

### **Sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA, cząsteczka RNA oraz jej zastosowanie**

Przedmiotem wynalazku jest sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA, zwłaszcza w cząsteczki mRNA, z puli cząsteczek RNA, cząsteczka RNA wyselekcjonowana i/lub wzbogacona tym sposobem jak również jej zastosowanie.

Nowy sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA według wynalazku znajduje zastosowanie w analizach molekularnych, sekwencjonowaniu i diagnostyce. Selekcja i wzbogacanie RNA mogą zostać wykorzystane, na przykład, do przygotowywania bibliotek do wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA (RNA-Seq) lub do wzbogacania materiału RNA do detekcji w testach diagnostycznych opartych o RNA patogenu.

W przybliżeniu 80% całkowitego RNA w komórkach eukariotycznych stanowi rRNA, kolejne 15% stanowi tRNA. W komórkach prokariotycznych rRNA i tRNA stanowią > 97% całkowitego RNA. W obu przypadkach, cząsteczki mRNA i innych niekodujących RNA stanowią mniej niż 5% całkowitego RNA.

Analizy molekularne, takie jak na przykład wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA czy analizy diagnostyczne oparte na kwasach nukleinowych, w których obiektem badania jest wyłącznie część transkryptomu kodująca białka, wymagają zatem wzbogacenia próby całkowitego RNA w cząsteczki informacyjnego RNA (mRNA). Etap wzbogacenia próby RNA w mRNA jest kluczowy dla efektywności analiz molekularnych.

Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA, RNA-Seq, jest obecnie jedną z głównych metod badania transkryptomów, w tym analizy ekspresji genów, badania alternatywnego składania mRNA oraz modyfikacji potranskrypcyjnych. Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania RNA-Seq, w szczególności do sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *Next Generation Sequencing*), dostosowane jest natomiast do tego jaka część transkryptomu ma zostać poddana analizie. W przypadku gdy badaniu podlega wyłącznie część transkryptomu kodująca białka, próba całkowitego RNA powinna zostać poddana selekcji w celu usunięcia wysokokopijnych RNA (rRNA i tRNA). Etap ten jest niezbędny aby uzyskać dobrej jakości wynik sekwencjonowania.

Do znanych metod wzbogacania próby RNA w sekwencje kodujące należy, między innymi, usuwanie rRNA przy pomocy komercyjnych zestawów, takich jak na przykład RiboMinus™ (ThermoFisher Scientific, Invitrogen), które wykorzystują specyficzne gatunkowo sondy do

selektywnego wychwytu sekwencji rybosomalnego RNA. Do usuwania rRNA stosowane są również inne zestawy dostępne komercyjnie, takie jak NEBNext® rRNA Depletion Kit (New England Biolabs) czy Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits (Epicenter, Illumina). Zestawy te posiadają jednak swoje ograniczenia. Na przykład, zestawy RiboMinus (Invitrogen) zawierają sondy LNA (LNA, ang. *Locked Nucleic Acid*) zaprojektowane tak aby selektywnie i wydajnie usuwać rRNA docelowego organizmu. Popularne zestawy komercyjne oferują sondy kompatybilne z RNA izolowanym z komórek człowieka, myszy, szczura, drożdży i bakterii. O ile mogą być one stosowane dla prób całkowitego RNA izolowanych z innych organizmów niż te, do których dedykowany jest dany zestaw, o tyle wydajność deplecji rRNA jest wówczas znacznie obniżona. Pozbycie się rRNA z prób izolowanych z organizmów, które nie są modelowe, jest zatem trudne, długotrwałe i kosztowne, gdyż wymaga przeprowadzenia kilku następujących po sobie rund deplecji. W literaturze naukowej opisano między innymi znaczące różnice w efektywności deplecji rRNA w zależności od tego, który z dedykowanych komercyjnych zestawów został wykorzystany (w bibliotece pozostawało od 0,5% do 75% sekwencji mapujących do rRNA, Petrova et al. (2017), *Scientific Reports*, 7(41114)).

Poza powyższymi metodami, usuwanie rRNA i tRNA prowadzi się przy pomocy egzorybonukleaz, jak na przykład egzozonukleazy *Terminator™ 5'-Phosphate Dependent Exonuclease*, która selektywnie degradowuje cząsteczki z grupą monofosforanową na końcu 5' lub przy pomocy RNazy H i oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji rRNA.

Niektóre z obecnie stosowanych metod selekcji RNA bazują na fakcie, że cząsteczki mRNA mogą posiadać różnego rodzaju modyfikacje na końcu 3' i na końcu 5'. W przypadku mRNA organizmów eukariotycznych, większość cząsteczek mRNA jest poliadenylowana przez dodanie serii adenozyn do końca 3' (ogon poliA). Charakterystyczną modyfikacją końca 5' mRNA u organizmów eukariotycznych jest natomiast obecność tzw. kapu (czapeczki), tj. zmodyfikowanego nukleozydu, 7-metyloguanozyny, 5' m7G, przyłączonego wiązaniem 5'-5' trójfosforanowym do pierwszego nukleotydu cząsteczki RNA na końcu 5'. W zależności od pochodzenia RNA, wyróżnić można różnego rodzaju modyfikacje końca 5', takie jak na przykład Kap 0, Kap 1, Kap 2. Obecność Kap 0 jest charakterystyczna dla mRNA niższych organizmów eukariotycznych i roślin a Kap 1 i Kap 2 posiada dodatkowe modyfikacje i występuje w mRNA wyższych eukariontów. mRNA organizmów prokariotycznych zawiera grupę trójfosforanową na końcu 5'.

Jedną z metod bazujących na modyfikacji końca cząsteczki jest metoda selekcji i wzbogacania RNA oparta na selektywnym wychwycie cząsteczek mRNA zawierających ogon poliA na końcu 3'. Wzbogacanie badanej próby w cząsteczki RNA poliadenylowane na końcu 3' można przeprowadzić przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów, takich jak na przykład NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs), Dynabeads™ mRNA Purification Kit (Invitrogen) lub Seq-Star™ poly(A) mRNA Isolation Kit (Arraystar Inc). Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia. Przeprowadzenie selekcji poliA nie daje gwarancji usunięcia z badanej próby cząsteczek wysokokopijnych RNA. W efekcie próba może nadal zawierać duże ilości rRNA, które ze względu na obecność odcinków wewnętrznych powtórzeń sekwencji poliA mogą ulec wzbogaceniu wraz z frakcją mRNA. Ze względu na fakt, że poliadenylacja końca 3' dotyczy wyłącznie mRNA z komórek eukariotycznych jest to metoda, która nie znajduje zastosowania dla prób izolowanych z bakterii. Należy mieć również na uwadze, że nie wszystkie eukariotyczne mRNA

są poliadenylowane. Ogony poliA nie zawierają np. mRNA białek histonowych, dla których metoda ta również nie może zostać zastosowana.

W publikacji Blower et al. (2013), *PLoS ONE* 8(10):e77700 wykorzystano białko eIF4E, które wiąże mRNA ze strukturą Kap 0 na końcu 5'. Użycie eIF4E do wiązania mRNA z kapem jest dosyć oczywiste, gdyż jest to białko dobrze znane ze względu na udział w procesie inicjacji translacji. Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia – wymaga metylacji w pozycji 7G (nukleotydu na końcu kapu) do pełnej wydajności wiązania. W przypadku, gdy metylacja ta nie jest obecna lub została utracona (przez rozpad chemiczny lub modyfikacje enzymatyczne), eIF4E nie rozpozna takiego RNA. eIF4E nie rozróżnia metylacji 2'O na pierwszych nukleotydach, czyli nie rozróżnia Kap 0 od Kap 1 i Kap 2, zatem nie rozróżnia RNA niższych eukariontów od RNA wyższych eukariontów. Ponadto, nie rozpoznaje ppp na końcu 5' RNA, a zatem nie znajduje zastosowania dla prób izolowanych z bakterii. Dodatkowo, gen kodujący białko eIF4E ulega ekspresji konstytutywnej w komórkach a białko występuje w komórkach w normalnych warunkach, zatem metoda obarczona jest ryzykiem wystąpienia artefaktów powstałych przez oddziaływanie białek komórkowych z eIF4E.

Choć istnieje obecnie wiele metod selekcji i wzbogacania próby RNA w sekwencji kodujące, wszystkie te metody mają swoje ograniczenia, nie są dostatecznie wydajne, często ograniczone tylko do dedykowanych gatunków, a także długotrwałe i kosztowne gdyż wymagają przeprowadzenia wielu rund selekcji.

Istnieje zatem potrzeba opracowania metody selekcji i wzbogacania próby RNA w pożądany typ cząsteczek, zwłaszcza w mRNA, do zastosowań w biologii molekularnej i diagnostyce, która byłaby wydajna, uniwersalna gatunkowo a także stosunkowo łatwa i szybka do wykonania, a zatem korzystna ekonomicznie.

Twórcy wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, że do selekcji i wzbogacania próby RNA, dla zastosowań w biologii molekularnej, można wykorzystać białka z rodziny białek IFIT otrzymując metodę, która jest uniwersalna, szybka, oparta na prostych technikach laboratoryjnych, a także korzystna ekonomicznie.

Białka IFIT (IFIT, ang. *Interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats*) wytwarzane są w organizmie człowieka w odpowiedzi na infekcję wirusową. Geny kodujące białka IFIT ulegają ekspresji indukowanej interferonem w przebiegu stanów zapalnych wywołanych patogenem wirusowym. Zatem białka IFIT należą do wrodzonego układu odpornościowego a ich rola polega na wychwytywaniu i blokowaniu translacji wirusowego RNA hamując w ten sposób namnażanie wirusa w komórkach. Dotychczas scharakteryzowano cztery ludzkie białka IFIT, w tym IFIT1 (znane również jako ISG56), IFIT2 (ISG54), IFIT3 (ISG60) oraz IFIT5 (ISG58).

Nieoczekiwanie okazało się, że białka IFIT mogą zostać z powodzeniem wykorzystane w sposobie selekcji i wzbogacania RNA dla zastosowań w biologii molekularnej, według wynalazku. O ile naturalnym celem działania białek IFIT w organizmie człowieka jest wirusowy RNA, tak metoda według wynalazku bazująca na białkach IFIT wychodzi szeroko poza naturalne czy sztuczne ligandy RNA i proponuje wykorzystanie białek IFIT celowo do selekcji i wzbogacania także innych RNA, również z organizmów takich jak bakterie czy niższe eukarionty takie jak na przykład drożdże, które nie są naturalnymi celami działania IFIT.

Przedmiotem wynalazku jest sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA, zwłaszcza w cząsteczki mRNA, z puli cząsteczek RNA, obejmujący etap, w którym inkubuje się próbkę zawierającą pulę cząsteczek RNA z białkiem wiążącym RNA do utworzenia kompleksów RNA-białko wiążące RNA, który to sposób charakteryzuje się tym, że jako białko wiążące RNA stosuje się białko z rodziny białek IFIT lub jego funkcjonalne warianty, homologi lub mutanty.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, białkiem z rodziny białek IFIT jest białko zawierające region powtórzeń tetratrikopeptydowych TPR oraz strukturalny motyw o sekwencji aminokwasowej CHFxW, gdzie x oznacza T lub N lub inny aminokwas, występujący w skręcie helikalnym w pętli między alfa-helisami. Region powtórzeń TPR jak i motyw CHFxW są charakterystyczne dla rodziny białek IFIT, przy czym motyw CHFxW jest jednym z najbardziej konserwowanych motywów wśród homologów IFIT, o którym wiadomo, że jest niezbędny dla podtrzymania struktury białka (mutacje w obrębie tego motywu powodują niestabilność białka).

Korzystnie, białkiem z rodziny białek IFIT jest białko zawierające sekwencję aminokwasową, która jest co najmniej w 20% identyczna z sekwencją aminokwasową ludzkiego białka IFIT1 przedstawioną jako SEQ ID NO:1, lub jej funkcjonalny fragment. Równie korzystnie, w sposobie według wynalazku, białkiem z rodziny białek IFIT jest białko zawierające sekwencję aminokwasową, która jest co najmniej w 20% identyczna z sekwencją aminokwasową ludzkiego białka IFIT5 przedstawioną jako SEQ ID NO:2, lub jej funkcjonalny fragment.

Najbardziej korzystnie, w sposobie według wynalazku, białko z rodziny białek IFIT stanowi ludzkie białko IFIT1 o sekwencji aminokwasowej przedstawionej jako SEQ ID NO:1 i/lub ludzkie białko IFIT5 o sekwencji aminokwasowej przedstawionej jako SEQ ID NO:2, lub ich mutanty.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, białko z rodziny białek IFIT stanowi funkcjonalny wariant białka IFIT1 i/lub białka IFIT5 z organizmu innego niż ludzki, lub ich mutanty.

W sposobie według wynalazku korzystnie jest gdy białko IFIT1 i/lub białko IFIT5 stanowi białko rekombinowane, które dodatkowo może zawierać metkę oligohistydynową, Strep-tag, One-Strep lub inne elementy do oczyszczania lub unieruchamiania białka oraz opcjonalnie miejsce cięcia dla proteazy pomiędzy metką a białkiem do usuwania metki oraz opcjonalnie metkę SUMO lub inne domeny poprawiające rozpuszczalność lub stabilność białka.

Rekombinowane białko IFIT1 i/lub IFIT5 może być stosowane, zgodnie z wynalazkiem, w postaci wolnej lub, opcjonalnie, w postaci związanej z cząsteczką reporterową, taką jak wyznakowana cząsteczka RNA, która współzawodniczy z pulą cząsteczek RNA o wiązanie z białkiem IFIT1 i/lub IFIT5. Jeśli w próbce zawierającej pulę cząsteczek RNA obecne są cząsteczki RNA, które białko IFIT wiąże lepiej niż cząsteczkę reporterową, to cząsteczka reporterowa ulega uwolnieniu, a docelowa cząsteczka RNA związaniu. Wówczas obecność wolnej cząsteczki reporterowej będzie świadczyć o obecności w próbce interesującego nas RNA. Uwolniona cząsteczka reporterowa, taka jak wyznakowana cząsteczka RNA, może dawać sygnał fluorescencyjny, który w kompleksie z białkiem nie mógł zostać wykryty, bo ulegał wygaszeniu, na przykład za pomocą quenchera umieszczonego na białku.

Korzystnie, sposób według wynalazku charakteryzuje się tym, że oprócz etapu, w którym inkubuje się próbkę zawierającą pulę cząsteczek RNA z białkiem wiążącym RNA do utworzenia kompleksów RNA-białko wiążące RNA, sposób dodatkowo zawiera etapy, w których:

- a. wytwarza się białko wiążące RNA w bakteryjnych systemach nadekspresji białek,
- b. oczyszcza się białko wiążące RNA,
- c. przygotowuje się białko wiążące RNA w postaci wolnej lub, opcjonalnie, w postaci związanej z cząsteczką reporterową,
- d. unieruchamia się białko wiążące RNA na złożu przed etapem inkubacji z RNA lub, opcjonalnie, unieruchamia się białko wiążące RNA na złożu po etapie inkubacji z RNA w postaci kompleksów RNA-białko wiążące RNA,
- e. po inkubacji próbki zawierającej pulę cząsteczek RNA z białkiem wiążącym RNA, odpłukuje się niezwiązane cząsteczki RNA i, opcjonalnie, uwolnioną cząsteczkę reporterową,
- f. opcjonalnie, uwalnia się RNA z kompleksów RNA-białko wiążące RNA,
- g. wykrywa się wyselekcjonowane i/lub wzbogacone cząsteczki RNA, w postaci uwolnionych cząsteczek RNA lub w postaci kompleksów RNA-białko wiążące RNA.

Zgodnie z wynalazkiem, białko wiążące RNA korzystnie wytwarza się w postaci rekombinowanej, w bakteriiach *Escherichia coli* lub w innych dogodnych bakteryjnych systemach nadekspresji białek. Oczyszczanie białka wiążącego RNA korzystnie prowadzi się za pomocą chromatografii powinowactwa i/lub filtracji żelowej lub innej dogodnej metody. Korzystnie, do unieruchamiania białka wiążącego RNA lub kompleksów RNA-białko wiążące RNA stosuje się złoże niklowe lub inne dogodne złoże. Uwalnianie RNA z kompleksów korzystnie prowadzi się poprzez trawienie białka proteinazą K lub za pomocą ekstrakcji fenolem i chloroformem lub innej dogodnej metody, przy czym uwalnianie RNA z kompleksów jest opcjonalne. Nie ma konieczności uwalniania RNA z kompleksów przed detekcją, wówczas RNA wykrywa się w postaci kompleksów z białkiem. Wykrywanie wyselekcjonowanych i/lub wzbogaconych cząsteczek RNA korzystnie prowadzi się przez odwrotną transkrypcję i amplifikację kwasów nukleinowych, RT-PCR, lub wiązanie wyznakowanej sondy do RNA, lub inną dogodną metodą, lub, opcjonalnie stwierdza się na podstawie obecności uwolnionej cząsteczki reporterowej.

Do przeprowadzenia wszystkich powyższych etapów sposobu według wynalazku stosować można dowolne dogodne metody znane w dziedzinie.

Korzystnie, sposób według wynalazku charakteryzuje się tym, że cząsteczki RNA wyselekcjonowane i/lub wzbogacone tym sposobem stanowią cząsteczki RNA, zwłaszcza mRNA, ze strukturą Kap 0 lub z grupą trójfosforanową na 5' końcu, przy czym struktura Kap 0 może obejmować m<sup>7</sup>Gppp i/lub jego formy różniące się metylacją, takie jak Gppp. Ponadto, sposób według wynalazku charakteryzuje się tym, że cząsteczki RNA wyselekcjonowane i/lub wzbogacone tym sposobem stanowią cząsteczki RNA, zwłaszcza mRNA, które zawierają region co najmniej 4 niesparowanych nukleotydów na 5' końcu. Wynika to z faktu, że wiązanie białek IFIT do RNA nie jest zależne od sekwencji a raczej od dostępności pierwszych kilku nukleotydów. Dzięki denaturacji

termicznej RNA wszystkie 5' końce mogą zostać uwolnione ze struktury drugorzędowej i stać się dostępne dla białek.

Korzystnie, sposób według wynalazku charakteryzuje się również tym, że wyselekcjonowane i/lub wzbogacone cząsteczki RNA stanowią cząsteczki RNA, zwłaszcza mRNA, wirusów, bakterii, grzybów, pierwotniaków, bezkręgowców i/lub roślin, lub mtRNA kręgowców, lub RNA będący stanem pośrednim w procesie dojrzewania RNA. Sposób może być z powodzeniem stosowany bez ograniczeń gatunkowych, ale z wyraźnym podziałem na niższe organizmy eukariotyczne i rośliny, których mRNA zawierają Kap 0 rozpoznawany przez białko IFIT1, oraz bakterie, których mRNA zawierają grupę trójfosforanową na końcu 5' rozpoznawaną przez białko IFIT5. IFIT1 specyficznie i selektywnie wiąże RNA ze strukturą Kap 0 na końcu 5'. IFIT5 specyficznie i selektywnie wiąże RNA ze strukturą ppp na końcu 5', dzięki czemu rozpoznaje mRNA bakterii.

Zatem sposób według wynalazku umożliwia selekcję i wzbogacanie RNA, zwłaszcza w cząsteczki mRNA, o pożądanej charakterystyce końca 5' cząsteczki RNA, tj. RNA ze strukturą Kap 0 i/lub grupą trójfosforanową na końcu 5', z puli cząsteczek RNA. Nowy sposób selekcji i wzbogacania RNA według wynalazku wykorzystuje właściwości białek IFIT, które specyficznie wiążą cząsteczki RNA z odpowiednio zmodyfikowanym 5' końcem. Udowodniono, że białko IFIT1, umieszczone w mieszaninie syntetycznych cząsteczek RNA o różnych końcach 5' (OH, P, ppp, Kap 0), specyficznie wiąże RNA ze strukturą Kap 0, natomiast białko IFIT5 specyficznie wiąże RNA zawierające grupę trójfosforanową (ppp) na końcu 5'.

Odpowiednio, w sposobie według wynalazku stosuje się białko IFIT1 do wzbogacania próby RNA w cząsteczki ze strukturą Kap 0 (m7Gppp lub Gppp), do których należą mRNA, snRNA oraz inne niekodujące RNA niższych organizmów eukariotycznych oraz roślin, a także białko IFIT5 do wzbogacania próby RNA w cząsteczki z grupą trójfosforanową (ppp) na końcu 5', do których należą bakteryjne mRNA i niektóre sRNA.

Metodą RT-qPCR pokazano również wzbogacenie niektórych RNA z puli całkowitego komórkowego RNA przy użyciu ludzkich białek IFIT: wzbogacone zostały niektóre mRNA drożdżowe (które mają koniec Kap 0) przez pulldown na IFIT1 oraz bakteryjne sRNA i mRNA (które zawierają 5'-ppp) przez pulldown na IFIT5. Zatem użycie białek IFIT może pozwolić na izolację lub wzbogacenie cząsteczek RNA o pożądanej charakterystyce 5' końca. Cząsteczki RNA związane z IFIT1 i IFIT5 mogą zostać uwolnione z kompleksów z białkami i poddane dalszemu badaniu np. poprzez rozdział elektroforetyczny, RT-qPCR lub sekwencjonowanie.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto cząsteczka RNA wyselekcjonowana i/lub wzbogacona sposobem według wynalazku. Korzystnie, stanowi ją cząsteczka RNA, zwłaszcza mRNA, ze strukturą Kap 0 lub z grupą trójfosforanową na 5' końcu, przy czym struktura Kap 0 obejmuje m7Gppp i/lub jego formy różniące się metylacją, takie jak Gppp. Korzystnie, cząsteczka RNA według wynalazku zawiera region co najmniej 4 niesparowanych nukleotydów na 5' końcu, co czyni ją dostępną dla białek IFIT.

Korzystnie, cząsteczkę RNA wyselekcjonowaną i/lub wzbogaconą sposobem według wynalazku stanowi cząsteczka RNA, zwłaszcza mRNA, wirusów, bakterii, grzybów, pierwotniaków, bezkręgowców i/lub roślin, lub mtRNA kręgowców, lub RNA będący stanem pośrednim w procesie dojrzewania RNA, przy czym wyraźny jest tu podział, że mRNA niższych organizmów eukariotycznych

i roślin, który zawiera Kap 0 będzie wiązany przez białko IFIT1, natomiast mRNA bakterii, który zawiera grupę trójfosforanową na końcu 5' będzie wiązany przez białko IFIT5.

Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie cząsteczki RNA wyselekcjonowanej i/lub wzbogaconej sposobem według wynalazku do detekcji w testach diagnostycznych opartych o RNA patogenu. Korzystnie, w zastosowaniu tym RNA patogenu stanowi RNA wirusów, bakterii, grzybów, pierwotniaków i/lub bezkręgowców a detekcję cząsteczki RNA patogenu prowadzi się przez odwrotną transkrypcję i amplifikację kwasów nukleinowych, RT-PCR, lub wiązanie wyznakowanej sondy do RNA patogenu, lub inną dogodną metodą, lub, opcjonalnie stwierdza się na podstawie obecności uwolnionej cząsteczki reporterowej.

Odpowiednio, sposób według wynalazku można stosować do wzbogacania RNA patogenu w próbkach pobranych od pacjentów z podejrzeniem zakażenia, w celu wykrywania obecności bakterii, wirusów, drożdży lub pasożytów. Wzbogacenie RNA patogenu w badanej próbce, jeszcze przed zastosowaniem metod detekcji RNA, znacznie zwiększa czułość i selektywność testów diagnostycznych opartych o RNA patogenu.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto zastosowanie cząsteczki RNA wyselekcjonowanej i/lub wzbogaconej sposobem według wynalazku do przygotowania bibliotek cDNA do sekwencjonowania RNA lub do przygotowania prób do bezpośredniego sekwencjonowania RNA, a korzystnie do wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA, zwłaszcza sekwencjonowania NGS.

Sposób selekcji i wzbogacania RNA według wynalazku umożliwia przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania nowej generacji RNA-Seq., na bazie puli RNA wzbogaconej w cząsteczki mRNA (o odpowiednio zmodyfikowanym końcu 5', czyli ppp np. u bakterii oraz Kap 0 np. u drożdży), a tym samym pozwala na pozbycie się z badanej próby cząsteczek RNA z innymi (nierozpoznanymi przez dane białko IFIT) grupami na końcach 5', w tym rybosomalnego i transportującego RNA (rRNA i tRNA), które zazwyczaj utrudniają procedurę RNA-Seq. Zatem, sposób według wynalazku można z powodzeniem stosować do wzbogacania bibliotek do RNA-Seq w doświadczeniach mających na celu m.in. analizę frakcji transkryptomu, która odpowiedzialna jest za kodowanie białek. Biblioteki NGS przygotowane sposobem według wynalazku są znacząco wzbogacone, przede wszystkim, w sekwencje kodujące białka ale także w sekwencje cząsteczek, które mają odpowiednio zmodyfikowane końce 5' i zazwyczaj występują w komórkach w znikomych ilościach, np. regulatorowe RNA.

Możliwe jest znalezienie także dodatkowych zastosowań dla białek IFIT w innych procedurach biologii molekularnej, na przykład do identyfikacji tożsamości grupy na 5' końcu w przypadku RNA w organizmach mniej poznanych pod względem metabolizmu RNA. Zatem, dodatkowo, wykorzystanie białek IFIT w sposobie selekcji i wzbogacania próby RNA będzie miało znaczenie poznawcze, ze względu na fakt, że stan końców 5' dla niektórych RNA (np. regulatorowych) nie został jeszcze poznany. W takich przypadkach wzbogacenie bibliotek NGS w dane sekwencje będzie również informacją o zaistniałej modyfikacji ich końca 5'.

Sposób selekcji i wzbogacania próby RNA według wynalazku jest uniwersalny, szybki, oparty na prostych technikach laboratoryjnych, a także korzystny ekonomicznie.

Sposób według wynalazku jest uniwersalny i powtarzalny dla większości organizmów niższych eukariontów, wszystkich bakterii oraz niektórych wirusów. Sposób może być z powodzeniem stosowany bez ograniczeń gatunkowych, ale z wyraźnym podziałem na niższe organizmy eukariotyczne i rośliny, których mRNA zawierają Kap 0 rozpoznawany przez białko IFIT1, oraz bakterie, których mRNA zawierają grupę trójfosforanową na końcu 5' rozpoznawaną przez białko IFIT5. IFIT1 specyficznie i selektywnie wiąże RNA ze strukturą Kap 0 na końcu 5'. Rozróżnia metylację 2'O na pierwszych nukleotydach, czyli rozróżnia Kap 0 od Kap 1 i Kap 2, dzięki czemu rozpoznaje mRNA niższych eukariontów oraz roślin. IFIT5 specyficznie i selektywnie wiąże RNA ze strukturą ppp na końcu 5', dzięki czemu rozpoznaje mRNA bakterii. Białka IFIT nie wiążą cząsteczek, których koniec 5' zawiera grupę monofosforanową (np. rRNA, tRNA) lub -OH (produkty rozpadu RNA, np. produkty autokatalizy RNA lub rozpadu związanego z preparatyką podczas izolacji). Przeprowadzona z ich użyciem selekcja będzie niezależna od sekwencji nukleotydowej RNA. Ponadto, z uwagi na fakt, że Kap 0 dodawany jest do cząsteczek mRNA kotranskrypcyjnie i w pierwszej kolejności podczas procesu dojrzewania RNA, w puli wiązanych przez IFIT1 cząsteczek powinny znaleźć się zarówno dojrzałe mRNA, jak również cząsteczki prekursorowe informacyjnego RNA (pre-mRNA) na różnych etapach procesowania (ang. *splicing*). Zatem, sposób według wynalazku może być z powodzeniem stosowany dla gatunków, które nie są modelowe i w przypadku których nie ma możliwości zastosowania dedykowanych komercyjnych zestawów do usuwania rRNA. Proponowane rozwiązanie może być stosowane zamiennie bądź razem z innymi metodami wzbogacania próby RNA w mRNA.

Ponadto, sposób według wynalazku jest metodą szybką i korzystną ekonomicznie, a jego wykonanie jest stosunkowo proste. Selekcja i wzbogacanie próby RNA trwa do kilku godzin i nie wymaga specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego, wykorzystuje proste techniki laboratoryjne i urządzenia będące standardowym wyposażeniem większości laboratoriów. Co istotne, procedura nie wprowadza modyfikacji RNA. Fakt, że białka IFIT nie występują w normalnych warunkach w komórkach, a jedynie u kręgowców i w warunkach indukowanych infekcją wirusową lub indukcją stanu zapalnego, może dawać dodatkową przewagę nad innymi metodami w postaci mniejszego ryzyka artefaktów powstałych przez oddziaływanie białek komórkowych z IFIT. Dodatkowo, zaletą białek IFIT jest łatwa, szybka i wydajna nadprodukcja w bakteryjnych systemach ekspresji białek. Na N-końcach białek IFIT umieszczane są znaczniki, które mogą być wykorzystane w celu oznakowania lub unieruchamiania białek IFIT na złożach i nie wpływają na ich aktywność. Białka IFIT są stosunkowo małe (IFIT1 56 kDa, IFIT5 58 kDa), stabilne (mogą być bezpiecznie przechowywane długookresowo w temperaturze - 20 °C lub - 80 °C oraz krótkookresowo w temperaturze 4°C) oraz podatne na inżynierię. Nie wykazują aktywności enzymatycznej związanej np. z modyfikowaniem czy fragmentacją RNA, co oznacza, że związane z nimi RNA można z łatwością odzyskać i wykorzystać w kolejnych procedurach, na przykład do amplifikacji i sekwencjonowania. Nie wymagają również labilnych kofaktorów takich jak ATP.

Wynalazek został zilustrowany na rysunku, na którym:

- Fig. 1** przedstawia schemat sposobu według wynalazku ilustrujący selekcję i wzbogacanie cząsteczek RNA z odpowiednią modyfikacją końca 5' za pomocą białka rhIFIT1 (A) oraz rhIFIT5 (B). Białka są unieruchamiane na złożu niklowym, następnie umieszczane w mieszaninie cząsteczek RNA z różnymi końcami 5'. Po odmyciu niezwiązanych cząsteczek RNA, kompleksy rhIFIT1 z 5'Kap 0-RNA i rhIFIT5 z 5'ppp-RNA są rozbijane a cząsteczki RNA uwolnione z kompleksów oczyszczane i analizowane.
- Fig. 2** przedstawia obrazy po rozdziale RNA w żelu poliakrylamidowym mieszaniny syntetycznych cząsteczek RNA o różnych końcach 5' oraz cząsteczek RNA uwolnionych z kompleksów z białkiem IFIT1 (A) lub IFIT5 (B) po doświadczeniu typu pull-down (próba badana „+IFIT+RNA” i negatywna próba kontrolna „-IFIT+RNA”). M – marker wielkości, PAA – żel poliakrylamidowy o danej zawartości poliakrylamidu.
- Fig. 3** przedstawia wykresy wzbogacenia wybranych mRNA z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* po reakcji pull-down z rhIFIT1 względem 18S rRNA. Wyniki RT-qPCR analizowano metodą względnej kwantyfikacji, Act1 - aktyna 1, Tdh3 - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, RPS26A – komponent małej jednostki rybosomalnej 40S, GCN4 – białko generalnej kontroli 4.
- Fig. 4** przedstawia wykresy wzbogacenia wybranych RNA z bakterii *Listeria monocytogenes* po reakcji pull-down z IFIT5. A) Względem 16S rRNA; B) Względem 23S rRNA. C) wzrost wartości C<sub>q</sub> oznacza mniejsze ilości rRNA w próbkach poddanych pulldown z IFIT5 (np. różnica C<sub>q</sub> równa 1 oznacza dwukrotny spadek ilości RNA).
- Fig. 5** przedstawia obraz po rozdziale RNA w żelu poliakrylamidowym mieszaniny syntetycznych cząsteczek RNA o różnych końcach 5' oraz cząsteczek RNA uwolnionych z kompleksów z białkiem rhIFIT1 po doświadczeniu typu pull-down (próba badana +IFIT+RNA, M - marker wielkości).
- Fig. 6** przedstawia porównanie i określenie % identyczności sekwencji aminowasowej homologów białka IFIT5 u różnych gatunków zwierząt. Zestawione zostały wybrane wyniki przeszukiwania bazy sekwencji białkowych NCBI algorytmem BLAST-P przy użyciu sekwencji hIFIT5 (SEQ ID NO:2). Podane są parametry dla wybranych sekwencji homologów ludzkich (H), króliczych (R), zółwich (T), rybich (F) oraz bezkręgowców (N). Białka oznaczone (\*) w ostatniej rubryce są najprawdopodobniej białkami z powtórzeniami TPR, które nie są strukturalnymi i funkcjonalnymi homologami IFIT, gdyż nie zawierają motywu CHF<sub>x</sub>W (Fig. 7).
- Fig. 7** przedstawia ułiniwienie wybranych homologów białek IFIT w rejonie konserwowanego motywu strukturalnego CHFTW. H, sekwencje ludzkich białek, F, sekwencje rybich białek, N\* sekwencje białek bezkręgowców najprawdopodobniej niebędących strukturalnymi i funkcjonalnymi odpowiednikami białek IFIT.
- Fig. 8** przedstawia obraz rozdziału podczas elektroforezy kapilarnej w urządzeniu Bioanalyzer, Agilent cząsteczek RNA uzyskanych po doświadczeniach typu pull-down opisanych w Przykładzie 2 (A) i Przykładzie 3 (B).

Wynalazek został szczegółowo przedstawiony w przykładach wykonania zamieszczonych poniżej. Przykłady wykonania nie ograniczają zakresu wynalazku.

## Przykłady wykonania

### Przykład 1

**Sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA w cząsteczki RNA ze strukturą Kap 0 na końcu 5' i w cząsteczki RNA z grupą trójfosforanową na końcu 5', z puli syntetycznych cząsteczek RNA o różnych końcach 5'**

W sposobie selekcji i wzbogacania RNA wykorzystano rekombinowane ludzkie białko IFIT1 (rhIFIT1) o SEQ ID NO:1 oraz rekombinowane ludzkie białko IFIT5 (rhIFIT5) o sekwencji SEQ ID NO:2, oba w postaci fuzji z metką histydynową (His-tag).

Białka rhIFIT1 i rhIFIT5 otrzymano w bakteryjnym systemie nadekspresji białek przy użyciu standardowych technik, wykorzystując szczep *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. Plazmid z sekwencją kodującą białko rhIFIT1 lub rhIFIT5 wprowadzano do komórek bakteryjnych metodą szoku cieplnego, następnie selekcjonowano klony bakteryjne, które pobrały wprowadzany materiał genetyczny poprzez hodowlę na złożach selekcyjnych LB z antybiotykami. Produkcję białek indukowano po osiągnięciu przez hodowlę bakteryjną OD<sub>600</sub> 0.6 poprzez dodanie izopropyl-β-D-galaktopiranozydu (IPTG) do końcowego stężenia 0.5 mM. Po zaindukowaniu produkcji białka, hodowlę bakterii kontynuowano przez noc (około 16 godzin) w temperaturze 25°C wytrząsając z prędkością 1200 - 1600 rpm. Po zakończonej hodowli bakterie zwirowano (4000 rpm, 20 min. 4°C), usunięto nadsącz, a pozostały osad zawieszono w buforze lizującym (50 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 10% glicerol, 0.5 mM TCEP), do którego dodano inhibitor proteaz oraz lizozym (Sigma). Zawiesinę bakterii poddano sonikacji (rozbijaniu ultradźwiękami), a następnie odwirowano (20000 rpm, 40 min. 4°C) i zebrano klarowny lizat bakteryjny zawierający m.in. rozpuszczalne białka IFIT wyprodukowane w komórkach bakterii.

Białka IFIT oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa oraz filtracji żelowej. W tym celu lizat bakteryjny przepuszczano przez kolumnę HisTrap HP crude (GE Healthcare Life Sciences). Białko rhIFIT1 lub rhIFIT5 eluowano z kolumny w gradiencie buforu z wysoką zawartością imidazolu (50 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazol, 10% glicerol, 0.5 mM TCEP). Łączono zebrane frakcje zawierające oczyszczane białko. Próbkę rozcieńczano 5x w buforze zawierającym 50 mM Tris pH 7.5, 10% glicerol, 0.5 mM TCEP i przepuszczano przez kolumnę HiTrap Heparin HP (GE Healthcare Life Sciences) zrównoważoną buforem heparinA (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 0.5 mM TCEP). Białko rhIFIT1 lub rhIFIT5 eluowano z kolumny heparynowej w gradiencie buforu heparinB z wysoką zawartością soli (50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 10% glicerol, 0.5 mM TCEP). Łączono zebrane frakcje zawierające oczyszczane białko. Próbkę zagęszczano do objętości 1 ml używając filtrów membranowych (Vivaspin 20, Sartorius) i przepuszczano przez kolumnę Superdex 200 Increase (GE Healthcare Life Sciences) w buforze SEC (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glicerol, 0.5 mM TCEP). Oczyszczone w ten sposób białka rhIFIT przechowywano w temperaturze 4°C przez kilka dni lub zamrażano w strumieniu ciekłego azotu i przechowywano w temperaturze -80°C.

Białka rhIFIT1 oraz rhIFIT5 wykorzystano następnie do doświadczeń typu pull-down, które rozpoczęto od unieruchomienia białka do złoża niklowego Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). W tym celu 10  $\mu$ l złoża przenoszono do probówki typu eppendorf, przemywano 1 ml wody wolnej od RNaz, a następnie 1 ml buforu wiążącego (BB, ang. *Binding Buffer*) o składzie: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM imidazol, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Tween 20, każdorazowo wirując z prędkością 100 rpm, 4°C, przez 1 min. i usuwając nadsącz. Do przygotowanego złoża dodawano 1 ml buforu BB i 2  $\mu$ g (35 pmoli) białka rhIFIT1 lub rhIFIT5. Próbkę inkubowano przez 30 min. w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając. Po związaniu białka do złoża próbkę wirowano jak poprzednio, złoże przemywano 1 ml buforu BB i ponownie odwirowywano.

Do złoża dodawano 1 ml mieszaniny zawierającej bufor BB, około 10  $\mu$ g RNA i poly(dIdC) (ang. *Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt*, Sigma) w stężeniu końcowym 2  $\mu$ g/ml. Wiązanie białka z RNA prowadzono przez 60 min. w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając. Alternatywnie, wiązanie białka do RNA przeprowadzono przed unieruchomieniem białka na złożu, poczynając od zmieszania 2  $\mu$ g białka rhIFIT1 lub rhIFIT5 z około 10  $\mu$ g RNA w 1 ml buforu BB. Wiązanie białka z RNA prowadzono przez 60 min. w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając. Następnie utworzone kompleksy białek z RNA unieruchamiano na złożu niklowym poprzez inkubację próby z dodatkiem poly(dIdC) w stężeniu końcowym 2  $\mu$ g/ml ze złożem (przemytym wodą i buforem BB) przez 30 min. w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając. W obu przypadkach, po okresie inkubacji i unieruchomieniu, usunięto cząsteczki RNA, które się nie związały z białkiem, poprzez ich odplukanie. W tym celu, unieruchomione na złożu niklowym kompleksy białek z RNA trzykrotnie przemywano 1 ml buforu płuczającego (WB, ang. *Wash Buffer*) o składzie: 50 mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM imidazol, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Tween 20, każdorazowo wirując z prędkością 100 rpm, 4°C, przez 1 min. i usuwając nadsącz.

W ostatnim etapie uwolniono RNA z kompleksów z białkiem IFIT1 i IFIT5, przez usunięcie białek. W tym celu do złoża z unieruchomionymi kompleksami dodawano 400  $\mu$ l buforu WB z dodatkiem proteinazy K (Sigma) w stężeniu końcowym 50  $\mu$ g/ml. Próbkę inkubowano 60 min. w temperaturze 37°C, wytrząsając z prędkością 800 rpm, następnie wirowano z prędkością 100 rpm, 4°C, przez 1 min. Zbierano nadsącz, dodawano do niego 5  $\mu$ l liniowego akrylamidu (Sigma) i 2.5 objętości 100% etanolu. Alternatywnie, do złoża z unieruchomionymi kompleksami dodawano 400  $\mu$ l buforu WB i następnie oczyszczano RNA poprzez ekstrakcję fenolem i chloroformem. RNA wytrącano dodając do oczyszczonej próby 1/10 objętości 3M octanu sodu pH 4.8, 5  $\mu$ l liniowego akrylamidu (Sigma) i 2.5 objętości 100% etanolu. Próbkę inkubowano przez noc w temperaturze -20°C, następnie wirowano minimum 30 min. w temperaturze 4°C przy maksymalnej prędkości. Usuwano nadsącz a osad przemywano 1 ml 80% etanolu i wirowano przez 15 min jak poprzednio. Osad RNA suszono (5-10 minut) w temperaturze pokojowej, następnie rozpuszczano w 10-20  $\mu$ l wody wolnej od RNaz.

Schemat ilustrujący opisane doświadczenie typu pull-down, mające na celu selekcję i wzbogacanie cząsteczek RNA za pomocą białek IFIT, przedstawia Fig. 1.

Aby sprawdzić czy z pomocą białek rhIFIT można dokonać selekcji i/lub wzbogacania próby RNA w cząsteczki RNA ze strukturą Kap 0 na końcu 5' i w cząsteczki RNA z grupą trójfosforanową na końcu 5' przeprowadzono pull-down z wykorzystaniem białka rhIFIT1 lub rhIFIT5 oraz puli syntetycznych cząsteczek RNA o różnych końcach 5'. W tym celu przygotowano mieszaninę czterech

typów syntetycznych cząsteczek RNA, uzyskanych na drodze transkrypcji *in vitro* (z wykorzystaniem zestawu HiScribe™ T7 In Vitro Transcription Kit, New England BioLabs, zgodnie z protokołem producenta) i enzymatycznej modyfikacji końców 5'. Modyfikację 5'OH uzyskano poprzez inkubację RNA z defosforylazą CIP (ang. *Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal*, New England BioLabs, zgodnie z protokołem producenta). Modyfikację 5'p uzyskano poprzez trawienie RNA pirofosforylhydrolazą 5' RNA (RppH, New England BioLabs, zgodnie z protokołem producenta). Modyfikacja 5'ppp jest naturalnym efektem transkrypcji *in vitro*. Modyfikację 5' Kap 0 uzyskano z wykorzystaniem enzymu kapującego z wirusa krowianki (korzystając z zestawu Vaccinia Capping System, New England BioLabs, zgodnie z protokołem producenta). Mieszaninę przygotowano poprzez zmieszanie 70 pikomoli każdego typu cząsteczek:

RNA 80mer (5'OH) 2 ug (70 pmoli)

RNA 100mer (5'p) 2.4 ug (70 pmoli)

RNA 135mer (5'ppp) 3.2 ug (70 pmoli)

RNA 160mer (5'Kap 0) 3.8 ug (70 pmoli)

Przygotowaną w ten sposób próbę RNA dodano do białka rhIFIT1 lub rhIFIT5 unieruchomionego na złożu niklowym i przeprowadzano wiązanie białka z RNA a następnie odyskiwano wyselekcjonowane cząsteczki RNA z kompleksów postępując zgodnie z protokołem pull-down opisanym powyżej. Pozyskane RNA rozdzielono poprzez rozdział elektroforetyczny w 12% żelu poliakrylamidowym zawierającym 7M mocznik, a na koniec wizualizowano barwiąc żel odczynnikiem SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) i udokumentowano przy pomocy urządzenia ChemiDoc MP Imaging System Bio-Rad (Fig. 2).

Wyniki przedstawione na Fig. 2 pokazują, że uzyskano znaczne wzbogacenie próby w cząsteczki RNA ze strukturą Kap 0 w stosunku do pozostałych RNA w przypadku zastosowania białka rhIFIT1 oraz w cząsteczki RNA z grupą trójfosforanową w przypadku zastosowania białka rhIFIT5. Próby RNA odzyskane z kompleksów z białkami rhIFIT1 i rhIFIT5 są dobrej jakości (brak śladów degradacji RNA), co pozwala na ich wykorzystanie w dalszych procedurach: przepisaniu na DNA, amplifikacji i sekwencjonowaniu lub detekcji znakowaną sondą. Opracowano wobec tego wydajny, szybki i prosty sposób selekcji i wzbogacania badanej próby RNA w cząsteczki RNA ze strukturą Kap 0 i/lub grupą trójfosforanową na końcu 5'.

Na tej podstawie założono, że sposób selekcji i wzbogacania RNA wykorzystujący białka rhIFIT1 i rhIFIT5 według wynalazku jest uniwersalny i umożliwi selektywny wychwyt cząsteczek RNA z Kap 0 i grupą trójfosforanową na 5' końcu również w złożonych próbach całkowitego RNA izolowanych z komórek lub tkanek różnych organizmów, których RNA posiada określone struktury Kap 0 i ppp na końcu 5'.

W celu weryfikacji powyższego przeprowadzono doświadczenia typu pull-down analogiczne do przedstawionych powyżej z wykorzystaniem białka rhIFIT1 oraz całkowitego RNA izolowanego z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, szczep BY4741 (Przykład 2), a także dla białka rhIFIT5 z całkowitym RNA z bakterii gatunku *Listeria monocytogenes*, szczep EGDc, (Przykład 3) hodowanych w warunkach stresowych stymulujących transkrypcję genów aktywnych podczas infekcji. Na tej podstawie stwierdzono uniwersalność sposobu pod względem pochodzenia próbki RNA, gdyż

sposób działa dla wzbogacania cząsteczek RNA z organizmów należących nawet do odległych królestw takich jak grzyby czy bakterie.

Dodatkowo, w celu potwierdzenia, że w sposobie według wynalazku stosować można nie tylko białka rhIFIT1 i rhIFIT5 pochodzenia ludzkiego ale również inne niż ludzkie homology białek rhIFIT1 i rhIFIT5, dokonano porównania sekwencji aminokwasowej tychże białek (Przykład 5) a następnie wykorzystano w dalszych eksperymentach króliczy homolog białka rhIFIT1 (Przykład 4) oraz rybi homolog białka rhIFIT5 (Przykład 4).

### **Przykład 2**

#### **Sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA izolowanego z drożdży w cząsteczki mRNA ze strukturą Kap 0 na końcu 5' za pomocą białka rhIFIT1**

Sposób selekcji i wzbogacania, w tym doświadczenia typu pull-down przeprowadzono analogicznie do przedstawionych powyżej w Przykładzie 1, z tą różnicą, że pulę cząsteczek RNA stanowiła próba całkowitego RNA izolowanego z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, szczep BY4741, poprzez ekstrakcję z wykorzystaniem fenolu i chloroformu. Stosowanym białkiem było rhIFIT1 o sekwencji SEQ ID NO:1, w fuzji z metką His-tag.

Po doświadczeniach typu pull-down, RNA uwolniony z kompleksów z białkiem rhIFIT1 został poddany reakcji odwrotnej transkrypcji (z wykorzystaniem komercyjnego zestawu, np. First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, zgodnie z protokołem producenta). Otrzymany cDNA wykorzystano do reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Wyniki analizowano metodą względnej kwantyfikacji przyrównując poziom wybranych transkryptów: Act1 (aktyna 1), Tdh3 (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego), RPS26A – (komponent małej jednostki rybosomalnej 40S), GCN4 (białko generalnej kontroli 4, czynnik transkrypcyjny) do poziomu 18S rRNA. Następnie wyznaczono wzbogacenie materiału w wybrane cząsteczki RNA przez porównanie względnej ilości przed i po procedurze pull-down.

Wyniki przedstawione na Fig. 3 pokazują, że zastosowanie białka rhIFIT1 wzbogaca próbę RNA pochodzenia drożdżowego w cząsteczki mRNA od kilku do kilkudziesięciu razy względem 18S rRNA.

### **Przykład 3**

#### **Sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA izolowanego z bakterii w cząsteczki RNA z grupą trójfosforanową na końcu 5' za pomocą białka rhIFIT5**

Sposób selekcji i wzbogacania, w tym eksperymenty typu pull-down przeprowadzono analogicznie do przedstawionych powyżej w Przykładzie 1 z tą różnicą, że pulę cząsteczek RNA stanowiła próba całkowitego RNA izolowanego z bakterii *Listeria monocytogenes* hodowanych w warunkach stresowych, stymulujących transkrypcję genów związanych z wirulencją, a stosowanym białkiem był rhIFIT5 o sekwencji SEQ ID NO:2, w fuzji z metką His-tag.

RNA uwolniony z kompleksów z białkiem rhIFIT5 po eksperymentach pull-down został poddany reakcji odwrotnej transkrypcji (z wykorzystaniem komercyjnego zestawu, np. First Strand cDNA Synthesis Kit od Roche). Otrzymany cDNA wykorzystano do reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Wyniki analizowano metodą względnej kwantyfikacji przyrównując poziom wybranych transkryptów do poziomu rybosomalnych RNA. Następnie wyznaczono wzbogacenie materiału w wybrane cząsteczki RNA przez porównanie względnej ilości przed i po procedurze pull-down.

Wyniki przedstawiono na Fig. 4. Po procedurze z wykorzystaniem białka rhIFIT5 odnotowano około 10-krotne wzbogacenie względem 16S rRNA (Fig. 4A) oraz ponad 20-krotne wzbogacenie względem 23S rRNA (Fig. 4B). Wzbogaceniu uległy cząsteczki należące do frakcji mRNA (Lmo2210) a także małych niekodujących sRNA (LhrC).

#### **Przykład 4**

**Sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA w cząsteczki RNA ze strukturą Kap 0 na końcu 5' za pomocą homologa białka IFIT z organizmu innego niż ludzki – na przykładzie rIFIT1 (króliczego homologa białka rhIFIT1) lub rIFIT12B (rybiego homologa białka IFIT1)**

Sposób selekcji i wzbogacania, w tym eksperymenty typu pull-down przeprowadzono analogicznie do przedstawionych powyżej w Przykładzie 1 z tą różnicą, że białko stanowiło królicze białko rIFIT1 o sekwencji SEQ ID NO:3 lub rybie białko rIFIT12B o sekwencji SEQ ID NO:4, w fuzji z metkami SUMO-tag i His-tag. Mieszaninę czterech typów syntetycznych cząsteczek RNA o różnych końcach 5', uzyskanych na drodze transkrypcji *in vitro*, przygotowano w sposób opisany w Przykładzie 1.

Wyniki przedstawione na Fig. 5 pokazują, że podobnie, jak w przypadku zastosowania rhIFIT1, przy pomocy króliczego homologa uzyskano znaczne wzbogacenie próby w cząsteczki RNA ze strukturą Kap 0. Próby RNA odzyskane z kompleksów z białkiem są dobrej jakości (brak śladów degradacji RNA), można je wykorzystać w dalszych procedurach: przepisaniu na DNA, amplifikacji i sekwencjonowaniu lub detekcji znakowaną sondą.

Na tej podstawie stwierdzono, że sposób selekcji i wzbogacania RNA, w którym wykorzystuje się homolog białka IFIT1 z organizmu innego niż człowiek, umożliwia selektywny wychwyt cząsteczek RNA z Kap 0.

#### **Przykład 5**

**Porównanie i określenie konserwacji sekwencji aminokwasowej homologów białek IFIT1 i IFIT5 u różnych gatunków zwierząt**

Porównania sekwencji aminokwasowej dokonano przy użyciu algorytmu BLASTp, przeszukującego bazę danych NCBI, dostępnego pod adresem <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, przy użyciu sekwencji ludzkiego białka IFIT1 (SEQ ID:1) lub IFIT5 (SEQ ID:2). Uzyskane wyniki dla wybranych znalezionych sekwencji przedstawiono na Fig. 6, gdzie zestawiono punktację oraz % identyczności sekwencji przy danym pokryciu sekwencji ludzkiego IFIT5 w indywidualnych

uliniowaniach. Wybrano przykłady homologicznych białek IFIT z różnych organizmów – człowieka, królika, żółwia i ryb, przy czym niektóre rybnie homologi IFIT posiadały sekwencję podobną w ok. 20% do sekwencji ludzkiego białka IFIT5. Stwierdzono, że homologi białek IFIT1 i IFIT5 są rozpowszechnione wśród kręgowców i ustalono dolną granicę identyczności sekwencji dla prawdopodobnych homologów IFIT na 20% przy pokryciu większości sekwencji ludzkiego białka IFIT.

Na Fig. 6 podano również kilka przykładów białek bezkręgowców, które zostały w bazie danych NCBI oznaczone jako homologi białek IFIT oraz enzym UDP-N-acetylglicosamine--peptide N-acetylglicosaminytransferase, który był częstym wynikiem wyszukiwania. Niektóre z tych białek posiadają motywy TPR oraz % identyczności sekwencji przekraczający 20% w porównaniu do ludzkich białek IFIT, choć są mało prawdopodobnym strukturalnym i funkcjonalnym odpowiednikiem białka IFIT. Wprowadzono więc pomocnicze kryterium dla identyfikacji homologów białek IFIT, którym jest występowanie ważnego strukturalnie motywu o sekwencji CHF<sub>x</sub>W (gdzie x jest aminokwasem będącym przeważnie T). Motyw CHF<sub>x</sub>W przyjmuje konformację helikalnego skrętu między helisami alfa w poddomenie I białek IFIT i jest najprawdopodobniej istotny dla prawidłowego zwijania lub stabilności białka IFIT. Strukturalne homologi białek IFIT, dla których dostępna jest pełna sekwencja w bazie danych NCBI, charakteryzują się obecnością motywu CHF<sub>x</sub>W, co pokazuje uliniowanie białek IFIT w tym rejonie pokazane na Fig. 7 (osiągnięte przy pomocy algorytmu Clustal Omega dostępnego w narzędziach NCBI).

### **Przykład 6**

#### **Ocena jakości i składu próby RNA uzyskanej sposobem według wynalazku po doświadczeniach typu pull-down**

Cząsteczki RNA wyselekcjonowane sposobem według wynalazku opisanym w Przykładzie 1 z zastosowaniem rhIFIT1 i całkowitego RNA z drożdży oraz rhIFIT5 i całkowitego RNA z bakterii analizowano za pomocą elektroforezy kapilarnej w urządzeniu Bioanalyzer (z zestawem Agilent RNA 6000 Nano Kit, zgodnie z protokołem producenta).

Wykazano, że frakcja rRNA w próbach RNA pozyskanych na drodze doświadczeń typu pull-down jest znacznie zredukowana (Fig. 8), co wskazuje, że sposób według wynalazku można wykorzystać do rybodeplecji (usunięcia rRNA) i wzbogacenia w cząsteczki mRNA i niektórych niekodujących regulatorowych RNA w celu przygotowania próby do sekwencjonowania RNA.

### **Przykład 7**

#### **Wzbogacanie materiału RNA sposobem według wynalazku do przygotowania próby RNA do wysokoprzepustowego sekwencjonowania opartego na nanoporach**

Cząsteczki RNA wyselekcjonowane sposobem według wynalazku opisanym w Przykładzie 1 z zastosowaniem rhIFIT1 i całkowitego RNA z drożdży oraz rhIFIT5 i całkowitego RNA z bakterii wykorzystano do przygotowania RNA do bezpośredniego sekwencjonowania na nanoporach. RNA uwolnione z kompleksów z białkami IFIT zostały poddane poliadenylacji (Poly(A) (z wykorzystaniem zestawu Tailing Kit, Invitrogen, zgodnie z protokołem producenta). Następnie przeprowadzono

wysokoprzepustowe sekwencjonowanie z wykorzystaniem urządzenia MinION (Oxford Nanopore, zgodnie z protokołem producenta).

Wstępna analiza uzyskanych wyników wykazała, że próba RNA po doświadczeniach typu pull-down jest wzbogacona w cząsteczki mRNA, natomiast frakcja rRNA i tRNA uległa zmniejszeniu.

### **Przykład 8**

#### **Wzbogacanie materiału RNA sposobem według wynalazku do detekcji RNA patogenu w testach diagnostycznych**

Sposób selekcji i/lub wzbogacania RNA według wynalazku, w tym eksperymenty typu pull-down przeprowadzono analogicznie do przedstawionych powyżej w Przykładzie 3. Następnie, wzbogacony RNA poddano dalszej analizie w kierunku wykrycia obecności specyficznego RNA pochodzącego od patogenu *Listeria monocytogenes* w badanej próbce poprzez test kolorymetryczny z użyciem komercyjnego zestawu do RT-LAMP (np. WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA), New England Biolabs, według zaleceń producenta). Test RT-LAMP łączy odwrotną transkrypcję, izotermiczną amplifikację kwasów nukleinowych i odczyt przez zmianę koloru reakcji w jednym.

Wstępne wyniki wykazały wzbogacenie RNA uzyskanego sposobem według wynalazku w porównaniu z próbką wyjściową i wynikającą ze sposobu zwiększoną czułość testu. Wykazano, że wzbogacenie cząsteczek RNA może stanowić etap testu diagnostycznego służącego wykrywaniu obecności patogenu. Wzbogacenie materiału RNA patogenu w próbkach pobranych od pacjentów z podejrzeniem zakażenia zwiększa czułość i selektywność testów diagnostycznych.

Zgłaszający: Uniwersytet Warszawski

Pełnomocnik: Karina Kaczkowska

  
**Karina Kaczkowska**  
rzecznik patentowy

**Lista sekwencji****SEQ ID NO:1 - sekwencja aminokwasowa ludzkiego białka IFIT1**

MSTNGDDHQVKDSLEQLRCHFTWELSIDDDDEMPDLENRVLDQIEFLDTKYSVGIHLLAYVKHLKGQ  
 NEEALKSLKEAENLMQEEHDNQANVRSVLTWGNFAWMYYHMGRLEAEQTYLDKVENICKKLSNPF  
 YRMECPEIDCEEGWALLKCGGKNYERAKACFEKVLVDPENPESSAGYAISAYRLDGFKATKNH  
 FSLLPLRQAVRLNPDNGYIKVLLALKLQDEGQEAEGEKYIEEALANMSSQTYVFRYAAKFYRRKGS  
 VDKALELLKALQETPTSVLLHHQIGLCYKAQMIQIKEATKGQPRGQNREKLDKMIRSAIFHFESAVE  
 KPTFEVAHLDLARMYIEAGNHRKAEENFQKLLCMKPVVEETMQDIHFHYGRFQEFQKKSDVNAI  
 IHHYLLKAIKIEQASLTRDKSINSLKLVLRKLRKALDLESLSLLGFVYKLEGNMNEALEYERAL  
 RLAADFENSVRQGP

**SEQ ID NO:2 - sekwencja aminokwasowa ludzkiego białka IFIT5**

MSEIRKDTLKAILLELECHFTWNLLKEDIDLFEVEDTIGQQLEFLTTKSRLALYNLLAYVKHLKGQ  
 NKALECLEQAEIIQQEHSKDKEEVRSVLTWGNAYAWVYHMDQLEEAQKYTGKIGNVCKKLSSPS  
 NYKLECPETDCEKGWALLKFGGKYYQAKAAFEKALEVEPDNPEFNIGYAITVYRLDSDREGSVK  
 SFSLSGPLRKAVTLNPDNSYIKVFLALKLQDVHAEAEGEKYIEEILDQISSQPYVLRYAAKFY  
 RRKNSWNAKALELLKALEVTPTSSFLHHQMGLCYRAQMIQIKKATHNRPKGGDKLVDELIS  
 SAIFHFKAAMERDSMFAFAYTDLANMYAEGGQYSNAEDIFRKALRLENITDDHKHQIHYHYGR  
 FQEFHRKSENTAIHHYLEALKVKDRSPLRTKLTSAKKLSTKRLCHNALDVQSLSALGFVYKLEGE  
 KRQAAEYKAKQKIDPENAEFLTALCELRLS

**SEQ ID NO:3 - sekwencja aminokwasowa króliczego białka IFIT1**

MWNPQRTRARSQRAQSGSGNLQTSASFATMSECAEEHPLKDRLQKLRCHFTWGLLIEDTGLPDLE  
 DRILEEIQFLDTENKVGYNLLAYVKHLQGHEDALENLKEAEVVOGDQADHSDVRSVLTWGN  
 YAWVHYHMGRLADAQTYLDKVENTCQKSADPTRYSTQCPMDCEEGWALLKCGGKNYERAKAC  
 FEKALEADPENPEFNITGYAITVYRLDYPARPCDVSDAFSLQPLRKAIRLNPDAYLKALLAL  
 KLQDVGEEAEGRECLEEALHTSSQTYVFRYAAKFFRRQGRVDEALKYLMALKATPSSAFLH  
 QQIGLCYKKTNTQIMNATHMQPTRQDRENVDRLIQLAIFHFEYAVKQKPTFEVAYVDLARMY  
 ITAGDHEKAEDTFQKVLKMTPLQEHIQQNIHFSYGQFQQFQKKSEVDAITHYLQAVTIRKDSY  
 ARDKSIKALEQLVSWKLERNPLDQEALS LREVLHRLVGGRDEALECSEQDLRLAADSGN  
 WVGSSS

**SEQ ID NO:4 - sekwencja aminokwasowa rybiego białka IFIT12B z *Danio rerio***

MTSDVSSMEADRALRTKLHQLECHFTWALIKDDIDINDLLNRLEEQINLDLEKKERLARTYSALAYVQY  
 LLGFHEKAHQSLMTSKKLHIESHGDEFYRTLIVTYGNLAWLNHYHMKNYTECESYLNLSQRINETS  
 PAEFSSIPEVLGEKGWTFKFSRKYDGAKECFRKAVELEPEEPEWHTGYAIALYRTEFESTVLEDSATVK  
 QLRLAIEMNPDVLLKVLVLSRLIVYKRYGEAESWVEKALEKSPDHPHVMRYVGGKFFRNKGCVDRS  
 IDLLKRALERSPNSSFIHHQLALCYKYKKIQVLQEQSHHARGSRVQQLRDQCIFHLEKATSLTTS  
 FISAMSDLALQYGENGDIPRAEELFQVTFKIAKEKNDGLHVVNYYYAEYQLYCHRCEPLAVQHYME  
 CLKMCPKSVEGRISSTRMKKTAEKWIDRKSQEGKAYGMLAFLHKVKGGEIAQAIECYEKALS  
 YEDNNEFLRNLRELRLSLL

Zgłaszający: Uniwersytet Warszawski

Pełnomocnik: Karina Kaczowska

*Karina Kaczowska*  
**Karina Kaczowska**  
 rzecznik patentowy