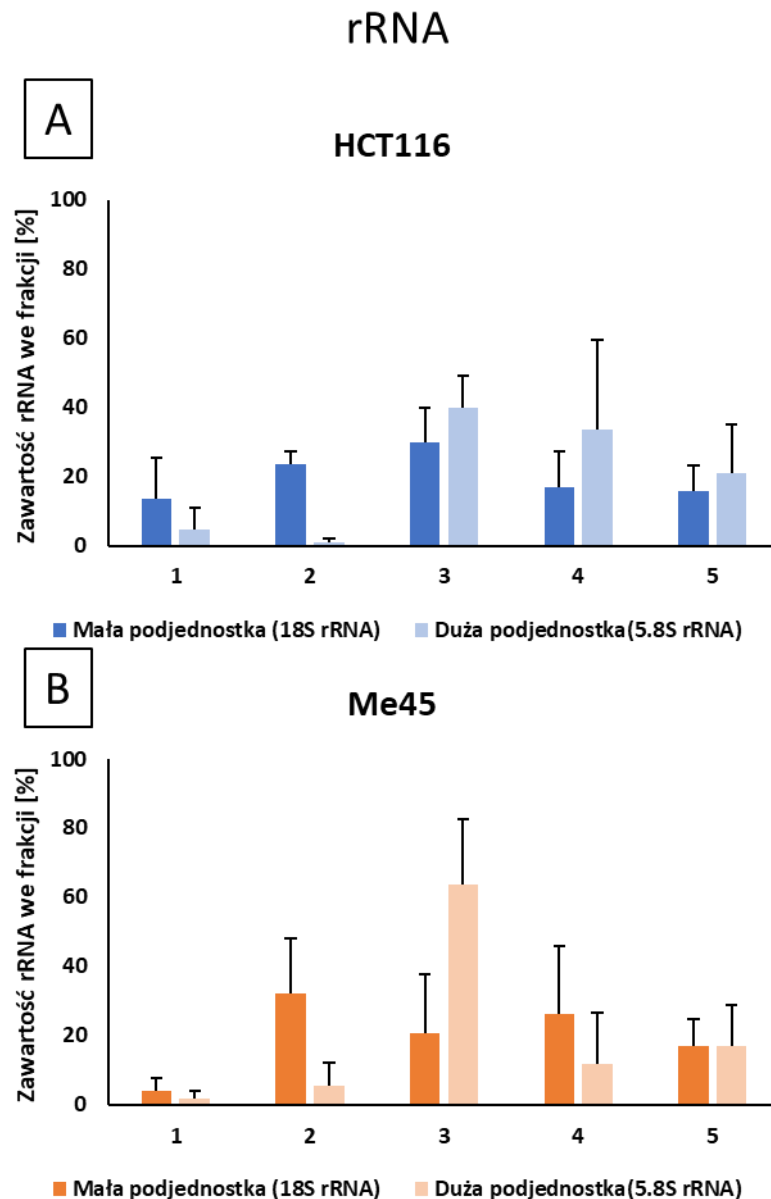


Rycina 32 Rozkład mRNA lucyferazy Renilla zawierającej miejsca wiązania let-7 i lucyferazy firefly w gradiencie sacharozy; A- komórki HCT116; B - komórki Me45.

#### 4.7 Rozkład RNA komórkowych w gradiencie sacharozy

Zbadałam również sedymentację w gradiencie sacharozy transkryptów kilku genów i rRNA komórkowych. Rycina nr 33 przedstawia rozkład dwóch RNA rybosomalnych – 18S i 5.8S, a na rycinie nr 34 przedstawiono sedymentację transkryptów genów GAPDH i RPL41, które są genami metabolizmu podstawowego często służące za tzw. geny referencyjne. GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) w komórce odpowiada za szereg różnych procesów w tym za produkcję ATP natomiast RPL41 (gen kodujący białko rybosomalne L41) to gen kodujący białko wchodzące w skład dużej podjednostki

rybosomalnej ale posiadające również właściwości stymulujące fosforylację topoiizomerazy II DNA poprzez interakcję z kinazą CKII.

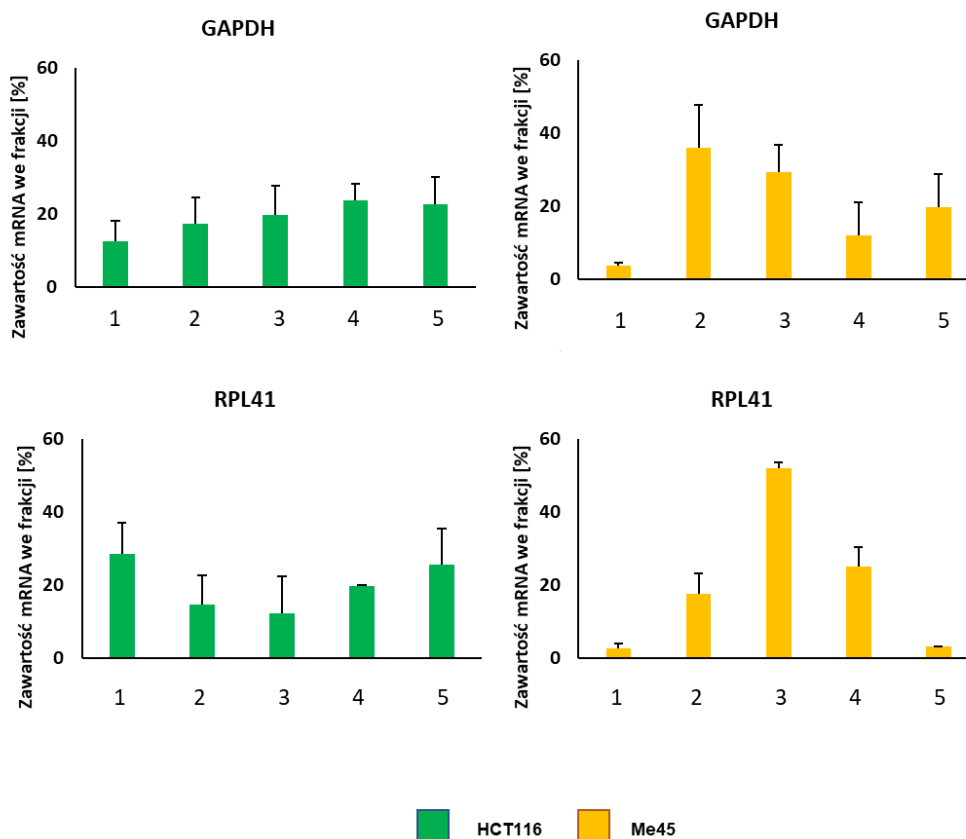


**Rycina 33 Rozkład rRNA malej i duzej podjednostki rybosomalnej w gradiencie sacharozy; A- komórki HCT116; B - komórki Me45.**

rRNA pochodzące z dużej podjednostki rybosomalnej wykrywałam głównie w obrębie frakcji o większej gęstości poczynając od frakcji 3, która może zawierać dużą ilość nie związanej z mRNA podjednostki rybosomalnej (60S) oraz monosomy (80S). rRNA wywodzące się z małej podjednostki rybosomalnej (40S) wykrywałam już we frakcji nr 2 czyli frakcji, w której głównie znajdują się mała podjednostka i w cięższych frakcjach zawierających polisomy. Nadmiar rRNA, z którejś z podjednostek w stosunku do rRNA drugiej podjednostki, we

frakcjach nr 4 i 5 może sugerować obecność innych kompleksów RNA-białko niż rybosomy. Wydaje się, że w komórkach HCT116 w tworzeniu takich kompleksów może być zaangażowane rRNA dużej podjednostki rybosomalnej (więcej rRNA 5.8S niż 18S), natomiast w Me45 większą rolę zdaje się mieć rRNA małej podjednostki.

Transkrypty genów kodujących białka tzw. metabolizmu podstawowego („housekeeping genes”) są znajdowane we wszystkich frakcjach gradientu sacharozy dla komórek HCT116 w podobnych ilościach. W przypadku komórek Me45 można zaobserwować akumulację transkryptu RPL41 we frakcji monosomalnej (nr 3), natomiast transkrypt GAPDH jest prawie w całości związany w kompleksach RNA-białko o gęstości co najmniej małej podjednostki rybosomalnej.

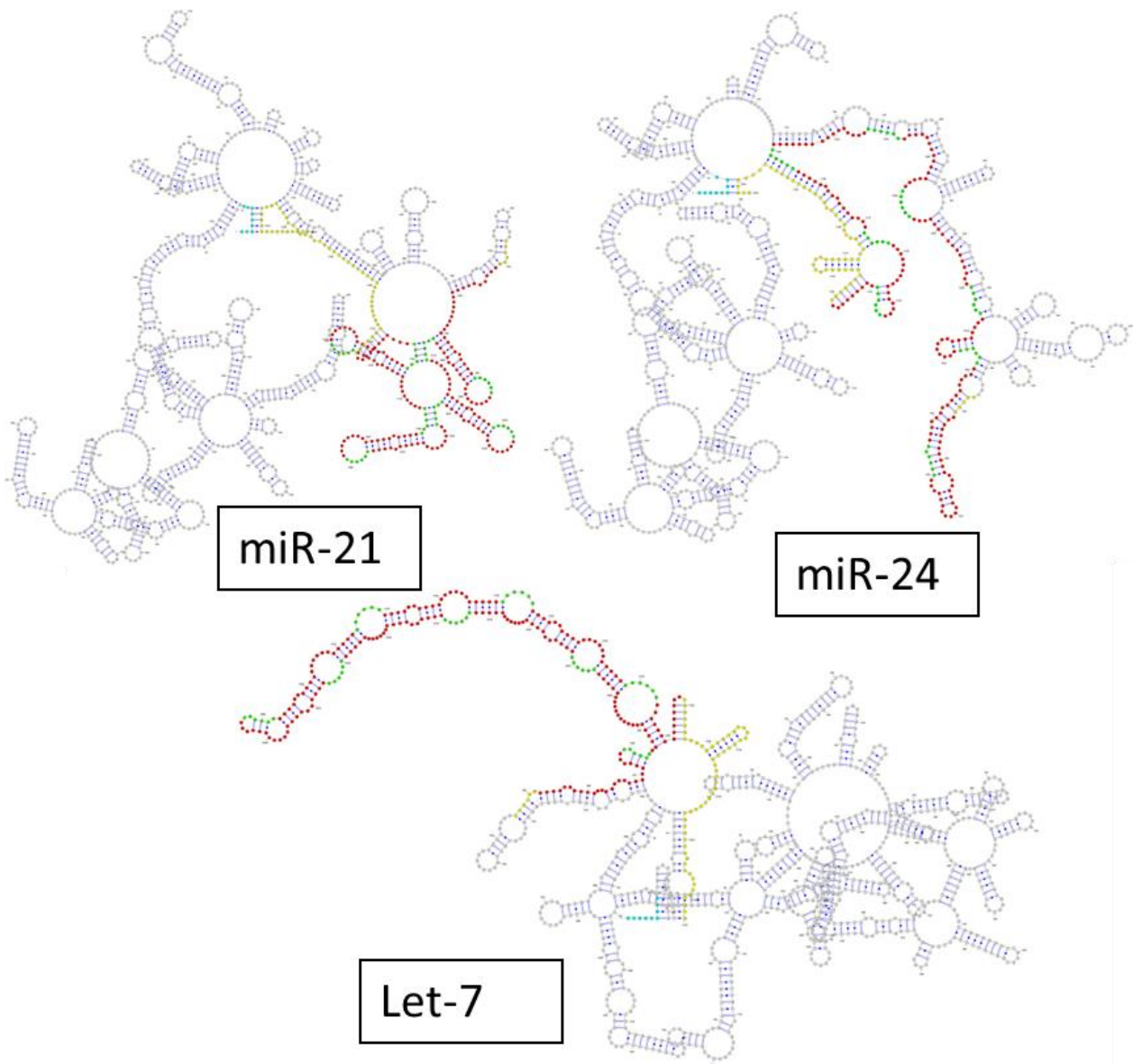


**Rycina 34 Rozkład mRNA genów „housekeeping” GAPDH i RPL41 w kolejnych frakcjach w komórkach HCT116 (zielone słupki) i Me45 (żółte słupki).**



## 4.8 Struktura cząsteczek mRNA

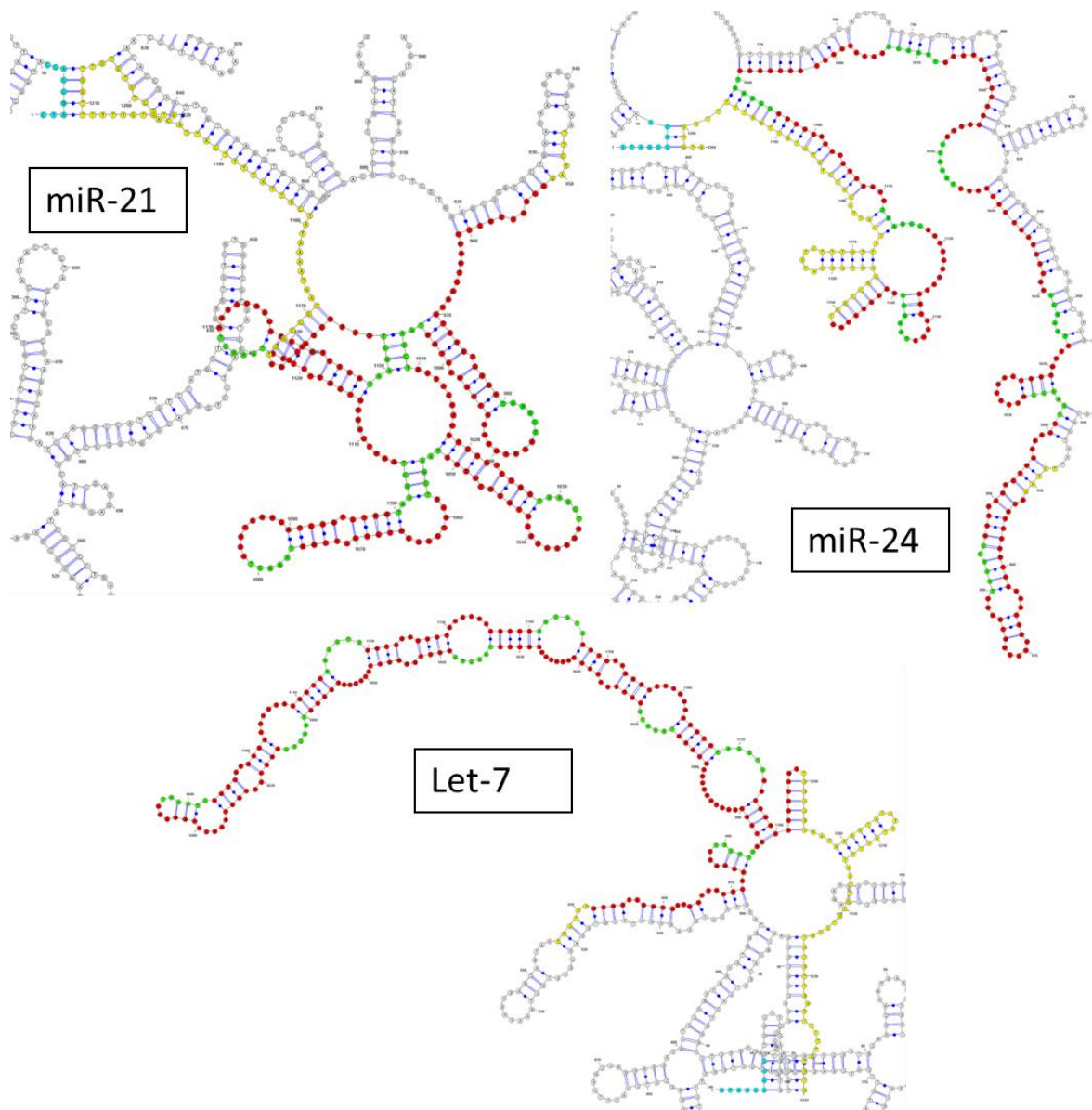
W tych samych komórkach w otoczeniu tych samych białek uczestniczących w regulacji translacji obserwowałam różnice w działaniu różnych miRNA i tworzonych kompleksów białko-RNA. Jedną z przyczyn różnic mogą być różnice w strukturze transkryptów niosących



*Rycina 35 Struktury cząsteczek mRNA lucyferazy Renilla zawierające wstawki z miejscami wiązania dla miRNA. Kolorem zielonym zaznaczono sekwencje „seedów”, kolorem czerwonym wstawkę w końcu 3’, kolorem żółtym pozostałą część końca 3’, kolorem niebieskim zaznaczono koniec 5’.*

miejsca wiązania miRNA. Dlatego używając programu RNAstructure (Reuter & Mathews, 2010) oraz VARNA GUI (Darty et al., 2009) określiłam strukturę mRNA dla badanych genów reporterowych (ryc. nr 35), program umożliwia zbadanie struktur cząsteczek RNA niezwiązanych z białkami. Przedstawione na rycinie nr 35 i 36 struktury są wariantami

o najniższej wolnej energii (MFE, minimum free energy) – prezentują teoretycznie najbardziej stabilną wersję cząsteczki mRNA. Na rycinach nr 35 i 36 kolorem zielonym przedstawiono sekwencje komplementarne do minimalnej sekwencji stanowiącej cel wiązania miRNA („seed”), kolor czerwony z zielonym obejmuje całą wstawkę wprowadzoną do końca 3’ genu lucyferazy *Renilla*, na żółto zaznaczona jest pozostała sekwencja końca 3’. Natomiast koniec 5’ został zaznaczony kolorem niebieskim/turkusowym. Najbardziej stabilne struktury



*Rycina 36 Struktury końców 3’ badanych genów lucyferazy Renilla. Kolorem zielonym zaznaczono sekwencje „seedów”, kolorem czerwonym wstawkę w końcu 3’, kolorem żółtym pozostałą część końca 3’, kolorem niebieskim zaznaczono koniec 5’.*

transkryptów niosących miejsca wiązania dla różnych miRNA („seed”) różnią się konformacją. Część sekwencji „seed” występuje w strukturach dwuniciowych i ich oddziaływanie z miRNA najprawdopodobniej wymaga rozplecenia dwuniciowej struktury przy udziale helikaz. Rycina

nr 36 zawiera struktury końców 3' trzech badanych transkryptów zawierających po 8 miejsc sekwencji „seed” dla miR-21, miR-24 i let-7.

#### **4.9 Modele wpływu miRNA na proces translacji genów reporterowych**

Poprzez wirowanie w gradiencie sacharozy rozdzielałam różne kompleksy wędrujące wraz z polisomami i frakcjami inicjującymi translację. Gromadząc materiał w 5 frakcjach nie jesteśmy w stanie określić bez szczegółowych badań jakie kompleksy mogą się tworzyć w poszczególnych frakcjach. Nie można rozróżnić kompleksów zawierających czynniki translacyjne od innych kompleksów RNA-białko m.in. tych, które zawierają miRNA, RISC i inne białka. Wiemy tylko ile materiału o określonym zakresie stałych sedymentacji występowało w konkretnych warunkach eksperymentalnych w kolejnych frakcjach. Dysponujemy sumaryczną ilością cząsteczek mRNA występujących w poszczególnych frakcjach. Żeby zrozumieć lepiej tworzenie różnych kompleksów podjęłam próbę zamodelowania zjawiska. W tym celu tworzyłam modele, w których zakładałam występowanie kompleksów RNA-białko innych niż polisomalne w kolejnych frakcjach z gradientu sacharozy. Każdy z przebadanych modeli mógł mieć różne kompleksy w poszczególnych frakcjach i mogły one różnić się zdolnością i dynamiką tworzenia kolejnych kompleksów, które mogą wędrować w innych frakcjach. Wydaje się, że główne przejścia między frakcjami to przejścia procesu translacji, ale oprócz nich mogą istnieć przejścia tworzące inne agregaty RNA-białko, które mogą blokować proces translacji lub powodować zwiększoną degradację kompleksów. Dla każdego modelu przeprowadzałam symulacje komputerowe, które polegały na dobieraniu losowych parametrów przejść między kompleksami i wyznaczałam zawartość badanego mRNA w kolejnych kompartmentach w stanie ustalonym. Dla każdego zestawu losowo wybranych parametrów algorytm wykonał obliczenia zgodnie z równaniami opisującymi model. Za najlepsze były uważane zestawy parametrów, które w obliczeniach dawały ilości badanego mRNA najbliższe do tych uzyskanych w eksperymentach. Dopasowania do danych eksperymentalnych, dla każdego modelu wykonałam co najmniej 100 000. Poszukując współczynników przejść między frakcjami dopasowywałam wyniki symulacji modelowych z losowymi współczynnikami do wyników otrzymanych eksperymentalnie i określałam metodą najmniejszych kwadratów podobieństwo między modelem a eksperymentem, porównując sumę kwadratów różnic między frakcjami z symulacji i eksperymentu. W ten sposób próbowałam znaleźć najlepiej dopasowany do obserwowanych wyników model, który mógłby wskazać gdzie tworzą się dodatkowe kompleksy i jakie są ich właściwości (czy zawierają białka

degradujące mRNA, hamujące translację itp.), oraz określić wydajność tworzenia kompleksów znajdujących się w różnych frakcjach przez mRNA genów reporterowych oddziaływujących z różnymi miRNA. Przykłady dopasowania, dla dwóch najlepszych z uzyskanych modeli, przedstawione zostały na rycinie nr 38 i 39. W pierwszym z nich założyłam, że inne kompleksy, niepolisomalne, występują we frakcjach 2 i 4, przy czym kompleksy z frakcji 2 są w stanie przejść do kompleksów uczestniczących w głównej ścieżce translacji, natomiast te z frakcji 4 ulegają degradacji o innej prędkości niż okres półtrwania transkryptu. Założyłam również stały w czasie dopływ transkryptów z procesu transkrypcji (stały parametr „plazmid” w równaniu nr 1) i możliwość degradacji na każdym stopniu translacji.

Przejścia w modelu zostały opisane następującymi równaniami od 1 do 7 (wersja modelu przedstawiona na rycinie nr 37B).

- (1) 
$$\text{frakcja1}(i+1) = \text{frakcja1}(i) + \text{plazmid} - k * \text{frakcja1}(i) - \text{ws}(j, 1) * \text{frakcja1}(i) - \text{ws}(j, 6) * \text{frakcja1}(i);$$
- (2) 
$$\text{frakcja2}(i+1) = \text{frakcja2}(i) + \text{ws}(j, 1) * \text{frakcja1}(i) - k * \text{frakcja2}(i) - \text{ws}(j, 2) * \text{frakcja2}(i) - \text{ws}(j, 5) * \text{frakcja2}(i);$$
- (3) 
$$\text{frakcja2B}(i+1) = \text{frakcja2C}(i) + \text{ws}(j, 5) * \text{frakcja2}(i) - \text{ws}(j, 8) * \text{frakcja2B}(i);$$
- (4) 
$$\text{frakcja3}(i+1) = \text{frakcja3}(i) + \text{ws}(j, 2) * \text{frakcja2}(i) - k * \text{frakcja3}(i) - \text{ws}(j, 3) * \text{frakcja3}(i) + \text{ws}(j, 8) * \text{frakcja2B}(i);$$
- (5) 
$$\text{frakcja4}(i+1) = \text{frakcja4}(i) + \text{ws}(j, 3) * \text{frakcja3}(i) - k * \text{frakcja4}(i) - \text{ws}(j, 4) * \text{frakcja4}(i) + \text{ws}(j, 9) * \text{frakcja5}(i);$$
- (6) 
$$\text{frakcja4B}(i+1) = \text{frakcja4B}(i) + \text{ws}(j, 6) * \text{frakcja1}(i) - \text{ws}(j, 7) * \text{frakcja4B}(i);$$
- (7) 
$$\text{frakcja5}(i+1) = \text{frakcja5}(i) + \text{ws}(j, 4) * \text{frakcja4}(i) - k * \text{frakcja5}(i) - \text{ws}(j, 9) * \text{frakcja5}(i);$$

Oznaczenia „frakcja1, frakcja2, frakcja 3, frakcja 4, frakcja 5” w równaniach modelu oznaczają ilość transkryptów genu reporterowego lucyferazy *Renilla*, a „ws” to współczynniki przejścia między frakcjami, natomiast „k” to stały współczynnik degradacji przyjęty na podstawie ogólnych okresów półtrwania RNA w komórkach opisanych literaturowo (Schwanhäusser et al., 2011).

W drugim modelu założyłam występowanie niepolisomalnych kompleksów we frakcji 2, 4 i 5. Przy czym we frakcji 2 były to dwa różne typy kompleksów, jeden nieulegający rozpadowi, ale też nie mogący wrócić do głównego obiegu translacji i drugi, który mógł wrócić do procesu translacji albo przejść w cięższe kompleksy znajdujące się we frakcjach 4 i 5. Kompleksy z frakcji 4 niebiorące udziału w translacji mogły przejść tylko do kolejnej cięższej frakcji (nr

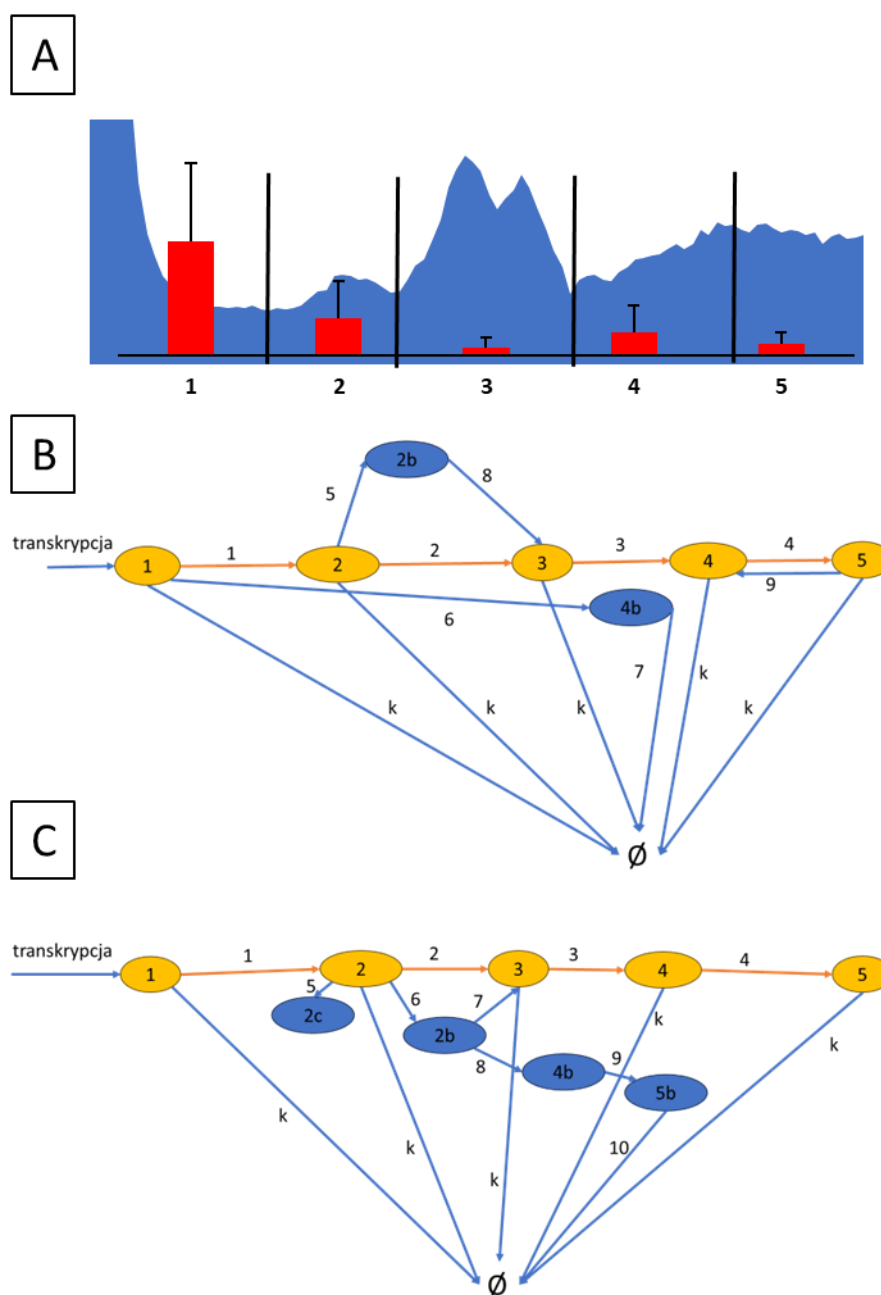
5) gdzie następnie ulegały degradacji z innym współczynnikiem niż współczynnik degradacji wywodzący się z okresu półtrwania.

Wersja modelu nr 2 jest przedstawiona na rycinie nr 37C, a przejścia między frakcjami opisują równania od 8 do 16.

- (8) 
$$\text{frakcja1}(i+1) = \text{frakcja1}(i) + \text{plazmid} - k * \text{frakcja1}(i) - \text{ws}(j, 1) * \text{frakcja1}(i);$$
- (9) 
$$\text{frakcja2}(i+1) = \text{frakcja2}(i) + \text{ws}(j, 1) * \text{frakcja1}(i) - k * \text{frakcja2}(i) - \text{ws}(j, 2) * \text{frakcja2}(i) - \text{ws}(j, 5) * \text{frakcja2}(i) - \text{ws}(j, 6) * \text{frakcja2}(i);$$
- (10) 
$$\text{frakcja2C}(i+1) = \text{frakcja2C}(i) + \text{ws}(j, 5) * \text{frakcja2}(i);$$
- (11) 
$$\text{frakcja2B}(i+1) = \text{frakcja2B}(i) + \text{ws}(j, 6) * \text{frakcja2}(i) - \text{ws}(j, 7) * \text{frakcja2B}(i) - \text{ws}(j, 8) * \text{frakcja2B}(i);$$
- (12) 
$$\text{frakcja3}(i+1) = \text{frakcja3}(i) + \text{ws}(j, 2) * \text{frakcja2}(i) - k * \text{frakcja3}(i) - \text{ws}(j, 3) * \text{frakcja3}(i) + \text{ws}(j, 8) * \text{frakcja2B}(i);$$
- (13) 
$$\text{frakcja4}(i+1) = \text{frakcja4}(i) + \text{ws}(j, 3) * \text{frakcja3}(i) - k * \text{frakcja4}(i) - \text{ws}(j, 4) * \text{frakcja4}(i);$$
- (14) 
$$\text{frakcja4B}(i+1) = \text{frakcja4B}(i) + \text{ws}(j, 7) * \text{frakcja2B}(i) - \text{ws}(j, 9) * \text{frakcja4B}(i);$$
- (15) 
$$\text{frakcja5}(i+1) = \text{frakcja5}(i) + \text{ws}(j, 4) * \text{frakcja4}(i) - k * \text{frakcja5}(i);$$
- (16) 
$$\text{frakcja5B}(i+1) = \text{frakcja5B}(i) + \text{ws}(j, 9) * \text{frakcja4B}(i) - \text{ws}(j, 10) * \text{frakcja5B}(i);$$

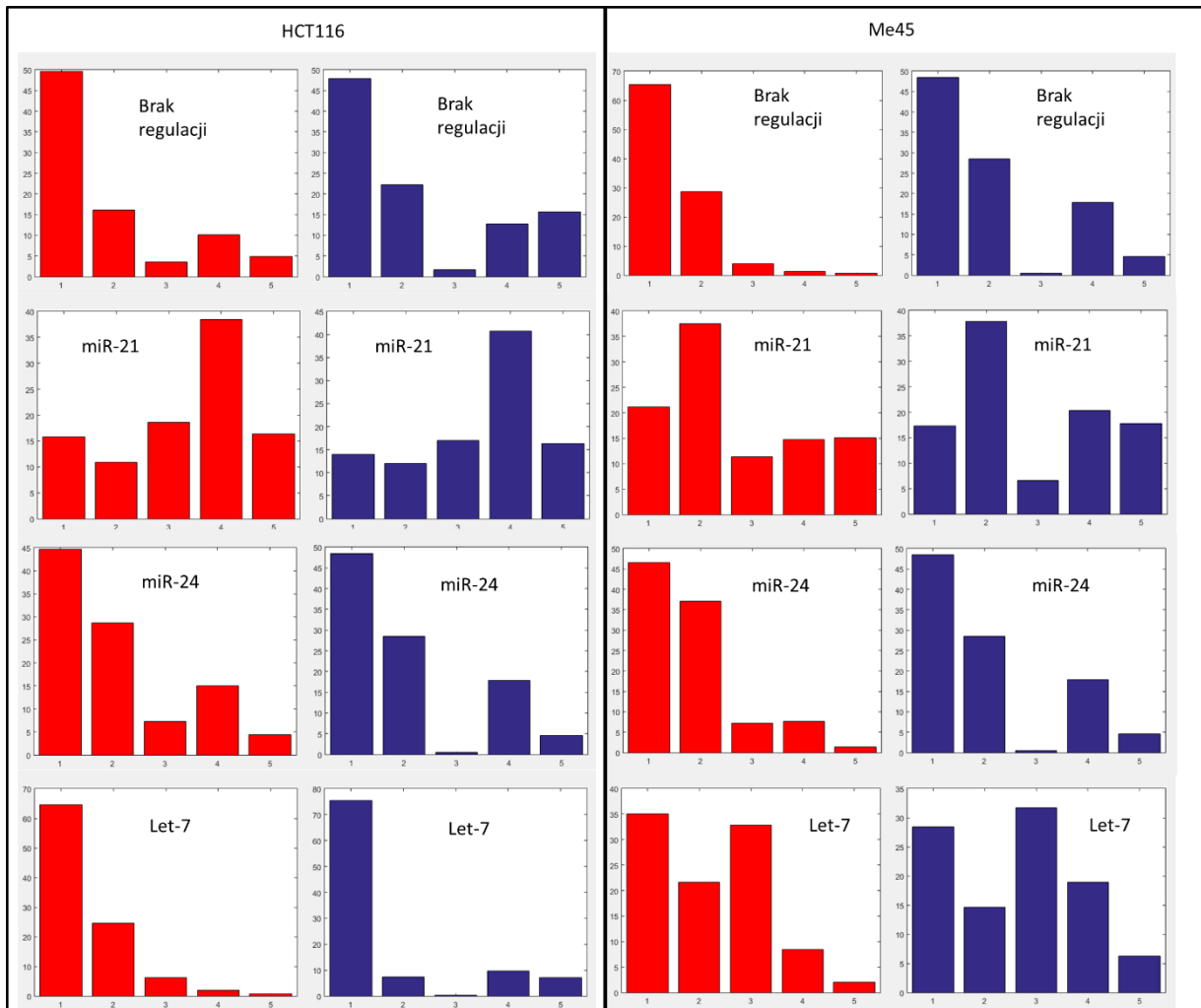
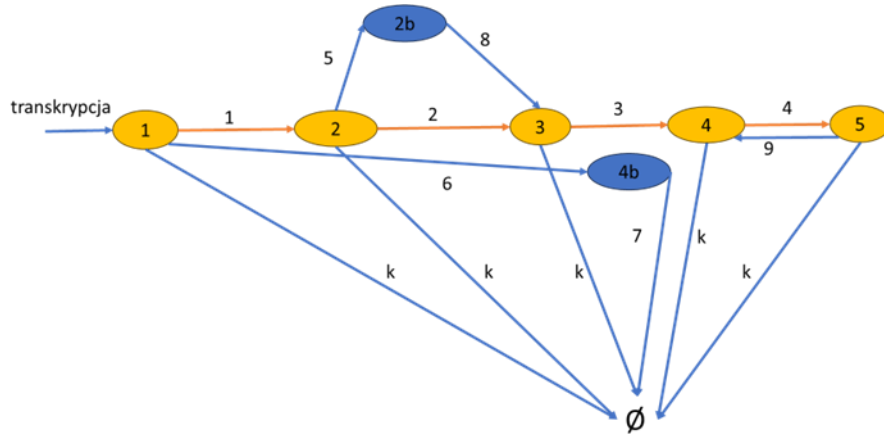
Przykłady modeli, w których uzyskałam najlepsze dopasowanie symulacji do danych eksperymentalnych przedstawiam na rycinie nr 37. Rycina 37A przedstawia rozkład materiału otrzymany z wirowania w gradiencie sacharozy (kolor niebieski) oraz rozkład transkryptu lucyferazy *Renilla* we frakcjach otrzymanych eksperymentalnie (kolor żółty) w komórkach HCT116, 37B przedstawia graficzny obraz modelu numer 1, w którym owale oznaczają kolejne etapy/frakcje procesu translacji, a strzałki przejścia pomiędzy tymi etapami, numery w owalach oznaczają numer etapu lub części etapu np. 2b zalicza się do frakcji 2 z rozkładu w gradiencie sacharozy, ale jest to inny niż inicjacyjny kompleks białko-RNA, numery przy strzałkach oznaczają numer kolejnego współczynnika opisującego dane przejście, współczynnik  $k$  to

współczynnik degradacji mRNA, kolorem żółtym zaznaczono główną ścieżkę działania



Rycina 37 **Schematy przedstawiające warianty modelu.** (A) - wynik eksperymentalny otrzymany w komórkach HCT116, kolor niebieski – absorbancja 260nm materiału w zebranych frakcjach po wirowaniu w gradiencie sacharozy, kolor czerwony – rozkład procentowy transkryptu lucyferazy Renilla w kolejnych częściach gradientu; (B) (C) – schematy wariantów modelu. Kolor żółty reprezentują główną ścieżkę translacji, kolor niebieski reprezentuje inne powstające kompleksy RNA-białko. Przedstawione schematy różnią się tworzeniem innych kompleksów w schemacie B zamodelowano tylko dwa możliwe kompleksy – jeden mniejszy (2b) mogący wrócić do głównej ścieżki translacji i drugi cięższy (4b) dążący do degradacji z inną prędkością niż wynikającą z okresu półtrwania cząsteczek. W schemacie C przedstawiono dwa różne lżejsze kompleksy (2bc), z których jeden (2c) jest blokowany całkowicie, natomiast drugi (2b) może wrócić do głównej ścieżki translacji lub przejść w cięższe kompleksy (4b, 5b) i ulec degradacji z inną prędkością niż wynikającą z okresu półtrwania.

procesu translacji czyli przejście transkryptu od wolnego mRNA do mRNA w polisomach, 37C przedstawia graficzny obraz modelu numer 2 zobrazowany podobnie jak model numer 1.



Rycina 38 Porównanie wyników eksperymentalnych (czerwony kolor) z wynikami otrzymanymi z modelowania (niebieski kolor) wg modelu numer 1. Wyniki otrzymane na podstawie modelu ze schematu 37B i równań 1-7.

Tworzenie kolejnych kompleksów przez mRNA nie jest równomierne i w każdym przypadku można określić specyficzny współczynnik przejścia pomiędzy kolejnymi etapami/frakcjami (kolejne owale na rycinie nr 37).

W tabeli nr 4 zaprezentowano otrzymane współczynniki dla wariantu pierwszego z najlepiej dopasowanych do wyników eksperymentalnych dla obu typów komórek. Wartość parametrów („ws”) oznacza prawdopodobieństwo przejścia między kompartmentami, w związku z czym im niższy współczynnik tym mniej cząsteczek przechodzi do danej frakcji. Kolorem pomarańczowym zaznaczono współczynniki występujące na głównej osi działania translacji, kolorem szarym współczynniki opisujące tworzenie ciężkich kompleksów innych niż polisomy 4B oraz degradację tych kompleksów, natomiast kolorem białym współczynniki tworzenia i rozpadu lekkich kompleksów blokujących translację (2B). Współczynnik k został dobrany na podstawie okresu półtrwania transkryptu lucyferazy *Renilla*. Na rycinie nr 38 zaprezentowano porównanie wyników eksperymentalnych z wynikami otrzymanymi z modelowania w przypadku modelu zaprezentowanego na rycinie nr 37B i równaniach od 1 do 7.

**Tabela 4 Współczynniki przejść kolejnych etapów translacji dla modelu nr 1**

| Współczynnik               | Współczynniki przejść między kolejnymi etapami/frakcjami |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                            | 1->2   | 2->3   | 3->4   | 4->5   | 2->2b  | 1->4b  | 4b->Ø  | 2b->3  | 5->4   | k      |
| <b>HCT116</b>              |  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Brak regulacji przez miRNA | 0.0107   | 0.1510 | 0.2819 | 0.3826 | 0.6511 | 0.0059 | 0.7442 | 0.0190 | 0.2843 | 0.0170 |
| Regulacja przez miR-21     | 0.0881   | 0.0358 | 0.0542 | 0.3764 | 0.8021 | 0.0397 | 0.1944 | 0.1097 | 0.8563 | 0.0170 |
| Regulacja przez miR-24     | 0.0047   | 0.0798 | 0.3811 | 0.5853 | 0.3214 | 0.2071 | 0.9750 | 0.0062 | 0.9382 | 0.0170 |
| Regulacja przez let-7      | 0.0037   | 0.0982 | 0.6134 | 0.8383 | 0.5279 | 0.0094 | 0.6194 | 0.0332 | 0.9655 | 0.0170 |
| <b>Me45</b>                |  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Brak regulacji miRNA       | 0.0047   | 0.0798 | 0.3811 | 0.5853 | 0.3214 | 0.2071 | 0.9750 | 0.0062 | 0.9382 | 0.0170 |
| Regulacja przez miR-21     | 0.0441   | 0.4868 | 0.0964 | 0.8818 | 0.2578 | 0.0295 | 0.6747 | 0.007  | 0.9509 | 0.0170 |

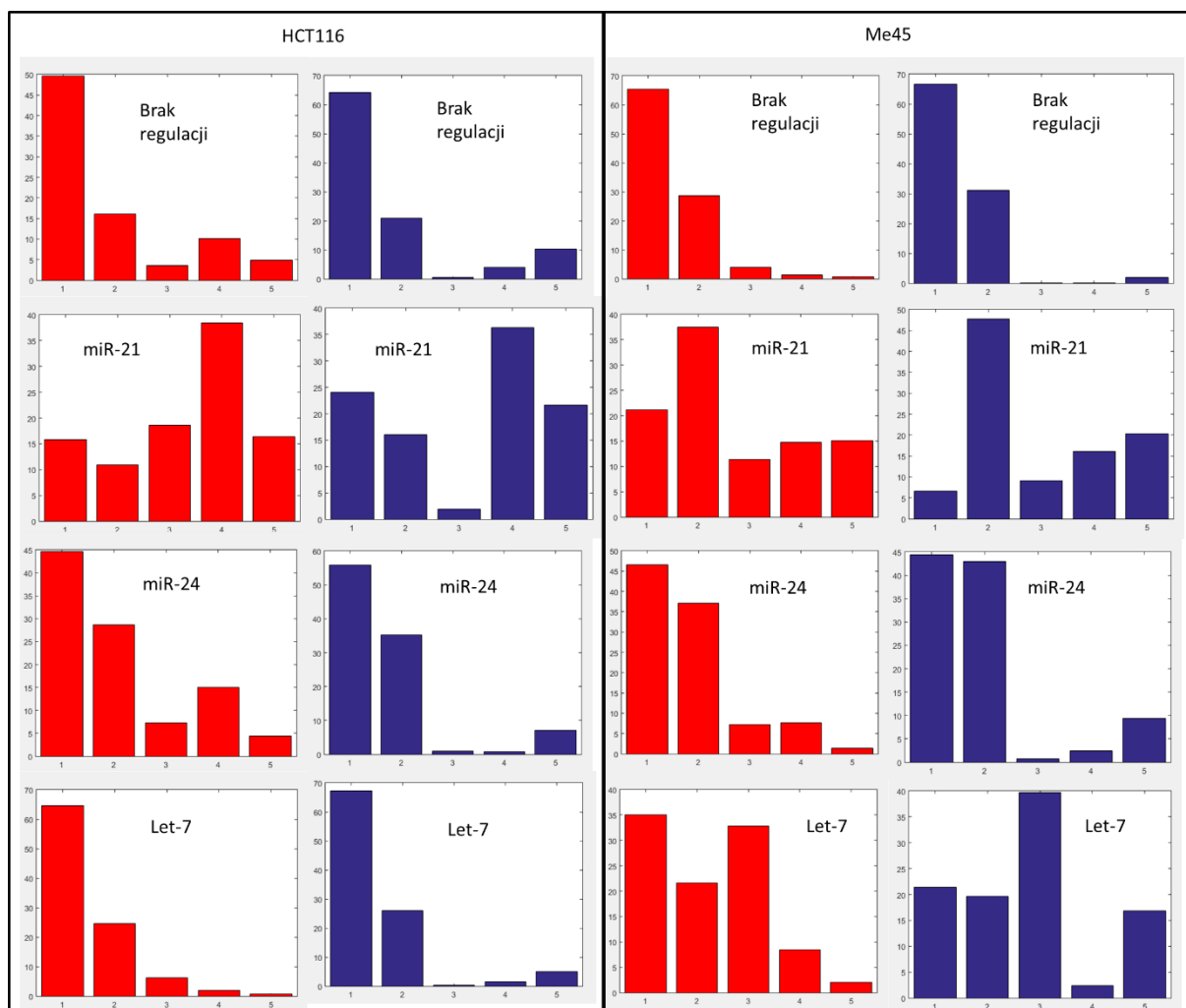
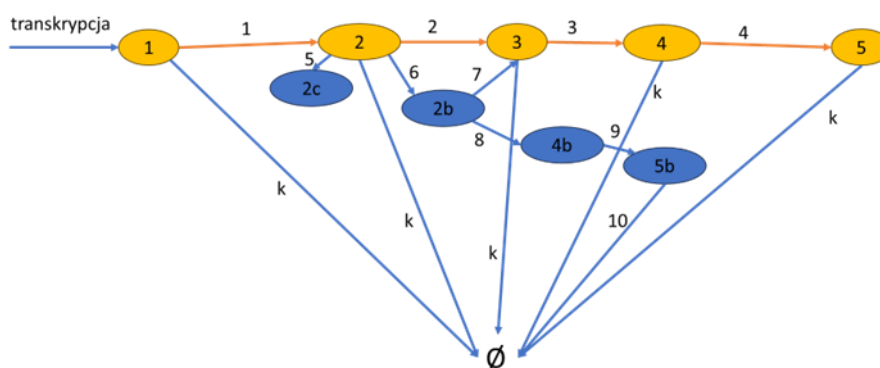


|                        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Regulacja przez miR-24 | 0.0047 | 0.0798 | 0.3811 | 0.5853 | 0.3214 | 0.2071 | 0.9750 | 0.0062 | 0.9382 | 0.0170 |
| Regulacja przez let-7  | 0.0317 | 0.0062 | 0.0046 | 0.4126 | 0.0471 | 0.5628 | 0.9621 | 0.332  | 0.1348 | 0.0170 |

**Tabela 5 Współczynniki przejść kolejnych etapów translacji dla modelu nr 2**

| Współczynnik               | Współczynniki przejść między kolejnymi etapami/frakcjami |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                            | 1->2   | 2->3   | 3->4   | 4->5   | 2->2c  | 2->2b  | 2b->3  | 2b->4b | 4b->5b | 5b-> Ø | k      |
| <b>HCT116</b>              |  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Brak regulacji przez miRNA | 0.0101   | 0.1651 | 0.4483 | 0.1608 | 0.0011 | 0.5827 | 0.6044 | 0.0698 | 0.1467 | 0.8441 | 0.0170 |
| Regulacja przez miR-21     | 0.0449   | 0.2891 | 0.5007 | 0.0101 | 0.0006 | 0.5841 | 0.0631 | 0.8592 | 0.2632 | 0.8178 | 0.0170 |
| Regulacja przez miR-24     | 0.0033   | 0.0121 | 0.1256 | 0.2345 | 0.0072 | 0.7122 | 0.1756 | 0.777  | 0.109  | 0.5424 | 0.0170 |
| Regulacja przez let-7      | 0.0018   | 0.4118 | 0.4164 | 0.0598 | 0.0100 | 0.5215 | 0.0517 | 0.4812 | 0.6751 | 0.3526 | 0.0170 |
| <b>Me45</b>                |  |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| Brak regulacji przez miRNA | 0.0008   | 0.353  | 0.5316 | 0.2939 | 0.0298 | 0.5785 | 0.1534 | 0.2534 | 0.6991 | 0.9456 | 0.0170 |
| Regulacja przez miR-21     | 0.1277   | 0.6696 | 0.067  | 0.0218 | 0.0023 | 0.1514 | 0.3508 | 0.6267 | 0.2277 | 0.5509 | 0.0170 |
| Regulacja przez miR-24     | 0.0051   | 0.1833 | 0.256  | 0.0659 | 0.0071 | 0.5545 | 0.0327 | 0.6325 | 0.5101 | 0.9243 | 0.0170 |
| Regulacja przez let-7      | 0.075  | 0.3591 | 0.0074 | 0.1565 | 0.0005 | 0.5862 | 0.5493 | 0.3378 | 0.8949 | 0.4796 | 0.0170 |

Podobne obliczenia wykonano dla drugiego modelu przedstawionego na rycinie 37C i równaniach od 8 do 16. Otrzymane wyniki zaprezentowano na rycinie nr 39 oraz w tabeli nr 5. Tabela zawiera otrzymane współczynniki dla drugiego wariantu najlepiej dopasowanego do wyników eksperymentalnych dla obu typów komórek. Kolorami zaznaczono współczynniki podobnie jak w tabeli nr 4 czyli kolorem pomarańczowym główna oś działania translacji, kolorem białym przejście do lekkich kompleksów „zawieszonych” (2C), czyli nieulegających degradacji ani translacji bez możliwości powrotu do procesu oraz kolorem szarym przejścia do i pomiędzy niepolisomalnymi kompleksami cięższymi mogącymi w początkowej fazie wrócić do procesu translacji albo w końcowym efekcie ulegającymi degradacji (2B, 4B, 5B).



Rycina 39 Porównanie wyników eksperymentalnych (czerwony kolor) z wynikami otrzymanymi z modelowania (niebieski kolor) wg modelu numer 2. Wyniki otrzymane na podstawie modelu ze schematu 3CB i równań 8-20.

Sprawdzanie działania badanych modeli dla różnych typów komórek charakteryzuje się w większości przypadków różnymi wartościami przejść między frakcjami, jednakże w przypadku modelu pierwszego uzyskano identyczne wyniki dla regulacji przez miRNA-24 i dla przypadku bez regulacji przez inne miRNA w komórkach Me45 (ryc. nr 38, tabela nr 4).

W większość przypadków nie uzyskano idealnego dopasowania wyników symulacji i eksperymentalnych, co sugeruje dalszy brak specyficznych kompleksów w modelu lub nie właściwie uchwycone ścieżki degradacji.

**Tabela 6 Wartości współczynników dopasowania do wyników eksperymentalnych dla trzech modeli**

|                 |        | HCT116  |         |              | Me45    |         |              |
|-----------------|--------|---------|---------|--------------|---------|---------|--------------|
|                 |        | Model 1 | Model 2 | Model prosty | Model 1 | Model 2 | Model prosty |
| Regulacja przez | Brak   | 313     | 168     | 221          | 26      | 585     | 82           |
|                 | miR-21 | 406     | 12      | 70           | 351     | 76      | 131          |
|                 | miR-24 | 420     | 67      | 249          | 170     | 239     | 188          |
|                 | let-7  | 63      | 553     | 122          | 496     | 220     | 385          |

W tabeli nr 6 przedstawiono wskaźniki dopasowania model - eksperyment dla badanych modeli oraz modelu zawierającego tylko główny szlak translacji z etapami oznaczonymi przez żółte owale na rycinie nr 37, bez dodatkowych, oznaczonych na niebiesko kompleksów niepolisomalnych (ten model w tabeli został oznaczony jako „prosty”). Im niższa wartość wskaźnika dopasowania tym model wierniej odwzorowuje wyniki eksperymentalne. Dla badanych modeli w komórkach HCT najwierniejsze odwzorowanie dawał model 2 zarówno dla przypadku bez regulacji przez miRNA jak i przy regulacji poprzez miR-21 i miR-24. Dla regulacji let-7 w tych komórkach dokładniejsze odwzorowanie było przy modelu nr 1. W komórkach Me45 przy braku regulacji i oddziaływaniu miR-24 lepiej sprawdził się model pierwszy, natomiast dla regulacji przez miR-21 i let-7 model drugi. Kolorem szarym zaznaczono najniższe wartości wskaźnika podobieństwa dla danego przypadku regulacji.



## 5 DYSKUSJA

### 5.1 Czy obecność transkryptów regulowanych przez miRNA może wpływać na los innych transkryptów z założenia nie posiadających miejsc regulacji przez miRNA?

Podwójne geny reporterowe wprowadzane do komórek na jednym plazmidzie, gdzie tylko jeden z genów zawiera badaną sekwencję regulatorową, wykorzystuje się w badaniach gdzie drugi z wprowadzonych genów jest traktowany jako normalizator korygujący różnice w warunkach między eksperymentami np. wydajność procesu transfekcji (Chen et al., 2023; Shell et al., 2007). Jednak w przeprowadzonych przeze mnie eksperymentach można było zauważyć, że obecność miejsc docelowych dla miRNA na genie lucyferazy *Renilla* wpływała również na ekspresję genu lucyferazy firefly, który ich nie posiadał. Dlatego w analizie wyników moich badań zrezygnowałam z użycia jednostek opartych o normalizację poziomów lucyferazy *Renilla* do poziomów lucyferazy firefly i zastosowałam jednostki mówiące o ilości kopii mRNA i aktywności białka na komórkę. Po przeanalizowaniu zmian dla poziomów mRNA i białka kodowanych przez oba geny uwidoczniły się zmiany, które w konwencjonalnym podejściu były niewidoczne. Wprowadzenie miejsc docelowych dla miRNA w genie lucyferazy *Renilla* powodowało nie tylko zmiany poziomów mRNA i białka tego regulowanego genu, ale również wpływało na ekspresję lucyferazy firefly (ryciny 9-15). Oba geny wykazywały się również podobnym rozkładem mRNA w trakcie wirowania w gradiencie sacharozy co sugerowało, że sedymentują z podobnymi kompleksami białko-mRNA (ryciny 29-32). Ponadto poziomy mRNA i białka lucyferazy firefly nieoczekiwanie zmieniały się po dodaniu oligonukleotydów anty-miR (ryciny 22-27) co świadczyłoby o wpływie obecności sekwencji regulowanych przez miRNA na cząsteczkach transkryptów lucyferazy *Renilla*.

Otrzymane wyniki sugerują, że zarówno transkrypty zawierające jak i nie zawierające miejsc wiązania dla miRNA, jak lucyferaza *Renilla* i firefly mogą występować w tych samych kompleksach i uczestniczyć w tych samych procesach regulowanych przez miRNA. Występowanie różnych cząsteczek mRNA w tych samych kompleksach opisali także Morisaki i wsp. (Morisaki et al., 2016), którzy wykorzystując fluorescencyjne sondy obserwowali proces translacji w pojedynczych komórkach i zauważyli występowanie różnych mRNA w tych samych widocznych w mikroskopie foci. Przypuszczalne występowanie regulowanych i nieregulowanych transkryptów w tych samych kompleksach może wynikać z tworzenia

kondensatów w podobny sposób jak tworzą się granule stresu poprzez częściowo losowe tworzenie wiązań RNA-RNA, białko-RNA lub białko-białko i inicjacji przejść fazowych przy interakcji związanego z miRNA białka Ago i białek typu TNRC6 wiążących wiele innych białek (Banani et al., 2016; Kedersha et al., 2016; Khong et al., 2017; Mugler et al., 2016; Panas et al., 2016; Protter & Parker, 2016; Van Treeck et al., 2018). Wiązanie Ago z miRNA i RNA wydaje się konieczne do utworzenia zarodków kondensatów takich jak np. granule stresu (Eulalio et al., 2007; Garcia-Jove Navarro et al., 2019; Jakymiw et al., 2005). W przeprowadzonych eksperymentach zaobserwowano tworzenie dużych kompleksów sedymentujących w gradiencie sacharozy wraz z polisomami (np. rycina 30) jednak były one mniejsze niż obiekty widoczne pod mikroskopem fluorescencyjnym. Obecność obu typów transkryptów genów reporterowych – zawierających i nie zawierających miejsc wiązania dla miRNA w tych samych ciężkich frakcjach w gradiencie sacharozy, może wynikać z indukcji kondensatów poprzez mechanizm analogiczny do mechanizmu powstawania „p-bodies”, i podobnie jak w przypadku „p-bodies” tworzenie tych kondensatów mogłoby być hamowane przez obecność niektórych białek np. przez białko NOT1 (Sachdev et al., 2019). Hipoteza o częściowo losowym mechanizmie powstawania kompleksów (oddziaływania RNA-RNA, RNA-białko, białko-białko) mogłaby wyjaśnić większość obserwowanych także w moich eksperymentach efektów.

W niektórych eksperymentach zauważyłam zwiększoną ekspresję lucyferazy firefly w momencie gdy gen lucyferazy *Renilla* posiadał miejsca wiązania dla miRNA (ryc. nr 15B). Przypadki te nie wpisują się w hipotezę wspólnego tworzenia kondensatów i hamowania translacji. Wzrost ekspresji genów pod wpływem oddziaływania niektórych z nich z kompleksem RISC można byłoby wiązać z opisywanym w literaturze zjawiskiem tworzenia kolistej struktury polirybosomów poprzez łączenie końców 5' i 3' cząsteczek mRNA przy udziale białek (Alekhina et al., 2020; Jackson et al., 2010; Vicens et al., 2018; Wells et al., 1998). Występowanie takiej kolistej struktury uważa się za jeden z czynników wpływających na zwiększenie wydajności procesu translacji poprzez ułatwioną ponowną inicjację translacji (Alekhina et al., 2020; Gallie, 1991; Wells et al., 1998). W warunkach, w których zachodzi proces translacji, jednym z czynników ułatwiających tworzenie kolistej struktury przez cząsteczki mRNA jest kompleks eIF4F, który wiążąc się z końcem 5' poprzez eIF4E, może również wiązać koniec 3' poprzez białko eIF4G1 tworząc wiązanie z kompleksującymi z polyA białkami PABP, przy czym wiązanie to może być zaburzone przez działanie kompleksu RISC (Filipowicz et al., 2008; Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2007). Filipowicz i wsp. (Filipowicz et al., 2008) proponowali, że wiązanie RISC do końca 3' mRNA

najprawdopodobniej tworzy przeszkodę w powstawaniu cyrkularnej cząsteczki mRNA i tą drogą hamuje proces translacji. Pokazano jednak, że kompleks RISC zawierający Ago2 i miRNA z białkiem FXR1 może także wiązać oba końce cząsteczki mRNA i w takiej konformacji ułatwiać inicjację translacji (Truesdell et al., 2012; Vasudevan et al., 2007). Moje doświadczenia pokazujące wzrost poziomu białka przy regulacji przez niektóre miRNA, a w szczególności genów nie posiadających miejsc wiązania dla miRNA sugerują możliwość powstawania cyrkularnych struktur z większej ilości cząsteczek mRNA np. koniec 5' jednej cząsteczki mógłby poprzez jak wyżej opisane oddziaływania łączyć się z końcem 3' drugiej cząsteczki, a jej koniec 5' wiązałby się z końcem 3' pierwszej cząsteczki. Taka struktura powinna ułatwiać inicjację translacji podobnie jak sugerowano dla pojedynczych cząsteczek. Taki model aktywacji translacji wyjaśniałby brak korelacji między ilościami czynników eIF4F i PABP wiążącymi oba końce pojedynczego transkryptu obserwowany w niektórych opublikowanych eksperymentach (Archer et al., 2015). Szczegółowe wyjaśnienie dróg inhibicji i stymulacji translacji wymaga jednak zastosowania dalszych badań z wykorzystaniem bardziej skomplikowanych metod badawczych.

## **5.2 Dlaczego w obecności tych samych białek w jednym typie komórki różne miRNA tworzące RISC mają różne działania i skąd się biorą różnice w działaniu tych samych miRNA między komórkami**

W moich badaniach na komórkach HCT116 albo Me45, miRNA-24 i miRNA-21 wykazywały odmienne działania. Wydaje się, że efekt RISC, który działa przez kompleksowanie z białkami komórkowymi powinien być taki sam dla genów reporterowych różniących się tylko sekwencją dla miRNA (przynajmniej mieć ten sam efekt jakościowy).

Jednak w prezentowanych badaniach geny reporterowe, które różniły się sekwencjami docelowymi dla miRNA w końcu 3', wykazywały różne poziomy ekspresji w ramach jednej linii komórkowej. Obecność miejsc wiązania dla miR-21 powodowała silne zmniejszenie translacji (ryc. nr 10) podczas gdy w obecności miejsc wiązania miR-24 albo miRNA z rodziny let-7 poziom translacji albo nie zmieniał się lub wręcz obserwowałam wzrost wydajności translacji (ryc. nr 12, 15, tabela nr 3). Niektóre różnice w obrębie jednej linii komórkowej mogłyby wynikać z różnic w poziomach komórkowego miRNA. W przypadku linii HCT116 poziom miR-21 był 4 razy wyższy od wspólnego poziomu miRNA z rodziny let-7 i ponad 15 razy wyższy od miRNA-24. W przypadku komórek Me45 była to już dużo mniejsza różnica, poziomy poszczególnych typów miRNA były porównywalne (ryc. nr 8). W obu przypadkach miRNA-21 było jednym z wyżej ekspresjonowanych miRNA. Te różnice mogą wyjaśniać

mocny efekt hamowania translacji w przypadku miRNA-21 natomiast nie wyjaśniają wzmocnienia procesu translacji. Specyficzność wiązania różnych miRNA przez Ago1, Ago2, Ago3, Ago4 i tworzenie różnych kompleksów białkowych mogłoby wyjaśniać różnice w efektach między działaniem różnych miRNA w tej samej komórce. Jednakże opublikowane dotychczas badania sugerują brak takiej specyficzności ludzkich Ago (Dueck et al., 2012; Yoda et al., 2010). Specyficzne efekty działania miRNA w obrębie tych samych komórek wydają się zależeć od różnic w strukturze motywów końca 3' mRNA. Czynnikiem mającym znaczenie w przypadku działania miRNA jest dopasowanie sekwencji pomiędzy targetem a miRNA. Duży wpływ na występowanie działań kompleksów z Ago związanych z represją translacji lub z działaniem endo- i egzo-nukleolitycznym na mRNA może mieć obecność i miejsce występowania niesparowań pomiędzy sekwencjami (McGeary et al., 2019; Salomon et al., 2015). W moich eksperymentach wprowadzone wstawki różniły się dopasowaniem sekwencji do badanych miRNA, o ile dla miR-21 była to 100% komplementarność, tak dla miR-24 niesparowanie występowało na 1 i 13 nukleotydzie rozpoczynając od końca 5' oraz na 6 ostatnich nukleotydach z końca 3' tego miRNA, w przypadku rodziny let-7 wspólne niedopasowanie w obrębie całej rodziny występowało na nukleotydach 9 do 12 licząc od końca 5' miRNA i na ostatnim nukleotydzie, dodatkowo dla niektórych członków tej rodziny pojawiały się niedopasowania w okolicy 18-tego nukleotydu. We wszystkich przypadkach sekwencja rozpoznająca miejsce docelowe, tzw. „seed” czyli 6 nukleotydów na końcu 5' miRNA rozpoczynając od drugiego nukleotydu, charakteryzowała się całkowitym dopasowaniem. Tak więc różnice w działaniu między miRNA w tej samej komórce mogą być po części związane z różnicami w komplementarności z targetem. Ale obserwowane różnice w obrębie jednej linii komórkowej pomiędzy badanymi miRNA nie muszą wynikać tylko z różnic w komplementarności do miejsc wiązania, ale znaczenie może mieć również konformacja cząsteczki mRNA i dostępność miejsc wiązania miRNA. Badane *in silico* struktury mRNA zawierających sekwencje dla badanych miRNA różniły się zarówno dostępnością sekwencji „seed” jak i ilością i skomplikowaniem tworzonych struktur (ryc. nr 35, 36). Część tych przewidywanych dwuniciowych fragmentów w strukturze może być zachowana także w warunkach komórkowych i odpowiadać za obserwowane różnice. W literaturze pojawiają się doniesienia wskazujące na występowanie dużej ilości dwuniciowych elementów w strukturze mRNA i ewentualnej roli w procesie translacji, np. Ruijtenberg i wsp. opisali aktywne rozplatanie dwuniciowej struktury RNA podczas procesu translacji połączone często z wiązaniem miRNA i degradacją mRNA (Ruijtenberg et al., 2020).



Ograniczając działanie miRNA poprzez dodanie oligonukleotydów anty-miR można było zaobserwować jaki efekt miały poszczególne miRNA oddziałując z mRNA reporterowym. Blokując działanie poszczególnych miRNA w komórkach HCT116 można było zaobserwować wzrost poziomu białka i mRNA przy regulacji przez miR-21, co jest w zgodzie z klasycznym modelem oddziaływania miRNA polegającym na hamowaniu procesu translacji i/lub degradacji mRNA (ryc. nr 22). Natomiast w przypadku let-7a, let-7f, let-7g oraz let-7i, obserwowano spadek poziomu białka i mRNA po zastosowaniu oligonukleotydów anty-miR (ryc. nr 24, 26), co sugeruje ochronną rolę tych miRNA w odniesieniu do mRNA. Zastosowanie oligonukleotydów anty-miR-24 sugeruje udział kompleksu RISC zawierającego miR-24 w degradacji mRNA i jednocześnie mogłoby wskazywać na omówioną wcześniej koncepcję wspomagania procesu translacji przez to miRNA (ryc. nr 23).

W linii komórkowej Me45 dodanie każdego z trzech typów oligonukleotydów anty-miR powoduje wzrost poziomu białka i nie wykazuje zróżnicowanego działania pomiędzy miRNA, co zgadza się z klasycznym podejściem do działania miRNA, czyli hamowaniem translacji (ryc. nr 22, 23, 27). W przypadku poziomu transkryptu w tej linii komórkowej działanie klasyczne miRNA możemy zaobserwować dla większości badanych miRNA z rodziny let-7, oprócz let-7a, które sugeruje działanie ochronne dla badanych transkryptów (ryc. nr 24). Dla miR-24 nie zaobserwowano większych zmian w poziomie transkryptu, natomiast dla regulacji poprzez miRNA-21 zauważono spadek mRNA po dodaniu oligonukleotydów anty-miR-21 (ryc. nr 25) sugerując podobnie jak dla let-7a działania ochronne.

Wydaje się również, że obserwowane różnice międzykomórkowe w działaniu tego samego miRNA np. działania miRNA let-7 mogą wynikać z różnicy w składzie powstających kompleksów białko-mRNA, na co wpływ będzie miało różne stężenie białek występujących w badanych komórkach. Kompleksy zawierające białka Ago mogą zawierać różne białka w tym m.in. TNRC6, PABC, helikazy, TP53, białka rybosomalne, czynniki translacyjne co przedstawiono w eksperymentach z immunoprecypitacją skierowaną przeciwko białkom Ago (Dueck et al., 2012; Kakumani et al., 2020; Landthaler et al., 2008; Meister et al., 2005). Pokazano również, że to samo miRNA może występować w kompleksach RISC o różnym składzie białkowym (Dallaire et al., 2018). Również kompleksy o różnych składach białkowych mogą współistnieć w komórce, a ich skład będzie zależał od dostępności składników w danym momencie. Co więcej białka wchodzące w skład kompleksu mogą być poddawane obróbce potranslacyjnej co może zmieniać ich interakcje i wpływać na właściwości tworzonych kompleksów z miRNA (Munakata et al., 2021), w związku z czym różne kompleksy białko-miRNA mogą powodować degradację mRNA lub hamowanie translacji z lub bez degradacji

mRNA, a nawet mogą stymulować translację np. poprzez interakcję PABP-eIF4F. W moich eksperymentach obecność miejsc wiązania let-7 nie prowadziła do degradacji mRNA, a nawet pełniła funkcję stabilizującą co można było zaobserwować gdy, po dodaniu oligonukleotydowych anti-miR, poziom mRNA zaczął spadać (ryc. nr 24).

Ponadto dodanie oligonukleotydów anti-miR-21 w obu liniach komórkowych powodowało wzrost poziomu białka co stało w zgodzie z klasyczną koncepcją działania miRNA hamującego proces translacji (ryc. nr 22). Natomiast w przypadku oddziaływania na poziom mRNA efekty między liniami komórkowymi różniły się, w komórkach HCT116 ten poziom wzrósł a w Me45 spadł w obecności tego samego oligonukleotydu anti-miR (ryc. nr 22). Wydaje się zatem, że mimo podobnego działania na proces translacji, inne białka są zaangażowane w kontrolę poziomu mRNA. Dla pozostałych miRNA (miR-24 i rodzina let-7) różnice te dotyczą również kontroli procesu translacji i poziomu białka.

### **5.3 Czy modelowanie matematyczne może nam ułatwić rozpoznawanie mechanizmów regulacji translacji?**

Dotychczas powstało wiele modeli matematycznych zajmujących się procesem translacji, który to proces jest jednak na tyle trudny do modelowania, że żaden z tych modeli nie wyczerpuje możliwości pełnego zrozumienia zagadnienia (Dauloudet et al., 2021; von der Haar, 2012; Zinovyev et al., 2013). W mojej pracy próbowałam poprzez konstrukcję modeli matematycznych znaleźć odpowiedź na pytanie czy w obecności miejsc wiązania miRNA, w procesie translacji mogą się tworzyć inne niż polisomalne kompleksy RNA-białko. Zakładałam istnienie takich kompleksów, ale nie znałam ich ilości ani właściwości. Dlatego utworzyłam szereg modeli, w których zakładałam istnienie niepolisomalnych kompleksów RNA-białko o właściwościach sedymentacyjnych podobnych do właściwości kompleksów przechodzących przez różne etapy translacji i wykonywałam obliczenia symulacyjne, które pozwalały na obliczenie teoretycznej ilości cząsteczek mRNA obecnych we frakcjach podobnych do frakcji otrzymanych eksperymentalnie. Następnie ilości cząsteczek w hipotetycznych frakcjach, wyliczone w modelu, porównywałam z wartościami eksperymentalnymi otrzymanymi dla tych frakcji oraz określałam wartości dopasowania. Sposób obliczania wartości dopasowania znajduje się na stronie 57, a wartości dla kilku modeli podane są w tabeli nr 6. Im niższa wartość dopasowania tym model wierniej odwzorowuje wyniki eksperymentalne. Modele zawierające kompleksy niepolisomalne wykazywały lepsze dopasowanie do wartości eksperymentalnych niż model zakładający wyłącznie istnienie

typowych kompleksów polisomalnych (tabela nr 6). Mimo, że te modele nie są idealne to sugerują istnienie innych niż polisomalne kompleksów w badanym materiale.

Uzyskane w pracy modele mogą do pewnego stopnia odwzorowywać występujące w naturze tworzenie kompleksów RNA-białko innych niż polisomy, jednak wybrane do pokazania w pracy modele nie są pozbawione wad lub niedoskonałości. Zwłaszcza w modelu nr 2 kompartment 2c obrazuje kompleksy, które wydawałoby się nie powinny istnieć w naturze, ponieważ powodowałyby nieskończone gromadzenie się materiału w komórkach, a jednak model ten wykazuje większe dopasowanie do danych eksperymentalnych niż porównywany model numer 1 choć, jak można zauważyć na podstawie współczynników (tabela nr 5), jedynie niewielka ilość transkryptów przechodzi do tego kompartmentu. Kompleks ten był w zamyśle kompleksem lekkim złożonym głównie z połączonych ze sobą cząsteczek RNA i wykazujących niską podatność na degradację, w związku z czym, element degradacji został pominięty w modelowaniu tego kompartmentu. W literaturze opisano eksperymenty wykazujące powstawanie takich kompleksów złożonych w większości tylko z cząsteczek RNA (lekkie komponenty), które wykazują znacznie wydłużony okres półtrwania tych cząsteczek RNA (Van Treeck et al., 2018). Zamodelowane w tej pracy inne kompleksy występujące w cięższych frakcjach np. kompartmenty 4b, 5b w modelach nr 1 i 2 mogą w naturze odpowiadać kondensatom będącym zaczątkami granul stresu. W takich kondensatach występowanie helikaz może powodować rozpad tych struktur i degradację RNA poprzez interakcję z miRNA dzięki rozpleceniu struktury (Tauber et al., 2020). W tych kompartmentach mogłyby powstawać też mniejsze kompleksy podobne do kompleksów tworzonych dzięki rozdzielaniu faz tzw. „liquid-liquid phase separation” (LLPS) opisanych w pracy Lyon i wsp. (Lyon et al., 2021). Lyon i wsp. sugerują też możliwość występowania mniejszych kompleksów na bazie RNA, których wielkość jest ograniczona ilością miejsc mogących tworzyć wiązania z innymi cząsteczkami (Lyon et al., 2021).

W symulacjach modelowych przeprowadziłam losowy dobór parametrów dla modeli charakteryzujących się liniowymi przejściami między kompartmentami, które to przejścia mogą nie być prawidłowe w momencie złożonych interakcji badanych transkryptów z innymi białkami i transkryptami komórkowymi. Takie uproszczenie interakcji najprawdopodobniej wpływa na to, że nie otrzymano idealnych dopasowań badanych modeli do danych eksperymentalnych. Niemniej wydaje się, że zaprezentowany model matematyczny może wskazywać miejsca gdzie można poszukiwać niepolisomalnych kompleksów nieuczestniczących w procesie translacji.



## 6 PODSUMOWANIE

W przeprowadzonych eksperymentach obserwowałam zarówno spadek jak i wzrost poziomów mRNA dla transkryptów posiadających miejsca wiązania dla miRNA w porównaniu do tych samych transkryptów nieposiadających takich miejsc. Na poziomie białka również podobne efekty były widoczne, pokazując oprócz hamowania translacji także możliwość wzrostu wydajności tego procesu. Takie różne działanie miRNA w jednym typie komórek nie zależało tylko od stężenia samych miRNA w komórkach, natomiast mogło być też związane ze strukturą cząsteczki transkryptu regulowanego przez miRNA.

Obserwowałam również, że ten sam transkrypt zawierający sekwencje wiążące miRNA wykazywał zwiększoną ekspresję w jednych komórkach i zmniejszoną ekspresję w drugich zarówno na poziomie mRNA jak i białka wykazując specyficzność tkankową. Takie różnice nie zależą od sekwencji RNA, ale raczej od różnic w składzie białkowym i możliwościach tworzenia kompleksów RNA-białko innych niż polisomalne między różnymi typami komórek.

Konstruując modele matematyczne procesu translacji przeprowadzałam również poszukiwania *in silico* jakiego typu kompleksy mogą tworzyć się w wyniku wprowadzenia transkryptów zawierających miejsca wiązania dla miRNA. Obserwowałam, że najbardziej porównywalne wyniki z danymi eksperymentalnymi występowały w modelu zakładającym istnienie niepolisomalnych kompleksów RNA-białko charakteryzujących się niską wartością sedymentacji w gradiencie sacharozy i wyłączającymi na trwałe mRNA z procesu translacji oraz tworzeniem większych kondensatów które mogą ulegać w kolejnych etapach degradacji.



## 7 BIBLIOGRAFIA

- Abernathy, D. G., Kim, W. K., McCoy, M. J., Lake, A. M., Ouwenga, R., Lee, S. W., Xing, X., Li, D., Lee, H. J., Heuckeroth, R. O., Dougherty, J. D., Wang, T., & Yoo, A. S. (2017). MicroRNAs Induce a Permissive Chromatin Environment that Enables Neuronal Subtype-Specific Reprogramming of Adult Human Fibroblasts. *Cell Stem Cell*, *21*(3), 332–348.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.002>
- Alekhina, O., Terenin, I., Dmitriev, S., & Vassilenko, K. (2020). Functional Cyclization of Eukaryotic mRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(5), 1677. <https://doi.org/10.3390/ijms21051677>
- Archer, S. K., Shirokikh, N. E., Hallwirth, C. V., Beilharz, T. H., & Preiss, T. (2015). Probing the closed-loop model of mRNA translation in living cells. *RNA Biology*, *12*(3), 248–254. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017242>
- Banani, S. F., Rice, A. M., Peeples, W. B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., & Rosen, M. K. (2016). Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell*, *166*(3), 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
- Beißel, C., Neumann, B., Uhse, S., Hampe, I., Karki, P., & Krebber, H. (2019). Translation termination depends on the sequential ribosomal entry of eRF1 and eRF3. *Nucleic Acids Research*, *47*(9), 4798–4813. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz177>
- Bogorad, A. M., Lin, K. Y., & Marintchev, A. (2018). eIF2B Mechanisms of Action and Regulation: A Thermodynamic View. *Biochemistry*, *57*(9), 1426–1435. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00957>
- Bulygin, K. N., Graifer, D. M., Hountondji, C., Frolova, L. Yu., & Karpova, G. G. (2017). Exploring contacts of eRF1 with the 3'-terminus of the P site tRNA and mRNA stop signal in the human ribosome at various translation termination steps. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1860*(7), 782–793. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.04.004>
- Chen, H., Wang, H., Liu, X., Li, L., Abudusimu, Y., & Tuoheti, Y. (2023). Construction of ceRNA regulatory networks for osteoporosis. *Molecular Medicine Reports*, *28*(2), 145. <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13033>
- Chendrimada, T. P., Finn, K. J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R. I., Liebhaber, S. A., Pasquinelli, A. E., & Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, *447*(7146), 823–828. <https://doi.org/10.1038/nature05841>
- Conte, M. R., Kelly, G., Babon, J., Sanfelice, D., Youell, J., Smerdon, S. J., & Proud, C. G. (2006). Structure of the Eukaryotic Initiation Factor (eIF) 5 Reveals a Fold Common to Several Translation Factors. *Biochemistry*, *45*(14), 4550–4558. <https://doi.org/10.1021/bi052387u>
- Dallaire, A., Frédérick, P.-M., & Simard, M. J. (2018). Somatic and Germline MicroRNAs Form Distinct Silencing Complexes to Regulate Their Target mRNAs Differently. *Developmental Cell*, *47*(2), 239–247.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.022>

- Darty, K., Denise, A., & Ponty, Y. (2009). VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, *25*(15), 1974–1975. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp250>
- Dauloudet, O., Neri, I., Walter, J.-C., Dornigac, J., Geniet, F., & Parmeggiani, A. (2021). Modelling the effect of ribosome mobility on the rate of protein synthesis. *The European Physical Journal E*, *44*(2), 19. <https://doi.org/10.1140/epje/s10189-021-00019-8>
- de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T. J., ... de Hoon, M. J. L. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, *35*(9), 872–878. <https://doi.org/10.1038/nbt.3947>
- Dever, T. E., & Green, R. (2012). The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(7), a013706–a013706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., & Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Research*, *40*(19), 9850–9862. <https://doi.org/10.1093/nar/gks705>
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., & Izaurralde, E. (2007). P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(11), 3970–3981. <https://doi.org/10.1128/MCB.00128-07>
- 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>
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, *9*(2), 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrg2290>
- Gallie, D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes & Development*, *5*(11), 2108–2116. <https://doi.org/10.1101/gad.5.11.2108>
- Garcia-Jove Navarro, M., Kashida, S., Chouaib, R., Souquere, S., Pierron, G., Weil, D., & Gueroui, Z. (2019). RNA is a critical element for the sizing and the composition of phase-separated RNA–protein condensates. *Nature Communications*, *10*(1), 3230. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11241-6>
- Godet, A.-C., David, F., Hantelys, F., Tatin, F., Lacazette, E., Garmy-Susini, B., & Prats, A.-C. (2019). IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4), 924. <https://doi.org/10.3390/ijms20040924>
- Jaako, P., Faille, A., Tan, S., Wong, C. C., Escudero-Urquijo, N., Castro-Hartmann, P., Wright, P., Hilcenko, C., Adams, D. J., & Warren, A. J. (2022). eIF6 rebinding dynamically couples ribosome maturation and translation. *Nature Communications*, *13*(1), 1562. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29214-7>



- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J. C., Fritzler, M. J., & Chan, E. K. L. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nature Cell Biology*, *7*(12), 1267–1274. <https://doi.org/10.1038/ncb1334>
- Kakumani, P. K., Harvey, L.-M., Houle, F., Guitart, T., Gebauer, F., & Simard, M. J. (2020). CSDE1 controls gene expression through the miRNA-mediated decay machinery. *Life Science Alliance*, *3*(4), e201900632. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900632>
- Kats, I. R., & Klann, E. (2019). Translating from cancer to the brain: regulation of protein synthesis by eIF4F. *Learning & Memory*, *26*(9), 332–342. <https://doi.org/10.1101/lm.050047.119>
- Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., Thomas, M., Lieberman, J., McInerney, G. M., Ivanov, P., & Anderson, P. (2016). G3BP–Caprin1–USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *Journal of Cell Biology*, *212*(7). <https://doi.org/10.1083/jcb.201508028>
- Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S. F., Wheeler, J. R., & Parker, R. (2017). The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Molecular Cell*, *68*(4), 808–820.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.015>
- Kramer-Marek, G., Serpa, C., Szurko, A., Widel, M., Sochanik, A., Snietura, M., Kus, P., Nunes, R. M. D., Arnaut, L. G., & Ratuszna, A. (2006). Spectroscopic properties and photodynamic effects of new lipophilic porphyrin derivatives: Efficacy, localisation and cell death pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *84*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.12.011>
- Krishna, K. H., & Kumar, M. S. (2018). Molecular evolution and functional divergence of eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinases. *PLOS ONE*, *13*(3), e0194335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194335>
- Kwan, T., & Thompson, S. R. (2019). Noncanonical Translation Initiation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(4), a032672. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032672>
- Landthaler, M., Gaidatzis, D., Rothballer, A., Chen, P. Y., Soll, S. J., Dinic, L., Ojo, T., Hafner, M., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2008). Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA*, *14*(12), 2580–2596. <https://doi.org/10.1261/rna.1351608>
- Lapointe, C. P., Grosely, R., Sokabe, M., Alvarado, C., Wang, J., Montabana, E., Villa, N., Shin, B.-S., Dever, T. E., Fraser, C. S., Fernández, I. S., & Puglisi, J. D. (2022). eIF5B and eIF1A reorient initiator tRNA to allow ribosomal subunit joining. *Nature*, *607*(7917), 185–190. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04858-z>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)

- Li, Z., Xu, R., & Li, N. (2018). MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? *Nutrition & Metabolism*, *15*(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0305-8>
- Liu, B., Shyr, Y., Cai, J., & Liu, Q. (2019). Interplay between miRNAs and host genes and their role in cancer. *Briefings in Functional Genomics*, *18*(4), 255–266. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elz002>
- Liu, Y., Cui, J., Hoffman, A. R., & Hu, J. (2023). Eukaryotic translation initiation factor *eIF4G2* opens novel paths for protein synthesis in development, apoptosis and cell differentiation. *Cell Proliferation*, *56*(3). <https://doi.org/10.1111/cpr.13367>
- Lyon, A. S., Peebles, W. B., & Rosen, M. K. (2021). A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *22*(3), 215–235. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00303-z>
- Marintchev, A., & Ito, T. (2020). eIF2B and the Integrated Stress Response: A Structural and Mechanistic View. *Biochemistry*, *59*(13), 1299–1308. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00132>
- 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*, *317*(5845), 1764–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1146067>
- McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*, *366*(6472). <https://doi.org/10.1126/science.aav1741>
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P. Y., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2005). Identification of Novel Argonaute-Associated Proteins. *Current Biology*, *15*(23), 2149–2155. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.048>
- Mitchell, S. F., & Lorsch, J. R. (2008). Should I Stay or Should I Go? Eukaryotic Translation Initiation Factors 1 and 1A Control Start Codon Recognition. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(41), 27345–27349. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800031200>
- Morisaki, T., Lyon, K., DeLuca, K. F., DeLuca, J. G., English, B. P., Zhang, Z., Lavis, L. D., Grimm, J. B., Viswanathan, S., Looger, L. L., Lionnet, T., & Stasevich, T. J. (2016). Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science*, *352*(6292), 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.aaf0899>
- Mugler, C. F., Hondele, M., Heinrich, S., Sachdev, R., Vallotton, P., Koek, A. Y., Chan, L. Y., & Weis, K. (2016). ATPase activity of the DEAD-box protein Dhh1 controls processing body formation. *eLife*, *5*. <https://doi.org/10.7554/eLife.18746>
- Munakata, F., Suzawa, M., & Ui-Tei, K. (2021). Identification of Phosphorylated Amino Acids in Human TNRC6A C-Terminal Region and Their Effects on the Interaction with the CCR4-NOT Complex. *Genes*, *12*(2), 271. <https://doi.org/10.3390/genes12020271>
- Nakanishi, K. (2016). Anatomy of *RISC* : how do small *RNAs* and chaperones activate Argonaute proteins? *WIREs RNA*, *7*(5), 637–660. <https://doi.org/10.1002/wrna.1356>

- Olsen, P. H., & Ambros, V. (1999). The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology*, 216(2), 671–680. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9523>
- O’Sullivan, M. H., & Fraser, C. S. (2023). Monitoring RNA restructuring in a human cell-free extract reveals eIF4A-dependent and eIF4A-independent unwinding activity. *Journal of Biological Chemistry*, 299(7), 104936. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104936>
- Panas, M. D., Ivanov, P., & Anderson, P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *Journal of Cell Biology*, 215(3), 313–323. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609081>
- Park, E.-H., Walker, S. E., Lee, J. M., Rothenburg, S., Lorsch, J. R., & Hinnebusch, A. G. (2011). Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1•PABP mRNPs *in vivo*. *The EMBO Journal*, 30(2), 302–316. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.312>
- Petersen, C. P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., & Sharp, P. A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 21(4), 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.031>
- Pfaff, J., & Meister, G. (2013). Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 855–860. <https://doi.org/10.1042/BST20130047>
- Pillai, R. S., Artus, C. G., & Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, 10(10), 1518–1525. <https://doi.org/10.1261/rna.7131604>
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., & Filipowicz, W. (2005). Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science*, 309(5740), 1573–1576. <https://doi.org/10.1126/science.1115079>
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., & Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, 17(3), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.12.007>
- Protter, D. S. W., & Parker, R. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in Cell Biology*, 26(9), 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004>
- Reuter, J. S., & Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>
- Ruijtenberg, S., Sonneveld, S., Cui, T. J., Logister, I., de Steenwinkel, D., Xiao, Y., MacRae, I. J., Joo, C., & Tanenbaum, M. E. (2020). mRNA structural dynamics shape Argonaute-target interactions. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(9), 790–801. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0461-1>
- Sachdev, R., Hondele, M., Linsenmeier, M., Vallotton, P., Mugler, C. F., Arosio, P., & Weis, K. (2019). Pat1 promotes processing body assembly by enhancing the phase separation of the DEAD-box ATPase Dhh1 and RNA. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.41415>
- Saini, A. K., Nanda, J. S., Martin-Marcos, P., Dong, J., Zhang, F., Bhardwaj, M., Lorsch, J. R., & Hinnebusch, A. G. (2014). Eukaryotic translation initiation factor eIF5 promotes the accuracy of start codon recognition by regulating Pi release and conformational transitions of the

- preinitiation complex. *Nucleic Acids Research*, 42(15), 9623–9640.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gku653>
- Salomon, W. E., Jolly, S. M., Moore, M. J., Zamore, P. D., & Serebrov, V. (2015). Single-Molecule Imaging Reveals that Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides. *Cell*, 162(1), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.029>
- Schwahnhäuser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., & Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10098>
- Shell, S., Park, S.-M., Radjabi, A. R., Schickel, R., Kistner, E. O., Jewell, D. A., Feig, C., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11400–11405.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0704372104>
- Shestakova, E. D., Smirnova, V. V., Shatsky, I. N., & Terenin, I. M. (2023). Specific mechanisms of translation initiation in higher eukaryotes: the eIF4G2 story. *RNA*, 29(3), 282–299.  
<https://doi.org/10.1261/rna.079462.122>
- Tauber, D., Tauber, G., Khong, A., Van Treeck, B., Pelletier, J., & Parker, R. (2020). Modulation of RNA Condensation by the DEAD-Box Protein eIF4A. *Cell*, 180(3), 411–426.e16.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.031>
- Thakur, A., Marler, L., & Hinnebusch, A. G. (2019). A network of eIF2 $\beta$  interactions with eIF1 and Met-tRNA<sup>i</sup> promotes accurate start codon selection by the translation preinitiation complex. *Nucleic Acids Research*, 47(5), 2574–2593. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1274>
- Truesdell, S. S., Mortensen, R. D., Seo, M., Schroeder, J. C., Lee, J. H., LeTonqueze, O., & Vasudevan, S. (2012). MicroRNA-mediated mRNA Translation Activation in Quiescent Cells and Oocytes Involves Recruitment of a Nuclear microRNP. *Scientific Reports*, 2(1), 842.  
<https://doi.org/10.1038/srep00842>
- Valášek, L. S., Zeman, J., Wagner, S., Beznosková, P., Pavlíková, Z., Mohammad, M. P., Hronová, V., Herrmannová, A., Hashem, Y., & Gunišová, S. (2017). Embraced by eIF3: structural and functional insights into the roles of eIF3 across the translation cycle. *Nucleic Acids Research*, 45(19), 10948–10968. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx805>
- Van Treeck, B., Protter, D. S. W., Matheny, T., Khong, A., Link, C. D., & Parker, R. (2018). RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(11), 2734–2739.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1800038115>
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*, 318(5858), 1931–1934.  
<https://doi.org/10.1126/science.1149460>
- Vicens, Q., Kieft, J. S., & Rissland, O. S. (2018). Revisiting the Closed-Loop Model and the Nature of mRNA 5′–3′ Communication. *Molecular Cell*, 72(5), 805–812.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.047>

- von der Haar, T. (2012). Mathematical and computational modelling of ribosomal movement and protein synthesis: an overview. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 1(1), e201204002. <https://doi.org/10.5936/csbj.201204002>
- Wang, B., Yanez, A., & Novina, C. D. (2008). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5343–5348. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801102105>
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D., & Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Molecular Cell*, 2(1), 135–140. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80122-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80122-7)
- Wu, J., Yang, J., Cho, W. C., & Zheng, Y. (2020). Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *Journal of Advanced Research*, 24, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.04.017>
- Xu, B., Liu, L., & Song, G. (2022). Functions and Regulation of Translation Elongation Factors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.816398>
- Yanagiya, A., Suyama, E., Adachi, H., Svitkin, Y. V., Aza-Blanc, P., Imataka, H., Mikami, S., Martineau, Y., Ronai, Z. A., & Sonenberg, N. (2012). Translational Homeostasis via the mRNA Cap-Binding Protein, eIF4E. *Molecular Cell*, 46(6), 847–858. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.004>
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., & Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), 17–23. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1733>
- Young, D. J., Guydosh, N. R., Zhang, F., Hinnebusch, A. G., & Green, R. (2015). Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3'UTRs In Vivo. *Cell*, 162(4), 872–884. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.041>
- Zeidler, M., Hüttenhofer, A., Kress, M., & Kummer, K. K. (2020). Intragenic MicroRNAs Autoregulate Their Host Genes in Both Direct and Indirect Ways—A Cross-Species Analysis. *Cells*, 9(1), 232. <https://doi.org/10.3390/cells9010232>
- Zhang, R., Jing, Y., Zhang, H., Niu, Y., Liu, C., Wang, J., Zen, K., Zhang, C.-Y., & Li, D. (2018). Comprehensive Evolutionary Analysis of the Major RNA-Induced Silencing Complex Members. *Scientific Reports*, 8(1), 14189. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32635-4>
- Zinovyev, A., Morozova, N., Gorban, A. N., & Harel-Belan, A. (2013). *Mathematical Modeling of microRNA-Mediated Mechanisms of Translation Repression* (pp. 189–224). [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1_11)
- Zipprich, J. T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., & Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA*, 15(5), 781–793. <https://doi.org/10.1261/rna.1448009>



Część eksperymentalna została opublikowana w 2022 roku w:

**Hudy D, Rzeszowska-Wolny J:** *Expression of miRNA-Targeted and Not-Targeted Reporter Genes Shows Mutual Influence and Intercellular Specificity.* International Journal of Molecular Sciences, **2022**, 23(23), 15059.

Podczas prac związanych z doktoratem miałam wsparcie Województwa Śląskiego w ramach programu „DoktoRIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska” w latach 2014-2015