

Zależność biogenezy cząsteczki miR-21 od dojrzewania jej prekursorów na poziomie alternatywnego splicingu oraz poliadenylacji

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) stanowią ważny element regulatorowy utrzymujący homeostazę w organizmach żywych. Te krótkie (20-22 nukleotydów), niekodujące RNA regulują poziom ekspresji niemal wszystkich genów kodujących białka, na drodze interferencji RNA. Na dzień dzisiejszy zidentyfikowanych jest blisko 2000 ludzkich miRNA. Jednym z lepiej poznanych jest miR-21. Cząsteczka ta od lat stanowi obiekt badań pod kątem jej roli w procesie rozwoju zwierząt, jak również w patogenezie chorób takich jak nowotwory. Pomimo dość dobrze opisanych szlaków w których zaangażowany jest miR-21, nadal słabo poznane są mechanizmy kontrolujące proces jego biogenezy. Alternatywny splicing (AS) oraz alternatywna poliadenylacja (APA) pierwotnych transkryptów są niezwykle ważnymi mechanizmami w regulacji ekspresji większości genów kodujących białka. Procesy te zachodzą podczas transkrypcji i są ze sobą ściśle związane i wzajemnie na siebie wpływają. Na dzień dzisiejszy niewiele prac badawczych skupiało się na udziale tych procesów w regulacji ekspresji genów miRNA.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie zaangażowania AS oraz APA w proces biogenezy miR-21. Podczas pierwszego etapu badań wykazano, że pierwotny transkrypt *pri-miR-21* powstaje niezależnie od pre-mRNA swojego genu-gospodarza *VMP1* i może podlegać charakterystycznym dla pre-mRNA *VMP1* procesom składania. W pracy, dzięki analizie danych z sekwencjonowania RNA, określono dużą zmienność w poziomie ekspresji *pri-miR-21* w różnych ludzkich tkankach. Wyniki te wskazują na obecność precyzyjnych mechanizmów, bezpośrednio regulujących transkrypcję *pri-miR-21*, ale również sugerują zachodzenie wariantywnego splicingu tego prekursorowego RNA, co przypuszczalnie przekłada się na zróżnicowany poziom ich ekspresji w ludzkich tkankach.

Wykorzystując model komórkowy ze znacznie ograniczonym tempem przetwarzania transkryptów pri-miRNA scharakteryzowano rozmaite izoformy *pri-miR-21* w tym izoformy z retencją intronu 11. Dodatkowo poprzez zastosowanie blokera oligonukleotydowego wiążącego się do określonych sekwencji RNA lub poprzez mutację tego miejsca w konstrukcie genetycznym wykazano, że aktywność alternatywnych sygnałów poliadenylacji (APAS) występujących w 3'UTR *VMP1*, ma wpływ na efektywność biogenezy miR-21. Na podstawie przeprowadzonych analiz można wnioskować, że powstawanie kilku różnych izoform

pri-miR-21 odgrywać może ważną rolę w procesie biogenezy miR-21. Dodatkowo badania wykazały bezpośredni wpływ PAS zlokalizowanego przed sekwencją kodującą miR-21 na ilość dojrzałej cząsteczki miR-21.

Uwzględniając obecność powszechnej izoformy *pri-miR-21* z retencją intronu, w ostatnim etapie pracy postanowiono sprawdzić zależność efektywności biogenezy miR-21 od splicingu *pri-miR-21*. Poprzez zablokowanie lub mutagenizację miejsca składania RNA zlokalizowanego po stronie 3' doprowadzono do zaburzenia splicingu *pri-miR-21* oraz zaobserwowano istotny wzrost poziomu tej cząsteczki RNA, co przełożyło się na zwiększenie liczby dojrzałych cząsteczek miR-21. Uzyskane wyniki dowodzą, że obecność izoformy z retencją intronu poprzez bezpośredni wpływ na aktywność miejsca 3' splicingu w 11 intronie *VMP1*, pozytywnie wpływa na biogenezę miR-21.

Uzyskane w pracy wyniki przyczynią się do lepszego zrozumienia mechanizmów, jakie zaangażowane mogą być w regulację poziomu cząsteczki miR-21. Opisywane w pracy zależności stanowią solidną podstawę do twierdzenia, że w globalne zmiany ilości cząsteczek miRNA zaangażowane są liczne mechanizmy po- i ko-transkrypcyjne. Taka wiedza może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów prawidłowej regulacji ekspresji genów miRNA, ale również patomechanizmów wielu chorób oraz w dalszej kolejności do opracowania potencjalnych strategii terapeutycznych, w tym terapii celujących w dojrzewanie prekursorowych *pri-miRNA* lub biogenezę miRNA.

Słowa kluczowe: miR-21, *pri-miR-21*, alternatywna poliadenylacja, alternatywny splicing, *VMP1*, biogeneza miRNA