

Autoreferat

**„Technologia interferencji RNA w eksperymentalnej terapii
chorób poliglutaminowych oraz efekty niespecyficzne
wywoływane przez reagenty RNAi”**

Dr Marta Olejniczak

Zakład Biomedycyny Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Poznań, 2016

1. DANE OSOBOWE

1.1 IMIĘ I NAZWISKO: Marta Olejniczak

1.2 POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

1999	Dyplom magistra biologii, specjalność biologia molekularna Praca magisterska pt. "Cechy sekwencji wpływające na częstość mutacji w genach <i>BRCA1</i> i <i>BRCA2</i> " Promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Krzyżosiak	Wydział Biologii UAM w Poznaniu; Praca wykonana w Pracowni Genetyki Nowotworów, IChB PAN w Poznaniu
2006	Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii Tytuł rozprawy doktorskiej: „Optymalizacja warunków analizy sekwencji mikrosatelitarnych” Promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Krzyżosiak	Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

1999-2006	asystent w Pracowni Genetyki Nowotworów (obecnie Zakład Biomedycyny Molekularnej), Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
2006-	adiunkt w Zakładzie Biomedycyny Molekularnej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
2014-	kierownik Zespołu Terapii Genetycznej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

3. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

Liczba wszystkich publikacji: **17**

Liczba publikacji wchodzących w skład habilitacji: **6**

Artykuły konferencyjne: **2**

Załącznik nr 2

Zgłoszenia patentowe: **1 (międzynarodowe)**

Udział w projektach badawczych:

- a) Kierownik projektów: **3**
- b) Główny wykonawca, manager projektu: **1 (Projekt strukturalny POIG)**
- c) Wykonawca: **7**, w tym 1 projekt międzynarodowy (RIGHT)

Udział w konferencjach krajowych i międzynarodowych: **10**

Recenzje dla czasopism: **4**

Recenzje projektów NCBIR: **3**

Recenzje prac licencyjnych: **1**

Sumaryczny IF artykułów, zgodnie z rokiem opublikowania (JCR): **83,063**

Liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection (bez autocytowań): **168**

Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: **8**

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego:

Technologia interferencji RNA w eksperymentalnej terapii chorób poliglutaminowych oraz efekty niespecyficzne wywoływane przez reagenty RNAi.

4.2 Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Wymienione poniżej prace są podstawą wniosku habilitacyjnego i stanowią zamknięty, monotematyczny cykl. Prace te powstały w ciągu ostatnich 5 lat (2010-2015) i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, specjalizujących się w tematyce biologii molekularnej.

1. **Olejniczak M***, Urbanek M.O., Jaworska E, Witucki Ł, Szcześniak M.W., Makałowska I, Krzyzosiak W.J. *“Sequence-non-specific effects generated by various types of RNA interference triggers”*, BBA Gene Regul Mech., 2016; 1859, 306–314 (IF₂₀₁₄ **6,332**; IF_{5-letni} **5,661**), punkty MNiSW: **40**, *autor korespondencyjny
2. Fiszer A, **Olejniczak M**, Galka-Marciniak P, Mykowska A, Krzyzosiak WJ. *„Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression”*.

- Nucleic Acids Res., 2013; 41, 10426-37
(IF₂₀₁₃ **8,808**; IF_{5-letni} **8,861**), punkty MNiSW: **40**, liczba cytowań (bez autocytowań): **6**
3. **Olejniczak M**, Galka-Marciniak P, Polak K, Fligier A, Krzyzosiak WJ. "RNAimmuno: A database of the nonspecific immunological effects of RNA interference and microRNA reagents."
RNA, 2012; 18, 930-935
(IF₂₀₁₂: **5,088**; IF_{5-letni} **4,9**), punkty MNiSW: **35**, liczba cytowań (bez autocytowań): **9**
4. Fiszer A, **Olejniczak M**, Switonski PM, Wroblewska JP, Wisniewska-Kruk J, Mykowska A, Krzyzosiak WJ. "An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases".
BMC Mol Biol., 2012; 7;13:6.
(IF₂₀₁₂: **2,796**; IF_{5-letni} **3,289**), punkty MNiSW: **30**, liczba cytowań (bez autocyt.): **9**
5. **Olejniczak M**, Polak K, Galka-Marciniak P, Krzyzosiak WJ "Recent Advances in Understanding of the Immunological Off-target Effects of siRNA",
Curr Gene Ther 2011; 11,532-43
(IF₂₀₁₁ **3,386**; IF_{5-letni} **2,948**), punkty MNiSW: **35**, (bez autocytowań): **15**
6. **Olejniczak M**, Galka P, Krzyzosiak WJ. „Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators”,
Nucleic Acids Res., 2010; 38: 1-16.
(IF₂₀₁₀ **7,836**; IF_{5-letni} **8,861**), punkty MNiSW: **40**, (bez autocytowań): **36**

Łączny 5-letni IF przedstawionego powyżej jednotematycznego cyklu publikacji wynosi **34,532** a łączna liczba cytowań (bez autocytowań) **75**. Oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie poszczególnych publikacji oraz kopie powyższych publikacji umieszczono w załączniku do wniosku habilitacyjnego.

4.3 Omówienie celu naukowego w/w prac oraz otrzymanych wyników

Wstęp

Technologia interferencji RNA jest wykorzystywana od ponad 10 lat w badaniu funkcji genów i w eksperymentalnej terapii chorób genetycznych, infekcji wirusowych i nowotworów. Narzędzia technologii RNAi, takie jak małe interferujące RNA (siRNA) czy małe spinki RNA (shRNA) wykorzystują naturalną ścieżkę biogenezy miRNA, przy czym włączają się do niej na różnych etapach [1–3]. Pierwotny prekursor miRNA (pri-miRNA) podlega obróbce przez wieloenzymatyczny kompleks Mikroprocesora do krótkiej spinki pre-miRNA, która jest następnie transportowana z jądra do cytoplazmy. Kolejnym etapem biogenezy jest cięcie pre-miRNA do krótkich dupleksów RNA, które są wiązane przez kompleks RISC i po rozpoznaniu komplementarnej sekwencji w docelowym transkrypcie indukują jego deadenylację i degradację lub cięcie przy udziale białka Ago (siRNA).

W Zakładzie Biomedycyny Molekularnej od wielu lat zajmujemy się chorobami genetycznymi związanymi z występowaniem ekspansji trójnukleotydowych powtórzeń w pojedynczych genach (Triplet Repeat Expansion Diseases, TREDs). Przykładem takich chorób jest Płasawica Huntingtona oraz szereg ataksji rdzeniowo-mózdkowych, np. SCA3. Podczas wykonywania pracy doktorskiej byłam zaangażowana w wątek badań diagnostycznych tych chorób. Wraz z rozwojem technologii RNAi pojawiły się nowe możliwości eksperymentalnej terapii chorób TREDs z wykorzystaniem takich narzędzi jak siRNA czy wektorowe shRNA/sh-miRNA. Włączyłam się do tych badań uzyskując finansowanie projektu pt. „Genetyczne podejścia do allelo-specyficznej terapii chorób poliglutaminowych”, a ich efektem są m.in. dwie publikacje eksperymentalne przedstawione we wniosku habilitacyjnym (NAR 2013 i BMC Mol Biol 2012) oraz międzynarodowy wniosek patentowy.

Podczas analiz efektywności działania reagentów wektorowych w komórkach fibroblastów ludzkich zaobserwowaliśmy ich silną toksyczność, co skłoniło nas do bardziej wnikliwej analizy efektów ubocznych wywoływanych przez obcy materiał genetyczny (projekt pt. „Testowanie efektów niespecyficzných wywoływanych przez reagenty technologii interferencji RNA i mikroRNA”). Efektem tych badań jest kilka publikacji, które zostały włączone do wniosku habilitacyjnego (NAR 2010, Curr Gene Ther 2011 i BBA Gene Regul Mech 2016) oraz internetowa baza danych RNAimmuno (RNA, 2012).

Cel

Głównym celem prac przedstawionych do rozprawy habilitacyjnej był rozwój technologii interferencji RNA, stosowanej szeroko w badaniach funkcji genów oraz w podejściach terapeutycznych. Celem szczegółowym było zaprojektowanie skutecznych i bezpiecznych narzędzi terapeutycznych, wykorzystujących zjawisko RNAi w eksperymentalnej terapii chorób neurodegeneracyjnych człowieka, takich jak choroba Huntingtona czy ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3. Cel ten realizowałam poprzez testowanie efektywności i specyficzności działania reagentów siRNA i wektorowych shRNA w komórkowych modelach chorób HD i SCA3 (fibroblasty wyprowadzone od pacjentów).

Ważnym celem pracy, który towarzyszył rozwijaniu wątku terapeutycznego, było badanie efektów niespecyficznych, wywoływanych przez reagenty technologii RNAi (na przykładzie reagentów siRNA, shRNA/sh-miR celujących m.in. w geny *HD* i *ATXN3*) oraz stworzenie pierwszej internetowej bazy danych zbierającej informacje na ten temat.

Wyniki

Odkrycie zjawiska interferencji RNA rozpoczęło nowy etap badań w terapii wielu chorób genetycznych człowieka, w tym chorób neurodegeneracyjnych z grupy TREDs. W przypadku chorób wywoływanych ekspansją powtórzeń CAG w jednym z dwóch alleli genów, dochodzi do powstawania toksycznego białka z wydłużoną domeną poliglutaminową (poliQ). W ramach pracy habilitacyjnej poszukiwałam skutecznych i bezpiecznych reagentów technologii RNAi, wyciszających ekspresję zmutowanych genów związanych z chorobami poliQ. Aby uzyskać allelo-selektywność wyciszania, stosowane przeze mnie strategie terapeutyczne obejmowały celowanie reagentami w regiony polimorficzne genów (SNP) oraz wydłużony ciąg powtórzeń CAG (STR). W badaniach wykorzystywałam różne typy narzędzi terapeutycznych: syntetyczne siRNA, sd-siRNA oraz shRNA i sh-miRs, dostarczane do komórek w postaci wektorów plazmidowych lub lentiwirusowych.

W ramach publikacji pt. "*An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases.*" (BMC Mol Biol., 2012) zaprojektowaliśmy szereg reagentów siRNA nacelowanych na sekwencje SNP w genach *ATXN1*, *ATXN3* oraz *HTT*. Strategia celowania w SNP opiera się na zdolności kompleksu RISC do dyskryminacji pomiędzy dwoma allelami genu, różniącymi się pojedynczym nukleotydem w sekwencji docelowej. Do degradacji zmutowanego transkryptu dochodzi tylko wtedy, gdy nić wiodąca siRNA jest w

pełni komplementarna do transkryptu. W pierwszym etapie przeanalizowaliśmy linie fibroblastów ludzkich w poszukiwaniu odpowiednich wariantów SNP w genach *ATXN1*, *ATXN3* oraz *HTT*. W przypadku modelu HD, badanego przeze mnie, jako cel terapeutyczny wybrany został SNP C/T (rs1065745), zlokalizowany ok. 1 kb od ciągu powtórzeń CAG. Zaprojektowane siRNA zawierały niesparowania z transkrypcyjnym normalnym w pozycjach: 9 (G9), 10 (G10) lub 16 (G16). W wyniku analiz poziomu transkryptu i białka huntingtyny wytypowałam najbardziej efektywny i allelo-specyficzny reagent, który zawierał niesparowanie w pozycji 16 (G16).

Ponieważ w przypadku genów związanych z chorobami poliQ brak jest odpowiednich SNP sprzężonych z mutacją i obejmujących dużą grupę populacji, bardziej uniwersalną i obiecującą strategią wydaje się celowanie w regiony STR różniące się długością (ok. 15-20 powtórzeń CAG w allelu normalnym i > 40 CAG w allelu zmutowanym). Jednak reagenty złożone z powtórzeń CAG/CUG wprowadzane do komórek w formie dupleksów lub wektorowych shRNA nie wykazywały allelo-selektywności działania. Poza tym obserwowaliśmy efekt niespecyficzny (tzw. off-target) w postaci aktywności nici pasażerskiej.

Równolegle z laboratorium Davida Coreya opracowaliśmy ideę wprowadzania selektywnych niesparowań w strukturę dupleksu siRNA, w ten sposób uzyskując allelo-selektywność działania. Aby zminimalizować negatywny wpływ nici pasażerskiej dupleksu siRNA, w ramach pracy pt. „*Self-duplexing CUG repeats selectively inhibit mutant huntingtin expression*” zaprojektowaliśmy i przetestowaliśmy szereg nowych reagentów, złożonych z pojedynczej nici zdolnej do tworzenia dupleksu (self-duplexing siRNA, sd-siRNA). Częsteczki te, zawierają selektywne modyfikacje sekwencji CUG (seria A i seria G), przez co przypominają cząsteczki typu miRNA. Zidentyfikowaliśmy grupę reagentów, które efektywnie i allelo-specyficznie wyciszają ekspresję zmutowanego genu *HTT* na poziomie transkryptu i białka w komórkowych modelach choroby Huntingtona.

Długotrwałe wyciszenie genu, pożądane przede wszystkim dla celów terapeutycznych, można uzyskać poprzez wewnątrzkomórkową ekspresję prekursora siRNA. W tym celu tworzone są m.in. wektory tzw. I generacji, kodujące spinki shRNA oparte na strukturze naturalnych prekursorów pre-miRNA. Sekwencja kodująca umieszczana jest w plazmidzie pod odpowiednim promotorem (głównie U6 lub H1) i może być dostarczana do komórek na drodze transfekcji bądź transdukcji przez cząstki wirusowe. Uwalniane w wyniku endogennej

ekspresji cząsteczki shRNA wchodzą w naturalny szlak biogenezy miRNA i są docinane do dojrzałych, efektorowych cząsteczek siRNA.

W ramach badań zaprojektowałam szereg konstruktów, zawierających modyfikacje ciągu CUG, stanowiącego trzon struktury shRNA powstającej z wektora plazmidowego. Konstrukty te, obejmowały również najbardziej efektywne cząsteczki sd-siRNA z serii A i G. Pętlę tych cząsteczek stanowiła sekwencja ludzkiego miRNA-23, często stosowana do konstrukcji efektywnych reagentów shRNA. Konstrukty wprowadzono do komórek fibroblastów ludzkich przy pomocy wektorów lentiwirusowych. Testowano sposób obróbki shRNA przez Dicer metodą northern-blot. shRNA składające się z powtórzeń CUG/CUG zawierają niesparowania U:U w strukturze trzonu spinki, przez co są złym substratem dla RNazy Dicer. Objawia się to niską efektywnością wyciszania docelowego transkryptu i białka huntingtyny. Lepiej „obrabiane” shRNA złożone z powtórzeń CAG/CUG wykazywały działanie w kierunku obu alleli genów *HTT* i *ATXN3* (publikacja w przygotowaniu). Wprowadzenie selektywnych modyfikacji dupleksu CAG/CUG w reagentach shRNA, analogicznie jak w przypadku syntetycznych reagentów sd-siRNA z serii A i G, zwiększyło allelo-selektywność ich działania. Nieopublikowane jeszcze wyniki wykazały, że reagenty te są efektywne i allelo-specyficzne również w przypadku innych genów, zawierających wydłużone ciągi CAG (*ATXN3* i *ATN1*) i mają potencjał uniwersalnych reagentów terapeutycznych dla chorób poliQ (międzynarodowy wniosek patentowy).

Ważnym elementem charakterystyki potencjalnych terapeutyków jest stopień ich toksyczności i możliwość wywoływania innych efektów ubocznych, takich jak np. zmiany ekspresji genów czy aktywacja odpowiedzi immunologicznej komórki [4–7]. W ostatnich latach coraz więcej wiemy na temat komórkowych sensorów obcego RNA i DNA, aktywowanych ścieżek oraz wzorców molekularnych (tzw. PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) rozpoznawanych w komórce jako zagrożenie. Niespecyficzna aktywacja komórkowego transkryptomu i proteomu przez reagenty RNAi może być przyczyną błędnej interpretacji wyników eksperymentów lub inhibicji wzrostu, podziałów komórkowych i apoptozy [8–12].

Praca nad publikacją przeglądową pt. „*Sequence-non-specific effects of RNA interference triggers and microRNA regulators*” (Nucleic Acids Res., 2010) miała na celu zapoznanie się z tą tematyką i identyfikację zagrożeń dla technologii RNAi. W pierwszym rozdziale pracy opisane jest bogactwo komórkowych białek, transkryptów i procesów, w których one uczestniczą. Na tym tle przedstawiony jest proces biogenezy mikroRNA oraz narzędzia

technologii interferencji RNA oraz mikroRNA wraz ze sposobami ich dostarczania do komórek. W następnym rozdziale opisane są znane sensory i przekaźniki sygnału aktywowane przez obcy RNA i DNA, takie jak PKR, OAS, TLR3, RIG-I czy MDA5. Poszczególne typy reagentów technologii RNAi oraz miRNA charakteryzują się różnym sposobem dostarczania i zawierają swoiste cechy struktury i sekwencji, które mogą aktywować różne ścieżki. Dlatego też w kolejnych rozdziałach opisane zostały wyniki badań dotyczące obserwowanych efektów niespecyficznego wywoływanych przez różne typy reagentów oraz metody badania tych efektów. Ważnym elementem pracy jest zaproponowanie praktycznych wskazówek, które mogą być pomocne w bezpiecznym stosowaniu technologii RNAi. Odnoszą się one m.in. do cech sekwencji, struktury, długości cząsteczek, modyfikacji chemicznych, stężenia, metod dostarczania, czy komórek docelowych. Ostatnie rozdziały pracy dotyczą zastosowania nowoczesnych metod transkryptomicznych i proteomicznych w poszukiwaniu nowych białek zaangażowanych w te procesy oraz zaproponowania perspektyw rozwoju tej dziedziny badań. Zwróciliśmy uwagę na potrzebę opracowania bazy danych zbierającej informacje na temat efektów niespecyficznego wywoływanych przez reagenty RNAi oraz na brak odpowiednich testów, uwzględniających rodzaj stosowanego reagenta czy linii komórkowej. W moich dalszych badaniach postanowiłam sprostać tym wyzwaniom i w ramach projektu pt. „*Testowanie efektów niespecyficznego wywoływanych przez reagenty technologii interferencji RNA i mikroRNA*” powstały 3 kolejne publikacje opisujące zarówno bazę danych jak również aspekty związane z testowaniem efektów ubocznych technologii RNAi.

Internetowa baza danych *RNAimmuno* (<http://rnaimmuno.ibch.poznan.pl/>) gromadzi i porządkuje informacje dotyczące efektów niespecyficznego wywoływanych w komórkach oraz modelach zwierzęcych pod wpływem obcego materiału genetycznego. W tym celu zebraliśmy ponad 150 publikacji eksperymentalnych, analizujących ww. efekty i opracowaliśmy przejrzysty system opisu danych w formie tabeli. Baza może być przeszukiwana przy pomocy wielu typów haseł: typ nośnika, reagenta, rodzaj komórek, wywoływany efekt, sekwencja, itp. („Quick search” oraz „Advanced search”). Opracowaliśmy również narzędzia umożliwiające analizę sekwencji wprowadzanych przez użytkownika pod kątem obecności elementów immunostymulujących (funkcja „simple tool” oraz „advanced tool”). Baza zawiera również informacje na temat sensorów obcego materiału genetycznego w komórkach (zakładka „Sensors”), ścieżek aktywowanych przez te białka (zakładka „Pathways”) oraz innych czynników biorących udział w odpowiedzi komórki na reagenty RNAi. Ważnym elementem bazy jest część poświęcona efektom niespecyficznym

wywoływanym przez najczęściej stosowane nośniki transfekcyjne, służące do dostarczania reagentów RNAi do komórek (zakładka „Delivery/Uptake”). Baza RNAimmuno zawiera również listę publikacji oraz najważniejszych patentów związanych z tematyką efektów niespecyficznych (zakładka „References”). Zebrane w bazie RNAimmuno informacje zostały poddane analizie i dyskutowane w publikacji pt. *“Recent Advances in Understanding of the Immunological Off-target Effects of siRNA”* (Curr Gene Ther., 2011). Analiza dużej grupy wyników (> 670 rekordów) pozwoliła m.in. na wyjaśnienie spornej kwestii wpływu długości siRNA na aktywację odpowiedzi interferonowej. Wykazaliśmy brak istotnej korelacji pomiędzy tymi parametrami, a obserwowane przez niektórych autorów efekty można wyjaśnić obecnością innych cech struktury i sekwencji siRNA, np. tępych końców [13]. Zaobserwowaliśmy ponadto, że często stosowana sekwencja pętli terminalnej używanej do konstrukcji shRNA zawiera znany z badań siRNA motyw immunostymulujący (UUCAAGAGA). Co więcej stosowane shRNA zawierają inne znane motywy immunostymulujące. Ponieważ brak jest systematycznych badań wykluczających ich efekt immunostymulujący, sugerujemy unikanie takich motywów podczas projektowania shRNA. Szczegółowa analiza wpływu chemicznych modyfikacji siRNA na efekty niespecyficzne wykazała, że modyfikacja 2'OMe, uważana dotychczas za skuteczny sposób generowania bezpiecznych siRNA nie jest wystarczająca i tak modyfikowane reagenty mogą wciąż być immunostymulujące. W pracy tej zwróciliśmy również uwagę na efekty niespecyficzne wywoływane przez nośniki transfekcyjne. Analiza danych zgromadzonych w bazie RNAimmuno wykazała, że badane cząsteczki można podzielić na dwie grupy: te, które stymulowały wszystkie badane markery oraz takie, które nie wywoływały efektu. Ta obserwacja została potwierdzona analizą statystyczną przeprowadzoną na grupie > 800 rekordów i może być wykorzystana do projektowania testów toksyczności reagentów RNAi.

Jak dotąd brak jest jednoznacznych wskazówek, co do sposobu testowania efektów niespecyficznych wywoływanych przez reagenty RNAi. Dlatego też, w ramach kolejnej pracy postanowiliśmy przeanalizować dostępne wyniki badań zgromadzone w bazach RNAimmuno oraz Geo Profiles w celu zaproponowania optymalnych markerów toksyczności reagentów RNAi (tzw. „prosty test”). Rodzaj i liczba aktywowanych genów różniły się istotnie pomiędzy eksperymentami, co może wynikać ze stosowania różnych typów komórek, nośników transfekcyjnych, czasów analizy, stężenia reagentów, itp. Stosując jednolity system eksperymentalny porównaliśmy efekty wywoływane przez syntetyczne siRNA oraz odpowiadające im wektorowe reagenty typu shRNA/sh-miR. Grupa genów (*MX1*, *IFIT1*,

IFIT2, *RIG-I*) wykazywała silną i szybką aktywację 6h po transfekcji, zanikającą po 24 h. Transkrypty te, były aktywowane głównie reagentami wektorowymi jak również plazmidami kontrolnymi. W drugiej grupie genów (*TLR3* i *IFN α 2*), aktywacja nasilała się w czasie. Transfekcja siRNAs wywoływała wzrost poziomu transkryptu *TLR3*, natomiast reagenty shRNA/sh-miRNA specyficznie indukowały ekspresję *IFN α 2*. Nie wykazaliśmy istotnej aktywacji ekspresji genów *PKR*, *IRF7*, *IFN β* i *NF κ B*, stosowanych często jako markery toksyczności reagentów RNAi.

Podsumowując, syntetyczne siRNA nie wywoływały indukcji odpowiedzi interferonowej w komórkach HeLa, a *TLR3* jest jedynym specyficznym markerem dla siRNA. Wykazaliśmy, że reagenty typu shRNA i sh-miRNA wywołują podobne efekty uboczne, a najsilniejszym induktorem odpowiedzi immunologicznej w komórkach jest plazmidowy DNA (lipopleksy). Specyficznym markerem stymulacji odpowiedzi interferonowej w komórkach HeLa przez reagenty shRNA/sh-miRNA jest *IFN α 2*. Dodatkowo wykazaliśmy, że poly(I:C) nie jest uniwersalną kontrolą pozytywną indukcji odpowiedzi interferonowej w eksperymentach wykorzystujących reagenty RNAi.

Ważnym elementem tych badań było wykazanie, że transfekcja zarówno siRNA jak i wektorowych shRNA/sh-miRNA wpływa na poziom komórkowych miRNA oraz udziały poszczególnych wariantów miRNA (izomirów). Wiele deregulowanych miRNA ma swoje sekwencje docelowe w genach związanych z biogenezą miRNA, takich jak *Dicer*, *Drosha*, *Exportyna 5* czy *Ago2*. Wykorzystując metodę sekwencjonowania nowej generacji, qRT-PCR oraz wysokorozdzielczą hybrydyzację typu northern wykazaliśmy m.in., saturację procesu biogenezy miRNA w komórkach fibroblastów ludzkich transfekowanych siRNA. Co ciekawe, reagenty wektorowe oraz plazmidy kontrolne wpływały na pojawienie się krótszych wariantów miR-221/222 w komórkach fibroblastów (izomiry 3'). Efekty te są zależne od typu komórek. Jak dotąd nie wiadomo jaki jest mechanizm powstawania takich wariantów miRNA oraz jaka jest ich funkcja. Być może jest to nowy sposób regulacji funkcjonowania komórki pod wpływem stresu.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć:

1. Opracowanie efektywnych reagentów genetycznych - shRNA, działających selektywnie na zmutowane allele w genach związanych z chorobami HD i SCA3. Są to pierwsze reagenty wektorowe, działające selektywnie na zmutowane allele poprzez celowanie w sekwencję powtórzeń - potencjalne uniwersalne terapeutyki do wykorzystania w chorobach

poliglutaminowych ("*Self-Duplexing CUG Repeats Selectively Inhibit Mutant Huntingtin Expression*" NAR, 2013; międzynarodowe zgłoszenie patentowe).

2. Opracowanie efektywnych i allelo-selektywnych reagentów siRNA naczelnianych na sekwencje SNP w genie *HD* ("*An evaluation of oligonucleotide-based therapeutic strategies for polyQ diseases*" BMC Mol Biol, 2012).

3. Stworzenie pierwszej internetowej bazy danych RNAimmuno (rnaimmuno.ibch.poznan.pl), która w prosty sposób pozwala na analizę potencjalnych zagrożeń wynikających ze stosowania reagentów technologii interferencji RNA ("*Recent Advances in Understanding of the Immunological Off-target Effects of siRNA*", Curr Gene Ther, 2011).

4. Wykazanie, że TLR3 i IFN α 2 mogą być stosowane jako specyficzne markery aktywacji odpowiedzi immunologicznej w komórkach HeLa transfekowanych odpowiednio siRNA i shRNA/sh-miRNA („*Sequence-non-specific effects generated by various types of RNA interference triggers*”. BBA Gene Regul Mech, 2016)

5. Wykazanie, że plazmidowy DNA indukuje apoptozę komórek HeLa i fibroblastów ludzkich, a co najważniejsze indukuje pojawianie się skróconych wariantów niektórych miRNA, co może być nowym mechanizmem regulatorowym komórki w warunkach stresowych.

Przyszłe plany badawcze

(częściowo realizowane w ramach projektu SONATA BIS, NCN, 2016-2021)

1. Zastosowanie wektorowych reagentów technologii RNAi, takich jak shRNA (short hairpin RNA) i sh-miR (artificial miRNA) w eksperymentalnej terapii HD i SCA3 w mysich modelach tych chorób. Zastosowanie ich w układzie *in vivo* wymaga m.in. opracowania sposobu dostarczania, wyboru miejsca docelowego, zbadania skuteczności i bezpieczeństwa.

2. Wykorzystanie najnowocześniejszych narzędzi genetycznych tzw. nukleaz CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9) do skrócenia zmutowanych ciągów powtórzeń CAG w genach *HTT* i *ATXN3* w komórkowych modelach chorób HD i SCA3. Technologia CRISPR/Cas9 jest obecnie jedną z najbardziej rozwijanych i obiecujących metod edycji genomu i jak dotąd nie została wykorzystana do edycji genów związanych z chorobami poliQ.

3. Badanie biogenezy i funkcji nowych wariantów izomirów w warunkach stresu komórkowego.

5. Omówienie pozostałego dorobku

W skład pozostałego dorobku naukowego wchodzi 11 publikacji. Prace te powstały w latach 2005-2015 i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR, specjalizujących się w tematyce biologii molekularnej. Szczegółowa informacja na temat mojego wkładu w powstanie tych prac znajduje się w załączniku nr 3.

lp	Autorzy	Tytuł, czasopismo	IF ₅
1	Galka-Marciniak P, Olejniczak M , Starega-Roslan J, Szcześniak M, Makalowska I, Krzyzosiak W	“siRNA release from pri-miRNA scaffolds is controlled by the sequence and structure of RNA” BBA Gene Regul Mech. 2016	5,661
2	Olejniczak M* , Urbanek MU, Krzyzosiak WJ* *co-corresponding	“The Role of the Immune System in Triplet Repeat Expansion Diseases” Mediators Inflamm. 2015; 873860	3,522
3	Urbanek MU, Galka-Marciniak P, Olejniczak M , Krzyzosiak WJ	“RNA imaging in living cells - methods and applications”. RNA Biol, 2014, 3;11(8):1083-95	5,237
4	Wojciechowska M*, Olejniczak M* , Galka-Marciniak P*, Jazurek M*, Krzyzosiak WJ *co-first authors	“RAN translation and frameshifting as translational challenges at simple repeats of human neurodegenerative disorders” Nucleic Acids Res 2014, 29;42(19):11849-64	8,867
5	Koscianska E, Starega-Roslan J, Sznajder LJ, Olejniczak M , Galka-Marciniak P, Krzyzosiak WJ.	„Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers”. BMC Mol Biol 2011, 12:14	3,289
6	Sobczak K, Michlewski G, de Mezer M, Kierzek E, Krol J, Olejniczak M , Kierzek R, Krzyzosiak WJ	“Structural diversity of triplet repeat RNAs.” J Biol Chem., 2010; 285:12755-64	4,693
7	Zielonka D.; Niezgoda A.; Olejniczak M. ; Krzyzosiak W, Marcinkowski J, Kozubski W	“Gender Differences in the CAG Repeats and Clinical Picture Correlations in Huntington's Disease” Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie 2008; 71: 688-694	0,2
8	Rozanska M, Sobczak K, Jasinska A, Napierala M, Kaczynska D, Czerny A, Koziel M, Kozlowski P, Olejniczak M , Krzyzosiak WJ.	"CAG and CTG repeat polymorphism in exons of human genes shows distinct features at the expandable loci." Hum Mutat. 2007, 28:451-8.	5,119
9	Olejniczak M , Krzyzosiak WJ.	"Genotyping of simple sequence repeats--factors implicated in shadow band generation revisited." Electrophoresis, 2006, 27:3724-34	2,723
10	Olejniczak M , Kozlowski P, Sobczak K, Krzyzosiak WJ	"Accurate and sensitive analysis of triplet repeat expansions by capillary electrophoresis." Electrophoresis, 2005, 26:2198-207	2,723
11	Kozlowski P, Olejniczak M , Krzyzosiak WJ	"Rapid heteroduplex analysis by capillary electrophoresis." Clin Chim Acta, 2005, 353: 209-14.	2,772

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

- [1] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*. 411 (2001) 1–5. doi:10.1038/35078107.
- [2] P.J. Paddison, A.A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, D.S. Conklin, Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells, *Genes Dev*. 16 (2002) 948–958. doi:10.1101/gad.981002.
- [3] Y. Zeng, E.J. Wagner, B.R. Cullen, Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells, *Mol. Cell*. 9 (2002) 1327–1333. doi:10.1016/S1097-2765(02)00541-5.
- [4] M.P. Gantier, B.R.G. Williams, The response of mammalian cells to double-stranded RNA, *Cytokine Growth Factor Rev*. 18 (2007) 363–371. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.06.016.
- [5] M. Sioud, RNA interference and innate immunity, *Adv. Drug Deliv. Rev*. 59 (2007) 153–163. doi:10.1016/j.addr.2007.03.006.
- [6] C.A. Sledz, M. Holko, M.J. de Veer, R.H. Silverman, B.R.G. Williams, Activation of the interferon system by short-interfering RNAs., *Nat. Cell Biol*. 5 (2003) 834–839. doi:10.1038/ncb1038.
- [7] A.J. Bridge, S. Pebernard, A. Ducraux, A.-L. Nicoulaz, R. Iggo, Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells., *Nat. Genet*. 34 (2003) 263–264. doi:10.1038/ng1173.
- [8] M.E. Kleinman, H. Kaneko, W.G. Cho, S. Dridi, B.J. Fowler, A.D. Blandford, et al., Short-interfering RNAs Induce Retinal Degeneration via TLR3 and IRF3, *Mol. Ther*. 20 (2012) 101–108. doi:10.1038/mt.2011.212.
- [9] M.E. Kleinman, K. Yamada, A. Takeda, V. Chandrasekaran, M. Nozaki, J.Z. Baffi, et al., Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3., *Nature*. 452 (2008) 591–597. doi:10.1038/nature06765.
- [10] D. Grimm, K.L. Streetz, C.L. Jopling, T.A. Storm, K. Pandey, C.R. Davis, et al., Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways., *Nature*. 441 (2006) 537–541. doi:10.1038/nature04791.
- [11] X. hai Liang, C.E. Hart, S.T. Crooke, Transfection of siRNAs can alter miRNA levels and trigger non-specific protein degradation in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech*. 1829 (2013) 455–468. doi:10.1016/j.bbagr.2013.01.011.
- [12] M. Robbins, A. Judge, E. Ambegia, C. Choi, E. Yaworski, L. Palmer, et al., Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation., *Hum. Gene Ther*. 19 (2008) 991–999. doi:10.1089/hum.2008.131.

- [13] A. Reynolds, E.M. Anderson, A. Vermeulen, Y. Fedorov, K. Robinson, D. Leake, et al., Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent., *RNA*. 12 (2006) 988–993. doi:10.1261/rna.2340906.

Marko Ajmich