

ROZSTRZYGNIĘCIE KONKURSU POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO I FIRMY MERCK SP. Z O.O. NA NAJLEPSZĄ PRACĘ DOKTORSKĄ Z BIOCHEMII W 2008 ROKU

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na podstawie opinii komisji w składzie: prof. Edward Bańkowski, prof. Grzegorz Bartosz, dr Karina Błachnio (Merck), prof. Adam Dubin, prof. Jacek Kuźnicki, prof. Tomasz Twardowski, prof. Sławomir Pikuła (przewodniczący) ogłasza, że wśród zgłoszonych na konkurs prac doktorskich nagrodę w wysokości 4 500 zł otrzymała **Pani dr Katarzyna Kubiak** za pracę doktorską p.t. „Modulacja zdolności krótkich interferujących RNA do wyciszenia ekspresji genów” wykonaną w Zakładzie Chemii Bioorganicznej i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Nawrot. Wręczenie nagrody odbyło się 16.09.2009 r. podczas uroczystości inauguracji XXX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi.

SYLWETKA KATARZYNY KUBIAK



Katarzyna Kubiak (z d. Sipa) ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w 2003 roku, uzyskując dyplom magistra inżyniera o specjalności biotechnologia molekularna i biochemia techniczna. Już od etapu pracy dyplomowej („Konstrukcja i zastosowanie plazmidów kodujących krótkie, interferujące RNA skierowane na mRNA białka BACE”) pracowała w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, w zespole prowadzo-

nym przez prof. dr hab. Barbarę Nawrot, późniejszą promotorkę pracy doktorskiej. W Centrum Katarzyna Kubiak ukończyła również studium doktoranckie. W latach 2003–2008 brała udział w realizacji trzech projektów badawczych (Grant ICGEB CPR/04/20, projekt Dwustronny Polsko-Włoski z zespołem prof. Sandro Sorbi oraz projekt zamawiany MNIł 059/T09/09), dotyczących konstrukcji różnorodnych krótkich cząsteczek kwasów nukleinowych, obniżających ekspresję genu białka BACE1 (ang. *β-site APP Cleaving Enzyme*). W 2006 roku Katarzyna Kubiak została laureatką VI edycji konkursu L'Oréal Polska dla kobiet i nauki przy wsparciu polskiego komitetu UNESCO i otrzymywała roczne stypendium doktoranckie.

Publiczna obrona jej rozprawy doktorskiej odbyła się 1 lipca 2008 r. Na wniosek obydwu recenzentów, którymi byli prof. dr hab. Czesław Cierniewski (Uniwersytet Medyczny, Łódź) i prof. dr hab. Leszek Kaczmarek (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa), praca doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN.

Katarzyna Kubiak jest współautorką 5 publikacji oryginalnych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz 4 artykułów przeglądowych (w tym jednego w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym). Publikacja, w której dr Kubiak jest pierwszą autorką (RNA, 2007, 13: 1–16) została wyróżniona przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne w zeszłym roku, jako najlepsza praca w dziedzinie kwasów nukleinowych powstała w polskim laboratorium.

Od lipca 2008 dr Kubiak pracuje w zespole prof. dr hab. inż. Stanisława Bieleckiego w Instytucie Biochemii Technicznej Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódz-

kiej, w którym jest odpowiedzialna za badania w obszarze biologii molekularnej bakterii *Gluconacetobacter xylinus*. Ze względu na jej wcześniejsze doświadczenie, zainteresowania badawcze dr Kubiak skupione są wokół bakteryjnych regulatorów RNA (*short RNA*, sRNA) i ich udziału w procesie tworzenia biofilmów przez mikroorganizmy.

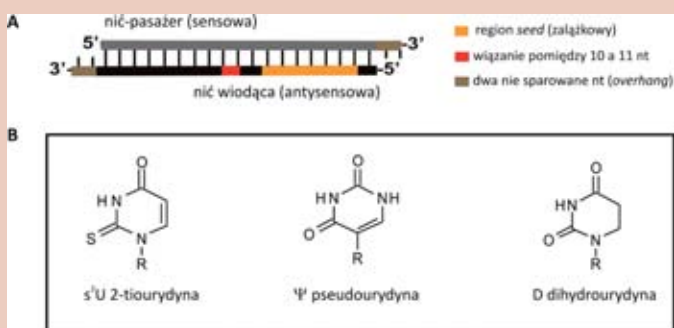
Modulacja zdolności krótkich interferujących RNA do wyciszenia ekspresji genów

STRESZCZENIE PRACY

Katarzyna Kubiak✉

✉Instytut Biochemii Technicznej, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej, ul Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; e-mail: katarzyna.kubiak@p.lodz.pl

Wyciszenie genów, których produkty są zidentyfikowanymi celami terapeutycznymi, jest jedną ze strategii rozwijaną w ramach szeroko pojętej terapii genowej. Pomysł obniżania ekspresji na poziomie potranskrypcyjnym za pomocą tzw. oligonukleotydów antysensowych narodził się w latach osiemdziesiątych XX wieku. Do pionierskich badań w tym obszarze należy także dorobek Zakładu Chemii Bioorganicznej CBMiM PAN w Łodzi. Kilkanaście lat badań nad rozwojem metod chemicznej syntezy i modyfikacji kwasów nukleinowych w celu nadania im pożądanых cech, zakończyło się wprowadzeniem na rynek farmaceutyczny dwóch leków oligonukleotydowych. Ponad 10 lat temu nastąpił przełom na drodze do wykorzystania kwasów nukleinowych w medycynie dzięki odkryciu zjawiska interferencji RNA (RNAi) [1]. W przeciągu ostatnich kilku lat dokonano ogromnego postępu w zrozumieniu roli, jaką spełniają małe RNA w rozmaitych procesach regu-



Rycina 1. A. Schemat budowy dupleksów siRNA (także stosowanych w niniejszej pracy); B. Struktura modyfikowanych zasad azotowych, wprowadzanych do siRNA, badanych w ramach omawianego projektu. R = reszta rybozy. Przedstawione symbole modyfikowanych zasad są także używane w tekście.

lacji ekspresji genów we wszystkich organizmach żywych. Krótkie interferujące RNA (ang. *short interfering RNA*, siRNA, Ryc. 1A), dupleksy pełniące centralną funkcję w mechanizmie RNAi, są obecnie narzędziem powszechnie używanym do badań funkcji genów organizmów eukariotycznych (zarówno zwierząt jak i roślin). Mechanizm wyciszenia jest już powszechnie znany i polega na tworzeniu nukleoproteinowego kompleksu RISC (ang. *RNA induced silencing complex*), w którego skład wchodzi jedna z nici dupleksu siRNA (tzw. nić wiodąca, ang. *guide strand*) służąca jako sonda do odnalezienia komplementarnej sekwencji w cząsteczce mRNA. Po związaniu z docelowym transkryptem kompleks RISC katalizuje hydrolizę jednego wiązania fosfodiesterowego w obrębie rozpoznawanej sekwencji, znajdującego się dokładnie w centrum dupleksu, utworzonego przez mRNA z nicią wiodącą siRNA. Powstające w ten sposób dwa fragmenty mRNA, pozbawione na nowoutworzonych końcach ochronnych sekwencji (cap'u i ogona poliadenylogowego) zostają uwolnione z kompleksu RISC (który katalizuje kolejne reakcje ukierunkowanej nukleolizy) i zdegradowane przez egzozom. W efekcie uruchomienia szlaku RNAi następuje zatem wyciszenie ekspresji genu na poziomie potranskrypcyjnym. Mechanizm ten może być wywołany przez siRNA dostarczane z zewnątrz komórki, ponieważ w organizmach wyższych funkcjonuje podobny do RNAi mechanizm kontroli ekspresji genów, angażujący te same składniki białkowe, ale oparty o regulatorowe RNA kodowane w genomie, tzw. mikro RNA. Pełne zrozumienie roli tych

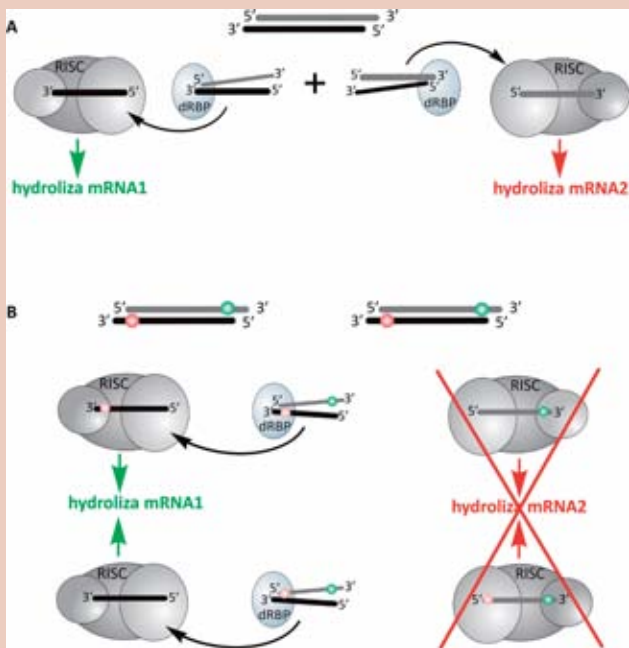
czynnego punktu widzenia spowodowały istotny postęp w obszarze ich przyszłego wykorzystania w medycynie. Dzięki wiedzy o chemii i termodynamice kwasów nukleinowych, zdobytej podczas rozwoju strategii antysensowej, ograniczenia związane z niską trwałością tych biomolekuł w żywym organizmie zostały w znacznym stopniu przezwyciężone. W ciągu ostatnich kilkunastu lat pojawiły się także bardzo interesujące możliwości wydajnego dostarczenia tych związków do komórek. Znane są rozwiązania, zapewniające transport tkankowo-specyficzny a nawet przekroczenie bariery krew-mózg [2]. Jednakże ciągle palącym problemem pozostaje kwestia zmniejszenia skutków ubocznych, wywoływanych przez krótkie interferujące RNA. Źródłem tych niepożądanych efektów są zarówno stymulacja systemu immunologicznego [3], jak i niespecyficzne wyciszenia (tzw. *off-target silencing*) [4]. Przyczyn powstawania tych niezaplanowanych zmian ekspresji wielu genów na skutek podania siRNA może być kilka. Przede wszystkim, w niektórych przypadkach wystarczy komplementarność tylko części regionu *seed* (nukleotydy w pozycjach 2-8, Ryc. 1A) nici wiodącej dupleksu siRNA aby wywołać degradację mRNA. Znalezienie unikalnej sekwencji o długości 7 nt w genomie człowieka jest praktycznie niemożliwe. Inną istotną przyczyną efektów ubocznych wywoływanych przez siRNA jest włączanie do efektorowego kompleksu RISC nici sensowej siRNA (zwanej też nicią-pasażerem, komplementarnej do oryginalnie zaprojektowanej, jako nić wiodąca). Sytuacji tej może w pewnym stopniu zapobiegać dobieranie sekwencji siRNA

cząstek potrawa zapewne jeszcze wiele lat, jednak już dziś trwają próby ingerencji w poziom ekspresji genów, będących uznanymi celami terapeutycznymi, z zastosowaniem dupleksów siRNA.

Intensywne prace nad nadaniem tym cząsteczkom cech pożądanых z farmakokine-

w sposób gwarantujący ich tzw. termodynamiczną asymetryczność, czyli lokalizując słabsze wiązania typu Watsona-Cricka w pobliżu 5'-końca nici projektowanej jako wiodąca [5]. Jednak wybieranie układu nukleotydów w nici siRNA jest ograniczone przez warunek jej komplementarności tylko do jednego mRNA. Przesunięcia w obrębie wybranej sekwencji docelowej nie są możliwe, zwłaszcza w przypadku allelo-specyficznych siRNA. Kolejną przyczyną powstawania efektów ubocznych, po wywołaniu interferencji RNA w organizmach ssaków, jest ryzyko wysycenia enzymów uczestniczących w procesie regulacji ekspresji genów na drodze mikro RNA. Zbyt duże zaangażowanie takich białek jak np. eksportyna 5 w transport „obcych” shRNA, może spowodować zakłócenie szlaków propagacji naturalnych pre-miRNA. Regulatorowe RNA są zaangażowane w wiele podstawowych procesów komórkowych, zatem zaburzenie ich działania prowadzi do bardzo poważnych, negatywnych skutków w całym organizmie. Ponieważ zakres niepożądanych efektów, niezależnie od ich źródła, koreluje w znacznym stopniu ze wzrostem zastosowanego stężenia siRNA [6], przezwyciężenie omówionego problemu powinno być osiągalne poprzez udoskonalanie tych cząstek (np. na drodze modyfikacji chemicznych) w taki sposób, aby osiągnąć wysoką skuteczność działania przy minimalnej dawce.

Głównym celem badań podjętych w ramach pracy doktorskiej było poszukiwanie modyfikacji, prowadzących do zwiększenia potencjału wyciszającego siRNA. Jako obiekt zainteresowań wybrano modyfikowane zasady azotowe, występujące w funkcjonalnych cząsteczkach RNA, takich jak tRNA. Były nimi trzy nukleozydy: 2-tiourydyna (s^2U), pseudourydyna (Ψ) i dihydrourydyna (D), których wzory strukturalne przedstawiono na Ryc. 1B. Wszystkie oligoribonukleotydy składowe do badanych dupleksów siRNA syntetyzowano w ZChB CBMiM PAN i oczyszczono stosując procedurę odblokowania ORN i oddzielenia krótszych produktów syntezy, opracowaną w ramach niniejszej rozprawy (amidofosforyny s^2U i D otrzymano z laboratorium prof. dr hab. E. Sochackiej z Wydzia-



Rycina 2. Schemat predefiniowania nici wiodącej siRNA zastosowanego w rozprawie doktorskiej. **A.** W przypadku niemodyfikowanych siRNA istnieje ryzyko włączenia do kompleksu RISC obu nici dupletu; **B.** Wprowadzenie modyfikacji na końcu siRNA indukuje asymetrię termodynamiczną dupletów, co definiuje nić wiodącą – degradacji ulega tylko mRNA zaprojektowane jako docelowe. Symbole na duplesie siRNA: czerwona kulka = modyfikacja stabilizująca dupleks (np. s²U); zielona kulka = modyfikacja destabilizująca dupleks (np. D).

łu Chemicznego PŁ). Pierwsze dwa z wymienionych analogów urydyny (s²U i Ψ) mają właściwości wzmacniające trwałość struktury dwuniciowej RNA, a ostatnia (D) przeciwnie – występuje w obszarach jednoniciowych. Rozprawa doktorska zawiera pełną charakterystykę wpływu tych modyfikacji na strukturę i aktywność siRNA, zawierających badane nukleozydy w centrum i na końcach dupletów. Badania termodynamiczne (widma dichroizmu kołowego, krzywe mięknienia i wyznaczone z nich parametry termodynamiczne) pozwoliły udowodnić silny wpływ pojedynczych modyfikacji zasad na strukturę i stabilność siRNA. Zgodnie z oczekiwaniami 2-tio-urydyna wpływała wyraźnie stabilizująco na strukturę typu A dupletów, nawet, gdy w jej sąsiedztwie występowała silnie destabilizująca para wahadłowa (G : U) [7].

Najważniejszym osiągnięciem tej części rozprawy było znalezienie możliwości zwiększenia aktywności cząsteczek siRNA (niezależnie od ich sekwencji docelowej) poprzez predefiniowanie jednej z nici dupletu jako wiodącej (Ryc. 2). Efekt ten osiągnięto

po wprowadzeniu jednostki dihydrourydyny (D) na końcu 5' dupletu (zgodnie z orientacją nici wiodącej) oraz reszty 2-tiourydyny (s²U) na końcu przeciwnego (Ryc. 3) [7]. Badania aktywności wyciszającej wszystkich otrzymanych dupletów siRNA przeprowadzono w opracowanym do tego celu układzie modelowym w komórkach HeLa. Był on oparty o przebiegi ekspresji białek fluorescencyjnych, z których jedno pełniło funkcję wewnętrznej kontroli wydajności transfekcji (RFP, *red fluorescence protein*) a mRNA drugiego było docelowym dla badanych cząsteczek siRNA (GFP lub BACE1) [7]. Tu prezentowany jest przykład analizy aktywności serii siRNA

SYM, którego sekwencja (skierowana na mRNA białka BACE1) została dobrana w taki sposób, aby na końcach znajdowały się pary zasad tworzące tę samą liczbę wiązań wodorowych (Ryc. 3A). Modyfikację destabilizującą strukturę dupletu (dihydrourydynę) wprowadzono w pozycję 20 nici sensowej, natomiast 1, 2 lub 3 jednostki 2-tio-urydyny (stabilizującej dupleks) w pobliżu końca 3' nici wiodącej (Ryc. 3A). Obecność już pojedynczych modyfikowanych zasad nukleinowych (duplety: s_s2U2_D20/a i s_D20/a_s2U20) spowodowało dwukrotny wzrost aktywności (obniżenie do 20% wyjściowej ekspresji genu docelowego) w porównaniu do

dupletu niemodyfikowanego (40%) (Ryc. 3B).

Otrzymane wyniki aktywności siRNA potwierdzono dla 3 różnych sekwencji docelowych w przypadku każdej z serii modyfikowanych dupletów. Pozwoliło to na sformułowanie ogólnych wniosków na temat zależności pomiędzy strukturą końców dupletów a ich aktywnością. Decydujący wpływ na asymetrię, a co za tym idzie, zdolność wyciszającą siRNA, mają siły wiązań tworzonej jedynie przez dwie skrajne pary zasad w duplesie. Warty podkreślenia jest fakt, że badane modyfikowane zasady azotowe występują naturalnie w komórkach ludzkich, zatem proponowane zmiany w składzie chemicznym siRNA nie powodują zwiększenia toksyczności tych potencjalnych terapeutów (co potwierdziły przeprowadzone testy cytotoxycznosci) [7]. Ponadto, w trakcie realizacji niniejszego projektu ukazały się publikacje dokumentujące brak stymulacji receptorów TLR (ang. *Toll like receptor*) przez cząsteczki RNA, zawierające modyfikowane zasady azotowe (m.in. s²U) [8]. Receptory TLR są odpowiedzialne za indukcję odpowiedzi immunologicznej organizmu po podaniu dupletów siRNA. Zatem proponowane modyfikacje siRNA mogą ograniczać wywoływane



Rycina 3. A. Sekwencja siRNA SYM. Wytluszczonym drukiem zaznaczono 3'- i 5'-końcowe pary Watsona-Cricka, które tworzą taką samą liczbę wiązań wodorowych. Podkreślono miejsca wprowadzania modyfikacji: kolorem zielonym oznaczono pozycje dihydrourydyny, czerwonym – 2-tiourydyn. **B.** Aktywność siRNA SYM, modyfikowanych na końcach dupletów. Wykres względnej poziomu ekspresji białka BACE-GFP w komórkach HeLa transfekowanych plazmidami pBACE-EGFP i pDsRed2-N1 oraz siRNA wyróżnionymi na wykresie (w stężeniu 1 nM). Słupki błędów odpowiadają odchyleniom standardowym wyników z co najmniej 3 niezależnych doświadczeń. Na palnety z prawej strony – schematyczne przedstawienie pozycji wprowadzonych modyfikacji.

przez nie efekty uboczne zarówno dzięki definiowaniu nici wiodącej, zwiększeniu ich potencjału wyciszającego, jak i prawdopodobnie poprzez ograniczenie odpowiedzi odpornościowej organizmu.

PIŚMIENNICTWO

1. Fire A, Xu SiQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-813
2. Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung K-E, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. Nature 448: 39
3. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I (2005) Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. Nat Biotechnol 23: 457-462
4. Jackson AL, Linsley PS (2004) Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? Trends Genet 20: 521-524
5. Kvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell 115: 209-216
6. Persengiev SP, Zhu X, Green MR (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). RNA 10: 12-18
7. Sipa K, Sochacka E, Kaźmierczak-Barańska J, Maszewska M, Janicka M, Nowak G, Nawrot B (2007) Effect of base modifications on structure, thermodynamic stability, and gene silencing activity of short interfering RNA. RNA 13: 1301-1316
8. Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D (2005) Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. Immunity 23: 165-175