**Тезисы для Международной конференции «Геномный анализ и генетическая модификация клеток»**

Роман Суворов, Дарья Губани, Мария Райгородская, Диана Мальцева

Факультет биологии и биотехнологии, НИУ ВШЭ

«Детекция изоформ микроРНК, образующихся при shRNA-опосредованной сверхэкспрессии»

Сверхэкспрессия молекул микроРНК с помощью трансдукции лентивирусными частицами, кодирующими shRNA, широко применяется для исследования функций микроРНК. В частности, данный способ является практически единственной возможностью для стабильной сверхэкспрессии микроРНК, закодированных в геноме в составе кластера, например, микроРНК-93-5p из кластера микроРНК-106b-25. В рамках такого подхода целевая микроРНК кодируется в 3p-плечо shRNA, поэтому вариации процессинга shRNA РНКазой Dicer в клетке могут приводить к образованию микроРНК с измененным 5’-концов (5’-изоформам микроРНК, 5’-изомикроРНК), а значит с измененным seed-регионом. Важно отметить, что изменение seed-региона микроРНК приводит к изменению набора ее мРНК-мишеней.

Одной из особенностей shRNA-опосредованной сверхэкспрессии является добавление РНК-полимеразой III (Pol III) нескольких урацилов на 3’-конец shRNA-транскрипта в процессе распознавания сигнала терминации (мотива из пяти Т-нуклеотидов). Наличие двух выступающих нуклеотидов на 3’-конце shRNA необходимо для ее распознавания и последующего процессинга Dicer. Однако shRNA, содержащие три и более выступающих нуклеотидов на 3’-конце, по-видимому, являются не оптимальными субстратами для Dicer и могут подвергаться альтернативному процессингу.

В настоящей работе клетки линии рака простаты DU145 были трансдуцированы лентивирусными частицами, кодирующими одну из трех shRNA для сверхэкспрессии микроРНК-93-5p. Использовавшиеся конструкции shRNA отличаются последовательностью петли, что, как ожидалось, способно влиять на эффективность процессинга shRNA. Выбранные последовательности петель или были взяты из литературы как показавшие свою эффективность, или ранее использовались нами в других экспериментах.

Проведенное секвенирование микроРНК показало значительную сверхэкспрессию изоформ микроРНК-93-5p в трансдуцированных линиях. Однако среди сверхэкспрессированных были преимущественно изоформы, которые имеют измененный 5’-конец, а также содержат дополнительные два-четыре урацила на 3’-конце микроРНК.

В то же время, ПЦР-РВ оказалось нечувствительной к образованию 5’-изомиРНК. Однако наличие дополнительных урацилов на 3’-конце изомиРНК приводило к значительному снижению эффективности ПЦР.

Таким образом, наличие трех и более урацилов на 3’-конце shRNA, по-видимому, действительно приводит к смещению положения разрезания shRNA ферментом Dicer. Подтверждение сверхэкспрессии микроРНК необходимо проводить с помощью микроРНК секвенирования, ПЦР-РВ не позволяет обнаружить образование 5’-изомиРНК.