



Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk

TOMASZ MAGACZ

*OPRACOWANIE METOD UMOŻLIWIAJĄCYCH WYKORZYSTANIE
TECHNIK MIKROMACIERZOWYCH W RÓŻNICOWEJ ANALIZIE
AKUMULACJI LUDZKICH MIKRORNA*

Rozprawa doktorska

Praca wykonana
w Pracowni Biologii Molekularnej i Systemowej
pod kierunkiem
prof. dr hab. Marka Figlerowicza

Poznań 2012

Spis treści

SPIS TREŚCI.....	2
STRESZCZENIE	5
SUMMARY.....	6
WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW	7
1. WSTĘP	10
1.1. UDZIAŁ RNA W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW.....	11
1.2. MAŁE REGULATOROWE RNA.....	13
1.3. MIKRORNA	15
1.3.1. NOMENKLATURA MIRNA.....	16
1.3.2. GENY I BIOGENEZA MIRNA	17
1.4. MIRNA U CZŁOWIEKA.....	23
1.4.1. MIRNA W NOWOTWORACH	26
1.4.2. MIRNA W REGULACJI HEMATOPOEZY	33
1.5. METODY BADANIA MIRNA.....	37
1.6. MIKROMACIERZE DNA.....	40
1.6.1. PODSTAWY TEORETYCZNE.....	40
1.6.2. PRODUKCJA MIKROMACIERZY.....	41
1.6.3. EKSPERYMENT MIKROMACIERZOWY	42
1.7. BIAŁACZKI I ICH PODZIAŁ.....	45
1.7.1. OSTRA BIAŁACZKA SZPIKOWA.....	47
2. CEL PRACY.....	53
3. MATERIAŁY.....	54
3.1. PODSTAWOWE ODCZYNNIKI.....	54
3.2. ROZTWORY I BUFORY	55
3.3. GOTOWE ZESTAWY ODCZYNNIKÓW	57
3.4. POŻYWKI	57
3.5. SZKIEŁKA PODSTAWOWE DO DRUKOWANIA MIKROMACIERZY	60
3.6. APARATURA I DROBNY SPRZĘT LABORATORYJNY	60
3.7. OPROGRAMOWANIE.....	61

4. METODY	62
4.1. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO.....	62
4.1.1. HODOWLA I OTRZYMYWANIE KOMÓREK HL-60 I HELA.....	62
4.1.2. IZOLACJA KOMÓREK JEDNOJĄDRZASTYCH Z KRWI ORAZ SZPIKU	62
4.2. OTRZYMANIE FRAKCJI NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA.....	64
4.2.1. IZOLACJA NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA.....	64
4.2.2. FRAKCJONOWANIE NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA.....	66
4.2.3. WYTRĄCANIE NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA.....	67
4.2.4. AMPLIFIKACJA NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA	68
4.3. ANALIZA JAKOŚCIOWA RNA	72
4.4. ZNAKOWANIE NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA	72
4.4.1. ZNAKOWANIE ENZYMATYCZNE NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA	72
4.5. DRUKOWANIE MIKROMACIERZY	75
4.6. HYBRYDYZACJA MIKROMACIERZY.....	76
4.6.1. HYBRYDYZACJA RĘCZNA – ZNAKOWANIE ENZYMATYCZNE	76
4.6.2. HYBRYDYZACJA AUTOMATYCZNA– ZNAKOWANIE ENZYMATYCZNE	78
4.6.3. HYBRYDYZACJA AUTOMATYCZNA – ZNAKOWANIE CHEMICZNE	80
4.7. SKANOWANIE MIKROMACIERZY	80
4.8. ANALIZA DANYCH	81
5. WYNIKI I DyskusJA.....	82
5.1. PROJEKTOWANIE MIKROMACIERZY.....	82
5.1.1. SONDY.....	82
5.1.2. POWIERZCHNIE DO DRUKOWANIA	85
5.1.3. PROJEKTOWANIE I PRZYGOTOWANIE MIKROMACIERZY	87
5.2. Uzyskiwanie NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA	90
5.2.1. IZOLACJA FRAKCJI NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA.....	90
5.3. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA.....	95
5.4. ZNAKOWANIE NISKOCZĄSTECzkOWYCH RNA	97
5.5. ANALIZA AKUMULACJI miRNA W KOMÓRKACH JEDNOJĄDRZASTYCH POBRANYCH OD PACJENTÓW Z OSTRĄ BIAŁACzkĄ SZPIKOWĄ TyPU M1 I M2.....	103
5.5.1. PRÓBKI KLINICZNE	103
5.5.2. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA RNA.....	104
5.5.3. EKSPERYMENTY MIKROMACIERZOWE	106
5.6. ANALIZA WYNIKÓW HYBRYDYZACJI MIKROMACIERZY	109
5.6.1. WSTĘPNA ANALIZA BIOINFORMATYCZNA	109
5.6.2. SCHEMAT ANALIZY	112
5.6.3. ANALIZA RÓŻNICOWA PRÓBEK KLINICZNYCH.....	117
5.6.3.1. ANALIZA JAKOŚCI MIKROMACIERZY	117
5.6.3.2. ANALIZA RÓŻNICOWA	121
5.7. PODSUMOWANIE.....	123
6. BIBLIOGRAFIA	126

7. ZAŁĄCZNIKI 142

ZAŁĄCZNIK 1. – LISTA SOND UŻYTYCH DO DRUKOWANIA MIKROMACIERZY 142
ZAŁĄCZNIK 2. .LISTA SOND „PREDICTED” WALIDOWANYCH W MIRBASE..... 168
ZAŁĄCZNIK 3. LISTA PACJENTÓW CIERPIĄCYCH NA AML, OD KTÓRYCH POBRANO ASPIRATY KRWI I
SZPIKU UŻYTE W EKSPERYMENTACH MIKROMACIERZOWYCH. 173
ZAŁĄCZNIK 4. LISTA PRÓBEK NISKOCZĄSTECZKOWYCH RNA..... 174
ZAŁĄCZNIK 5. ZGODA NA WYKORZYSTANIE W PRACY RYSUNKÓW Z PUBLIKACJI..... 176

Streszczenie

MikroRNA (miRNA) są klasą naturalnie występujących niekodujących RNA o długości ok. 21 nukleotydów. Kodowane w genomie miRNA wyzwalane są z większych dwuniciowych transkryptów w wieloetapowym procesie zachodzącym zarówno w jądrze komórkowym jak i cytoplazmie. Dojrzały jednoniciowy miRNA zostaje włączony do wyciszającego kompleksu rybonukleoproteinowego (RISC) odpowiedzialnego za regulację procesu ekspresji genów. Każdy miRNA jest częściowo lub całkowicie komplementarny do kilku lub kilkudziesięciu mRNA. Po włączeniu do kompleksu rybonukleoproteinowego miRNA pełni funkcję sond kierujących RISC do docelowych transkryptów. W rezultacie mRNA ulega degradacji lub jego translacja zostaje zahamowana. Udowodniono, że miRNA uczestniczą w procesach indukujących przejście komórek z jednego stanu czynnościowego w inny tak o charakterze fizjologicznym: różnicowanie, programowana śmierć komórki, jak i patologicznym: nowotworzenie. Z uwagi na fakt, że u człowieka zidentyfikowano już ponad 2000 dojrzałych miRNA ich potencjał regulacyjny i wpływ na losy komórki jest nie do przecenienia. Dlatego też stworzenie metod kompleksowej analizy miRNA jest niezbędne dla lepszego zrozumienia przebiegu różnych procesów rozwojowych lub chorobowych.

Podstawowym celem niniejszej pracy było opracowanie metod umożliwiających wykorzystanie technik mikromacierzowych w różnicowej analizie akumulacji ludzkich miRNA.

Aby osiągnąć ten cel opracowałem pełną ścieżkę analizy mikromacierzowej miRNA obejmującą: (i) zaprojektowanie i wykonanie mikromacierzy dedykowanej miRNA, (ii) optymalizację metod pozyskiwania materiału biologicznego i izolacji frakcji niskocząsteczkowych RNA, (iii) optymalizację metod znakowania i hybrydyzacji RNA do mikromacierzy, oraz (iv) obróbkę bioinformatyczną i statystyczną uzyskanych wyników.

W ostatnim etapie badań chcąc wykazać przydatność opracowanej metody przeprowadziłem wstępną analizę różnicową akumulacji ludzkich miRNA w komórkach jednojądrzastych uzyskanych z krwi i szpiku pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę szpikową typu M1 i M2.

Summary

MicroRNAs (miRNAs) are a class of naturally occurring non-coding RNAs about 21 nucleotides in length). Genome encoded miRNAs are excised from longer double-stranded RNA transcripts in a multistage process occurring both in nucleus and cytoplasm. Mature single-stranded miRNA species are then incorporated into a ribonucleoprotein silencing complex (RISC) playing important role in gene expression regulation. Every miRNA is partially or fully complementary to one or more cellular mRNAs. Thus, miRNA guides RISC silencing complex to target transcripts. In result target mRNA molecules are degraded or their translation is inhibited. It has been shown that miRNAs can induce a transition of cells from one functional state to other as well as physiological (differentiation, programmed cell death), or pathological (oncogenesis). Due to the fact, that more than 2000 different human miRNAs were identified up to date their regulatory potential and impact on cell fate is not to be underestimated. Therefore it is necessary to develop the assays enabling a comprehensive miRNA analysis in order to gain a better understanding of various developmental and pathological processes.

The main purpose of the present thesis was a development of techniques enabling usage of DNA microarray methods in a differential analysis of human miRNAs expression patterns.

In order to achieve the above-mentioned goal I have developed a complete DNA microarray-based procedure of miRNA analysis. This procedure comprises: (i) design and production of a microarray dedicated to detect human miRNAs, (ii) optimization of biological material acquisition and small RNA isolation, (iii) optimization of small RNA labeling and microarray hybridization, (iv) bioinformatic and statistical analysis of acquired data.

In the last phase of my research in order to prove a usefulness of developed methods I have conducted a preliminary differential analysis of miRNA accumulation in blood and bone marrow mononuclear cells obtained from acute myeloid leukemia patients.

Wykaz skrótów i akronimów

- AML – *ang. acute myeloid leukemia* – ostra białaczka szpikowa
- ATP – *ang. adenosine-5'-triphosphate* – adenozy-5'-trifosforan
- BSA – *ang. bovine serum albumin* – surowicza albumina bydłęca
- CGH – *ang. comparative genomic hybridization* – porównawcza hybrydyzacja genomowa
- CLL – *ang. chronic lymphoid leukemia* – przewlekła białaczka limfoblastyczna
- CML – *ang. chronic myeloid leukemia* – przewlekła białaczka szpikowa
- CTP – *ang. cytidine-5'-triphosphate* – cytydino-5'-trifosforan
- Cy3 / Cy5 – *ang. cyanine 3/5* – cyjanina 3/5
- DEPC – *ang. diethylpyrocarbonate* – dietylopirowęglan
- DGCR8 – *ang. DiGeorge syndrome critical region gene 8* – region krytyczny dla zespołu DiGeorge gen 8
- dNTP – *ang. deoxyribonucleotide triphosphate* – trifosforany deoksynukleotydów
- dsRNA – *ang. double stranded RNA* – dwuniciowy RNA
- dTTP – *ang. 2'-deoxythymidine-5'-triphosphate* – 2'-deoksytymidyno-5'-trifosforan
- DTT – *ang. dithiothreitol* – ditiotreitól (1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol)
- EDTA – *ang. ethylenediaminetetraacetic acid* – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- FBS – *ang. foetal bovine serum* – bydłęca surowica płodowa
- GAL – *ang. Gene Array List* – lista macierzy genów (rozszerzenie pliku komputerowego)
- GPR – *ang. GenePix Results* – wyniki GenePix (rozszerzenie pliku komputerowego)
- GTP – *ang. guanosine-5'-triphosphate* – guanozy-5'-trifosforan

KIT – *ang. Mast/stem cell growth factor receptor Kit* – receptor czynnika wzrostu komórek macierzystych/tucznych KIT

LNA – *ang. locked nucleic acid* – kwas nukleinowy o usztywnionej konformacji

miRNP – *ang. microRNA ribonucleoprotein complex* – kompleks rybonukleoproteinowy związany z mikroRNA

miRNA – *ang. microRNA* – mikroRNA

MYC – *ang. Myc proto-oncogene protein* – proto-onkogen Myc

PCR – *ang. polymerase chain reaction* – łańcuchowa reakcja polimerazy

piRNA – *ang. Piwi-interacting RNA* – RNA oddziałujące z białkami Piwi

PMT (gain) – *ang. photomultiplier gain* – amplifikacja sygnału przez fotopowielacz

PTC – *ang. papillary thyroid carcinoma* – rak pęcherzykowy tarczycy

PV – *ang. polycythemia vera* – czerwienica prawdziwa

qRT-PCR – *ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

RISC – *ang. RNA-induced silencing complex* – indukowany RNA kompleks wyciszający

RPM – *ang. revolutions per minute* – obroty na minutę

RT – *ang. reverse transcription* – odwrotna transkrypcja

SDS – *ang. sodium dodecyl sulfate* – laurylosiarczan sodu, dodecylosiarczan(VI) sodu

siRNA – *ang. small interfering RNA* – małe interferujące RNA

SSC – *ang. sodium saline citrate buffer* – bufor zawierający chlorek sodu i cytrynian sodu

TGF- α – *ang. transforming growth factor alpha* - transformujący czynnik wzrostu alfa

TNF- α – *ang. tumor necrosis factor α* – czynnik nekrozy nowotworu alfa

Tris – *ang. tris(hydroxymethyl)aminomethane* – tris(hidroksymetylo)aminoetan

UTP – *ang. uridine-5'-triphosphate* – urydyno-5'-trifosforan

VSN – *ang. Variance Stabilization and Normalization* – stabilizacja wariancji
i normalizacja (dla danych mikromacierzowych)

I. Wstęp

Na przełomie XX i XXI wieku jednym z największych wyzwań biologii molekularnej było ukończenie zapoczątkowanego w 1990 roku projektu sekwencjonowania genomu człowieka (Human Genome Project)^{1,2}. Gdy 14 kwietnia 2003 roku opublikowano ostateczne wyniki projektu³ wielu naukowców niemalże euforycznie zapowiadało nastanie nowej ery dla ludzkości. Thomas Michael Dexter, ówczesny dyrektor Wellcome Trust (fundacji, która współfinansowała badania) stwierdził: „*Kilka miesięcy temu porównałem nasz projekt do wynalezienia koła. Po refleksji uważam, że jest czymś więcej. Mogę sobie wyobrazić, że technologia spowoduje, że koło stanie się przestarzałe, a ten kod jest esencją człowieczeństwa*”⁴. W rzeczywistości sama znajomość sekwencji genów, których liczbę oszacowano na ok. 30 tysięcy, bez wystarczającej wiedzy na temat ścieżek regulacji aktywności genomu była i wciąż jest niewystarczająca dla opisu skomplikowanych procesów molekularnych zachodzących w komórkach. Pomimo iż każda dojrzała ludzka komórka (za wyjątkiem erytrocytów i gamet) zawiera ten sam zestaw genów, jedynie część z nich jest aktywna w danym momencie determinując m.in. specyficzność tkankową, stan fizjologiczny czy reakcję na bodźce egzo- i endogenne. Z tego też powodu w ostatnim dziesięcioleciu wysiłki biologów molekularnych skupione zostały na poszukiwaniu mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę ekspresji genów. W rezultacie repertuar znanych systemów regulacyjnych funkcjonujących np. poprzez czynniki transkrypcyjne, acetylację i deacetylację białek histonowych lub metylację DNA poszerzony został o mechanizmy wykorzystujące niewielkie, 20-30 nukleotydowe regulatorowe cząsteczki RNA. Pełnią one w komórkach eukariotycznych rozliczne funkcje, biorąc m.in. udział w: remodelowaniu struktury chromatyny, transkrypcji, segregacji chromosomów, obróbce i stabilizacji RNA czy translacji. Zważywszy na fakt, iż krótkie RNA zazwyczaj hamują ekspresję genów (choć istnieją wyjątki od tej reguły), związany z nimi proces regulacji został nazwany interferencją RNA (RNAi – ang. *RNA interference*) lub też wyciszaniem RNA (ang. *RNA silencing*).

¹ CANTOR, C.R., *Nature*, (1990), s. 106.

² WATSON, J.D., *Science* (1990), s. 44.

³ VENTER, J.C., *Science* (2003), s. 1183.

⁴ DEXTER, T.M., (2000).

I.1. Udział RNA w regulacji ekspresji genów

W procesie RNAi krótkie RNA wiążą się z białkami efektorowymi i decydują o specyficzności oddziaływań powstałego kompleksu rybonukleoproteinowego z docelową cząsteczką RNA lub DNA. Kompleks ten może łączyć się jedynie z cząsteczkami wykazującymi znaczny stopień komplementarności do wbudowanego krótkiego RNA. Wobec tego jeśli sekwencja nukleotydowa krótkiego RNA jest głównym czynnikiem determinującym efekt wyciszenia, to praktyczne możliwości wykorzystania zjawiska RNAi w regulacji ekspresji genów wydają się wprost nieograniczone. Nie może zatem dziwić, iż odkrywcy interferencji RNA, Craig C. Mello i Andrew Fire, uhonorowani zostali w 2006 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie Fizjologii i Medycyny. W swojej pionierskiej pracy opublikowanej na łamach *Nature* udowodnili oni, że iniekcja do robaka *Caenorhabditis elegans* dwuniciowego RNA, którego jedna nić była komplementarna a druga homologiczna do fragmentu mRNA powoduje jego wyciszenie⁵.

Należy zaakcentować, że efekty działania mechanizmu RNAi były już wcześniej obserwowane i opisywane w literaturze, choć brakowało wówczas spójnej teorii tłumaczącej uzyskiwane wyniki. Na początku lat 90 ubiegłego stulecia grupa pod kierunkiem Richarda Jorgensena oraz Carolyn Napoli z Uniwersytetu w Arizonie starała się wpłynąć na kolor kwiatów petunii ogrodowej (*Petunia hybrida*), poprzez zwiększenie ekspresji syntazy chalkonowej, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za pigmentację kwiatów. Paradoksalnie wprowadzenie kilku kopii transgeny, zamiast zaowocować fenotypem o intensywniejszym kolorze, spowodowało pojawienie się jaśniejszych lub całkiem białych kwiatów, co sugerowało znaczne obniżenie aktywności enzymu. Analiza poziomu akumulacji mRNA i białka potwierdziła obniżenie poziomu ekspresji zarówno transgeny jak i endogennego genu syntazy chalkonowej⁶. W tym konkretnym przypadku udowodniono zależność, zgodnie z którą za nagłe obniżenie ekspresji genu syntazy chalkonowej po transformacji roślin odpowiada zwiększona szybkość degradacji mRNA tego genu⁷. Fenomen ten określano

⁵ FIRE, A., *Nature* (1998), s. 806.

⁶ NAPOLI, C., *Plant Cell* (1990), s. 278.

⁷ VAN BLOKLAND, R., *Plant Journal* (1994), s. 861.

mianem kosupresji⁸, jednakże mechanizm molekularny tego zjawiska pozostawał nieznany.

U workowca *Neurospora crassa* opisano podobne zjawisko wyciszania poprzez transformację komórek DNA homologicznym do wyciszanego genu i określono je mianem tłumienia ang. *quelling*⁹.

Dalsze obserwacje związane były z odpornością roślin na infekcje wirusowe. Wiadomym było, że wprowadzenie do rośliny na drodze transgenezy endogennych białek wirusowych (głównie białek płaszczka) zwiększało jej tolerancję i odporność na infekcję danym typem wirusa. Co ciekawe podobny efekt uzyskiwano gdy zamiast genu kodującego białko wirusowe wprowadzano krótki niekodujący fragment genomu wirusowego¹⁰. W eksperymencie, w którym do genomu wirusa wprowadzano krótkie fragmenty genów roślinnych również zaobserwowano supresję danego genu w infekowanej roślinie. Proces ten nazwano wyciszaniem indukowanym wirusem (ang. *virus-induced gene silencing* – VIGS), z kolei wyżej opisane mechanizmy zbiorczo nazwano potranskrypcyjnym wyciszaniem genów¹¹.

Wymaga podkreślenia, że chociaż pierwsze badania dotyczyły jedynie kilku grup organizmów (grzyby, robaki obłe, rośliny) to fenomen RNAi jest obecny we wszystkich *Eucaryota*. Należy też nadmienić, iż dotychczas zidentyfikowano kilka ścieżek działania mechanizmu RNAi, i tak może on:

- (i) wpływać na strukturę genomu i w ten sposób decydować, które jego fragmenty ulegają transkrypcji (przekształcanie euchromatyny w heterochromatynę oraz tzw. transkrypcyjne wyciszanie genów, ang. *transcriptional gene silencing* – TGS),
- (ii) powodować specyficzną degradację mRNA (potranskrypcyjne wyciszanie genów, ang. *posttranscriptional gene silencing* – PTGS),
- (iii) selektywnie hamować translację wybranych cząsteczek mRNA (represja translacji, ang. *translational repression* – TR).

⁸ JORGENSEN, R.A., *Science* (1995), s. 686.

⁹ ROMANO, N., *Mol Microbiol.* (1992), s. 3343.

¹⁰ BAULCOMBE, D.C., *Plant Cell*, (1996), s. 1833.

¹¹ RATCLIFF, F., *Science*, (1997), s. 1558.

We wszystkich przypadkach w proces RNAi zaangażowane są małe niekodujące, regulatorowe RNA.

I.2. Małe regulatorowe RNA

Aktualnie znanych jest wiele rodzajów krótkich RNA występujących w komórkach, wszakże z uwagi na ich pochodzenie, rolę, biogenezę i działanie możemy wyróżnić trzy podstawowe typy: siRNA (krótkie interferujące RNA ang. *small interfering RNAs*), miRNA (mikroRNA ang. *micro RNAs*) oraz piRNA (RNA oddziałujące z białkami PIWI ang. *piwi-interacting RNAs*). Wydaje się, że wszystkie te grupy regulatorowych RNA są charakterystyczne dla *Eucaryota*. Niemniej obecność u niektórych bakterii i *Archea*^{12,13} białek podobnych do białek z rodziny Argonaute (zaangażowanych w mechanizm wyciszania genów u *Eucaryota*) może sugerować obecność mechanizmów podobnych do RNAi także u *Procaryota*. Podstawowe cechy wyżej wymienionych grup krótkich regulatorowych RNA przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela I. Grupy małych regulatorowych RNA – cechy charakterystyczne

Nazwa	Prekursory	Występowanie	Białka odpowiedzialne za wyciszenie zależne od RNA
siRNA	Dwuniciowe	Rośliny/zwierzęta	Ago
miRNA	Dwuniciowe	Rośliny/zwierzęta	Ago
piRNA	Jednociowe ¹⁴	Zwierzęta – ograniczone do linii komórek płciowych	Piwi

Zarówno siRNA jak i miRNA posiadają wiele cech wspólnych, tak pod względem ich biogenezy, jak i mechanizmu działania, stąd na początku tego przeglądu chciałbym skupić się na aspektach wspólnych dla obu tych dużych grup, a następnie

¹² MORITA, T., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2006), s. 4858.

¹³ MAKAROVA, K.S., *Biol Direct*, (2006), s. 7.

¹⁴ MALONE, C.D., *Cell*, (2009), s. 522.

zwrócić uwagę na kwestie charakterystyczne dla miRNA. W sposób szczególny pragnę zwrócić uwagę na funkcje miRNA w specjalizacji komórkowej, apoptozie i onkogenezie u człowieka oraz w modelach zwierzęcych.

Mając na względzie historię odkryć związanych z małymi regulatorowymi RNA nie sposób nie wymienić kilku pionierskich prac bezpośrednio związanych z tym zagadnieniem. I tak w 1993 roku zidentyfikowano pierwszy miRNA. Był nim lin-4, kontrolujący rozwój larwy *C. elegans*¹⁵. Pięć lat później opisano mechanizm RNAi. Z kolei rok 1999 przyniósł odkrycie związku między wyciszaniem genów u roślin a obecnością w komórkach krótkich, 20-25 nt RNA, o sekwencji komplementarnej do fragmentu wyciszanego genu. W tym samym roku zaproponowano mechanizm procesu bezpośredniej konwersji dłuższych cząsteczek dsRNA w 21-23 nt siRNA¹⁶. Natomiast już w połowie 2001 roku Lagos-Quintana i Lau opisali na łamach *Science* odkrycie dużej grupy krótkich RNA, które zakwalifikowano do rodziny miRNA. Ich obecność potwierdzono u kilku gatunków roślin i zwierząt, co wskazywało na powszechność związanych z nimi ścieżek regulacyjnych u *Eucaryota*^{17,18}.

W tym czasie powstały dwie teorie dotyczące funkcji siRNA i miRNA w komórce, zgodnie z którymi kodowane w genomie miRNA pełniłyby funkcje regulatorowe dla endogennych genów, natomiast siRNA jawiły się jako „strażnicy genomu”, chroniący komórkę przed egzogennymi kwasami nukleinowymi: wirusami, transgenami, czy też transpozonami¹⁹. W obu przypadkach potwierdzono obecność jednoniciowych cząsteczek regulatorowych RNA w kompleksie z białkami efektorowymi²⁰. Rybonukleoproteinę tę nazywano kompleksem wyciszającym indukowanym RNA (ang. *RNA-induced silencing complex* – RISC)²¹. W zależności od wiązanego RNA wyróżniono odpowiednio siRISC i miRISC. Pierwotnie siRNA i miRNA wiązano wyłącznie z potranskrypcyjnym wyciszaniem genów. Założenie to nie okazało się być uniwersalną regułą, szczególnie w przypadku siRNA²², które w pewnych przypadkach pełnią rolę regulacyjną już na etapie transkrypcji.

¹⁵ LEE, R.C., *Cell*, (1993), s. 843.

¹⁶ TOMARI, Y., *Genes Dev.*, (2005), s. 517.

¹⁷ LAGOS-QUINTANA, M., *Science*, (2001), s. 853.

¹⁸ LAU, N.C., *Science*, (2001), s. 858.

¹⁹ MALONE, C.D., *Cell*, (2009), s. 656.

²⁰ MEISTER, G., *Nature*, (2004), s. 343.

²¹ HAMMOND, S.M., *Nature*, (2000), s. 293.

²² LIPPMAN, Z., *Nature*, (2004), s. 364.

Czynnikiem determinującym to, który z genów zostanie wyciszony jest sekwencja nukleotydowa rybonukleinowego komponentu kompleksu RISC. Decyduje ona o specyficzności oddziaływań pomiędzy regulatorowym RNA a docelowym mRNA. Dzięki temu system ten jest bardzo elastyczny i łatwo dostosowuje się do nowych warunków środowiskowych i potrzeb komórki. Jeśli sytuacja wymaga zmiany profilu ekspresji genów, aktywacja odpowiedniego zestawu miRNA umożliwia przeprogramowanie komórki i wprowadzenie jej na nową ścieżkę rozwojową lub skierowanie jej na drogę programowanej śmierci. Z kolei pojawienie się nowych zagrożeń w postaci egzogennych kwasów nukleinowych powoduje włączenie zjawiska RNAi. Powstają wówczas specyficzne siRNA, hamujące ekspresję obcych genów. W ten sposób zwiększa się wydatnie adaptowalność komórek w sytuacji infekcji.

I.3. mikroRNA

MikroRNA (miRNA) można zdefiniować jako ok. 20-23 nukleotydowe cząsteczki RNA będące posttranskrypcyjnymi regulatorami ekspresji genów. miRNA wiążą się z komplementarnymi docelowymi mRNA i jako część kompleksu nukleoproteidowego RISC indukują represję translacji lub degradację transkryptu, a tym samym wyciszenie danego genu^{23,24}. Regulacja ekspresji genów poprzez działanie miRNA jest szeroko rozpowszechnionym mechanizmem u większości *Eucaryota*, za wyjątkiem grzybów²⁵, gdzie nie potwierdzono dotychczas obecności miRNA. Przypuszcza się, że ludzki genom może kodować ponad 2000 różnych miRNA²⁶, a około 60% ludzkich transkryptów zawiera sekwencje docelowe dla miRNA²⁷. Szacunki te w wyraźny sposób pokazują jak ważną rolę w regulacji ekspresji genów odgrywają miRNA.

²³ BARTEL, D.P., *Cell*, (2004), s. 281.

²⁴ BARTEL, D.P., *Cell*, (2009), s. 215.

²⁵ NAKAYASHIKI, H., *Curr Opin Microbiol*, (2008), s. 494.

²⁶ BENTWICH, I., *Nat Genet*, (2005), s. 766.

²⁷ FRIEDMAN, R.C., *Genome Res*, (2009), s. 92.

I.3.1. Nomenklatura miRNA

Stosownie do przyjętych powszechnie zasad wszystkie nowoodkryte miRNA muszą być potwierdzone eksperymentalnie poprzez klonowanie lub też poprzez zweryfikowanie ich ekspresji i obróbki w komórce. Eksperymentalnie potwierdzonym miRNA nadawane są nazwy wg następujących reguł^{28,29}:

- (i) nazwa składa się z przedrostka „mir”, po którym kolejno następują myślnik i oznaczenie numeryczne, przy czym użycie „mir” małymi literami wskazuje na odnoszenie się do prekursora (pre-miRNA), z kolei zastosowanie przedrostka „miR” oznacza odwołanie się dojrzałego miRNA, jak np. mir-20 oznacza pre-miRNA, natomiast miR-20 odnosi się do dojrzałego miRNA o numerze 20;
- (ii) oznaczenia numeryczne są nadawane rosnąco według kolejności deponowania w bazie MiRBase poszczególnych miRNA;
- (iii) nazwy miRNA posiadających zbliżone sekwencje (różniących się jednym lub dwoma nukleotydami) zawierają dodatkowo przyrostek literowy: np. miR-125a i miR-125b;
- (iv) w przypadku pre-miRNA, które są prekursorami identycznych dojrzałych miRNA, jednak kodowanych przez różne fragmenty genomu do podstawowej nazwy dołączany jest myślnik i oznaczenie numeryczne jak w przypadku mir-194-1 i mir-194-2;
- (v) trzyliterowy przedrostek przed nazwą miRNA określa gatunek, z którego dany miRNA pochodzi, wywodząc się bezpośrednio z łacińskiej nazwy gatunku np. hsa-miR-155 (*Homo sapiens*), mmu-miR-21 (*Mus musculus*), gga-miR-105 (*Gallus gallus*);
- (vi) gdy dwa miRNA są produktami obróbki jednego pre-miRNA oznacza się je odpowiednio przyrostkami 3p lub 5p. W przypadku gdy względny poziom akumulacji obu z nich jest znany, miRNA o niższej akumulacji w porównaniu do drugiego miRNA wywodzącego się z tego samego pre-miRNA oznacza się gwiazdką – „*”, jak np. w przypadku miR-123 i miR-123*.

²⁸ AMBROS, V., *RNA*, (2003), s. 277.

²⁹ GRIFFITHS-JONES, S., R., *Nucleic Acid Res*, (2006), s. 140.

I.3.2. Geny i biogeneza miRNA

Ponad połowa genów miRNA (ok. 60%) znajduje się w rejonach genomu zidentyfikowanych wcześniej jako sekwencje międzygenowe oraz w niciach antysensownych w stosunku do genów kodujących białka. Tworzą one odrębne jednostki transkrypcyjne, charakteryzujące się obecnością specyficznych promotorów i sekwencji regulatorowych^{30,31,32}. Pozostałe geny miRNA (ok. 40%) znajdują się w intronach genów kodujących białka, w intronach genów niekodujących albo w eksonach (często genów, które same regulują)³³. W przypadku gdy miRNA zakodowane są w intronach lub eksonach, zazwyczaj, choć nie zawsze, ich geny znajdują się w orientacji sensownej w stosunku do genów, w obrębie których się znajdują^{34,35}, przez co ich ekspresja jest regulowana wraz z genami „gospodarzami”^{36,37}. Pozostałe geny kodujące miRNA cechują się obecnością specyficznego dlań promotora. W poszukiwaniach nowych potencjalnych miRNA można zatem wykorzystywać metody bioinformatyczne za pomocą których identyfikowane są sekwencje posiadające cechy charakterystyczne dla promotorów genów miRNA. Wyróżnić należy także szeroką grupę rodzin miRNA (ok. 30% wszystkich miRNA) wywodzących się z policistronowych jednostek transkrypcyjnych (tzw. klastrów), których produktami są długie cząsteczki prekursorowe zawierające od 2 do 7 wewnętrznych struktur spinkowych, z których wycinane są dojrzałe miRNA³⁸. Co więcej dowiedziono, że przynajmniej część z tych klastrów ulega wspólnej specyficznej tkankowo ekspresji^{39,40,41}. Nie oznacza to wszakże, iż miRNA należące do jednej rodziny zawsze posiadają zbliżoną sekwencję zasad lub funkcję.

Polimeraza RNA III bierze udział w transkrypcji wielu małych RNA występujących w komórce m.in. tRNA, czy U6 snRNA. Z uwagi na ten fakt początkowo sugerowano, że enzym ten odpowiada także za transkrypcję prekursorów

³⁰ LEE, Y., *EMBO J.*, (2004), s. 4051.

³¹ LEE, R.C., *Science*, (2001), s. 862.

³² RODRIGUEZ, A., *Genome Res.*, (2004), s. 1902.

³³ CAI, X., *RNA*, (2004), s. 1957.

³⁴ WEBER, M.J., *FEBS J.*, (2005), s. 59.

³⁵ KIM, Y.K., *EMBO J.*, (2007), s. 775.

³⁶ BASKERVILLE, S., *RNA*, (2005), s. 241.

³⁷ ALTUVIA, Y., *Nucleic Acids Res.*, (2005), s. 2697.

³⁸ ZHOU, X., *PLoS Comput Biol.*, (2007), s. 37.

³⁹ LANDGRAF, P., *Cell*, (2007), s. 1401.

⁴⁰ WITTEN, D., *BMC Biol.*, (2010), s. 58.

⁴¹ CHIANG, H.R., *Genes Dev.*, (2010), s. 992.

miRNA. Jednakże kilka faktów przeczyło powyższej hipotezie. Po pierwsze pri-miRNA mają długość sięgającą kilku tysięcy zasad oraz zawierają w sobie sekwencje ponad czterech powtórzonych po sobie reszt urydylowych, które są sygnałem terminacji transkrypcji przez polimerazę RNA III⁴². Smalheiser analizując sekwencje cDNA zdeponowane w bazach danych EST wykazał obecność dużej ilości chimerowych transkryptów zawierających sekwencje miRNA wraz z przyległymi fragmentami mRNA⁴³. Nadto wiele z wyżej wspomnianych EST jest poliadenylowanych i ulega splicingowi, co nie ma miejsca w przypadku transkryptów generowanych przez polimerazę RNA III. Poza tym wspomniane wcześniej specyficzne promotory genów miRNA wykazują podobieństwo sekwencyjne do promotorów polimerazy RNA II⁴⁴, co sugeruje udział właśnie tego enzymu w pierwszym etapie biogenezy miRNA.

Sekwencja dojrzałego miRNA znajduje się w jednym z ramion ok. 80 nukleotydowej struktury „spinki do włosów”, zawartej w dłuższym pierwotnym transkrypcie prekursorowym nazywanym pri-miRNA (ang. *primary miRNA*). Pri-miRNA na końcu 5' jest modyfikowany resztą 7-metyloguanozyny, z kolei koniec 3' jest poliadenylowany. Długość transkryptów pri-miRNA jest zróżnicowana. Na uwagę zasługuje brak korelacji pomiędzy długością transkryptu a ilością miRNA w nim się znajdujących. Na przykład, zidentyfikowano 2200 nukleotydowy transkrypt zawierający trzy miRNA (miR-23a, miR-27a oraz miR-24-2) oraz 3400 nukleotydowy transkrypt, w którym występuje pojedynczy mir-21 (oba te transkrypty nie podlegają splicingowi). Dla odmiany pri-miRNA dla miR-155 zawiera dwa introny oraz dwa alternatywne miejsca poliadenylacji, dając w rezultacie dwa złożone pri-miRNA o długości odpowiednio ok. 600 oraz 1400 nukleotydów.

Obróbka pri-miRNA odbywa się w jądrze komórkowym, przy udziale kompleksu enzymatycznego, w którym główną rolę pełni rybonukleaza typu III – Drosha (określana także jako Rybonukleaza 3)⁴⁵. U człowieka występują trzy rybonukleazy klasy III, z czego jedna jest zlokalizowana w mitochondriach i najprawdopodobniej uczestniczy w dojrzewaniu mitochondrialnego rRNA. Pozostałe dwie są zaangażowane w biogenezę miRNA, z czego wyżej wspomniana Drosha występuje w jądrze. Natomiast Dicer jest cytoplazmatycznym enzymem, biorącym

⁴² LEE, Y., *EMBO J*, (2002), s. 4663.

⁴³ SMALHEISER, N.R. *Genome Biol.*, (2003), s. 403.

⁴⁴ FALLER, M., *Biochim Biophys Acta*, (2008), s. 663.

⁴⁵ LEE, Y., *Nature*, (2003), s. 415.

udział w końcowym etapie generowania miRNA. Charakterystyczną cechą opisywanych rybonukleaz jest specyficzność substratowa wobec dwuniciowego RNA (ang. *double-stranded RNA* – dsRNA). Jak wcześniej wspomniałem sekwencja miRNA znajduje się w strukturze spinki do włosów i każda z komplementarnych nici może zawierać dojrzały miRNA. U człowieka za generowanie pre-miRNA (ang. *precursor miRNA*) odpowiedzialny jest kompleks białkowy nazywany „mikroprocesorem”⁴⁶ o wielkości ok. 600 kDa, będący heterotetramerem zawierającym dwie cząsteczki białka Drosha oraz dwie DGCR8 (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*)^{47,48}. Białko DGCR8 zawiera dwie domeny wiążące dwuniciowy RNA i uczestniczy w rozpoznawaniu substratu przez kompleks, podczas gdy Drosha odpowiada za aktywność nukleazową. Produktem nukleolitycznego cięcia pri-miRNA są cząsteczki pre-miRNA o długości ok. 70 nt.^{49,50}. Poza tym podczas powstawania pre-miRNA w miejscu cięcia na jednej z nici pozostaje 2-3 nukleotydowe niesparowanie. Istnieje jednak alternatywna ścieżka powstawania pre-miRNA bez udziału kompleksu „mikroprocesora”. Podczas splicingu niektórych pri-miRNA następuje uwolnienie intronu, który swoją strukturą jest na tyle zbliżony do pre-miRNA, że bezpośrednio może wejść w dalsze etapy biogenezy miRNA, bez udziału mikroprocesora^{51,52}. Te tzw. „mirtrony” nie występują często, jednak zidentyfikowano je u dużej ilości gatunków.

Eksport pre-miRNA odbywa się poprzez system porów jądrowych, przy udziale Eksportyny 5. Białko to należy do rodziny nukleoporyn i jest rozpuszczalnym receptorem zależnym od białka RAN i GTP⁵³. Eksportyna 5 jest też zaliczana do rodziny karioferyn, transporterów zależnych od kofaktora RAN. RAN jest GTPazą, która po związaniu z GTP wiąże się z karioferynami. W tej formie jest transportowana do jądra, gdzie tworzy się heterotrimer składający się z RAN-GTP, Eksportyny 5 i pre-miRNA^{54,55}. Podobnie jak Drosha, Eksportyna 5 rozpoznaje specyficzne motywy strukturalne w pre-miRNA (strukturę spinki i niesparowanie na końcu 3’), dzięki czemu

⁴⁶ GREGORY, R. I., *Nature*, (2004), s. 235.

⁴⁷ LANDTHALER, M., *Curr Biol*, (2004), s. 2162.

⁴⁸ HAN, J., *Genes Dev.*, (2004), s. 3016.

⁴⁹ DENLI, A. M., *Nature*, (2004), s. 231.

⁵⁰ GREGORY, R. I., *Nature*, (2004), s. 235.

⁵¹ OKAMURA, K., *Cell*, (2007), s. 89.

⁵² RUBY, J.G., *Nature*, (2007), s. 83.

⁵³ LUND, E., *Science*, (2004), s. 95.

⁵⁴ YI, R., *Genes Dev*, (2003), s. 3011.

⁵⁵ BOHNSACK, M.T., *RNA*, (2004), s. 185.

eksport prekursorów miRNA jest niezależny od sekwencji⁵⁶. Wydaje się także, że Eksportyna 5 stabilizuje pre-miRNA w jądrze komórkowym. Stwierdzono bowiem, że wyciszenie kodującego ją genu (*XPO5*) prowadzi do obniżenia ilości dojrzałego miRNA w cytoplazmie, przy jednoczesnym spadku ilości prekursorów w jądrze. Natomiast zwiększenie ekspresji tego genu skutkuje dwukrotnym zwiększeniem ilości dojrzałych miRNA w cytoplazmie i ponad pięciokrotnym ich prekursorów w jądrze komórkowym⁵⁷.

W ostatnim, cytoplazmatycznym etapie biogenezy miRNA główną rolę ponownie odgrywa kompleks endonukleaza – białko pomocnicze. W tym przypadku endonukleaza klasy III Dicer wycina z prekursora dojrzały miRNA w formie dupleksu miRNA:miRNA* o długości ~ 20 nt. Białkiem pomocniczym jest TRBP (ang. *the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*⁵⁸), zawierające trzy domeny wiążące dwuniciowy RNA. TRBP jest niezbędne do stworzenia funkcjonalnego kompleksu między nukleazą Dicer a białkami Ago. Te ostatnie są katalitycznym składnikiem kompleksu wyciszającego RISC⁵⁹, nazywanego czasami także miRNP (ang. *microRNA ribonucleoprotein complex*)⁶⁰. Podczas procesu tworzenia kompleksu RISC dochodzi do selekcji nici miRNA. Dupleks miRNA:miRNA* ulega rozpleceniu, a następnie jedna z nici zwana nicią wiodącą (ang. *guide strand*) jest inkorporowana do miRISC. Spośród dwóch nici wybierana jest ta, która tworzy na końcu 5' słabsze oddziaływanie typu Watsona-Cricka^{61,62,63}. Druga z nici jest oznaczana * i zazwyczaj jest degradowana. W niektórych jednak przypadkach obie nici dupleksu są funkcjonalne i regulują różne grupy mRNA⁶⁴, choć jednocześnie tylko jedna z nich jest związana w kompleksie miRISC.

Kompleks miRISC oprócz wymienionych wcześniej białek i miRNA zawiera dodatkowe składniki białkowe: PACT (ang. *protein activator of the interferon induced protein kinase*), kompleks SMN (ang. *survival of motor neurons*), białko FMRP (ang. *fragile X mental retardation protein*), oraz Tudor-SN (ang. *Tudor staphylococcal*

⁵⁶ GWIZDEK, C., *J Biol Chem*, (2001), s. 25910.

⁵⁷ YI, R., *RNA*, (2005), s. 220.

⁵⁸ GATIGNOL, A., *Science*, (1991), s. 1597.

⁵⁹ CHENDRIMADA, T.P., *Nature*, (2005), s. 740.

⁶⁰ SCHWARZ, D.S., *Genes Dev*, (2002), s. 1025.

⁶¹ KROL, J., *J Biol Chem*, (2004), s. 42230.

⁶² KHVOROVA, A., *Cell*, (2003), s. 209.

⁶³ SCHWARZ, D.S., *Cell*, (2003), s. 199.

⁶⁴ OKAMURA, K., *Cell Cycle*, (2008), s. 2840.

nuclease-domain-containing protein)^{65,66}. Jak już wcześniej nadmieniałem za wyciszenie ekspresji genu bezpośrednio odpowiadają białka z rodziny Argonaute⁶⁷, jednak w zależności od stopnia komplementarności między miRNA a mRNA może dojść do:

(i) katalizowanego przez AGO2 przecięcia mRNA i jego degradacji. Dzieje się tak, gdy miRNA jest w pełni komplementarna do mRNA. AGO2 hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe w mRNA pomiędzy 10 a 11 nukleotydem nici wiodącej (licząc od końca 5')⁶⁸, w rezultacie cząsteczka mRNA staje się celem dla komórkowych nukleaz;

(ii) inhibicji translacji. Ma ona miejsce w przypadku niepełnej komplementarności pomiędzy miRNA i mRNA. Kompleks RISC może wiązać się do reszty 7-metyloguanozyny na końcu 5' mRNA, uniemożliwiając tym samym wiązanie czynnika inicjującego eIF4-E (ang. *Eukaryotic translation initiation factor 4E*). Z kolei interakcja kompleksu RISC z białkiem EIF6 (ang. *Eukaryotic translation initiation factor 6*), odpowiedzialnym za asocjację podjednostek rybosomalnych przeciwdziała formowaniu rybosomów, poprzez sekwestrację białka EIF6⁶⁹. Inhibicja translacji prowadzi do akumulacji wyciszanych mRNA w cytoplazmatycznych ciałkach P, gdzie są degradowane⁷⁰.

Warunkiem *sin equa non* dla inhibicji translacji jest obecność w cząsteczce miRNA jedynie 7-8 nukleotydów komplementarnych do docelowego transkryptu. Ten kluczowy rejon w cząsteczce miRNA nazywany jest z ang. *seed region*. Również swoiste cechy miejsca komplementarnego do *seed region* w 3' UTR docelowego mRNA są konieczne dla efektywnego wiązania miRNA m.in.: odległość min. 15 nt od kodonu „stop”, czy też obecność dużej ilości powtórzeń AU w pobliżu miejsca wiązania⁷¹. Z uwagi na fakt, że sekwencje komplementarne do *seed region* danego miRNA występują zazwyczaj w wielu różnych transkryptach każdy miRNA może regulować poziom ekspresji wielu genów. Tym samym potencjał regulacyjny miRNA jest wydatnie zwiększony.

Cały proces biogenezy i działania miRNA przedstawiono na Rysunku 1.

⁶⁵ MURCHISON, E.P., *Curr Opin Cell Biol*, (2004), s. 223.

⁶⁶ MOURELATOS, Z., *Genes Dev.*, (2002), s. 720.

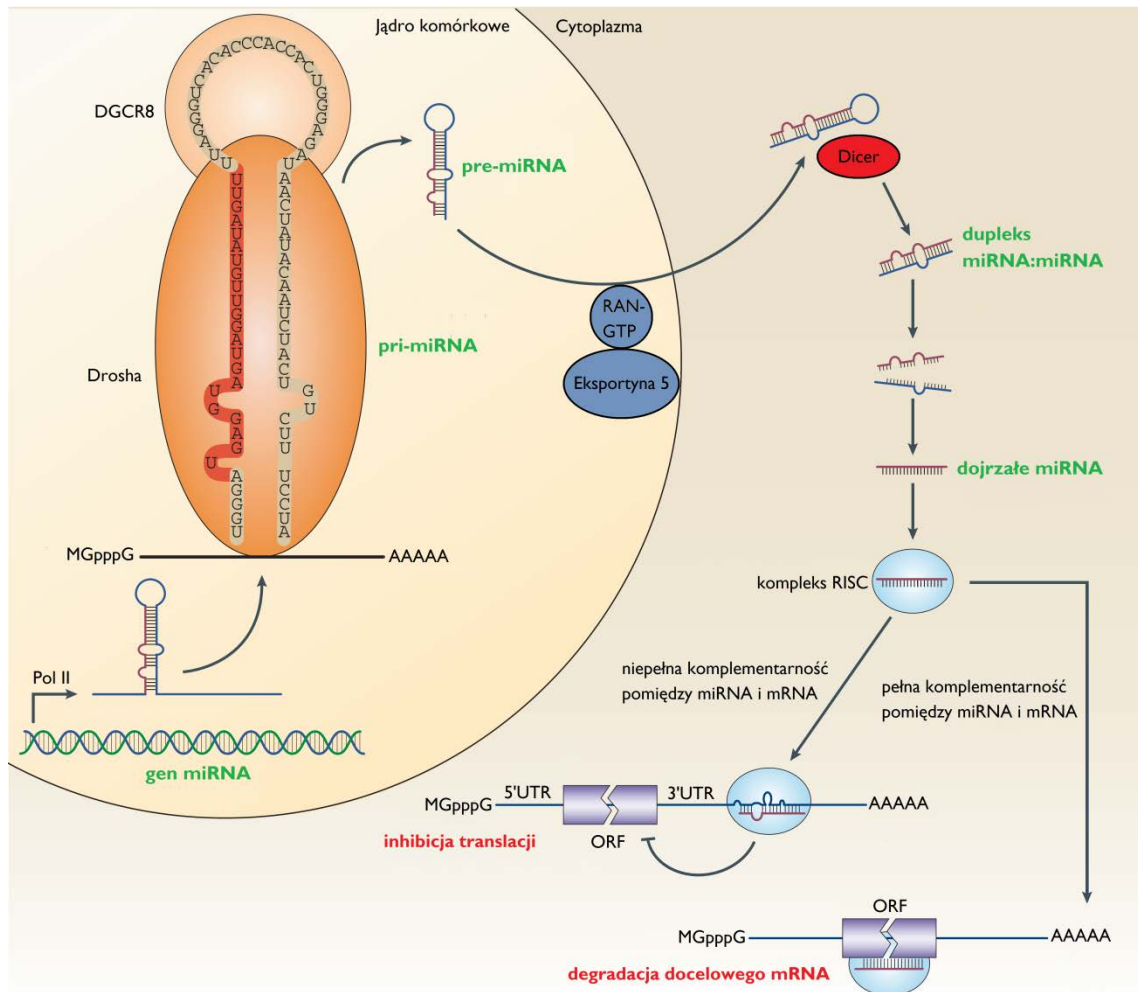
⁶⁷ HOCK, J., *Genome biol.*, (2008), s. 210.

⁶⁸ MARTINEZ J., *Genes Dev*, (2004), s. 975.

⁶⁹ CHENDRIMADA, T. P., *Nature*, (2007), s. 823.

⁷⁰ SEN, G. L., *Nat. Cell Biol.*, (2005), s. 633.

⁷¹ GRIMSON, A., *Mol Cell*, (2007), s. 91.



Rysunek 1. Biogeneza miRNA oraz indukowane przez miRNA wyciszenia ekspresji genów (za zgodą⁷²).

Powyżej przedstawiłem ogólnie przyjęty, „kanoniczny” model biogenezy i działania miRNA, jednakże od tego modelu istnieje kilka wyjątków. Prócz opisanych wyżej „mirtronów” omijających jądrową ścieżkę dojrzewania miRNA odkryto również szlak biogenezy miRNA, w którym nie uczestniczy rybonukleaza Dicer. W przypadku wysoce konserwatywnego u kręgowców miR-451, pre-miRNA o długości 42 nukleotydów jest bezpośrednio wiązany przez białko AGO2. Następnie jest przycinany przez AGO2 do dojrzałego miR-451⁷³ o długości ~ 23 nt.

Kolejnym wyjątkowym zjawiskiem jest zdolność niektórych miRNA do aktywowania translacji zamiast jej wyciszenia w zależności od stanu fizjologicznego komórki. Sekwencje bogate w AU (ang. *AREs* – *AU-rich elements*) są

⁷² ESQUELA-KERSCHER A., *Nature*, (2006), s. 259.

⁷³ YANG, J.S., *Cell Cycle*, (2010), s. 4455.

konserwatywnymi sekwencjami zlokalizowanymi w nieulegających translacji końcach 3' mRNA genów podlegających regulacji przez miRNA. Gdy komórka jest w stanie stacjonarnym ARE znajdujące się w mRNA genu czynnika nekrozy nowotworu α (TNF α – ang. *tumor necrosis factor α*) łączą się z miR369-3 i związanymi z nim białkami, przez co wzrasta wydajność translacji. Najprawdopodobniej odbywa się to poprzez stabilizację docelowego mRNA. W analogiczny sposób pierwszy zidentyfikowany miRNA let-7 oraz sztuczne miRNA miRcxcr4 mogą aktywować translację docelowych mRNA. Jednak w przypadku tych samych komórek będących w stadium proliferacji miRNA te hamują translację TNF α ⁷⁴.

Koniecznym do szybkiej regulacji ekspresji genów jest także mechanizm usuwania zbędnych miRNA. Mechanizm ten umożliwia przystosowanie się komórki do zmieniających się warunków. Degradacja miRNA u zwierząt jest katalizowana przez egzorybonukleazę XRN2 ⁷⁵. Proces ten ma miejsce w ciałka P ⁷⁶. Wiadomo ponadto, że podczas procesu dojrzewania w cytoplazmie, wiązanie miRNA z białkami Ago zwiększa jego stabilność. Ostatnio Kai opisał mechanizm nazwany „użyj lub strać” – ang. „*Use it or Lose it*”, który zakłada, że wraz ze wzrostem stężenia docelowych transkryptów wzrasta czas półtrwania odpowiadających im miRNA ⁷⁷.

I.4. miRNA u człowieka

W największej bazie miRNA, miRBase (wersja 19.0, sierpień 2012), afiliowanej przy Uniwersytecie w Manchesterze, zdeponowano 1600 sekwencji pre-miRNA oraz 2042 sekwencji dojrzałych miRNA kodowanych w ludzkim genomie. Ilość ta potwierdza wcześniejsze szacunki zakładające, że ludzki genom może kodować ponad 1000 różnych miRNA. Co więcej, jak już wcześniej zaakcentowałem, ok. 60% ludzkich transkryptów zawiera sekwencje docelowe dla miRNA, co w połączeniu z faktem, iż jeden miRNA może regulować jednocześnie wiele transkryptów pokazuje dobitnie jak ważną rolę odgrywają miRNA w regulacji ekspresji genów u człowieka.

⁷⁴ VASUDEVAN, S., *Science*, (2007), s. 1931.

⁷⁵ CHATTERJEE, S., *Nature*, (2009), s. 546.

⁷⁶ CHAN, S.P., *RNA Biol*, (2006), s. 97.

⁷⁷ KAI, Z.S., *Nat Struct Mol Biol*, (2010), s. 5.

Co szczególnie istotne każda z ludzkich tkanek charakteryzuje się specyficznym dla niej zestawem miRNA. Zestaw ten zmienia się w trakcie życia komórki i często kontroluje proces jej przejścia z jednego stanu fizjologicznego w drugi, regulując wzrost, różnicowanie, odpowiedź immunologiczną, apoptozę, nowotworzenie itp.. Ta plastyczność umożliwia komórkom „przeprogramowanie” się na nową ścieżkę fizjologiczną w odpowiedzi na dany bodziec egzo- lub endogenny.

Funkcja wielu miRNA została dobrze udokumentowana i potwierdzona eksperymentalnie. Pełnią one kluczową rolę w różnicowaniu i rozwoju praktycznie wszystkich ludzkich tkanek. Przykładowo, miR-219 i miR-338 odpowiadają za różnicowanie oligodendrocytów w rozwijających się osłonkach mielinowych włókien nerwowych poprzez wyciszanie inhibitorów różnicowania, m.in. czynników transkrypcyjnych *Sox6* i *Hes5*⁷⁸. Natomiast zestaw czterech miRNA: miR-1, miR-133a, miR-133b oraz miR-206 konieczny jest podczas różnicowania mięśnia poprzecznie prążkowanego w życiu płodowym, w procesie przekształcania mioblastów w miotubule⁷⁹.

Doskonałą ilustracją potencjału regulacyjnego miRNA jest przypadek miR-155/BIC. Jego sekwencja zawiera się w obrębie innego genu – *BIC* (*BIC* – ang. *B-cell Integration Cluster* – klaster integracji limfocytów B), pomiędzy 241 a 262 nukleotydem. Gen *BIC*, o długości 13 kpz, występuje na dłuższym ramieniu chromosomu 21, w prążku q21.3, składa się z trzech eksonów i koduje nieposiadający otwartej ramki odczytu transkrypt o długości 1,5 kb⁸⁰. Rejon genomu zawierający miR-155/BIC cechuje się wysokim stopniem zachowawczości sekwencji między gatunkami m.in. pomiędzy człowiekiem, myszą, szczurem, czy kurą domową, co wskazuje na jego funkcjonalne znaczenie w komórkach tych organizmów. U człowieka miR-155 może pełnić zarówno funkcje ochronne, jak i regulować stan fizjologiczny komórki, a także być związany ze stanami patologicznymi. Zakłada się, że miR-155 może być zaangażowany w tak różne procesy jak: rozwój chorób sercowo-naczyniowych i nadciśnienia, odpowiedź immunologiczna i zapalna, stabilizacja genomu, różnicowanie komórek czy też odpowiedź na infekcje wirusowe lub nowotworzenie⁸¹. Rola ochronna miR-155 zazwyczaj polega na wyciszeniu docelowych genów, co

⁷⁸ ZHAO, X., *Neuron*, (2010), s. 612.

⁷⁹ KOUTSOULIDOU, A., *BMC Mol Biol*, (2011), s. 34.

⁸⁰ TAM, W., *Gene*, (2001), s. 157.

⁸¹ FARAONI, I., *Biochim Biophys Acta*, (2009), s. 497.

bezpośrednio wpływa na czas ich ekspresji oraz ilość kodowanego przez nie białka. W taki sposób jest regulowany przez miR-155 gen kodujący indukowaną aktywacją limfocytów B deaminazę cytydyny (ang. AID – *Activation-Induced Cytidine Deaminase*). Białko AID poprzez deaminację reszt deoksycytydyny w DNA (przekształcenie dC w dU) wprowadza mutacje w DNA genów limfocytów B przyczyniając się tym samym do zwiększenia różnorodności produkowanych przez nie limfocytów⁸². Cykliczne zmiany stężeń białka AID w różnych etapach odpowiedzi immunologicznej są kontrolowane przez współdziałanie dwóch miRNA: miR-155 i miR-93⁸³. Ze względu na udział w regulacji białka AID, miR-155 jest uznawany za odgrywający kluczową rolę w modulacji zarówno odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej. Mutacje w rejonie wiązania miR-155 przez mRNA genu AID uniemożliwiają jego wyciszenie prowadząc do niekontrolowanej progresji niedojrzałych form limfocytów B, a także zależnych od AID translokacji chromosomowych⁸⁴. Podobnie brak lub niedostateczna akumulacja miR-155 powoduje poważne zaburzenia pamięci immunologicznej i związane z nimi nawroty choroby wywoływanej tym samym patogenem⁸⁵, a także znaczne obniżenie poziomów przeciwciał typu IgG1. Ten ostatni fakt łączy się z towarzyszącą spadkowi poziomu miR-155 zwiększoną akumulacją czynnika transkrypcyjnego Pu.1, który regulując alternatywny splicing genów immunoglobulin wpływa na powstanie ich defektywnych izoform. miR-155 powstaje także w aktywowanych limfocytach B i T oraz makrofagach i komórkach dendrytycznych.

Reakcje zapalne wywoływane specyficznym bodźcem zewnętrznym, takim jak TNF α także są modulowane przez działanie miR-155. Anormalnie zwiększona akumulacja miR-155 prowadzić może do wystąpienia objawów atopowego zapalenia skóry poprzez wyciszenie ekspresji białka CTLA-4, którego brak powoduje wzmożenie proliferacji i stałą aktywację pomocniczych limfocytów T, a tym samym przewlekły stan zapalny skóry⁸⁶. W przypadku chorób autoimmunologicznych, takich jak

⁸² BRAR S.S., *DNA repair*, (2008), s. 77.

⁸³ BORCHERT, G. M., *BMC Cancer*, (2011), s. 347.

⁸⁴ CALAME, K., *Immunity*, (2007), s. 825.

⁸⁵ RODRIGUEZ, A., *Science*, (2007), s. 608.

⁸⁶ SONKOLY E., *J. Allergy Clin. Immunol.*, (2010), s. 581.

reumatoidalne zapalenie stawów, również stwierdzono podwyższenie poziomu miR-155 w fibroblastach stawów pacjentów⁸⁷.

Jednym z najważniejszych białek regulujących ciśnienie krwi jest receptor angiotensyny II - AT1R. W stanie fizjologicznym poziom ekspresji AT1R jest regulowany przez działanie miR-155. Polimorfizm genu AT1R w miejscu wiązania miR-155 uniemożliwia jego wyciszenie, co prowadzi do wzrostu ekspresji genu, a objawem klinicznym jest pojawienie się nadciśnienia tętniczego. Z kolei zwiększona akumulacja miR-155 skutkująca niedostateczną ilością białka AT1R występuje w przypadkach niedociśnienia^{88,89}.

Powyższe przykłady dobrze obrazują powszechność i uniwersalność kontroli procesów komórkowych przez miRNA. Regulacja ekspresji genów przez miRNA, jak każdy proces biologiczny, może ulegać zaburzeniom. Dochodzi do nich zarówno w sytuacji, gdy brak jest niezbędnego w danym momencie miRNA, jak i kiedy pojawia się niepożądany miRNA. W rezultacie inicjowane są procesy patologiczne, często prowadzące do wejścia komórki na drogę nowotworzenia.

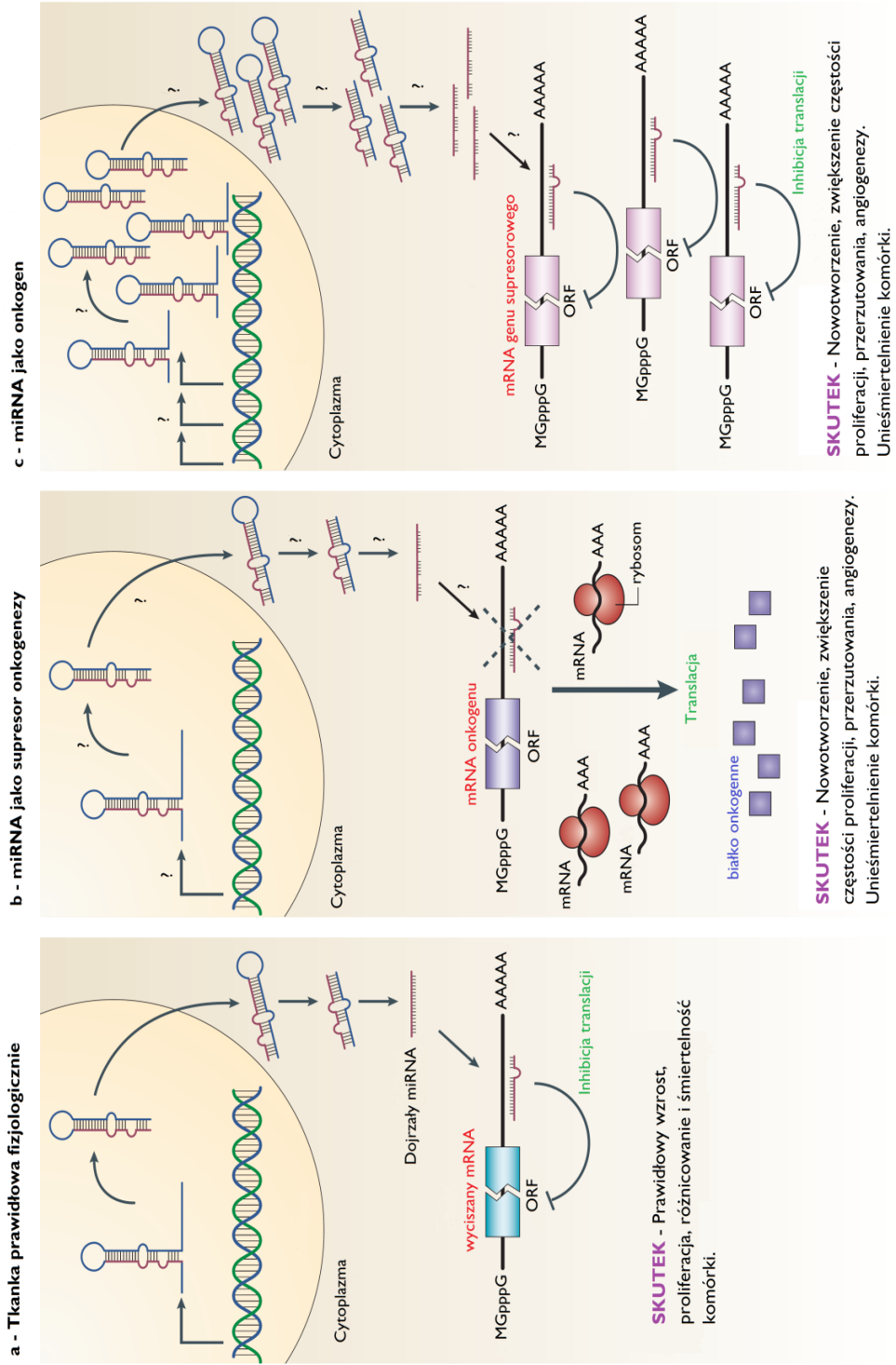
I.4.1. miRNA w nowotworach

Analiza wpływu miRNA na procesy nowotworzenia pozwala wyróżnić dwa podstawowe przypadki. W pierwszym wyciszający onkogen miRNA funkcjonuje jako inhibitor procesu nowotworzenia. Brak tego miRNA skutkuje ekspresją onkogenu i powstaniem onkogenego białka. W drugim miRNA pełni rolę onkogenu, hamując translację białka będącego inhibitorem onkogenezy. Schematycznie oba przypadki udziału miRNA w procesie nowotworzenia przedstawiono na Rysunku 2.

⁸⁷ KUROWSKA-STOLARSKA, M., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2011), s. 11193.

⁸⁸ MARTIN M.M., *J. Biol. Chem.*, (2007), s. 24262.

⁸⁹ CEOLOTTO, G., *Am. J. Hypertens*, (2011), s. 241.



Rysunek 2. Schemat działania miRNA w nowotworzeniu.

W nowotworach zmiana profilu ekspresji miRNA ma charakter globalny, nie dotyczy bowiem pojedynczych miRNA, a całego ich zestawu. Ostatnie badania wykazały istnienie ścisłej korelacji pomiędzy profilem ekspresji miRNA a danym typem nowotworu⁹⁰. Każdy ze znanych typów raka posiada specyficzny dla siebie zestaw miRNA, odróżniający go zarówno od zdrowej tkanki, z której wywodzą się komórki nowotworowe, jak i od innych rodzajów raka. Nadto ponad połowa znanych miRNA jest umiejscowiona w tzw. łamliwych rejonach genomu, o których wiadomo, iż z uwagi na swoją niestabilność i zwiększoną częstość mutacji mają istotny związek z rozwojem nowotworów⁹¹. Literatura dotycząca wpływu miRNA na nowotworzenie jest nadzwyczaj bogata, dlatego dla potrzeb tej pracy skupię się jedynie na wybranych przykładach.

Rodzina miRNA let-7 charakteryzuje się dużą zachowawczością i występuje u wszystkich dotychczas badanych zwierząt. Jeden z jej reprezentantów, let-7a, jest homologiem pierwszego miRNA odkrytego w 1993 roku u *C.elegans* przez Ambrosia. W przypadku człowieka wykazano, że reprezentanci rodziny let-7 regulują ekspresję rodziny onkogenów RAS. Geny RAS należą do grupy błonowych GTPaz sygnałowych regulujących różnicowanie i wzrost komórek. Aktywujące je mutacje występują wg różnych doniesień w 15-30% nowotworów. Początkowo miRNA z rodziny let-7 przypisywano rolę supresorów onkogenów z uwagi na fakt, iż występują one we wrażliwych rejonach chromosomów, w których zmiany wiązano z powstaniem i progresją raków płuc, piersi, pęcherza oraz szyjki macicy. O udziale miRNA let-7 w transformacji nowotworowej świadczy fakt, iż obniżenie ich ekspresji w nie-małokomórkowych rakach płuc odwrotnie koreluje ze stopniem inhibicji apoptozy i opornością linii nowotworowych na chemioterapię⁹². Suplementacja let-7 w hodowlach *in vitro* linii gruczolaka płuc zdecydowanie obniża progresję i proliferację komórek nowotworowych, co może sugerować użycie tego miRNA jako potencjalnego czynnika terapeutycznego. Okazało się, że let-7b wycisza ekspresję białka HMGA2, które jest onkogenem odpowiedzialnym za niekontrolowaną proliferację komórek nowotworowych. Niedostateczna ilość let-7b prowadzi do patologicznego

⁹⁰ LU, J., *Nature*, (2005), s. 834.

⁹¹ CALIN, G.A., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2004), s. 2999.

⁹² TAKAMIZAWA, J., *Cancer Res*, (2004), s. 3753.

podwyższenia poziomu HMGA2 w komórce, a tym samym zwiększa intensywność jej podziałów⁹³.

Pośród ponad 20 typów białaczek występujących u dorosłych najczęściej występującą jest przewlekła białaczka szpikowa (ang. *Chronic lymphocytic leukemia* – CLL). Najbardziej typową dla CLL aberracją chromosomalną jest delecja 13q14 diagnozowana u ponad połowy chorych⁹⁴. Delecja tego fragmentu chromosomu występuje także w innych nowotworach, a mianowicie: w 16-40% przypadków szpiczaka mnogiego, w 50% przypadków chłoniaka z komórek płaszczka oraz w 60% przypadków raka prostaty^{95,96,97}. Jednakże żaden z genów kodujących białka obecnych w rejonie podlegającym delecji nie wpływa bezpośrednio na proces przekształcenia limfocytów w linie białaczkowe. Tym niemniej w wyżej wspomnianym rejonie znajdują się dwa geny kodujące miRNA – miR-15 oraz miR-16-1. Aż u 68% pacjentów cierpiących na CLL zaobserwowano znaczne obniżenie ekspresji tych miRNA lub jej całkowite zahamowanie. Co więcej analiza Northern Blot u części pacjentów wykazała zwiększoną akumulację pre-mir-15a, co sugeruje nieprawidłową obróbkę cząsteczek prekursorowych dla tego genu⁹⁸. Nie można jednak wykluczyć także innych przyczyn transformacji limfocytów związanych z tą delecją. Klinicyści zauważyli już wcześniej, że pacjenci z delecją 13q14 charakteryzowali się zdecydowanie lepszą prognozą w porównaniu z pacjentami z innymi rodzajami aberracji chromosomowych – del(11q23), czy del(17p13)^{99,100}. Wynika to najprawdopodobniej z faktu, iż homologi genów miR-15 oraz miR-16-1, (odpowiednio *mir-15b* i *mir-16-2*.) znajdują się na chromosomie 3. W rezultacie produkcja obu miRNA u pacjentów z del(13q14) jest obniżona, ale nie całkowicie zahamowana.

Ostatnie badania mające na celu poznanie funkcji miR-15 oraz miR-16-1 wykazały, że akumulacja obu negatywnie koreluje z akumulacją inhibitora apoptozy BCL2¹⁰¹. Postranskrypcyjne wyciszenie kodującego go genu indukuje apoptozę

⁹³ LEE, Y. S., *Genes Dev*, (2007), s. 1025.

⁹⁴ BULLRICH, F., *Cancer Res*, (2001), s. 6640.

⁹⁵ KROGER, N., *Blood*, (2004), s. 4056.

⁹⁶ CAMPS, J., *Leuk Res*, (2006), s. 923.

⁹⁷ DONG, J.T., *Prostate*, (2001), s. 166.

⁹⁸ CALIN, G.A., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2002), s. 15524.

⁹⁹ DOHNER, H., *N Engl J Med*, (2000), s. 1910.

¹⁰⁰ OSCIER, D.G., *Blood*, (2002), s. 1177.

¹⁰¹ CIMMINO, A., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2005), s. 13944.

w zmienionych nowotworowo komórkach szpiku. Brak miR-15 oraz miR-16-1 może tłumaczyć zwiększoną przeżywalności komórek rakowych związanej z delecją 13q14.

W rakach piersi zidentyfikowano zestaw 15 miRNA, które wyraźnie ulegają deregulacji w porównaniu ze zdrową kontrolą. Na podstawie zmian w profilu ich ekspresji można precyzyjnie różnicować podtypy raka piersi, a także ocenić stan receptorów estrogenowych, stopień proliferacji oraz poziom unaczynienia guza. Pośród tych 15 genów największe różnice zauważono dla miR-21, miR-125b, miR-145 oraz miR-155¹⁰². Analogicznie jak w przypadku raka płuc, obniżona ekspresja let-7a sugeruje gorszą prognozę, związaną z przerzutami do węzłów chłonnych oraz wysokim indeksem proliferacji.

Kolejnym z onkogenów, którego mutacje są szeroko rozpowszechnione w wielu nowotworach jest gen *MYC*. Koduje on czynnik transkrypcyjny typu helisa-pętla-helisa. Czynnik ten bierze udział w regulacji transkrypcji genów, których produkty wpływają zarówno na podział komórek jak i na apoptozę. Na uwagę zasługuje fakt, że współgranie miRNA i *MYC* wyraża się szczególnie w nowotworach limfocytów B. W przypadku ostrej białaczki limfocytów B, w wyniku translokacji t(8;17) region kodujący *MYC* włączony zostaje w locus miR-142, tuż poniżej sekwencji kodującej prekursor miR-142. Tym samym gen *MYC* znajduje się pod kontrolą promotora tego miRNA. Dodatkowo delecja około 20-nukleotydowego fragmentu tuż poniżej promotora miR-142 wpływa na obróbkę pierwotnego transkryptu. Wzrasta jego stabilność, a w konsekwencji poziom ekspresji onkogenu *MYC*. W rezultacie dochodzi do transformacji nowotworowej limfocytów B¹⁰³.

Deregulacji w kilku różnych nowotworach ulega także mechanizm kontrolujący produkcję wspomnianego już wcześniej miR-155/BIC. Wykazano, że poziom ekspresji genu miR-155 jest obniżony ponad stukrotnie w chłoniaku Burkitt'a¹⁰⁴, z kolei inne badania wykazały wprost przeciwną sytuację w chłoniakach ziarnicznych oraz pierwotnym śródpiersiowym i rozproszonym chłoniaku wielokomórkowym limfocytów B¹⁰⁵.

¹⁰² IORIO, M.V., *Cancer Res*, (2005), s. 7065.

¹⁰³ RAMKISSOON, S.H., *Leuk Res*, (2006), s. 643.

¹⁰⁴ KLUIVER, J., *Gene Chromosome Canc*, (2006), s. 147.

¹⁰⁵ KLUIVER, J., *J Pathol*, (2005), s. 243.

Ustalono również korelację między obniżoną ekspresją miR-27b a zwiększoną ilością białka CYP1B1 (należącego do nadrodziny cytochromów P450-CYP) odpowiedzialnego między innymi za metabolizm leków¹⁰⁶. CYP1B1 występuje w dużym stężeniu, głównie w komórkach wrażliwych na estrogeny oraz zmienionych nowotworowo, katalizując między innymi aktywację rozlicznych proonkogenów, a także 4-hydroksylację 17 β -estradiolu. W ten sposób miRNA wpływa nie tylko na funkcje fizjologiczne komórki, czy transformację nowotworową, lecz także na wrażliwość pacjenta na leki, co ma istotne znaczenie w doborze kuracji i dawek podczas chemioterapii.

Analiza akumulacji miRNA w pęcherzykowym raku tarczycy (PTC) zaowocowała identyfikacją 5 miRNA różnicujących próbki chore od zdrowych. Lista ta zawierała m.in. miR-146, miR-221 i miR-222¹⁰⁷. Nowotwory ze znacznie zwiększoną akumulacją tych trzech miRNA charakteryzowały się drastycznie obniżoną ilością transkryptów genu *KIT*, a w konsekwencji białka będącego produktem jego ekspresji. Warto jest też podkreślić, że obserwowany w przypadku genu *KIT* polimorfizm 3' UTR dotyczy miejsc wiązania odpowiednio miR-146, miR-221 i miR-222. Można zatem sądzić, że poszczególne transkrypty polimorficzne posiadają różną zdolność wiązania każdego z miRNA. Stwierdzono ponadto, iż dwa spośród powyżej wspomnianych miRNA (miR-221 i miR-222) hamują wzrost linii komórkowej erytroleukemii TR-1 w sposób zależny od *KIT*. Reasumując dane te wskazują na potencjalnie onkogenny charakter wymienionych miRNA.

Dotychczas opisane miRNA pochodziły z różnych transkryptów. Inaczej jest w przypadku klastra miR-17-92, zawierającego aż 7 miRNA: miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 oraz miR-92-1 zlokalizowanych wewnątrz niekodującego białka transkryptu C13orf25. Klaster miR17-92 znajduje się we fragmencie chromosomu 13q31, który podlega częstej amplifikacji w nowotworach. Ma to między innymi miejsce w rozproszonym wielkokomórkowym chłoniaku limfocytów B, chłoniaku pęcherzykowym, chłoniaku z komórek płaszczka oraz pierwotnym ostrym chłoniaku limfocytów B, gdzie wykazano, że klaster miR-17-92 podlega podwyższonej ekspresji w 65% próbek zbadanych chłoniaków¹⁰⁸.

¹⁰⁶ TSUCHIYA, Y., *Cancer Res.*, (2006), s. 9090.

¹⁰⁷ HE, H., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2005), 19075.

¹⁰⁸ HE, L., *Nature*, (2005), s. 828.

Aby zbadać wpływ tej grupy miRNA na transformację nowotworową wyizolowano komórki macierzyste szpiku z transgenicznych myszy zawierających w genomie ludzki gen *MYC*. Otrzymane komórki dodatkowo transformowano wektorem retrowirusowym niosącym sekwencję kodującą klastery miR-17-19b-1. Tak zmienione komórki wszczepiano myszom typu dzikiego, poddanym uprzednio subletalnej dawce promieniowania celem zniszczenia ich własnego szpiku. Myszy te rozwinęły złośliwe chłoniaki po ok. 50 dniach, o wiele szybciej niż kontrolne myszy wykazujące ekspresję jedynie genu *Myc* (3-6 miesięcy). Podobne eksperymenty, w których zastosowano transgeniczne komórki macierzyste transformowane *MYC*, a następnie genami kodującymi 96 niezwiązanych ze sobą miRNA lub też genem kodującym pojedyncze miRNA z klastra miR-17-19b-1 nie doprowadziły do uzyskania myszy wykazujących zwiększoną zachorowalność na chłoniaki. Uzyskane wyniki wskazują zatem na istnienie korelacji pomiędzy ekspresją *MYC* a aktywacją onkogenów zawartych w klastrze miR-17-19b-1. Należące do tej grupy miRNA mogą wyciszać czynniki apoptotyczne, stąd nowotwory charakteryzujące się zwiększoną ekspresją *MYC* oraz klastra miR-17-19b-1 wykazują szczególnie niską śmiertelność komórek. W momencie zaburzenia prawidłowej ścieżki apoptozy, produkty genu *MYC* mogą powodować niekontrolowaną proliferację komórek i w efekcie raka¹⁰⁹. Fakt ten potwierdzają doniesienia o podwyższonej ekspresji produktów klastra miR-17-19b-1 u pacjentów cierpiących na bardzo różne nowotwory takie jak: przewlekła białaczka limfoblastyczna typu B, rak płuc, mięsaki i tłuszczaki.

Zupełnie niezależnie wykazano, że produkty onkogeny *MYC* wiążą się bezpośrednio z pierwszym intronem genu *C13orf25* i regulują jego ekspresję¹¹⁰. Na podstawie analizy bioinformatycznej wytypowano potencjalny docelowy mRNA wyciszany przez dwa miRNA z klastra miR-17-19b-1 (miR17-5p oraz miR-20a). mRNA ten koduje czynnik transkrypcyjny E2F1 zaangażowany w procesy związane z przejściem komórek z fazy G1 do fazy S. E2F1 reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za replikację DNA, podział komórki oraz apoptozę. Wyciszenie genów miR17-5p oraz miR-20a w hodowlach tkankowych powoduje wzrost akumulacji czynnika E2F1, bez zmiany ilości jego mRNA w komórce. Obserwowane zmiany w sposób oczywisty wskazują, iż gen ten jest regulowany poprzez małe RNA na drodze

¹⁰⁹ TAGAWA, H., *Canc Sci.*, (2007), s. 1482.

¹¹⁰ O'DONNELL, K.A., *Nature*, (2005), s. 839.

inhibicji translacji. Mutacje we fragmencie 3'-UTR E2F1 komplementarnym do miejsc wiązania mir17-5p oraz mir-20a skutkują zwiększeniem akumulacji białka, tym samym indukują podział i tzw. „unieśmiertelnienie komórek”.

Powyżej zaprezentowano jedynie kilka przykładów obrazujących bezpośredni związek pomiędzy zaburzeniami produkcji miRNA a transformacją nowotworową. W ostatniej dekadzie podobne rezultaty uzyskane zostały przez wielu badaczy.

1.4.2. miRNA w regulacji hematopoezy

Hematopoeza to proces powstawania i różnicowania się elementów morfotycznych krwi. Udział miRNA w procesie hematopoezy był badany zarówno poprzez całkowite zahamowanie biogenezy miRNA jak i selektywną inaktywację poszczególnych miRNA. Pierwsze podejście polegające na wyciszeniu rybonukleazy Dicer prowadziło do zmian letalnych na poziomie embrionalnym¹¹¹. Podobnie embrionalne komórki macierzyste pozbawione białka DGCR8 (podjednostka kompleksu mikroprocesora) wykazywały zahamowanie różnicowania w fazie G1 cyklu komórkowego^{112,113}. Tym niemniej w przypadku, gdy rybonukleaza Dicer była przejściowo inaktywowana we wczesnych stadiach dojrzewania limfocytów T, wykazano, że jej obecność jest niezbędna do prawidłowego wykształcenia limfocytów T pomocniczych¹¹⁴, natomiast jej brak nie wpływał negatywnie na dojrzewanie limfocytów T linii CD4/CD8¹¹⁵. Wyciszenie genu białka Ago2, głównego składnika kompleksu RISC powoduje poważne zaburzenia rozwoju linii komórek szlaku hematopoezy¹¹⁶. Z kolei selektywne wyciszanie poszczególnych miRNA prowadzi do wytworzenia charakterystycznych fenotypów. Na podstawie zebranych dotychczas danych można przypuszczać, że miRNA uczestniczą praktycznie we wszystkich etapach hematopoezy (Rysunek 3, Tabela 2).

¹¹¹ BERNSTEIN, E., *Nat Genet*, (2003), s. 215.

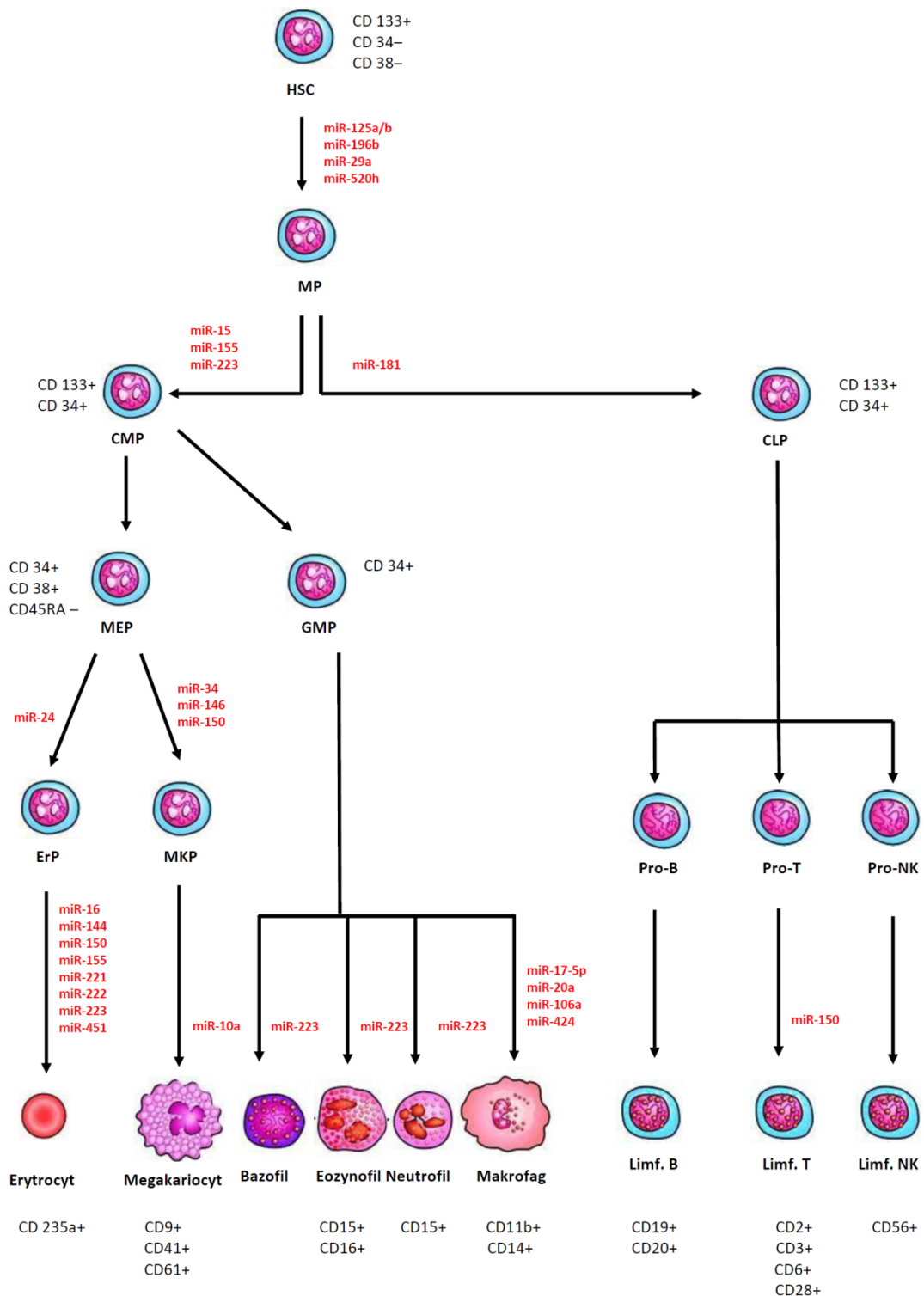
¹¹² WANG, Y., *Nat Genet*, (2007), s. 380.

¹¹³ WANG, Y., *Nat Genet*, (2008), s. 1478.

¹¹⁴ COBB, B.S., *J Exp Med*, (2006), s. 2519.

¹¹⁵ COBB, B.S., *J Exp Med*, (2005), s. 1367.

¹¹⁶ O'CARROLL, D., *Genes Dev*, (2007), s. 1999.



Rysunek 3 – Udział miRNA w poszczególnych etapach hematopoezy. Legenda - HSC (ang. *hematopoietic stem cell*) komórka macierzysta szpiku; MP, ang. (*multipotent progenitors*) – multipotentne komórki progenitorowe; CMP, (ang. *common myeloid progenitor*) – wspólna komórka progenitorowa krwi linii mieloidalnej i granulocytarnej; CLP, (ang. *common lymphoid progenitor*) – wspólna progenitorowa komórka limfopoezy; MEP, (ang. *megakaryocyteerythroid progenitor*) – komórka progenitorowa megakariocytów i erytrocytów; ErP, (ang. *erythroid progenitor*) – komórka progenitorowa erytrocytów; MkP, (ang. *megakaryocyte progenitor*) – komórka progenitorowa megakariocytów. Przy poszczególnych komórkach zaznaczono obecność (+) lub brak (-) specyficznych antygenów powierzchniowych (CD, ang. *cluster of differentiation*).

Tabela 2. Ogólna charakterystyka miRNA zaangażowanych w proces hematopojezy.

miRNA	Funkcja	Komórki	Gen docelowy
miR-10a	Obniżona ekspresja podczas megakariocytopoezy ¹¹⁷	CD34+	HOXA1
mir-15a	Nadekspresja miR-15a hamuje tworzenie kolonii komórek linii erytroidalnych i mieloidalnych ¹¹⁸	CD34+	MYB
miR-24	Hamuje erytropoezę ¹¹⁹	CD34+	ALK4
miR-29a	Pobudza proliferację komórek progenitorowych ^{120, 121}	Lin-CD34+CD38- CD90+CD45RA- CD133+	HBPI FZD5, TPM1
miR-34a	Nadekspresja w czasie różnicowania megakariocytów, zaangażowany w różnicowanie komórek dendrytycznych ¹²²	CD34+	CDK4, CDK6, MYB
miR-125b	Wspiera podziały komórek macierzystych szpiku ¹²³	Lin-CD34+CD38- CD90+CD45RA-	BMF, KLF13
miR-130a	Obniżona ekspresja podczas megakariocytopoezy	CD34+	MAFB
miR-142-3p	Hamuje proliferację komórek CD133+	CD133+	PROM1
miR-146	Obniżona ekspresja podczas megakariocytopoezy ¹²⁴	CD34+	CXCR4
miR-150	Kieruje różnicowanie w stronę linii megakariocytarnej ¹²⁵	MEP (CD34+CD38+IL-3Rα- CD45RA-)	MYB
miR-155	Hamuje tworzenie kolonii komórek linii erytroidalnych i mieloidalnych ^{126, 127}	CD34+	ETS-1, MEIS1

¹¹⁷ GARZON, R., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2006), s. 5078.¹¹⁸ ZHAO, H., *Blood*, (2009), s. 505.¹¹⁹ WANG, Q., *Blood*, (2008), s. 588.¹²⁰ HAN, Y.C., *J Exp Med*, (2010), s. 475.¹²¹ BISSELS, U., *Stem Cells*, (2011), s. 847.¹²² NAVARRO, F., *Blood*, (2009), s. 2181.¹²³ OOI, A.G., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2010), s. 21505.¹²⁴ LABBAYE, C., *Nat Cell Biol*, (2008), s. 788.¹²⁵ LU, J., *Dev Cell*, (2008), s. 843.¹²⁶ GEORGANTAS, R.W., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2007), s. 2750.¹²⁷ ROMANIA, P., *Br J Haematol*, (2008), s. 570.

miR-221	Hamuje erytropoezę ^{128, 129}	CD34+	KIT
miR-222	Hamuje erytropoezę	CD34+	KIT
miR-223	Hamuje różnicowanie granulocytów i erytrocytów ^{130, 131}	CD34+	LMO2, NFI-A
miR-424	Nadekspresja podczas różnicowania monocytów ¹³²	CD34+	NFI-A
miR-451	Kieruje różnicowanie w stronę linii erytrocytarnej. ^{133, 134}	CD34+	-
miR-520h	Umożliwia różnicowanie komórek macierzystych szpiku w komórki progenitorowe ¹³⁵	CD34+CD38-	ABCG2
miR-17-92	Kontroluje różnicowanie monocytów ¹³⁶	CD34+	AML1, M-CSFR

Rola miRNA we wczesnych stadiach hematopoezy na poziomie komórek macierzystych szpiku jest wciąż niedostatecznie poznana, szczególnie w odniesieniu do procesu samoodnowy komórek macierzystych szpiku. Badania w tym kierunku są utrudnione przez stosunkowo niewielką ilość dostępnego materiału biologicznego i brak uniwersalnego markera molekularnego wyróżniającego ludzkie komórki macierzyste szpiku. Większość dotychczasowych badań koncentrowała się wokół problemów związanych z wpływem miRNA na różnicowanie komórek w późniejszych stadiach szlaku hematopoezy.

Wygodnym narzędziem badawczym okazały się analizy funkcjonalne jednostek tworzących kolonie (CFU – ang. *Colony Forming Units*), czyli pojedynczych komórek, z których mogą powstawać kolonie różnicujące się następnie w poszczególne linie rozwojowe np. limfocytarną, erytroidalną itp.. Wykazano, że transfekcja komórek CD34+ przy pomocy wektora niosącego miR-155 wydatnie zmniejsza ilość tworzących

¹²⁸ BRUCHOVA, H., *Exp Hematol*, (2007), s. 1657.

¹²⁹ FELLI, N., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2005), s. 18081.

¹³⁰ FAZI, F., *Cell*, (2005), s. 819.

¹³¹ FELLI, N., *Haematologica*, (2009), s. 479.

¹³² ROSA, A., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2007), s. 19849.

¹³³ DORE, L.C., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2008), s. 3333.

¹³⁴ ZHAN, M., *Exp Hematol*, (2007), s. 1015.

¹³⁵ LIAO, R., *J Cell Biochem*, (2008), s. 805.

¹³⁶ FONTANA, L., *Nat Cell Biol*, (2007), s. 775.

się kolonii linii mieloidalnych i erytroidalnych, natomiast analogiczna transdukcja miR-146 hamuje powstawanie kolonii megakariocytarnych. Dla odmiany miR-142-3p działa jako ogólny negatywny regulator zdolności do tworzenia kolonii w przypadku komórek CD133+. Zwiększenie akumulacji miR-520h w komórkach CD34+CD38- powoduje ich wejście na drogę różnicowania w kierunku form bardziej dojrzałych komórek progenitorowych poprzez wyciszenie genu ABCG2, białka należącego do rodziny transporterów ABC, specyficznego dla nie zróżnicowanych komórek hematopoetycznych, w tym komórek macierzystych szpiku. Powyższe wyniki wspierają hipotezę zakładającą znaczne zaangażowanie miRNA w procesy wzrostu i różnicowania komórek hematopoetycznych u człowieka.

I.5. Metody badania miRNA

Ponieważ miRNA różnią się od innych komórkowych RNA jedynie wielkością stąd podczas ich badań możliwe jest zastosowanie większości klasycznych metod używanych w biologii molekularnej. Problem stanowi nie tyle niewielka masa cząsteczkowa miRNA co ich stosunkowo niska zawartość w materiale biologicznym.

Poniżej przedstawione zostały najbardziej standardowe podejścia stosowane w badaniach miRNA:

- (i) analiza jakościowa i ilościowa zawartości miRNA może być wykonana przy użyciu dwuetapowej reakcji PCR (zmodyfikowany RT-PCR, po którym następuje ilościowy Real-Time PCR) lub mikromacierzy DNA¹³⁷. W ten sposób określić można absolutną bądź względną ilość miRNA w próbce^{138,139,140};
- (ii) funkcję miRNA można określić poprzez blokowanie ich aktywności przy użyciu: oligonukleotydów LNA¹⁴¹, oligonukleotydów morfolinowych¹⁴² lub 2'-O-metylo-oligonukleotydów^{143,144,145};

¹³⁷ SHINGARA, J., *RNA*, (2005), s. 1461.

¹³⁸ CHEN, C., *Nucleic Acids Res.*, (2005), s. 179.

¹³⁹ CHEN, Y., *BMC Genomics.*, (2009), s. 407.

¹⁴⁰ LAO, K., *Biochem Biophys Res Commun.*, (2006), s. 85.

¹⁴¹ KLOOSTERMAN, W.P., *Nucleic Acids Res.*, (2004), s. 6284.

- (iii) proces dojrzewania miRNA można hamować używając modyfikowanych oligonukleotydów¹⁴⁶;
- (iv) detekcja miRNA najczęściej odbywa się na drodze hybrydyzacji typu Northern, a w przypadku analiz „*in situ*” z wykorzystaniem sond LNA^{147, 148};
- (v) odkrycie nowych miRNA przebiega zazwyczaj poprzez klonowanie potencjalnego miRNA i jego analizę bioinformatyczną. Coraz częściej w poszukiwaniach nowych miRNA stosuje się również sekwencjonowanie nowej generacji (tzw. głębokie sekwencjonowanie)¹⁴⁹.

Dodatkowo obok wymienionych powyżej klasycznych metod analizy RNA w badaniach miRNA stosowane są specyficzne, w tym właśnie celu stworzone metody. Z uwagi na objętość niniejszej pracy chciałbym ograniczyć się jedynie do omówienia kilku szczególnie ciekawych i oryginalnych podejść. Jak wspominałem wcześniej niska zawartość miRNA w komórkach powoduje, że konieczne jest opracowanie metod o wysokiej czułości i specyficzności. Jedną z takich technik wykorzystuje tzw. „sondy kłódkowe” i amplifikację metodą toczącego się koła¹⁵⁰. Sondy kłódkowe są liniowymi cząsteczkami DNA, tak zaprojektowanymi by ich końce hybrydowały do dwóch sąsiadujących sekwencji docelowych (patrz Rysunek 4). W odpowiednich warunkach ligaza DNA łączy końce sondy kłódkowej pod warunkiem, iż są one w pełni komplementarne do analizowanej cząsteczki RNA. W ten sposób można rozróżnić nawet bardzo blisko spokrewnione miRNA¹⁵¹. Zhybrydowany z sondą miRNA służy następnie jako starter do jej amplifikacji metodą toczącego się koła. Reakcja ta jest katalizowana przez polimerazę DNA phi29 i umożliwia ilościowe określenie zawartości danego miRNA w nanogramowych próbkach całkowitego RNA. Opisana metoda przedstawiona została na Rysunku 4.

¹⁴² FLYNT, A.S., *Nat Genet*, (2007), s. 259.

¹⁴³ MEISTER, G., *RNA*, (2004), s. 544.

¹⁴⁴ CHOI, W.Y., *Science*, (2007), s. 271.

¹⁴⁵ KLEIN, M.E., *Nat Neurosci*, (2007), s. 1513.

¹⁴⁶ KLOOSTERMAN, W.P., *PLoS Biol*, (2007), s. 203.

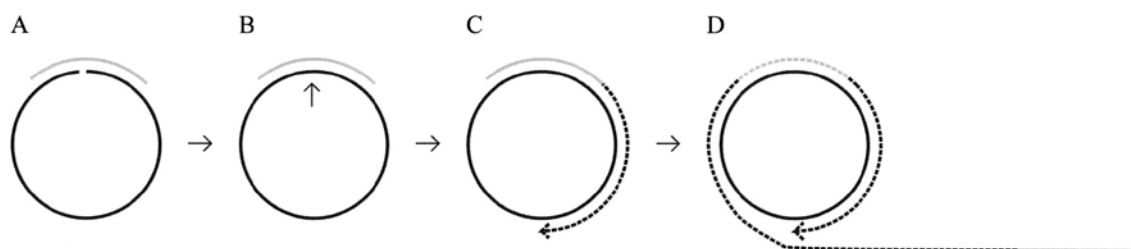
¹⁴⁷ YOU, Y., *Nucleic Acids Res*, (2006), s. 60.

¹⁴⁸ KAUR, H., *Biochemistry*, (2006), s. 7347.

¹⁴⁹ BUERMANS, H.P., *BMC Genomics*, (2010), s. 716.

¹⁵⁰ JONSTRUP, S.P., *RNA*, (2006), s. 1747.

¹⁵¹ NILSSON, M., *Nat Biotechnol*, (2000), s. 791.



Rysunek 4. Analiza miRNA przy użyciu sond kółkowych. (A) sonda jest zaprojektowana tak by specyficznie wiązała się z wybranym miRNA; (B) przyłączona do miRNA sonda przekształcana jest w kolistą cząsteczkę przy udziale ligazy DNA; (C) po ligacji miRNA służy jako starter dla polimerazy DNA phi29; (D), która amplifikuje sondę zgodnie z mechanizmem toczącego się koła. W rezultacie sonda zawierająca sekwencję miRNA zostaje wielokrotnie powielona¹⁵².

Kolejną metodą, która w zmodyfikowanej formie znalazła szerokie zastosowanie w analizie miRNA jest hybrydyzacja typu Northern. Opracowana przez Ramkissona modyfikowana metoda Northern wykorzystująca sondy znakowane na końcu 3' dioksygeniną (naturalnym haptenu o wysokiej immunogenności) okazała się doskonałą alternatywą dla klasycznych technik izotopowych. Co istotne pozwala ona zachować specyficzność i czułości hybrydyzacji typu Northern¹⁵³. W miejscu tym należy także wspomnieć, że detekcja na drodze chemiluminescencyjnej jest o wiele szybsza niż w przypadku sond radioizotopowych.

Powyżej opisane metody pozwalają w pojedynczym eksperymencie wykryć lub określić ilość stosunkowo niewielkiej liczby miRNA. Wydaje się, że w najbliższych latach metodą z wyboru stanie się głębokie sekwencjonowanie^{154,155,156,157}. Można z całą stanowczością stwierdzić, że wprowadzenie na masową skalę tej metody, przy jednoczesnej redukcji kosztów zrewolucjonizuje tak poszukiwania nowych miRNA, jak i badania ich akumulacji.

Z biologicznego punktu widzenia najważniejsze jest jednak potwierdzenie funkcji i miejsca działania danego miRNA *in vivo*. Do określenia miejsca akumulacji miRNA w komórkach używa się najczęściej hybrydyzacji *in situ* w połączeniu z mikroskopią konfokalną¹⁵⁸. Natomiast w badaniach funkcjonalnych najpopularniejszą metodą jest transfekcja linii komórkowych danym miRNA celem wyciszenia

¹⁵² NILSSON, M., *Hum Mutat*, (2002), s. 410.

¹⁵³ RAMKISSOON, S.H., *Mol Cell Probes*, (2006), s. 1.

¹⁵⁴ WHEELER, D.A., *Nature*, (2008), s. 872.

¹⁵⁵ ZHENG, Z., *Nucleic Acids Res.*, (2010), s. 137.

¹⁵⁶ MARGULIES, M., *Nature*, (2005), s. 376.

¹⁵⁷ LEY, T.J., *Nature*, (2008), s. 66.

¹⁵⁸ DEO, M., *Dev Dyn*, (2006), s. 2538.

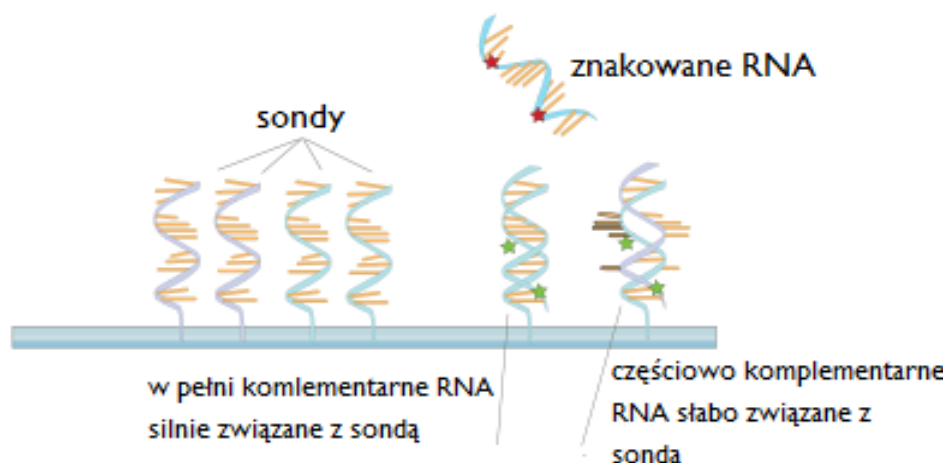
specyficznego transkryptu, a następnie określenie efektu fenotypowego¹⁵⁹. Stosuje się też knock-out danego miRNA poprzez komplementarny RNA (tzw. antagomir) czy ukierunkowaną mutagenezę. Ważnym elementem uzupełniającym wszystkie techniki eksperymentalne są analizy *in silico*, bez których identyfikacja nowych miRNA oraz celów ich działania byłaby niezwykle trudna o ile nie niemożliwa.

I.6. Mikromacierze DNA

I.6.1. Podstawy teoretyczne

Mikromacierze DNA są jedną z odmian technik hybrydacyjnych wykorzystywanych powszechnie w biologii molekularnej. Mikromacierz składa się z zestawu oligonukleotydów (tzw. sond) immobilizowanych w określonym porządku na podłożu stałym. Umieszczone na macierzy sondy są komplementarne do sekwencji analizowanych cząsteczek DNA lub RNA. Do mikromacierzy hybrydowane jest uprzednio wyznakowane DNA lub RNA (tzw. próba). Dzięki zastosowaniu odpowiednich warunków hybrydacji, a następnie odmywania próby, jedynie cząsteczki w pełni komplementarne do sond pozostają związane z macierzą (Rysunek 5). Zhybrydowane z sondami cząsteczki są wykrywane dzięki detekcji sygnału pochodzącego od znakowanej próby. Jako znaczniki najczęściej wykorzystywane są barwniki fluorescencyjne bądź chemiluminescencyjne. Pomiar emitowanego przez nie sygnału umożliwia określenie względnej ilości poszczególnych cząsteczek w badanej próbce, a tym samym analizę jakościową oraz ilościową.

¹⁵⁹ OBAD, S., *Nat Genet*, (2011), s. 371.



Rysunek 5. Hybrydyzacja próby do mikromacierzy. Zaznaczono silnie wiążące się, w pełni komplementarne do sondy, wyznakowane cząsteczki RNA oraz cząsteczki nie w pełni komplementarne, słabiej wiążące się do mikromacierzy. Gwiazdkami w dwóch kolorach zaznaczono różne fluorochromy użyte podczas znakowania RNA.

I.6.2. Produkcja mikromacierzy

Sondy są zazwyczaj immobilizowane na mikromacierzy poprzez wytworzenie wiązań elektrostatycznych lub kowalencyjnych pomiędzy wbudowanym do oligonukleotydu łącznikiem a znajdującym się na powierzchni stałej amino- lub epoksy-silanem. Modyfikowanym silanem pokrywane są najczęściej płytki szklane lub silikonowe. Istnieją także niestandardowe metody wiązania sondy do powierzchni mikromacierzy, wykorzystujące np. elektrostatyczne oddziaływanie ujemnie naładowanych cząsteczek DNA sond z dodatnio naładowanymi mikroelektrodami na powierzchni mikromacierzy^{160,161}.

W zależności od platformy sondy mogą być syntetyzowane *in situ* (np. metodą fotolitografii lub drukowania natryskowego (ang. *ink-jet printing*), odpowiednio mikromacierze Affymetrix i Agilent^{162,163}) lub nanoszone za pomocą drukarki. Metoda fotolitografii polega na użyciu do syntezy sond zmodyfikowanych nukleotydów wyposażonych we wrażliwe na światło grupy blokujące. Poprzez naświetlanie wybranych punktów mikromacierzy można precyzyjnie kontrolować przebieg syntezy

¹⁶⁰ GILLES, P. N., *Nat. Biotechnol.*, (1999), s. 365.

¹⁶¹ HELLER, M. J., *Electrophoresis*, (2000), s. 157.

¹⁶² PEASE, A.C., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1994), s. 5022.

¹⁶³ BARONE, A.D., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, (2001), s. 525.

milionów różnych sond. Długość sond waha się od 25 nukleotydów (Affymetrix) do 60 (Agilent). Krótsze sondy są tańsze w syntezie i mogą mieć większą gęstość na macierzy, natomiast dłuższe charakteryzują się większą specyficnością. Alternatywą jest opracowana przez firmę NimbleGene Systems zmodyfikowana metoda fotolitografii, niekorzystająca z siatek maskujących¹⁶⁴.

Drugą z metod jest drukowanie kontaktowe uprzednio zsyntetyzowanych sond¹⁶⁵. Zazwyczaj odbywa się to w odpowiednich drukarkach, za pomocą igieł metalowych lub silikonowych zanurzających się w studzienkach zawierających rozpuszczone sondy, a następnie przenoszących je we wcześniej zdefiniowane miejsca na szkiełkach. Technika ta umożliwia większą elastyczność w planowaniu eksperymentu (pozwala zmieniać rodzaj i długość sond oraz ich ułożenie na macierzy), często też obniża jego koszty.

I.6.3. Eksperyment mikromacierzowy

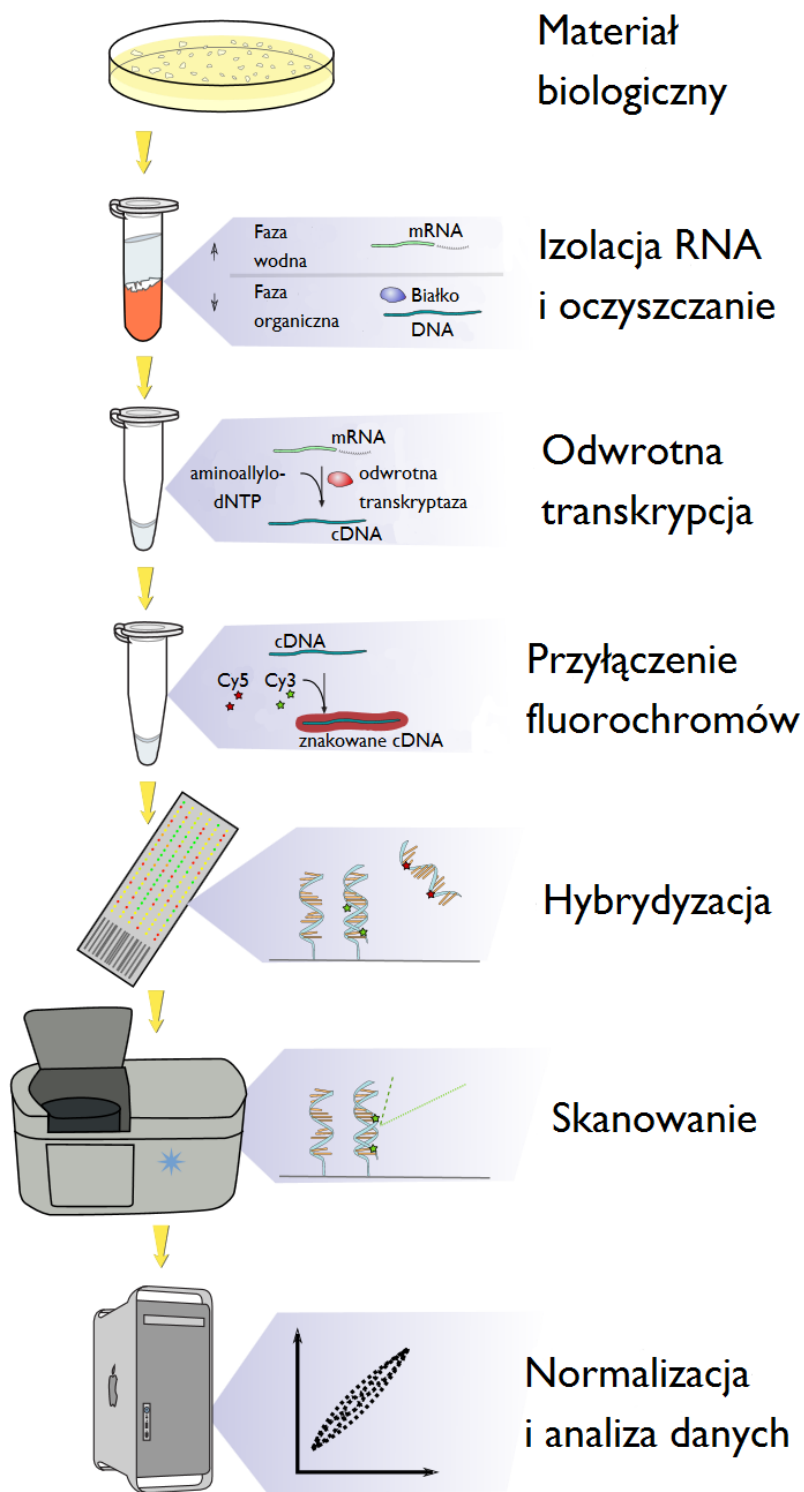
W przypadku mikromacierzy służących do analizy poziomu ekspresji genów (Rysunek 6) ogólny schemat eksperymentu przedstawia się następująco:

- (i) z materiału biologicznego izolowany jest RNA (w tym mRNA), oczyszczany (metodą fenol:chloroform lub na kolumnkach) oraz oceniany pod względem jakościowym (elektroforeza kapilarna) oraz ilościowym (metody spektrofotometryczne);
- (ii) uzyskany RNA służy jako matryca do syntezy cDNA metodą odwrotnej transkrypcji ze starterami oligo(dT) (w przypadku mRNA). Opcjonalnie cDNA może być poddany amplifikacji metodą PCR;
- (iii) następnie do modyfikowanych aminoallylo-dNTP wprowadzanych do cDNA podczas odwrotnej transkrypcji przyłączane są reaktywne barwniki fluorescencyjne, przy stężeniach mieszaniny reakcyjnej tak dobranych, by jeden wyznakowany nukleotyd przypadał średnio na 60 nieznakowanych;

¹⁶⁴ NUWAYSIR, E.F., *Genome Res.*, (2002), s. 1749.

¹⁶⁵ BARBULOVIC-NAD, I., *Crit Rev Biotechnol.*, (2006), s. 237.

- (iv) znakowana próba jest hybrydyzowana z mikromacierzą, a następnie pozostałe niezwiązane cząsteczki są odmywane;
- (v) mikromacierz jest skanowana celem uzyskania tabeli intensywności fluorescencji dla poszczególnych sond;
- (vi) ostatnim etapem jest analiza bioinformatyczna uzyskanych wyników.



Rysunek 6. Eksperyment mikromacierzowy – schemat.

I.7. Białaczki i ich podział

Terminem białaczka (łac. *leucaemia*) określamy grupę chorób nowotworowych układu krwiotwórczego. Historycznie etymologia słowa białaczka wywodzi się od jasnego koloru próbek krwi uzyskanych od osób z ostrą formą choroby.

Z punktu widzenia klinicznego i etiologicznego białaczki można podzielić na dwie podstawowe grupy: ostre i przewlekłe. Ostre białaczki cechują się szybką i nagłą akumulacją w szpiku dużej liczby niedojrzałych komórek krwi. W konsekwencji prowadzi to do upośledzenia normalnych funkcji szpiku, a tym samym niedostatecznej produkcji prawidłowych elementów morfotycznych krwi. Pociąga to za sobą konieczność natychmiastowej terapii z uwagi na szybki rozwój choroby, akumulację zmienionych nowotworowo komórek oraz ich rozsianie do innych organów. Dla odmiany przewlekłe formy białaczek mogą rozwijać się wiele lat, a zmienione nowotworowo komórki są podobne do dojrzałych form prawidłowych komórek krwi. Często przed rozpoczęciem leczenia pacjenci cierpiący na przewlekłe białaczki są monitorowani przez dłuższy czas celem dokładnej diagnostyki i dobrania optymalnej terapii.

Inny podział białaczek odnosi się do rodzaju komórek progenitorowych, których mutacja prowadzi do wejścia na ścieżkę nowotworzenia. Wyróżnić możemy zatem: białaczki limfoblastyczne (wywodzące się z komórek szlaku limfoidalnego – zazwyczaj limfocytów B) i mieloblastyczne (pochodzące z komórek szlaku szpikowego – erytroidalnego, monocytarnego, granulocytarnego i trombocytarnego). Najbardziej rozpowszechnione typy białaczek przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Najpowszechniejsze typy białaczek.

Nazwa	Charakterystyka	Podtypy
Ostra białaczka limfoblastyczna	Najczęściej występuje u dzieci, u dorosłych występuje zazwyczaj po 65 roku życia, przeżywalność zależna od wieku (85% u dzieci, 50% u dorosłych)	Ostra białaczka limfoblastyczna z prekursorów limfocytów B, ostra białaczka limfoblastyczna z prekursorów limfocytów T, białaczka Bukitt'a, ostra białaczka bifentotypowa
Przewlekła białaczka limfoblastyczna	Najczęściej występuje u dorosłych powyżej 55 roku życia, w tym 2/3 mężczyzn; przeżywalność wynosi ok. 75%	Białaczka prolimfoblastyczna z limfocytów B
Ostra białaczka szpikowa	Występuje częściej u dorosłych niż dzieci przeżywalność wynosi ok. 40% ¹⁶⁶	Ostra białaczka promielocytowa, ostra białaczka megakarioblastyczna, ostra białaczka mieloblastyczna
Przewlekła białaczka szpikowa	Dotyka najczęściej dorosłych, bardzo rzadka dzieci; przeżywalność ok. 90%	Przewlekła białaczka monocytowa
Białaczka włochatokomórkowa	Dzieli wiele cech wspólnych z przewlekłą białaczką limfoblastyczną, ponad 80% cierpiących na białaczkę włochatokomórkową to dorośli mężczyźni, brak odnotowanych przypadków u dzieci, przeżywalność 96-100% ¹⁶⁷	
Białaczka prolimfocytarna z limfocytów T	Transformacji ulegają limfocyty T ¹⁶⁸ , przebieg ostry, przeżywalność rzędu kilku miesięcy	
Białaczka z dużych ziarnistych limfocytów	Transformacji ulegają limfocyty T i NK, przeżywalność jest wysoka, 96-100%, a przebieg stosunkowo łagodny	
Białaczka z dorosłych komórek T	Czynnikiem sprawczym jest retrowirus – ludzki wirus T-limfotropowy (HTLV), podobnie jak HIV infekuje limfocyty CD4+, jednak w odróżnieniu od HIV nie niszczy ich, a powoduje unieśmiertelnienie prowadząc tym samym do powstania białaczki	

¹⁶⁶ COLVIN, G.A., *Med Health R I*, (2003), s. 243.¹⁶⁷ ELSE, M., *Cancer*, (2005), s. 2442.¹⁶⁸ VALBUENA, J.R., *Am J Clin Pathol*, (2005), s. 456.

I.7.1. Ostra białaczka szpikowa

Ostra białaczka szpikowa (AML ang. *acute myeloid leukemia*) należy do grupy chorób mieloproliferacyjnych, charakteryzujących się niekontrolowanym rozplemem w szpiku i krwi obwodowej zmienionych nowotworowo niedojrzałych komórek prekursorów elementów morfotycznych krwi (blastów). Transformacja następuje w wyniku zajścia wielu mutacji somatycznych w totipotentnych komórkach hematopoetycznych lub rzadziej bardziej zróżnicowanych komórkach progenitorowych. W AML dochodzi do poważnego upośledzenia wytwarzania normalnych komórek krwi, co wiąże się z anemią i trombocytopenią, często także z obniżoną ilością krwinek w szpiku¹⁶⁹.

Wyższe tempo podziałów oraz większa przeżywalność blastów prowadzi do ich znacznego nagromadzenia – ilość blastów w organizmie pacjenta może dochodzić do 11 mld komórek nowotworowych obecnych w szpiku i krwioobiegu. W rezultacie u chorego obserwowana jest anemia powodująca osłabienie, bledość i zaburzenia wysiłkowe. Dodatkowo występująca neutropenia wraz z monocytopenią utrudniają gojenie ran i sprzyjają pojawianiu się infekcji oportunistycznych, natomiast trombocytopenia może powodować spontaniczne krwawienia, szczególnie podskórne.

Klasyczna diagnostyka AML opiera się na mierzeniu poziomu elementów morfotycznych w połączeniu z rozmazem krwi i szpiku celem identyfikacji białaczkowych blastów. Diagnoza zazwyczaj jest potwierdzana metodami biochemicznymi poprzez stwierdzenie aktywności mieloperoksydazy w blastach lub metodami immunologicznymi poprzez identyfikację specyficznych antygenów CD (ang. *cluster of differentiation*) m.in. CD 13 i CD 33. Z uwagi na fakt, że niedojrzałe blasty mogą wykazywać cechy morfologiczne i immunofenotypowe wielu linii hematopoetycznych (erytroblastów, megakariocytów, monocytów, eozynofili, lub rzadziej bazofili i komórek tucznych) oraz mieloblastów i promielocytów, oraz różne stadium różnicowania można mówić o wielu typach białaczek szpikowych i do tego odnosi się klasyczny ich podział, tzw. klasyfikacja FAB (French-American-British), przedstawiona w Tabeli 4.

¹⁶⁹Williams Hematology, Eighth Edition (2010).

Tabela 4. Podział ostrej białaczki szpikowej wg FAB.

Typ	Częstość	Morfologia	Charakterystyka	Typowe zmiany kariotypowe
M0	2-3%	ostra białaczka szpikowa, z komórkami o bardzo niskim stopniu zróżnicowania	diploidalne komórki białaczkowe	kariotyp prawidłowy
M1	20%	ostra białaczka mieloblastyczna, bez cech dojrzewania	obecność pałeczek Auera (lizosomalne ziarnistości)	trisomia 8, -5, -7
M2	30%	ostra białaczka mieloblastyczna, z dojrzewaniem	obecność pałeczek Auera (lizosomalne ziarnistości)	trisomia 8, -5, -7, t(8;21)
M3	10%	ostra białaczka promielocytowa (APL, ang. <i>acute promyelocytic leukemia</i>)	>30% promielocytów w ogólnej liczbie blastów	t(15;17)
M4	25-30%	ostra białaczka mielomonocytowa	mielomonocytyczne blasty	inv16
M5	10%	ostra białaczka monocytowa	obecność monoblastów	t(9;17), t(8;17), 11q-
M6	4%	ostra erytroleukemia	zmiany dysplastyczne	trisomia 8, -5, -7
M7	1-3%	ostra białaczka megakariocytowa	obecność megakariocytów	trisomia 21, inv 3

Klasyfikacja FAB w praktyce klinicznej jest ostatnio coraz szerzej zastępowana przez nową, zaproponowaną przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). Klasyfikacja WHO jest przydatna dla lekarzy, gdyż koncentruje się głównie na obrazie klinicznym AML, jednakże gorzej niż podział FAB tłumaczy podstawy biologiczne transformacji białaczkowej.

Czynnikami środowiskowymi mogącymi wpływać na powstanie AML są: promieniowanie jonizujące, wysokie dawki benzenu i dym tytoniowy. Obserwowany jest także rosnący odsetek przypadków AML u pacjentów poddawanych intensywnej chemioterapii, szczególnie przy użyciu czynników alkilujących czy inhibitorów topoisomerazy II. Co więcej, AML może się rozwinąć na bazie innych klonalnych zespołów mielodysplastycznych, m.in. przewlekłej białaczki szpikowej (ang. *Chronic Myeloid Leukemia* – CML), czerwienicy prawdziwej (ang. *polycythemia vera* – PV), pierwotnej mielofibrozy, nadpłytkowości samoistnej czy niedokrwistości syderoblastycznej. Wśród innych schorzeń, które mogą prowadzić do rozwoju ostrej białaczki szpikowej warto wymienić niedokrwistość aplastyczną, szpiczaka mnogiego lub rzadziej AIDS. Stwierdzono także zależność pomiędzy chorobami tarczycy¹⁷⁰ oraz wrodzonymi zaburzeniami poliendokrynnymi¹⁷¹ a zwiększoną zachorowalnością na AML. Także szeroka grupa chorób dziedzicznych związana jest z AML, wśród których zauważyć można kilka charakterystycznych zaburzeń w stabilności genomu: (i) zakłócony system naprawy DNA przy anemii Fanconiego, (ii) obecność genów „podatności” faworyzujących pojawienie się kolejnej mutacji – rodzinny zespół płytkowy, (iii) defekty w genach supresorowych – zespół Zinser’a-Cole’a-Edmana, (iiii) lub też zaburzenia o nieznanym etiologii.

Możemy także wyróżnić kilka specyficznych zmian o charakterze cytogenetycznym, m.in. translokacje t(8;21), t(15;17), inwersję inv(16), trisomię chromosomu 8 czy też delecję całego lub fragmentu chromosomów 5 i 7. Szczególnie charakterystyczna jest translokacja obejmująca chromosom 17 w locus genu kodującego receptor kwasu retinowego (RAR α) związana zawsze z ostrą białaczką promielocytową (AML-M3).

Ostra białaczka szpikowa zazwyczaj jest leczona arabinozydem cytozyny (1 β - *arabinofuranozylocytozyna*), który w warunkach fizjologicznych szybko przekształcany jest w trójfosforan arabinocytozyny, silny inhibitor polimeraz DNA i RNA. Zważywszy na fakt szybkiej deaminacji arabinozydu cytydyny do arabinozydu uracylu, który nie wykazuje aktywności cytostatycznej, konieczne jest dożylnie podanie leku¹⁷². Drugim ze składników chemioterapii jest antracyklina i jej pochodne, będące antybiotykami glikozydowymi zbudowanymi z daunozaminy jako reszty cukrowej oraz

¹⁷⁰ MOSKOWITZ, C., *Am J Hematol*, (1992), s. 102.

¹⁷¹ WILLEMS, E., *Leukemia*, (2003), s. 1912.

¹⁷² PERRY, MICHAEL C., (2008).

czteropierścieniowego aglikonu zawierającego szkielet antrachinonu z dodatkowymi grupami hydroksylowymi tworzącymi ugrupowanie hydrochinonowe. Substancje te uważane są za jedne z najskuteczniejszych dostępnych leków antynowotworowych. Jednocześnie wykazują trzy aktywności cytostatyczne: (i) interkalują heterodupleksy DNA/RNA, (ii) są inhibitorami topoizomerazy II, uniemożliwiając relaksację superhelikalnych cząsteczek DNA, hamują transkrypcję i replikację, (iii) powodują tworzenie wolnych rodników uszkadzających DNA i błony komórkowe¹⁷³. Wspomniana wyżej terapia łączona wprowadzona została w latach 70. ubiegłego wieku. Jako pierwsza dająca zadowalające wyniki jest ona do dziś stosowana z powodzeniem, pod nazwą chemioterapii 7 i 3 (7 dni podawania arabinozydu i 3 dni daunarubycyny)¹⁷⁴. Inne leki mogą być wprowadzane do terapii w przypadku niekorzystnej prognozy, podczas wznowy lub u pacjentów opornych na leczenie. Wyjątkiem od tej reguły jest leczenie ostrej białaczki promielocytowej (AML-M3), gdzie stosuje się kwas retinowy, trójtlenek arsenu oraz antracyklinę. Przeszczepy szpiku kostnego (autologiczne bądź autogeniczne) wykonywane są u pacjentów ze wznową lub z jej wysokim ryzykiem po chemioterapii. Procentowe szanse uzyskania remisji całkowitej wahają się od 80% u dzieci do poniżej 25% u osiemdziesięciolatków, natomiast wyleczenia od ok. 50% u dzieci do praktycznie zera w przypadku osiemdziesięciolatków.

1.7.2. Podstawy molekularne

Jak wcześniej wspomniano AML może być skutkiem zaburzeń tak w liniach pierwotnych komórek totipotencyjnych¹⁷⁵, jak i pluripotencyjnych komórek progenitorowych odpowiednich linii hematopoezy^{176,177,178,179,180,181}. Białaczkowe blasty charakteryzują się specyficznym immunofenotypem komórek macierzystych: CD123+CD45dimCD34+CD38. W przypadku remisji w celach diagnostycznych używa

¹⁷³ MINOTTI, G., *Pharmacol Rev*, (2004), s. 185.

¹⁷⁴ YATES, J.W., *Cancer Chemother Rep*, (1973), s. 485.

¹⁷⁵ SHARATHKUMAR, A., *Am J Med Genet A*, (2003), s. 194.

¹⁷⁶ GONZALEZ, C.H., *Birth Defects Orig Artic Ser*, (1977), s. 31.

¹⁷⁷ FIALKOW, P.J., *Blood*, (1991), s. 1415.

¹⁷⁸ FERRARIS, A.M., *Blood*, (1984), s. 817.

¹⁷⁹ GREAVES, M.F., *Br J Cancer*, (1993), s. 413.

¹⁸⁰ TURHAN, A.G., *Blood*, (1995), s. 2154.

¹⁸¹ VAN LOM, K., *Leukemia*, (1997), s. 202.

się panelu przeciwciał CLL-1, CD5, CD7, CD19, CD56, celem wykrycia pozostałych komórek niosących antygeny CD45dim,CD34+Cd38⁻¹⁸².

Mutacje somatyczne prowadzące do wejścia na ścieżkę nowotworzenia u większości pacjentów wynikają z translokacji chromosomowych w krytycznych regionach protoonkogenów¹⁸³. Zazwyczaj ich rezultatem jest fuzja dwóch genów, powodująca powstanie niefunkcjonalnego białka. Ulegające fuzji geny kodują najczęściej czynniki transkrypcyjne lub inne białka związane z transkrypcją. W rezultacie dochodzi do zaburzenia całej ścieżki regulacyjnej odpowiadającej za wzrost, różnicowanie i dojrzewanie komórek macierzystych szpiku^{184, 185}.

Wśród genów często podlegających mutacjom wartę wyróżnienia są *CBF* (ang. *core binding factor*), gen receptora kwasu retinowego alfa (*RARA*), rodzina genów homeotycznych *HOX*, czy też *MLL*. Mutacje w pierwszym z wymienionych genów, a mianowicie *CBF* będącym czynnikiem transkrypcyjnym, (złożony z dwóch podjednostek *CBFA1* i *RUNX1*, dawniej zwany *AML1*) występują u ok. 10% przypadków AML, przy czym odsetek ten jest zależny od wieku pacjenta i waha się między 6% u pacjentów > 50 lat do 20% u osób młodszych. Ścieżki regulowane przez *CBF* odgrywają istotną rolę w mechanizmach dojrzewania i różnicowania prekursorów komórek krwi. Jednakże te pierwotne mutacje nie wystarczają do wystąpienia białaczki, konieczne są dodatkowe tzw. mutacje aktywujące w genach kinaz tyrozynowych *FLT3* oraz *KIT* lub w *N-RAS* i *K-RAS*, zwiększające tempo podziałów w zmienionych komórkach prekursorowych. Dla AML charakterystyczne są także inne mutacje, m.in. w genach *FES*, *FOS*, *GATA-1*, *JUN B*, *MPL*, *MYC*, *p53*, *PU.1*, *RB*, *WT1*, *WNT*, *NPM1*, *CEPBA*^{186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197}. W połączeniu z mutacjami powodującymi

¹⁸² VAN RHENEN, A., *Blood*, (2007), s. 2659.

¹⁸³ LOOK, A.T., *Science*, (1997), s. 1059.

¹⁸⁴ PABST, T., *Oncogene*, (2007), s. 6829.

¹⁸⁵ KELLY, L.M., *Annu Rev Genomics Hum Genet*, (2002), s. 179.

¹⁸⁶ ADAMS, J.M., *Cancer Surv*, (1992), s. 119.

¹⁸⁷ BASHEY, A., *Blood*, (1992), s. 981.

¹⁸⁸ PREISLER, H.D., *Cancer Res*, (1987), s. 874.

¹⁸⁹ BUESO-RAMOS, C.E., *Blood*, (1993), s. 2617.

¹⁹⁰ MORI, N., *Leuk Res*, (1995), s. 869.

¹⁹¹ WEIDE, R., *Leuk Lymphoma*, (1995), s. 135.

¹⁹² RIDGE, S.A., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1990), s. 1377.

¹⁹³ MENSSEN, H.D., *Leukemia*, (1995), s. 1060.

¹⁹⁴ WILLMAN, C.L., *Clin Lab Med*, (1990), s. 769.

¹⁹⁵ VIGON, I., *Blood*, (1993), s. 877.

¹⁹⁶ MILLS, K., *Front Biosci*, (2008), s. 4605.

¹⁹⁷ SCHLENK, R.F., *N Engl J Med*, (2008), s. 1909.

utrata funkcji przez hematopoetyczne czynniki transkrypcyjne odpowiadają one za tzw. fenotyp AML. Proponowany mechanizm zakłada współgranie dwóch klas mutacji: (i) mutacji klasy I, np. genu *RUNX1* zwiększających szybkości podziałów i przeżywalność zmienionego klonu, (ii) mutacji klasy II, np. *CBF* prowadzących do zmian w różnicowaniu i dojrzewaniu klonu. W miejscu tym warto zauważyć, że zmiany w komórkach krwiotwórczych o niskim stopniu specjalizacji, przy zachowaniu ich zdolności do różnicowania i intensywnych podziałów są bezpośrednio odpowiedzialne za dużą różnorodność fenotypów transformowanych białaczkowo linii klonalnych. Kilka z wyżej wymienionych mutacji ma szczególną wagę, tak pod kątem klinicznym jak i biologicznym, o czym świadczą dwa przytoczone poniżej przykłady.

Gen *FLT3* koduje receptor kinazy tyrozynowej w komórkach progenitorowych szlaku erytroidalnego i limfoidalnego. Charakterystyczna wewnętrzna duplikacja tandemowa w tym genie odnotowywana jest w 25-35 % przypadków AML, szczególnie przy normalnym kariotypie lub przy translokacjach *PML-RARA* lub *DEK-CAN*¹⁹⁸. Opisowana mutacja jest złym czynnikiem rokującym, w porównaniu z grupą bez tej duplikacji^{199,200}. Przeciwnie mutacje w genie nukleofosminy *NPM1*, które występują nawet u 35% przypadków związane są z korzystnym rokowaniem²⁰¹. Co uderzające, przy dużej ilości genów odpowiedzialnych za deregulację normalnego cyklu komórkowego w AML jedynie niewiele ścieżek transdukcji sygnału jest jednocześnie zaburzonych. Odpowiadają one za: (i) różnicowanie i dojrzewanie *PI3K-AKT*, (ii) proliferację *RAS-RAF-MEK-ERK*, (iii) przeżywalność i unieśmiertelnienie komórek *STAT3*²⁰²

¹⁹⁸ RENNEVILLE, A., *Leukemia*, (2008), s. 915.

¹⁹⁹ LIBURA, M., *Blood*, (2003), s. 2198.

²⁰⁰ SMALL, D., *Semin Hematol*, (2008), s. 17.

²⁰¹ DOHNER, K., *Blood*, (2005), s. 3740.

²⁰² SCHOLL, C., *Semin Oncol*, (2008), s. 336.

2. Cel pracy

Podstawowym celem niniejszej rozprawy było opracowanie metod umożliwiających wykorzystanie technik mikromacierzowych w różnicowej analizie akumulacji ludzkich miRNA. Jego osiągnięcie wiązało się z realizacją następujących zadań szczegółowych:

- zaprojektowanie mikromacierzy DNA – wybór sond i metody ich wiązania z powierzchnią szkiełek podstawowych, opracowanie procedury drukowania mikromacierzy;
- wytworzenie mikromacierzy i potwierdzenie ich przydatności w analizie krótkich RNA;
- opracowanie efektywnych i wydajnych metod izolacji frakcji zawierającej niskocząsteczkowy RNA oraz metod jakościowej i ilościowej analizy uzyskanych próbek;
- opracowanie efektywnych metod znakowania niskocząsteczkowych RNA, ich hybrydyzacji oraz skanowania mikromacierzy;
- opracowanie ścieżki analizy bioinformatycznej i statystycznej uzyskanych danych.

Wybrany układem modelowym umożliwiającym dopracowanie i przetestowanie poszczególnych metod były dwie linie komórkowe: HeLa oraz HL-60. Następnie zoptymalizowana procedura analizy akumulacji miRNA techniką mikromacierzową sprawdzona została w praktyce. Wykorzystano ją w pilotażowych badaniach akumulacji miRNA w jednojądrzastych komórkach krwi i szpiku uzyskanych od pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę szpikową typu M1 i M2 (AML-M1 i AML-M2).

3. Materiały

3.1. Podstawowe odczynniki

- Akrylamid (5 mg/ml) – Ambion;
- Błękit trypanu – Sigma-Aldrich;
- Chlorek sodu – Sigma-Aldrich;
- Cytrynian sodu – Sigma-Aldrich;
- Dietylopirowęglan (DEPC) – Sigma-Aldrich;
- Dodecylosiarczan sodu (SDS) – BioRad;
- Etanol (98%) – POCh;
- Bydłęca surowica płodowa (FBS) – Sigma-Aldrich;
- Fenol „kwaśny” (fenol : chloroform : alkohol izoamyłowy 125:24:1; pH 4,5) – Ambion;
- Gentamycyna (50 mg/ml) – Sigma-Aldrich;
- Gradisol – L (ficoll + urgoline L) $d=1,077 \text{ g/cm}^3$ – Polfa Kutno;
- Izopropanol – POCh;
- Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) – Sigma-Aldrich;
- Kwas octowy – POCh;
- Kwas solny (chlorowodorowy) – POCh;
- Octan sodu (uwodniony) – Sigma-Aldrich;
- Roztwory z inhibitorami RNaz (RNase Zap, ElectroZap) – Ambion;
- Tris (tris(hydroksymetylo)aminoetan) – ChemPur;
- Trypsyna (0,25%) – Sigma-Aldrich;
- Woda wolna od RNaz – Ambion;
- Wodorotlenek sodu – Sigma-Aldrich.

3.2. Roztwory i Bufory

Do przygotowania roztworów i buforów używanych w pracy z RNA wykorzystano wodę dwukrotnie destylowaną i traktowaną DEPC (dietylopirowęglan) celem inaktywacji RNaz, chyba, że zaznaczono inaczej. Wszystkie proporcje składników roztworów i buforów podano w przeliczeniu na 1 litr roztworu/buforu i przedstawiono odpowiednio w tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Roztwory

DEPC-H₂O		
Składnik	Ilość	Uwagi
0,1% DEPC	1 ml	Po dodaniu DEPC mieszaninę inkubowano przez 1h w 37°C, a następnie autoklawowano, celem rozkładu pozostałego DEPC. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
H ₂ O	Do 1 l	
10M NaOH (wodorotlenek sodu)		
Składnik	Ilość	Uwagi
NaOH	400g	Z uwagi na egzotermiczność reakcji rozpuszczano na lodzie. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
H ₂ O	Do 1 l	
1M HCl (kwas solny)		
Składnik	Ilość	Uwagi
36% HCl	86,2 ml	Przechowywano w temperaturze pokojowej.
H ₂ O	Do 1 l	
5M NaCl (chlorek sodu)		
Składnik	Ilość	Uwagi
NaCl	292 g	Przechowywano w temperaturze pokojowej.
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
10% SDS (dodecylosiarczan sodu)		
Składnik	Ilość	Uwagi
SDS	100 g	Przechowywano w temperaturze pokojowej.
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
3M CH₃COONa (octan sodu), pH=4,8		
Składnik	Ilość	Uwagi
CH ₃ COONa*3H ₂ O	408 g	pH ustalano za pomocą 3M CH ₃ COOH (kwas octowy). Przechowywano w temperaturze pokojowej.
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
1M TrisHCl (tris(hydroksymetylo)aminoetan), pH=8		
Składnik	Ilość	Uwagi
Tris	121 g	pH ustalano za pomocą 1M HCl. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	

3. Materiały

0,5 M EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy); pH=8,0		
Składnik	Ilość	Uwagi
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	121 g	pH ustalano za pomocą 10M NaOH. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	

Tabela 6. Bufory

Bufor TE (Tris:EDTA)		
Składnik	Ilość	Uwagi
1M TrisHCl, pH=8,0	10 ml	Końcowy skład buforu: 10mM Tris, 1mM EDTA. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
0,5 M EDTA, pH=8,0	2 ml	
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
Bufor 10x PBS		
Składnik	Ilość	Uwagi
NaCl	80 g	Roztwór roboczy: 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O, 1.4 mM KH ₂ PO ₄), pH ok. 7,3, sterylizowano przez filtrację. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
KCl	2 g	
Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O	11,5 g	
KH ₂ PO ₄	2 g	
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
Bufor 20x SSC, pH = 7,0		
Składnik	Ilość	Uwagi
NaCl	175 g	pH ustalano 1M HCl, sterylizowano przez filtrację. Przechowywano w temperaturze pokojowej.
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ (cytrynian sodu)	88 g	
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
Bufory do płukania mikromacierzy		
2xSSC / 0,1% SDS		
Składnik	Ilość	Uwagi
20x SSC	100 ml	Końcowy skład buforu: 300 mM NaCl, 30 mM cytrynian sodu, 0,1% SDS Przechowywano w temperaturze pokojowej.
10% SDS	10 ml	
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
2xSSC		
Składnik	Ilość	Uwagi
20x SSC	100 ml	Końcowy skład buforu: 300 mM NaCl, 30 mM cytrynian sodu Przechowywano w temperaturze pokojowej.
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	
0,2x SSC		
Składnik	Ilość	Uwagi
20x SSC	10 ml	Końcowy skład buforu: 30 mM NaCl, 3 mM cytrynian sodu Przechowywano w temperaturze pokojowej.
DEPC-H ₂ O	Do 1 l	

3.3. Gotowe zestawy odczynników

Zestaw	Producent	Nr kat.	Zastosowanie
mirVana miRNA Isolation Kit	Ambion	AM1560	izolacja niskocząsteczkowych RNA
PureLink miRNA Isolation Kit	Invitrogen	K1570-01	izolacja niskocząsteczkowych RNA
flashPAGE Pre-Cast Gels (Type A)	Ambion	AM10010	frakcjonowanie niskocząsteczkowych RNA
flashPAGE Buffer Kit (Type A)	Ambion	AM9015	frakcjonowanie niskocząsteczkowych RNA
NCode miRNA Amplification System	Invitrogen	MIRAS-20	amplifikacja niskocząsteczkowych RNA
Agilent Small RNA Kit	Agilent	5067-1548	elektroforeza kapilarnej niskocząsteczkowych RNA
NCode miRNA LabelingSystem	Invitrogen	MIRLS-20	znakowanie niskocząsteczkowych RNA
Label IT miRNA Labeling Kit, Cy3/Cy5	Mirus BioSciences	MIR 8305	znakowanie niskocząsteczkowych RNA
NCode Mammalian and Non-Mammalian miRNA Microarray Probe Set v. 1.0.	Invitrogen	MIRMPS-01	sondy do drukowania mikromacierzy

3.4. Pożywki

Pożywka DMEM (pożywka minimalna Eagle'a z modyfikacją Dulbecco) (*Gibco*), której skład przedstawiono w Tabeli 7 z dodatkiem: D-glukozy, L-glutaminy, pirogronianu sodu i wodorowęglanu sodu. Pożywka RPMI-1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute – Medium 1640*) (*Gibco*), skład przedstawiono w Tabeli 8 z dodatkiem L-glutaminy oraz wodorowęglanu sodu.

Tabela 7. Skład pożywki DMEM²⁰³.

Składniki	Masa molowa [g/mol]	Stężenie [mg/L]	Stężenie [mM]
Aminokwasy			
Glicyna	75	30	0,4
Chlorowodorek L-argininy	211	84	0,398
L-cysteina	313	63	0,201
L-glutamina	146	584	4
Uwodniony chlorowodorek L-histydyny	210	42	0,2
L-izoleucyna	131	105	0,802
L-leucyna	131	105	0,802

²⁰³DULBECCO, R., *Virology*, (1959), s. 396

3. Materiały

Chlorowodorek L-histydyny	183	146	0,798
L-metionina	149	30	0,201
L-fenylalanina	165	66	0,4
L-seryna	105	42	0,4
L-treonina	119	95	0,798
L-tryptofan	204	16	0,0784
Bezwodna sól sodowa L-tyrozyny	261	104	0,398
L-walina	117	94	0,803
Witaminy			
Chlorek choliny	140	4	0,0286
Pantotenian wapnia	477	4	0,00839
Kwas foliowy	441	4	0,00907
Amid kwasu nikotynowego	122	4	0,0328
Chlorowodorek pirydoksyny	206	4	0,0194
Ryboflawina	376	0,4	0,00106
Chlorowodorek tiaminy	337	4	0,0119
Inozytol	180	7,2	0,04
Sole nieorganiczne			
Chlorek wapnia (CaCl ₂) (bezw.)	111	200	1,8
Azotan (V) żelaza (III) (Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O)	404	0.1	0,000248
Siarczan (VI) magnezu (MgSO ₄) (bezw.)	120	97.67	0,814
Chlorek potasu (KCl)	75	400	5,33
Wodorowęglan sodu (NaHCO ₃)	84	3700	44,05
Chlorek sodu (NaCl)	58	4750	81,9
Diwodorooortofosforan sodu (NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O)	138	125	0,906
Inne składniki			
D-glukoza	180	4500	25
HEPES	238	5958	25,03

Tabela 8. Skład pożywki RPMI-1640 wg Gibco

Składniki	Masa molowa [g/mol]	stężenie [mg/L]	Stężenie [mM]
Aminokwasy			
Glicyna	75	10	0,133
L-arginina	174	200	1,15
L-asparagina	132	50	0,379
Kwas L-asparaginowy	133	20	0,15
L-cysteina	313	65	0,208
Kwas L-glutaminowy	147	20	0,136
L-glutamina	146	300	2,05
L-histydyna	155	15	0,0968

3. Materiały

L-hydroksypolina	131	20	0,153
L-Izoleucyna	131	50	0,382
L-leucyna	131	50	0,382
Chlorowodorek L-lizyny	183	40	0,219
L-metionina	149	15	0,101
L-feniloalanina	165	15	0,0909
L-prolina	115	20	0,174
L-seryna	105	30	0,286
L-treonina	119	20	0,168
L-tryptofan	204	5	0,0245
Bezwodna sól sodowa L-tyrozyny	261	29	0,111
L-walina	117	20	0,171
Witaminy			
Biotyna	244	0,2	0,00082
Chlorek choliny	140	3	0,0214
Pantotenian wapnia	477	0,25	0,000524
Kwas foliowy	441	1	0,00227
Amid kwasu nikotynowego	122	1	0,0082
Kwas para-aminobenzoowy	137	1	0,0073
Chlorowodorek pirydoksyny	206	1	0,00485
Ryboflawina	376	0,2	0,000532
Chlorowodorek tiaminy	337	1	0,00297
Kobalamina	1355	0,005	0,0000037
Inozytol	180	35	0,194
Sole nieorganiczne			
Azotan (V) wapnia ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	236	100	0,424
Siarczan (VI) magnezu (MgSO_4) (bezw.)	120	48,84	0,407
Chlorek potasu (KCl)	75	400	5,33
Wodorowęglan sodu (NaHCO_3)	84	1500	17,86
Chlorek sodu (NaCl)	58	6000	103,45
Diwodoroortofosforan sodu (NaH_2PO_4) (bezw.)	142	800	5,63
Inne składniki			
D-glukoza	180	4500	25
Glutation (zredukowany)	307	1	0,00326
HEPES	238	2383	10,01
Phenol Red	376.4	5	0,0133
Pirogronian sodu	110	110	1

3.5. Szkiełka podstawowe do drukowania mikromacierzy

- szkiełka podstawowe do drukowania mikromacierzy pokryte epoksylianem – *Corning Epoxide Coated Slides (Corning)*
- szkiełka podstawowe do drukowania mikromacierzy pokryte epoksylianem – *Nexterion Slide E, (Schott)*

3.6. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

- Aparat do elektroforezy kapilarnej – Bioanalyzer 2100 (Agilent);
- Aparat do elektroforezy niskocząsteczkowych RNA – flashPAGE Fractionator (Ambion);
- Automatyczna stacja hybrydacyjna – HybArray 12 (Perkin Elmer);
- Drukarka kontaktowa – NanoPrint LM60 (ArrayIt);
- Drukarka kontaktowa – SpotArray 24 (Perkin Elmer);
- Mikrowirówka – MSC-3000 (BioSan);
- Mikrowirówka – 5415 R (Eppendorf);
- Probówki wirówkowe z filtrem UV (do pracy z substancjami fluorescencyjnymi) (Eppendorf);
- Skaner do mikromacierzy – GenePix 4100A (Molecular Devices);
- Skaner do mikromacierzy – ScanArray (Perkin Elmer);
- Spektrofotometr – BioPhotometer Plus (Eppendorf);
- Spektrofotometr – NanoDrop (Thermal Scientific);
- Stacja myjąca do mikromacierzy – ArrayIt High-Throughput Wash Station (ArrayIt);
- Termomikser – Thermomixer Comfort z adaptorem na płytki mikrotitracyjne (Eppendorf);
- Wirówka susząca do mikromacierzy – Microarray High-Speed Centrifuge (MHC) (ArrayIt);
- Wirówka z rotorem wychyłowym (SWING – OUT) oraz rotorem dla płytek mikrotitracyjnych (Hettich Zentrifugen);

- Wyrząsarka typu vortex (BioSan);
- Wyrząsarka typu vortex z adaptorem do chipów do elektroforezy kapilarnej (IKA).
- Zasilacz do elektroforezy (BioRad);

3.7. Oprogramowanie

- Analiza obrazów mikromacierzy: ScanArray 3.0 (Perkin Elmer); GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices);
- Analiza jakościowa i ilościowa RNA: Agilent 2100 Expert (Agilent);
- Analiza statystyczna mikromacierzy: platforma programistyczna R (CRAN), wersja 2.11.0; oprogramowanie do analizy statystycznej BioConductor, pakiety: marray, vsn, limma.

4. Metody

4.1. Przygotowanie materiału biologicznego

4.1.1. Hodowla i otrzymywanie komórek HL-60 i HeLa

Linia komórkowa HL-60 (wyprowadzona z komórek ostrej białaczki promielocytarnej) hodowana była na pożywce RPMI1640 (Materiały pkt 3.4) z dodatkiem 5% bydlęcej surowicy płodowej oraz 100 µg/ml gentamycyny w 37°C i przy stężeniu dwutlenku węgla wynoszącym 5%. Pasażowanie odbywało się co 3 dni, zaś liczba komórek w pasażu wynosiła około 1×10^5 /ml pożywki. Komórki były zbierane podczas logarytmicznej fazy wzrostu, liczone w hemocytometrze z dodatkiem 0,1% błękitu trypanu celem wybarwienia martwych komórek, a następnie odwirowane przy 300g i dwukrotnie przemyte 1x PBS. W drugim etapie płukania komórki rozdzielano na porcje po 10^6 komórek, natychmiast mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C .

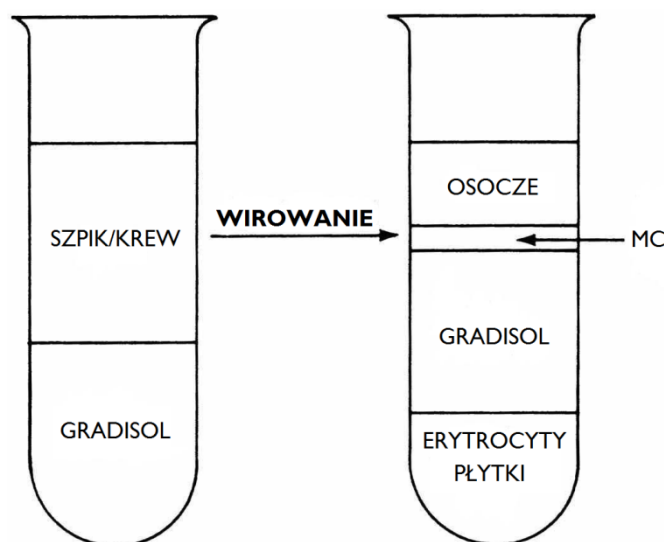
Komórki HeLa hodowano na pożywce DMEM (Materiały pkt 3.4) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej oraz 100 µg/ml gentamycyny w 37°C i przy stężeniu dwutlenku węgla wynoszącym 5%. Pasażowano co 2-3 dni, po zajęciu 90% powierzchni hodowlanej. Komórki zbierano podczas logarytmicznej fazy wzrostu, traktując roztworem trypsyny (0,5 mg/ml z 0,2 mg/ml EDTA w PBS) w celu ich oddzielenia od powierzchni. Liczono w hemocytometrze z dodatkiem 0,1% błękitu trypanu celem wybarwienia martwych komórek, a następnie odwirowywano przy 300g, przemywano 1x PBS, rozdzielano na porcje zawierające 10^6 kom, natychmiast mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C .

4.1.2. Izolacja komórek jednojądrzastych z krwi oraz szpiku

Próbki krwi i szpiku były pobierane do próbek zawierających antykoagulant (EDTA w stężeniu 1,2 - 2 mg EDTA/ml pobranej krwi/szpiku). Do czasu izolacji komórek krew i szpik były przechowywane na lodzie. Krew rozcieńczano dwukrotnie,

4. Metody

a szpik trzykrotnie buforem 1x PBS, przeciągając dodatkowo przez strzykawkę z igłą o średnicy 0,5 mm). Do probówki o pojemności 50 ml nawarstwiano gradisol do ok. 1/3 wysokości probówki, nie dotykając ścianek. Rozcieńczone w 1 x PBS próbki szpiku / krwi delikatnie nawarstwiano strzykawką na warstwę gradisolu. Wirowano z minimalnym hamowaniem przez 25 min., przy 2700 rpm, w temp. pokojowej. Otrzymany po rozdzieleniu preparat powinien wyglądać jak na Rysunku 7.



Rysunek 7. Typowy obraz po wirowaniu krwi/szpiku w gradiencie gęstości; **MC** – komórki jednojądrzaste (ang. *mononuclear cells*).

- Górną fazę osocza odrzucano, a następnie ostrożnie zbierano białą, watową interfazę zawierającą komórki jednojądrzaste (MC, ang. *mononuclear cells*) do nowej probówki (50 ml);
- Zebrane komórki przemywano buforem 1x PBS;
- Wirowano 10 min. przy 1000 rpm w temp. pokojowej;
- Supernatant odrzucano, osad zawieszano w niewielkiej ilości 1x PBS, a następnie przenoszono do probówki Eppendorf 2 ml, rozcieńczano 1x PBS;
- Powtarzano wirowanie przez 10 min. przy 1000 rpm w temp. pokojowej;
- Supernatant odrzucano;
- Uzyskane komórki jednojądrzaste zawieszano w buforze do lizy (1800 µl na ok. 10^7 komórek) i przechowywano w -80°C , do czasu izolacji RNA.

4.2. Otrzymanie frakcji niskocząsteczkowych RNA

4.2.1. Izolacja niskocząsteczkowych RNA

mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) z modyfikacjami

Przygotowanie buforów odmywających:

Wash Solution 1 – do 30 ml Wash Solution 1 dodawano 21 ml 98% etanolu;

Wash Solution 2/3 – do 50 ml Wash Solution 2/3 dodawano 40 ml 98% etanolu.

Liza komórek

- W przypadku komórek HL-60 i HeLa (pkt 4.1.1) zamrożone komórki rozmrażano na lodzie, a następnie dodawano 1800 µl buforu lizującego, natomiast lizat komórek jednojądrzastych (pkt 4.1.2) rozmrażano na lodzie;
- Lizat worteksowano ok. 2 minut aż do uzyskania homogennej mieszaniny (trudne szczególnie w przypadku kom. krwi i szpiku z uwagi na tworzenie się agregatów).

Ekstrakcja organiczna

- Dodawano 1/10 objętości (180 µl) miRNA Homogenate Additive do lizatu, worteksowano 30 sekund, następnie inkubowano przez 10 minut na lodzie, lizat rozdzielano na dwie części po 990 µl i przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf o objętości 2 ml;
- Dodawano 900 µl mieszaniny fenol : chloroform: alkohol izoamylowy (25:24:1) pH 4,5;
- Worteksowano 30-60 sek;
- Wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 min. (13000 rpm), celem oddzielenia fazy wodnej od organicznej;
- Oddzielono fazę wodną (górną), mierzono jej objętość i przenoszono do nowej probówki.

Oczyszczanie i zateżanie niskocząsteczkowych RNA

- Do fazy wodnej dodawano 1/3 objętości 98% etanolu, wortexowano ok. 30 sekund;
- Nanoszono 700 µl mieszaniny na kolumnienkę umieszczoną w probówce wirówkowej (jeżeli objętość mieszaniny przekraczała 700 µl nanoszono kolejne porcje na tę samą kolumnienkę);
- Wirowano przez 1 min. (10000 rpm) w temp. pokojowej;
- Zbierano filtrat, zawierający małe RNA. Jeżeli objętość mieszaniny przekraczała 700µl, przenoszono filtrat do nowej probówki, powtarzano wirowanie z resztą mieszaniny, filtry łączyło, mierzono objętość;
- Dodawano 2/3 obj. 98% etanolu do filtratu, wortexowano ok. 60 sekund;
- Nanoszono max 700µl filtratu na nową kolumnienkę, umieszczoną w probówce wirówkowej (jeżeli objętość mieszaniny przekracza 700 µl nanoszono kolejne porcje na tę samą kolumnienkę);
- Wirowano przez 1 min. (10000 rpm) (większe obroty mogą uszkodzić złożę);
- Odrzucano filtrat, powtarzano dopóki cały filtrat z poprzedniego etapu nie został przepuszczony przez złożę;
- Kolumnienkę przemywano 700 µl miRNA Wash Solution 1 wirując 30 sekund, przy 10000 rpm, odrzucono filtrat;
- Kolumnienkę dwukrotnie przemywano 500 µl buforu myjącego (Wash Solution 2/3), odrzucano filtrat za każdym razem;
- Po odrzuceniu filtratu z ostatniego płukania wirowano pustą kolumnienkę 1 min przy 10000 rpm celem pozbycia się resztek buforu;
- Kolumnienkę przeniesiono do nowej probówki i naniesiono 50 µl wody wolnej od RNaz (podgrzanej uprzednio do 95°C), inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 min. (celem pełnej penetracji wody do złoża), a następnie wirowano 2 min., przy 13000 rpm. Procedurę powtórzono na tej samej kolumnienki i eluowano kolejnymi 50 µl wody wolnej od RNaz.

PureLink miRNA Isolation Kit (Invitrogen) – z modyfikacjami.

Przygotowanie buforu odmywającego:

Wash Buffer W5 – do 10 ml buforu W5 dodawano 40 ml 98% etanolu.

- Komórki lizowano poprzez dodanie 300 µl buforu wiążącego (L3), worteksowano do uzyskania homogennego lizatu ok. 60 sekund;
- Do lizatu dodano 300 µl 70% etanolu, worteksowano około 30 sekund;
- Lizat nanoszono na kolumnkę ze złożem umieszczoną w probówce wirówkowej, a następnie wirowano przez 1 min. przy 13000 rpm, filtrat zebrano;
- Do zebranego filtratu dodano 700 µl 98% etanolu, worteksowano około 30 sekund;
- Filtrat z etanolem nanoszono na kolejną kolumnkę ze złożem umieszczoną w probówce wirówkowej, a następnie wirowano przez 1 min. przy 13000 rpm, filtrat odrzucono;
- Dwukrotnie przemywano kolumnkę 500 µl buforu odmywającego (**Wash Buffer W5**), wirując 1 min, przy 13000 rpm, za każdym razem odrzucano filtrat;
- Po odrzuceniu filtratu z ostatniego płukania wirowano pustą kolumnkę 3 min przy 13000 rpm celem pozbycia się resztek buforu;
- Kolumnkę przenoszono do nowej próbówki i nanoszono 50 µl wody wolnej od RNaz, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 min. (celem pełnej penetracji wody do złoża), a następnie wirowano 2 min., przy 13000 rpm. Procedurę powtarzano na tej samej kolumnie i eluowano kolejnymi 50 µl wody wolnej od RNaz.

4.2.2. Frakcjonowanie niskocząsteczkowych RNA

- Nanoszono 250 µl buforu (flashPAGE Lower Running Buffer) do dolnej komory frakcjonatora;
- Przy pomocy szczypic wyciągano kolumnkę z żelem (flashPAGE Pre-cast Gel) z buforu, w którym są zabezpieczone kolumnki na czas transportu

- i przechowywania, po czym dokładnie osuszano. Następnie kolumnienkę umieszczano w dolnej komorze frakcjonatora lekko przekręcając aby zapobiec tworzeniu się pęcherzyków powietrza na granicy bufor/żel;
- Nanoszono 250 μ l buforu (flashPAGE Upper Running Buffer) na kolumnienkę z żelem;
 - Mieszano równe objętości próbki krótkich RNA i buforu obciążającego (flashPAGE Gel Loading Buffer A40) do maksymalnej objętości 100 μ l. Przygotowaną próbkę denaturowano w temp. 95° C przez 2 min. i umieszczano na lodzie;
 - Nanoszono próbkę na żel, elektroforezę prowadzono przy stałym napięciu 75 – 80 V przez ok. 12 min. dla wydzielenia cząsteczek RNA < 40 nt lub do momentu, kiedy barwnik zaczął opuszczać żel przechodząc do dolnego zbiornika;
 - Zbierano bufor z dolnego zbiornika, RNA wydzielano poprzez wytrącanie przez noc z octanem sodu i etanolem (pkt 4.2.4).

4.2.3. Wytrącanie niskocząsteczkowych RNA

- Do próbki zawierającej niskocząsteczkowe RNA dodawano 2 μ l liniowego akrylamidu, dokładnie mieszano;
- Dodawano 10 μ l 3M octanu sodu, pH 4,8, wortexowano ok. 20-30 sekund, wirowano 30 sekund;
- Dodawano 440 μ l 98% etanolu;
- Wymieszano i inkubowano 12 godzin w –20° C;
- Wirowano 30 min przy 13000 rpm w 4° C;
- Delikatnie zbierano i odrzucano supernatant;
- Osad przemywano 500 μ l 80% zimnego etanolu, a następnie wirowano przez 10 min. (13000 rpm) (jeśli występował widoczny duży osad soli płukanie powtarzano), supernatant zbierano i odrzucano;
- Wirowano 30 sekund i aspirowano resztki etanolu cienkim tipsem;
- Suszono na powietrzu i rozpuszczano w 20 μ l H₂O wolnej od RNaz, pobierano 1 μ l i rozcieńczano 20x do określenia jakości i stężenia RNA. Próbkę RNA przechowywano w –80° C.

4.2.4. Amplifikacja niskocząsteczkowych RNA

NCode miRNA Amplification System (Invitrogen) (z modyfikacjami)

Po izolacji i wzbogaceniu we frakcję niskocząsteczkowych RNA oraz oznaczeniu stężenia i jakości próbki można poddać amplifikacji. W tym celu zagęszczano próbki do końcowej objętości 18 μ l – przy użyciu koncentratora próżniowego SpeedVac. W zależności od ilości niskocząsteczkowego RNA używanego w procedurze ATP używany podczas etapu poliadenylacji (10 mM w 1 mM Tris pH 8,0) rozcieńczano wg wzoru:

Współczynnik rozcieńczenia = 5000 / ilość ng wzbogaconego miRNA

Z uwagi na fakt użycia w procedurze 10 ng RNA, stężenie ATP ustalono na 0,02 mM.

Poliadenylacja miRNA

Przygotowywano mieszaninę do poliadenylacji miRNA, której skład przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Poliadenylacja miRNA

Składnik	Objętość [μl]
RNA	18
10X miRNA Reaction Buffer	2,5
25 mM MnCl ₂	2,5
0,02 mM ATP	1
Poly A Polymerase	1
Objętość końcowa: 25 μ l	

- Delikatnie mieszano i wirowano celem połączenia reagentów;
- Inkubowano w 37°C przez 1h.

Odwrotna transkrypcja

- Rozcieńczano starter Oligo(dT)24V w stosunku 1:10 w 0,1x TE, wortexowano ok. 60 sekund i wirowano ok. 30 sekund;

4. Metody

- Do poliadenylowanego miRNA dodawano 2 µl rozcieńzonego startera Oligo(dT)24V i umieszczano na lodzie, mieszano i wirowano ok. 30 sekund w temp. pokojowej;
- Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 65°C przez 10 min., następnie przenoszono na lód na 2 min;
- Przygotowano mieszaninę do odwrotnej transkrypcji, o składzie przedstawionym w Tabeli 10.

Tabela 10. Odwrotna transkrypcja miRNA

Składnik	Objętość [µl]
Mieszanina z poprzedniego etapu	27
5X First-Strand Buffer	10
0.1 M DTT	5
10 mM dNTP Mix	2,5
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1
Woda wolna od RNaz	2,5
Objętość końcowa: 50 µl	

- Delikatnie mieszano i inkubowano w 46°C przez 1h;
- Dla zatrzymania reakcji dodawano 8,75 µl 0,5 M NaOH/50mM EDTA (roztwór może zmienić kolor na brązowy), wortexowano około 60 sekund i wirowano ok. 30 sekund w temp. pokojowej;
- Próbę inkubowano w 65°C przez 30 min. celem zdegradowania miRNA (roztwór może się odbarwić);
- Do próby dodawano 12,5 µl 1 M Tris, pH 8.0, wortexowano około 30-60 sekund, a następnie wirowano ok. 30 sekund w temp. pokojowej, ustalano końcową objętość na 100 µl poprzez dodanie 28,75 µl buforu 1x TE.

Oczyszczanie i zateżanie jednoniciowego cDNA

- Kolumienkę ze złożem umieszczano w probówce wirówkowej i nanoszono na nią 100 µl mieszaniny reakcji odwrotnej transkrypcji, wirowano przy 13000 rpm przez 6 min. w temp. pokojowej;

4. Metody

- Złóże przemywano 200 μ l 1X TE poprzez wirowanie przy 13000 rpm przez 6 min. w temp. pokojowej, filtrat odrzucono (procedurę powtarzano dwukrotnie);
- Na kolumnkę наносono 5 μ l 10 mM Tris, pH 8,0, kolumnkę obracano o 180° i umieszczano w nowej probówce wirówkowej, wirowano przy 13000 rpm przez 3 min w temp. pokojowej;
- Objętość filtratu (zawierającego jednoniciowe cDNA) doprowadzano do 10 μ l wodą wolną od RNaz.

Politymidylacja jednoniciowego cDNA

- Próbę zawierającą jednoniciowe cDNA inkubowano w 80°C przez 10 min, schładzano na lodzie przez 2 minuty, wirowano około 60 sekund w temp. pokojowej, a następnie przenoszono na lód;
- Przygotowano mieszaninę do politymidylacji cDNA o składzie przedstawionym w Tabeli 11.

Tabela 11. Politymidylacja cDNA

Składnik	Objętość [μl]
Jednoniciowe cDNA	10
10X miRNA Reaction Buffer	2
10 mM dTTP	4
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	2
Woda wolna od RNaz	2
Objętość końcowa: 20 μ l	

- Próbę inkubowano w 37°C przez 3 min;
- Reakcję zatrzymywano przez ogrzewanie w 80°C przez 10 minut, następnie próbę wirowano przez 2 min. i schładzano do temperatury pokojowej.

Synteza promotora T7

- Do politymidylowanego cDNA dodawano 2 μ l T7 Template Oligo, inkubowano w 37°C przez 10 min;
- Przygotowano mieszaninę reakcyjną do syntezy promotora T7. Jej skład przedstawiony został w Tabeli 12.

Tabela 12. Synteza promotora T7

Składnik	Objętość [μl]
Politymidylowane cDNA	20
T7 Template Oligo	2
10X miRNA Reaction Buffer	1
10 mM dNTP Mix	1
Fragment Klenowa	1
Objętość końcowa: 25 μ l	

- Mieszaninę reakcyjną delikatnie mieszano i wirowano przez 30 sekund, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min;
- Reakcję zatrzymywano poprzez odgrzanie do 65°C przez 10 min, próbkę przenoszono na lód.

Transkrypcja *in vitro*

- Próbkę zawierającą cDNA oraz 10x T7 Reaction Buffer inkubowano w 37°C przez 10 minut, a następnie przenoszono do temperatury pokojowej;
- Przygotowano mieszaninę do transkrypcji *in vitro* o składzie przedstawionym w Tabeli 13.

Tabela 13. Transkrypcja *in vitro*

Składnik	Objętość [μl]
cDNA	25
10X T7 Reaction Buffer	4
100 mM ATP	1,5
100 mM CTP	1,5
100 mM GTP	1,5
100 mM UTP	1,5
T7 Enzyme Mix	7
Objętość końcowa: 42 μ l	

- Transkrypcję przeprowadzano w 37°C przez 12h;
- Produkty transkrypcji oczyszczano poprzez wytrącanie z liniowym akrylamidem (patrz pkt 4.2.3)

4.3. Analiza jakościowa RNA

Analizę wykonywano wg zaleceń producenta przy użyciu aparatu do elektroforezy kapilarnej Bioanalyzer 2100 (Agilent) oraz zestawu chipów i odczynników (Small RNA Kit). Analizy spektrofotometryczne wykonywano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop (Thermal Scientific) wg zaleceń producenta. Preparaty RNA rozcieńczano 10x przed rozpoczęciem analizy.

4.4. Znakowanie niskocząsteczkowych RNA

4.4.1. Znakowanie enzymatyczne niskocząsteczkowych RNA

NCode miRNA Labeling System z modyfikacjami

Przygotowanie buforów:

Bufor wiążący RNA (**Binding Buffer**) – do 18 ml buforu dodawano 6,5 ml 95% izopropanolu.

Bufor do przemywania złoża (**Wash Buffer**) – do 5 ml buforu dodawano 20 ml 98% etanolu.

Po izolacji i wzbogaceniu we frakcję małych RNA oraz oznaczeniu stężenia i jakości końcowa objętość próbki do znakowania doprowadzana była do 15,5 μ l. W razie konieczności próbkę zagęszczano przy użyciu koncentratora próżniowego SpeedVac. W zależności od ilości niskocząsteczkowego RNA używanego w procedurze ATP (10 mM w 1 mM Tris pH 8,0) używany podczas etapu poliadenylacji rozcieńczano wg wzoru podanego w pkt 4.2.4.

Z uwagi na fakt użycia w procedurze 1 μ g RNA, stężenie ATP ustalono na 2 mM.

4. Metody

Poliadenylacja miRNA

Przygotowywano mieszaninę do poliadenylacji miRNA, której skład przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Poliadenylacja miRNA

Nazwa	Objętość [μ l]
RNA	15,5
5X miRNA Reaction Buffer	5
25 mM MnCl ₂	2,5
2 mM ATP	1
Poly A Polymerase	1
Objętość końcowa: 25 μ l	

- Delikatnie mieszano i wirowano przez 30 sekund;
- Inkubowano przez 1h w 37°C.

Ligacja adaptera wprowadzającego sekwencję „wyłapującą”

- Przygotowano w temperaturze pokojowej mieszaninę do ligacji, której skład przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Ligacja adaptera wprowadzającego sekwencję „wyłapującą”

Nazwa	Objętość [μ l]
Poliadenylowane RNA	25
Alexa Fluor 3 Ligation Mix LUB Alexa Fluor 5 Ligation Mix	6
T4 DNA Ligase	2
Woda wolna od RNaz	3
Objętość końcowa: 36 μ l	

- Mieszaninę reakcyjną delikatnie mieszano i wirowano przez 30 sekund;
- Mieszaninę inkubowano w 20°C przez 3h;
- Reakcję zatrzymywano dodając 4 μ l 0,5 M EDTA;
- Dodawano 60 μ l buforu 1x TE, wortexowano przez 30 sekund, wirowano przez 2 min. w temp. pokojowej.

Oczyszczanie znakowanego miRNA

- Do próby z poprzedniego etapu dodawano 700 μ l Binding Buffer, wortexowano przez 30 sekund i wirowano przez 1 min. w temp. pokojowej;
- 800 μ l próby nanoszono na kolumnkę, wirowano przez 1 minutę, przy 5000 rpm. w temp. pokojowej, przesącz odrzucano;
- W przypadku hybrydyzacji dwukolorowej nakładano na tą samą kolumnkę kolejną próbkę, wirowano j.w.;
- Kolumnkę przemywano 600 μ l Wash Buffer, wirowano przez 30 sekund;
- Wirowanie powtarzano na pustej kolumnce celem pozbycia się resztek buforu myjącego;
- Eluowano 55 μ l (w przypadku hybrydyzacji automatycznej) lub 20 μ l (w przypadku hybrydyzacji ręcznej) wody wolnej od RNaz, wirowano 2 min. przy 13000 rpm. w temp. pokojowej.

4.4.2. Znakowanie chemiczne niskocząsteczkowych RNA

Label IT miRNA Labeling Kit, CyTM3/CyTM5 (Mirus Biosciences)

Przygotowanie odczynników:

Probówki zawierające *Label IT Cy3 Reagent* i *Cy5 Reagent* ogrzewano do temp. pokojowej, a następnie rozpuszczano zawartość w 110 μ l roztworu zawieszającego (*Reconstitution Solution*), delikatnie mieszano przez pipetowanie i wirowano przez 60 sekund.

Przygotowywano mieszaninę do znakowania miRNA, której skład przedstawiono w Tabeli 16. Każdorazowo do reakcji używano 1 μ g niskocząsteczkowych RNA.

Tabela 16. Znakowanie chemiczne niskocząsteczkowych RNA

Składnik	Objętość [μ l]
RNA	95
Label IT Cy3 Reagent LUB Label IT Cy5 Reagent	4
10X Labeling Buffer M 10	1
Objętość końcowa: 100 μ l	

- Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 37°C przez 1h;
- Reakcję zatrzymywano przez dodanie 10 μ l 10X STOP Reagent, delikatnie worteksowano;
- Wyznakowane RNA wytrącano poprzez dodanie 2 μ l koprecypitanta (Precipitation Enhancer Solution), 11 μ l 5M chlorku sodu i 300 μ l 98% etanolu. Inkubowano w -20°C przez 2h;
- Wirowano 30 min przy 13000 rpm w 4° C, delikatnie zbierano i odrzucano supernatant;
- Osad przemywano 500 μ l 70% zimnego etanolu poprzez wirowanie przez 20 min przy 13000 rpm w 4° C (jeśli występował duży osad soli powtarzano), zebrano i odrzucano supernatant;
- Wirowano przez 30 sekund i aspirowano resztki etanolu cienkim tipsem;
- Osad suszono na powietrzu i rozpuszczano w 110 μ l roztworu hybrydyzacyjnego (1X Hybridization Solution), podgrzanego do temperatury hybrydyzacji.

4.5. Drukowanie mikromacierzy

Sondy:

Do przygotowania mikromacierzy wykorzystano komercyjne oligonukleotydowe sondy z zestawu *NCode Mammalian miRNA Microarray Probe Set v. 1.0* (Invitrogen). Sondy zaprojektowano na podstawie sekwencji dojrzałych miRNA zawartych w bazie Sanger miRBase 7.0 (<http://microrna.sanger.ac.uk>) dla człowieka, myszy domowej oraz szczura. Zestaw zawierał w sumie 897 sond, w tym 144 sondy dla potencjalnych ludzkich miRNA przewidywanych metodami bioinformatycznymi²⁰⁴.

²⁰⁴XIE, X., *Nature*, (2005), s. 338.

Sekwencje sond zostały zaprojektowane przy użyciu opatentowanego algorytmu²⁰⁵ i posiadają znormalizowane temperatury topnienia w ramach całego zestawu.

Oligonukleotydowe sondy są niemodyfikowane oraz charakteryzują się zakresem długości od 34-44 nt. Zestaw zawierał 500 pmoli każdej sondy. Stężenie robocze sond ustalono na 20 μ M.

Przygotowanie sond:

Zliofilizowane sondy rozpuszczono w 50 μ l buforu Pronto/na studzienkę płytki mikrotitracyjnej, wytrząsając w temperaturze pokojowej przez 3h. Po wytrząsaniu płytki mikrotitracyjne wirowano przez 3 min przy 1500 rpm. Sondy nadrukowywano w trzech powtórzeniach na szkiełkach pokrytych epoksysilanem Corning Epoxide Coated Slides (*Corning*) w warunkach zalecanych przez producenta przy użyciu 4 igieł SMP3 i drukarek do mikromacierzy SpotArray 24 (*Perkin Elmer*) oraz NanoPrint LM60 (*ArrayIt*).

4.6. Hybrydyzacja mikromacierzy

Po oczyszczeniu znakowanego miRNA, przygotowano mieszaninę hybrydyzacyjną wg poniższych protokołów.

4.6.1. Hybrydyzacja ręczna – znakowanie enzymatyczne

- Roztwór hybrydyzacyjny (2X Hybridization Solution) inkubowano w 70°C przez 10 min, a następnie wortkesowano przez około 60 sekund do całkowitego rozpuszczenia;
- Próbę do hybrydyzacji przygotowano poprzez zmieszanie 20 μ l znakowanego miRNA z 20 μ l podgrzanego roztworu hybrydyzacyjnego;
- Próbę worteksowano przez 30 sekund i wirowano przez ok. 60 sekund, inkubowano w 80°C przez 10 minut, a następnie w 52°C do momentu nałożenia na macierz.

²⁰⁵ GOFF, L.A., *RNA Biol*, (2005), s. 93.

4. Metody

- Nałożono szkiełko nakrywkowe na macierz, delikatnie nałożono próbkę na skraj szkiełka podstawowego (siły kapilarne powodują rozprowadzenie próby między szkiełko nakrywkowe i mikromacierz), przeniesiono macierz do komory hybrydyzacyjnej Corning Hybridization Chamber (*Corning*), hybrydyzowano w łaźni wodnej wg następującego protokołu przedstawionego w Tabeli 17:

Tabela 17. Hybrydyzacja miRNA znakowanego enzymatycznie

Etap	temp. [°C]	Czas
hybrydyzacja 1	52	6h
hybrydyzacja 2	46	6h
hybrydyzacja 3	40	6h

- Macierze przemywano w stacji myjącej ArrayIt High-Throughput Wash Station (*ArrayIt*) w 500 ml objętości kolejnych buforów, jak przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Płukanie mikromacierzy

Etap	temp. [°C]	Czas	Uwagi
płukanie 1	50	10 min	Bufor: (2x SSC, 0,1% SDS)
płukanie 2	25	10 min.	Bufor: (2x SSC)
płukanie 3	25	10 min.	Bufor: (0,2x SSC)

- Macierze suszono wirując przez 2 min. przy 1500 rpm.

Przed zakończeniem hybrydyzacji przygotowano mieszaninę hybrydyzacyjną dla drugiej hybrydyzacji:

- Rozpuszczano w ciemności Alexa Fluor 3 i Alexa Fluor 5 Capture Reagents przez 20 min. w temp. pokojowej;
- Alexa Fluor 3 i Alexa Fluor 5 Capture Reagents worteksowano przez 15 sekund, wirowano przez 30 sekund, a następnie inkubowano w ciemności w 55°C przez 10 minut, worteksowano 15 sekund, wirowano 1 minutę;
- Przygotowywano mieszaninę hybrydyzacyjną poprzez zmieszanie 20 µl podgrzanego do 70°C roztworu hybrydyzacyjnego (2X Hybridization Solution) z 15 µl wody wolnej od RNaz oraz po 2,5 µl Alexa Fluor 3 i Alexa Fluor 5;

4. Metody

- Inkubowano w ciemności w temp 80°C, przez 10 min, a do momentu nałożenia na macierz próbę inkubowano w 58°C;
- Nałożono szkiełko nakrywkowe na macierz, delikatnie nałożono próbę na skraj szkiełka podstawowego (siły kapilarne powodują rozprowadzenie próby między szkiełko nakrywkowe i mikromacierz), przeniesiono macierz do komory hybrydyzacyjnej, hybrydyzowano w łaźni wodnej w temperaturze 58°C przez 4 godziny. Macierze przemywano w stacji myjącej, analogicznie jak w przypadku pierwszej hybrydyzacji (Tabela 18);
- Macierze suszono wirując przez 2 min. przy 1500 rpm.

4.6.2. Hybrydyzacja automatyczna– znakowanie enzymatyczne

- Roztwór hybrydyzacyjny (2X Hybridization Solution) inkubowano w 70°C przez 10 min, a następnie wortkesowano przez 60 sekund do całkowitego rozpuszczenia;
- Przygotowano próbę do hybrydyzacji poprzez zmieszanie 55 µl znakowanego miRNA z 55 µl podgrzanego roztworu hybrydyzacyjnego;
- Próbę worteksowano przez 15 sekund, wirowano przez 60 sekund, a następnie inkubowano w 80°C przez 10 minut, po czym inkubowano w 52°C do momentu nałożenia na macierz);
- hybrydyzowano w automatycznej stacji hybrydyzacji HybArray 12 (*Perkin Elmer*) wg protokołu przedstawionego w Tabeli 19.

Tabela 19. Hybrydyzacja automatyczna miRNA znakowanego enzymatycznie

Etap	temp. [°C]	Czas	Uwagi
Podgrzewanie	52	1 min	-
nałożenie próby	52	-	-
hybrydyzacja 1	52	6h	-
hybrydyzacja 2	46	6h	-
hybrydyzacja 3	40	6h	-
płukanie 1	50	10 min	Bufor: (2x SSC, 0,1% SDS)
płukanie 2	25	10 min.	Bufor: (2x SSC)
płukanie 3	25	10 min.	Bufor: (0,2x SSC)
Suszenie	Pokojowa	1 min.	-

4. Metody

- Macierze suszono wirując przez 2 min. przy 1500 rpm.

Przed zakończeniem hybrydyzacji przygotowano mieszaninę hybrydyzacyjną dla drugiej hybrydyzacji:

- Rozpuszczano w ciemności Alexa Fluor 3 i Alexa Fluor 5 Capture Reagents przez 20 min. w temperaturze pokojowej;
- Alexa Fluor 3 i Alexa Fluor 5 Capture Reagents wortexowano przez 15 sekund, wirowano przez 30 sekund, a następnie inkubowano w ciemności w 55°C przez 10 minut, wortexowano 15 sekund, wirowano 1 minutę;
- Przygotowano mieszaninę hybrydyzacyjną poprzez zmieszanie 55 µl podgrzanego do 70°C roztworu hybrydyzacyjnego (2x Hybridization Solution) z 50 µl wody wolnej od RNaz oraz po 2,5 µl barwników Alexa Fluor 3 i Alexa Fluor 5;
- Inkubowano w ciemności w temp 80°C, przez 10 min, (do momentu nałożenia na macierz próbę inkubowano w 58°C), hybrydyzowano wg protokołu przedstawionego w Tabeli 20.

Tabela 20. Hybrydyzacja automatyczna Alexa Fluor 3/5 Capture Reagents do uprzednio hybrydyzowanej mikromacierzy.

Etap	temp. [°C]	Czas	Uwagi
Podgrzewanie	58	1 min	-
nałożenie próby	58	-	-
Hybrydyzacja	58	4h	-
płukanie 1	50	10 min	Bufor: (2x SSC, 0,1% SDS)
płukanie 2	25	10 min.	Bufor: (2x SSC)
płukanie 3	25	10 min.	Bufor: (0,2x SSC)
Suszenie	pokojowa	1 min.	-

- Macierze suszono wirując przez 2 min. przy 1500 rpm.

4.6.3. Hybrydyzacja automatyczna – znakowanie chemiczne

- Przed właściwą hybrydyzacją mikromacierz poddano prehybrydyzacji w 45°C przez 45 minut w buforze (5X SSC, 0.1% SDS, 1% BSA);
- Macierze przemyto wodą wolną od RNaz, a następnie suszono przez wirowanie przez 2 min. przy 1500 rpm;
- Wyznakowaną próbkę (100 µl) rozpuszczano w roztworze hybrydyzacyjnym (1x Hybrydization Solution) w 65°C przez 5 min, a następnie krótko wirowano;
- hybrydyzowano w automatycznej stacji hybrydyzacji HybArray 12 (Perkin Elmer) wg protokołu przedstawionego w Tabeli 21.

Tabela 21. Hybrydyzacja automatyczna miRNA znakowanego chemicznie

Etap	temp. [°C]	Czas	Uwagi
Podgrzewanie	45	1 min	
nałożenie próby	45	-	
hybrydyzacja	45	18h	
płukanie 1	45	10 min	Bufor: (2x SSC, 0,1% SDS)
płukanie 2	45	10 min.	Bufor: (1x SSC)
płukanie 3	25	10 min.	Bufor: (0,1x SSC)
Suszenie	pokojowa	1 min.	

- Macierze suszono wirując przez 2 min, przy 1500 rpm.

4.7. Skanowanie mikromacierzy

Osuszone mikromacierze umieszczano w skanerze (ScanArray Express – *Perkin Elmer*, GenePix 4100A – *Molecular Devices*). W zależności od dobranego fluoroforu używano lasera o długości fali 546 nm (AlexaFluor 3) lub 647 nm (AlexaFluor 5). Wstępne skanowanie wykonywano przy rozdzielczości 50 µm, dobierając na bieżąco wartość parametru PMT gain, w zależności od intensywności sygnału. Ostateczne skanowanie wykonywano przy rozdzielczości 10 µm.

4.8. Analiza danych

Uzyskane skany mikromacierzy poddawano obróbce w programie GenePix Pro 6.0, celem wygenerowania danych numerycznych (plików gpr). Dane te zawierają m.in. takie informacje jak liczba pikseli odzwierciedlająca intensywność fluorescencji poszczególnych sond oraz tła wokół nich, identyfikatory sond i parametry ich lokalizacji na szkiełku, a także etykiety jakości (ang. *flags*) odnoszące się do jakości plamek na mikromacierzy.

Po wygenerowaniu danych dla wszystkich badanych macierzy przystąpiono do analiz wyższego rzędu. Wybraną platformą do analiz było środowisko programistyczne R wraz z oprogramowaniem do analiz danych biologicznych BioConductor. Analiza składała się z następujących etapów: (i) import surowych danych generowanych w GenePix Pro; (ii) usunięcie danych dla kanału kontrolnego; (iii) normalizacja wartości intensywności w ramach macierzy metodą VSN (**Variance stabilization and calibration for microarray data**); (iv) normalizacja pomiędzy macierzami metodą SCALE; (v) uśrednienie powtórzeń tych samych sond; (vi) tworzenie modelu liniowego i analiza różnicowa (test t-Studenta, z wykorzystaniem twierdzenia Bayesa wraz z poprawką dla testowań wielokrotnych Benjamini i Hochberga); (vii) selekcja miRNA różnicujących analizowane grupy; (viii) filtracja różnicujących miRNA pod względem istotności statystycznej.

5. Wyniki i dyskusja

5.1. Projektowanie mikromacierzy

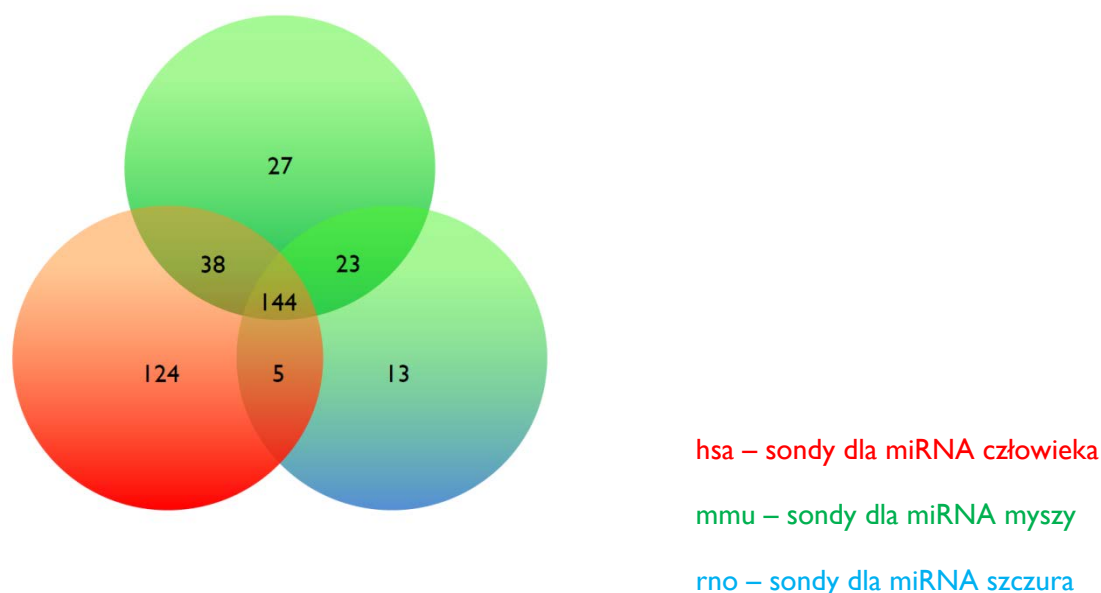
Podczas projektowania eksperymentu mikromacierzowego pierwszą decyzją, jaką należy podjąć, jest wybór platformy technologicznej. Częściowo wybór ten determinują względy praktyczne – posiadane fundusze, rozmach eksperymentu oraz to, jakim sprzętem dysponuje pracownia, w której eksperyment będzie wykonywany. Decydując się na niektóre z komercyjnych platform, np. Affymetrix czy Illumina, jesteśmy uzależnieni od aktualnie dostępnych mikromacierzy danego producenta. Z drugiej strony, dysponując bardziej uniwersalną aparaturą, obsługującą macierze w formacie szkiełka podstawowego, 2,5x7,5 cm, mamy zarówno większy wybór gotowych mikromacierzy jak i możliwość produkcji macierzy własnego projektu.

5.1.1. Sondy

Jeżeli realizowany projekt zakłada wykonanie dużej liczby eksperymentów mikromacierzowych, warto rozważyć drukowanie mikromacierzy we własnym zakresie. Minimalizuje się wówczas koszty samych macierzy. Jeśli obiektem naszych badań jest organizm modelowy, pozostaje wybór pomiędzy projektowaniem sond „*de novo*” a skorzystaniem z dostępnych komercyjnych zestawów. W przypadku mikromacierzy dedykowanych miRNA (z uwagi na fakt niewielkiej długości cząsteczek miRNA i zróżnicowania ich sekwencji) właściwe zaprojektowanie sond, tak aby spełniały warunek izotermiczności przy jednoczesnym zachowaniu specyficzności hybrydyzacji jest zadaniem skomplikowanym. Stworzenie od podstaw zastawu sond do drukowania mikromacierzy (wraz z ich ewentualnymi modyfikacjami chemicznymi np. w postaci nukleotydów LNA), w połączeniu z ich walidacją i testami jest wyzwaniem samym w sobie, wykraczającym poza ramy tej pracy doktorskiej. Ponieważ materiałem badawczym miały być komórki ludzkie, zdecydowano się wykorzystać jeden z komercyjnie dostępnych zestawów sond oferowany przez firmę Invitrogen (Materiały pkt. 3.3). Zawarte w nim były:

- (i) sondy specyficzne dla ludzkich, mysich oraz szczurzych miRNA;
- (ii) sondy kontrolne (kontrolne znakowania i kontrolne „spike-in”);
- (iii) sondy dla potencjalnych ludzkich miRNA zidentyfikowanych jedynie metodami bioinformatycznymi.

Aby odpowiedzieć na pytanie, których sond należy użyć przy projektowaniu mikromacierzy wykonano analizę homologii sond dedykowanych dla poszczególnych gatunków, co przedstawiono na Rysunku 8. Ponadto określono ile sond dla danego gatunku różni się odpowiednio o 1, 2, 3 lub więcej nukleotydów od sond ludzkich, co przedstawiono w Tabeli 22.



Rysunek 8. Diagram Venne’a przedstawiający 3 zbiory sond ssaczych w zestawie NCode Mammalian and Non-Mammalian miRNA Microarray Probe Set v. 1.0. (Invitrogrn). Kolorami przedstawiono sondy specyficzne dla *Homo sapiens* (czerwone), *Mus musculus* (zielone) i *Rattus norvegicus* (niebieskie), zaznaczono liczbę sond identycznych pomiędzy gatunkami oraz dlań specyficznych.

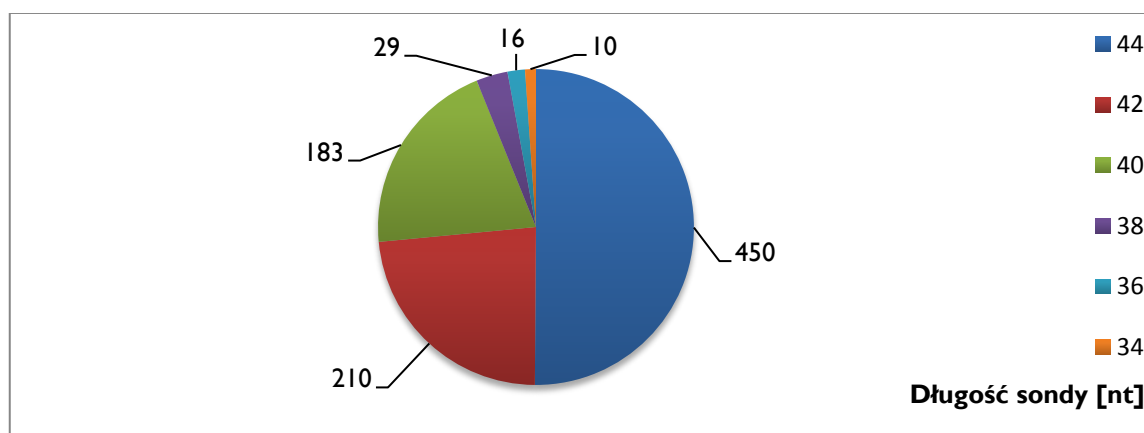
Tabela 22. Liczba sond stosowanych do detekcji mysich i szczurzych miRNA różniących się od swoich odpowiedników używanych do detekcji ludzkich miRNA.

	1 różny nt	2 różne nt	3 i więcej różnych nt
Mus musculus	1	3	>13
Rattus norvegicus	0	3	>10

5. Wyniki i dyskusja

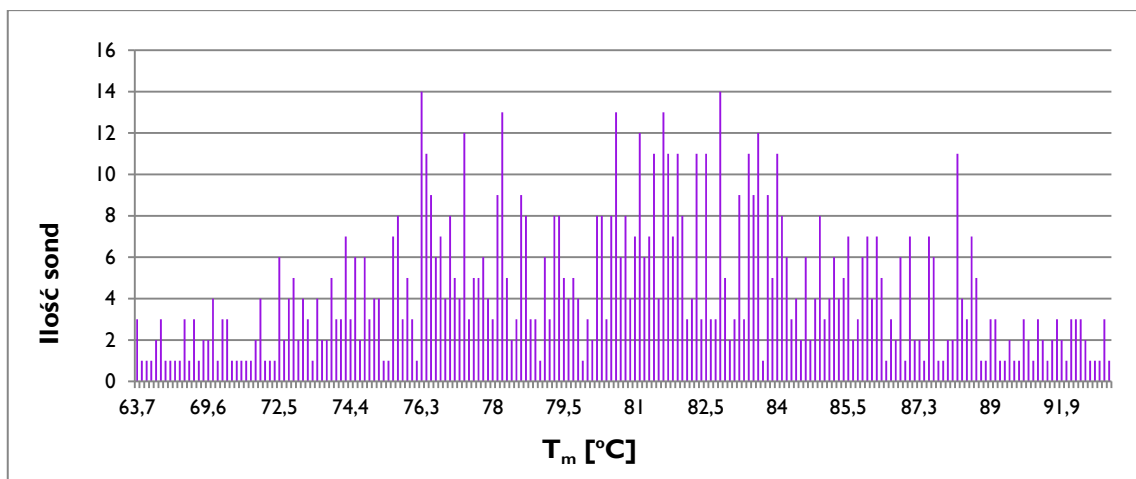
Powyższe dane umożliwiły podjęcie decyzji, że najkorzystniejsze będzie użycie do drukowania wszystkich dostępnych sond, a nie tylko tych dedykowanych do wykrywania miRNA człowieka. Z uwagi na fakt, że 200 sond dla myszy, szczura i człowieka ma identyczną sekwencję, ich nadrukowanie w różnych miejscach na mikromacierzy umożliwia zwiększenie powtórzeń danej sondy. Z drugiej strony, sondy różniące się dokładnie jednym, dwoma lub trzema nukleotydami mogą służyć jako kontrole negatywne, pozwalając na dopracowanie optymalnych warunków hybrydyzacji. W odpowiednich warunkach różnica jednej zasady w sekwencji sondy powinna zapewnić specyficzność hybrydyzacji próby, bowiem jedynie w pełni komplementarna cząsteczka wyznakowanego miRNA winna wiązać się stabilnie z odpowiadającą jej sondą. Wiadomo też, że restrykcyjne warunki odmywania mikromacierzy dodatkowo zwiększają specyficzność, pozwalając pozbyć się materiału, który słabiej związał się z sondami.

Wykorzystane sondy miały długość od 34 do 44 nt, przy czym dla zdecydowanej większości z nich (94%) mieściła się ona w zakresie 40-44 nt, co ilustruje Wykres 1.



Wykres 1. Długość sond.

Temperatury topnienia użytych sond wahały się od 63,7 do 101,9 °C, co przedstawia Wykres 2.



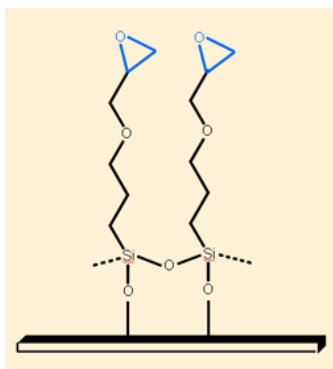
Wykres 2. Wykres przedstawiający liczbę sond o określonej temperaturze topnienia.

Ostatnim etapem analizy sond była weryfikacja tych sond, które w chwili projektowania zestawu były dedykowane miRNA zidentyfikowanym jedynie metodami bioinformatycznymi (potencjalne miRNA). W trakcie realizacji niniejszej pracy okazało się, że część z tych sond rzeczywiście wykrywa ludzkie miRNA. Część jednak okazała się bardziej pasować do miRNA z innych gatunków lub też do innych sekwencji w ludzkim transkryptomie, tym samym powiększając liczbę kontroli negatywnych na mikromacierzy. Wyniki analizy pokazano w Załączniku 2.

5.1.2. Powierzchnie do drukowania

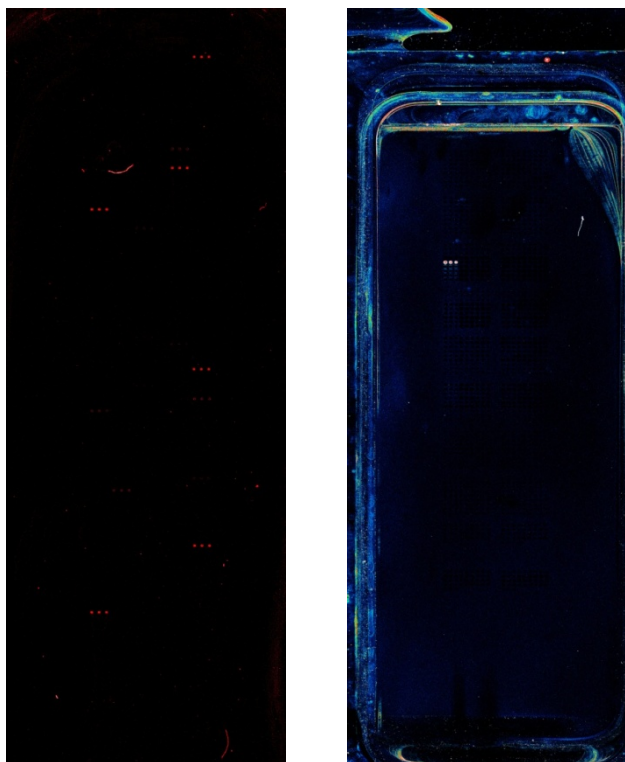
Mając na względzie fakt, że użyte sondy posiadały linker z wolną grupą aminową zdecydowano się na użycie szkiełek podstawowych pokrytych epoksysilanem. Dzięki temu sondy połączone były kowalencyjnie z powierzchnią szkiełka, czyli stabilniej niż w przypadku wiązania na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych²⁰⁶. Poza tym wykorzystanie epoksysilanów nie wymaga zapiekania w wysokiej temperaturze oraz cross-linkingu nadrukowanych sond ze szkiełkami podstawowymi. Budowę chemiczną epoksysilanów, którymi pokryta została powierzchnia szkiełek przedstawiono na Rysunku 9.

²⁰⁶CHIU, S.K., *Biochem J*, (2003), s. 625.



Rysunek 9. Schematyczne przedstawienie epoksylanów naniesionych na powierzchnię szkiełek podstawowych – zaznaczono połączenia między sąsiadującymi grupami silylowymi oraz reaktywne reszty epoksydowe (kolor niebieski).

We wstępnych testach użyto dwóch komercyjnie dostępnych szkiełek podstawowych Corning Epoxide Coated Slides (*Corning*) oraz Nexterion Slide E, (*Schott*). Do obu typów szkiełek przyłączono sondy kontrolne (Alexa 5 Test Feature), a następnie do uzyskanych w ten sposób mikromacierzy hybrydowano próbę zawierającą wyznakowany komplementarny oligonukleotyd. Eksperyment prowadzono wg przedstawionego wcześniej protokołu (Metody pkt 4.6.1.). Skany mikromacierzy otrzymanych po hybrydyzacji przedstawiono na Rysunku 10.



Rysunek 10. Po lewej przedstawiono typowy skan mikromacierzy drukowanej na powierzchni epoksydowej firmy Corning, po prawej analogiczny skan mikromacierzy drukowanej na szkiełku epoksydowym firmy Schott.

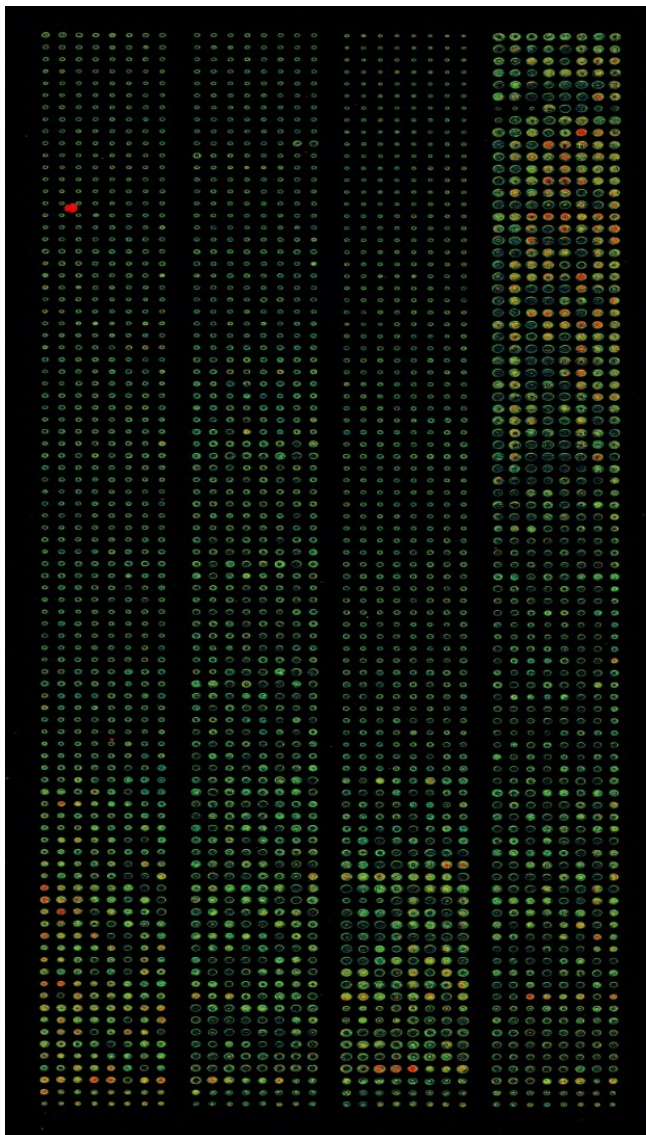
Jak widać na przedstawionych powyżej obrazach, szkiełka epoksydowe firmy Corning charakteryzowały się mniejszą fluorescencją tła, w odróżnieniu od szkiełek firmy Schott, w przypadku których sygnał tła był zdecydowanie mocniejszy, za to ilość sygnałów kontrolnych mniejsza, co mogłoby sugerować niepełne wiązanie sondy do powierzchni lub słabsze wiązanie sondy z próbą. Z tego powodu w kolejnych eksperymentach używano szkiełek firmy Corning.

5.1.3. Projektowanie i przygotowanie mikromacierzy

Kolejnym etapem po wyborze sond oraz szkiełek podstawowych było zaprojektowanie układu sond na mikromacierzy. W przypadku drukowania mikromacierzy decyzje, które należy podjąć sprowadzają się m.in.: do określenia: (i) liczby powtórzeń danej sondy; (ii) umiejscowienia powtórzeń w ramach macierzy; (iii) ilości bloków (submacierzy) oraz ich kształtu; (iv) optymalnej średnicy plamek (reprezentujących pojedynczą naniesioną sondę), odległości między nimi oraz lokalizacji całej macierzy na szkiełku podstawowym. Ilość powtórzeń (replik) danej sondy powinna być możliwie jak największa. Dzięki temu uśredniona wartość intensywności sygnału jest bardziej wiarygodna. Poszczególne repliki powinny znajdować się możliwie jak najdalej od siebie na macierzy (np. w różnych submacierzach). Pozwala to ustalić czy warunki hybrydyzacji na całej powierzchni szkiełka podstawowego są homogenne. Jeśli tak jest wówczas intensywność fluorescencji dla każdej z replik jest porównywalna. W przypadku kształtu macierzy najważniejszym kryterium jest ich symetria, gdyż jej brak dalece utrudnia analizę wyników. Natomiast wielkość plamek i odległości między nimi muszą być dostosowane między innymi do rodzaju użytego buforu, w którym rozpuszczone są sondy, a także rozstawu igieł głowicy drukującej. W przypadku komercyjnego zestawu sond czynnikiem ograniczającym jest przyjęte przez producenta rozmieszczenie liofilizowanych sond na płytkach mikrotitracyjnych. Chcąc uzyskać rozdzielanie replik w ramach macierzy konieczna byłaby zmiana położenia sond na płytkach, bądź też użycie jedynie jednej igły do drukowania, co znacznie wydłużyłoby proces drukowania macierzy. To z kolei wiąże się ze zmianami stężeń sond w trakcie drukowania na skutek odparowania części buforu. Pierwszy problem udało się rozwiązać stosując sondy nie tylko dla miRNA człowieka, ale i dla miRNA myszy i szczura. Ponieważ większość

odpowiadających sobie sond była identyczna stanowiły one repliki ulokowane w różnych częściach macierzy. Z kolei użycie buforu zawierającego DMSO (Pronto! Epoxide Spotting Solution – *Corning*) ograniczyło parowanie w trakcie drukowania. Tym samym podczas nanoszenia sond na szkiełka ich stężenie na płytkach mikrotitracyjnych było lepiej kontrolowane. Z drugiej jednak strony uzyskiwana była większa średnica plamek w porównaniu z tymi, gdy stosuje się bufor wodne, np. bufor fosforanowy lub 3 x SSC. Mając to na względzie zwiększono odległość między plamkami celem zapobieżenia ewentualnemu zlewaniu się nadrukowanych plamek.

Biorąc pod uwagę liczbę sond i powyższe ograniczenia maksymalną ilość replik każdej sondy ustalono na 3. Wykonana mikromacierz składała się z czterech prostokątnych bloków (submacierzy), składających się z 8 kolumn i 90 rzędów plamek każdy. Symetrię submacierzy uzyskano poprzez nadrukowanie samego buforu w miejscach, gdzie brakowało sond. Uzyskano plamki o rozmiarze ok. 300 μm , przy odległości między plamkami wynoszącej 500 μm . Wydrukowaną mikromacierz przedstawiono na Rysunku 11.



Rysunek II. Skan niehybrydowanej mikromacierzy ukazujący rozmieszczenie sond, rozdzielczość 10 μm , PMT 70, filtr – Red Reflect. Użyty filtr umożliwia zobrazowanie kryształów soli zawartych w buforze do drukowania macierzy, a tym samym pozwala ocenić jakość drukowania bez konieczności hybrydacji.

W programie obsługującym drukarki do mikromacierzy generowany jest tzw. plik GAL (ang. *GenePix Array List*), który jest konieczny na etapie analizy wyników. Zawarte są w nim między innymi dane o: (i) ilości submacierzy oraz ich kształcie; (ii) pozycji i wymiarach poszczególnych submacierzy, średnicy plamek i odległości między nimi, liczbie kolumn i rzędów; (iii) współrzędnych każdej plamki (submacierz, kolumna, rząd) wraz z identyfikatorem sondy, którą reprezentuje.

5.2. Uzyskiwanie niskocząsteczkowych RNA

5.2.1. Izolacja frakcji niskocząsteczkowych RNA

Podstawowym kryterium stosowanym przy doborze metody izolacji RNA do badań mikromacierzowych było założenie, że musi ona posiadać trzy cechy: (i) umożliwiać izolację całkowitego komórkowego RNA, w tym frakcji niskocząsteczkowej; (ii) pozwalać wydzielić zatężoną frakcję zawierającą niskocząsteczkowe RNA (w tym miRNA); (iii) zapewniać wysoką wydajność izolacji i czystość preparatu. Do wstępnych testów wybrano dwa komercyjnie dostępne zestawy (patrz Materiały pkt 3.3.1.). Podczas optymalizacji metod korzystano z RNA uzyskanego z linii komórkowych HL-60 i HeLa (warunki hodowli opisano w rozdziale Metody pkt 4.1.1.), otrzymanych od dr Marcina Schmidta z Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

W obu wybranych metodach pierwszy etap polegał na lizie komórek w denaturującym roztworze stabilizującym RNA oraz inaktywującym RNazy. Następnie w przypadku zestawu miRVana następowała ekstrakcja mieszaniną kwaśny fenol:chloroform:alkohol izoamylowy, która umożliwia pozbycie się większości niepożądanych składników komórkowych, w tym większości DNA²⁰⁷. W kolejnym etapie do fazy wodnej dodawano 98% etanol, do uzyskania końcowego stężenia 25%. W przypadku zestawu PureLink bezpośrednio do lizatu uzyskanego w pierwszym etapie dodawano 98% etanol do końcowego stężenia 35%. Otrzymane roztwory przepuszczono przez złoża: z włókna szklanego – miRVana lub krzemionkowe – PureLink. W obu przypadkach duże RNA są immobilizowane, a małe przechodzą wraz z filtratem. Następnie stężenie EtOH w filtracie jest zwiększane: do 55% – miRVana lub 70% – PureLink. Filtrat zostaje naniesiony na kolejne złożo, na którym immobilizowane zostają małe RNA. Złożo jest przemywane kilkakrotnie, a w dalszej kolejności dokonuje się elucji roztworem o niskiej sile jonowej. W rezultacie otrzymuje się frakcje wzbogacone w cząsteczki o długości poniżej 200 nt. Schemat obu metod izolacji pokazuje Rysunek 12.

²⁰⁷ CHOMCZYNSKI, P., *Anal Biochem*, (1987), s. 157.

miRVana (Ambion)



liza komórek i homogenizacja



ekstrakcja – fenol: chloroform:
alkohol izoamylowy (25:24:1),
pH= 4,5



dodanie 98% etanolu do **fazy
wodnej** do końcowego
stężenia **25%**.



wirowanie ze złożem,
zebranie filtratu



dodanie 98% etanolu do filtratu
do końcowego stężenia **55%**,
wirowanie ze złożem



trzykrotne przemycie złoża
dwoma buforami myjącymi



elucja wodą wolną od RNaz

PureLink (Invitrogen)



liza komórek i homogenizacja



dodanie 98% etanolu do **lizatu**
do końcowego stężenia **35%**.



wirowanie ze złożem,
zebranie filtratu



dodanie 98% etanolu do
filtratu do końcowego stężenia
70%, wirowanie ze złożem



dwukrotne przemycie złoża
jednym buforem myjącym



elucja wodą wolną od RNaz

Rysunek 12. Schemat przedstawiający kolejne etapy izolacji niskocząsteczkowych RNA dwiema testowanymi metodami.

5. Wyniki i dyskusja

Do pierwszych izolacji użyto 10^7 komórek z hodowli linii komórkowych HeLa i HL-60. Jakość i stężenie niskocząsteczkowych RNA określono przy użyciu spektrofotometru UV, przy długościach fali 280, 260 i 230 nm. Stężenie niskocząsteczkowych RNA obliczano wg zmodyfikowanego wzoru na stężenie całkowitego RNA:

$$c[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \frac{1000 * M}{\epsilon * l}$$

Gdzie:

ϵ – molowy współczynnik ekstynkcji ($l * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$);

l – długość drogi świetlnej (w przypadku użytego spektrofotometru – 1 cm);

M – masa molowa (g/mol);

c – stężenie.

Dla niskocząsteczkowych kwasów nukleinowych iloraz $1000 * M / \epsilon * l$ wynosi w przybliżeniu 33, dlatego też wzór można było uprościć do:

$$c[\mu\text{g/ml}] = A_{260} * 33$$

Przykładowe wyniki z serii izolacji przedstawiono w Tabeli 23.

Tabela 23. Jakościowa i ilościowa analiza spektrofotometryczna niskocząsteczkowych RNA

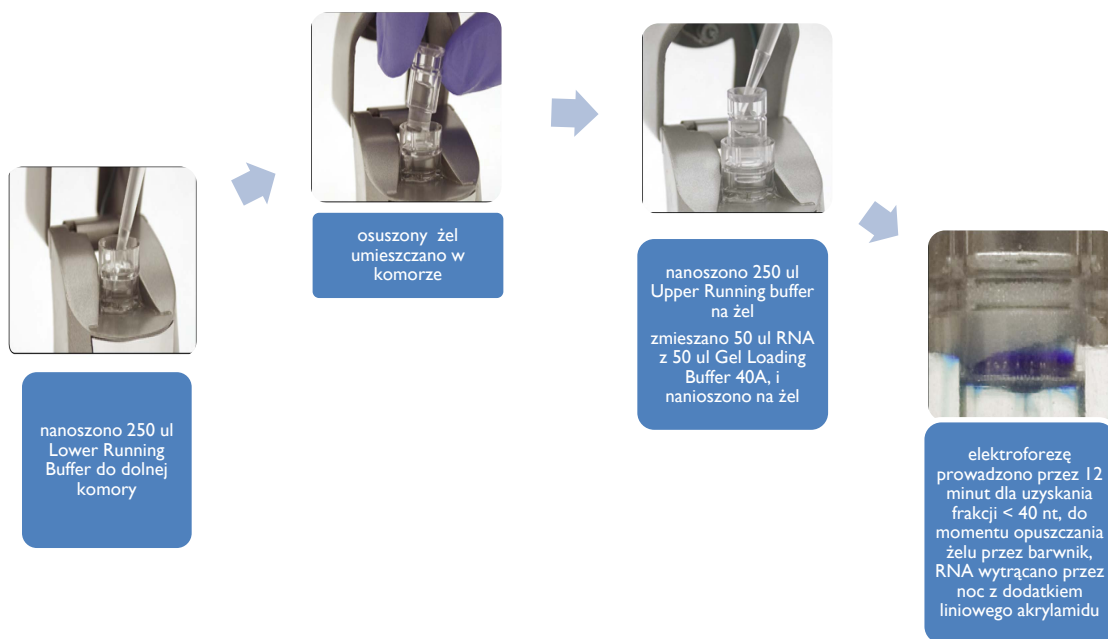
Próbka	A ₂₆₀	Rozc.	V [μl]	C [ng/μl]	Masa [μg]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
HL60/PL	0,14	X100	55	280	15,5	1,75	1,95
HeLa/PL	0,14	X100	55	270	16	1,72	1,92
HL60/MVana	0,35	X100	100	160	13,9	1,97	2,01
HeLa/MVana	0,32	X100	100	146	13,5	2,03	2,07

Uzyskane wyniki sugerowały przewagę metody izolacji z wykorzystaniem ekstrakcji fenol:chloroform (miRVana). Charakteryzujące jakość uzyskanego RNA wartości współczynnika 260nm/280nm (stosunek absorpcji przy długości fali 260nm i 280nm) były bowiem bliższe optymalnej wartości 2 dla próbek otrzymanych przy

5. Wyniki i dyskusja

użyciu zestawu miRVana (1,97 i 2,03). Dla próbek otrzymanych przy pomocy zestawu PureLink wynosiły one 1,75 i 1,72 co wskazywało na zanieczyszczenie próbek białkami. Dlatego też w dalszych badaniach wykorzystywano metodę opisaną w pkt. 4.2.1. rozdziału Metody.

Kolejnym pytaniem, jakie zadano podczas procesu optymalizacji pozyskiwania niskocząsteczkowych RNA, było czy frakcjonowanie preparatu (RNA < 200 nukleotydów) dla uzyskania puli cząsteczek poniżej 30 nukleotydów może wydatnie wpływać na jakość późniejszego znakowania oraz hybrydyzacji próby. Do tego celu zdecydowano się wykorzystać frakcjonator firmy Ambion. Frakcjonowanie prowadzono wg wskazań producenta (Metody pkt 4.2.2.) zgodnie z procedurą przedstawioną schematycznie na Rysunku 13.



Rysunek 13. Schemat frakcjonowania niskocząsteczkowych RNA (Ambion).

Na frakcjonator każdorazowo nanoszono 10 µg niskocząsteczkowych RNA (< 200 nt). RNA o długości poniżej 30 nt zawarte w buforze po elektroforezie wytrącano z dodatkiem liniowego akrylamidu (Metody pkt. 4.2.3), rozpuszczano w 20 µl wody wolnej od RNaz. Jakość i ilość RNA określano spektrofotometrycznie. Wyniki przedstawiono w Tabeli 24.

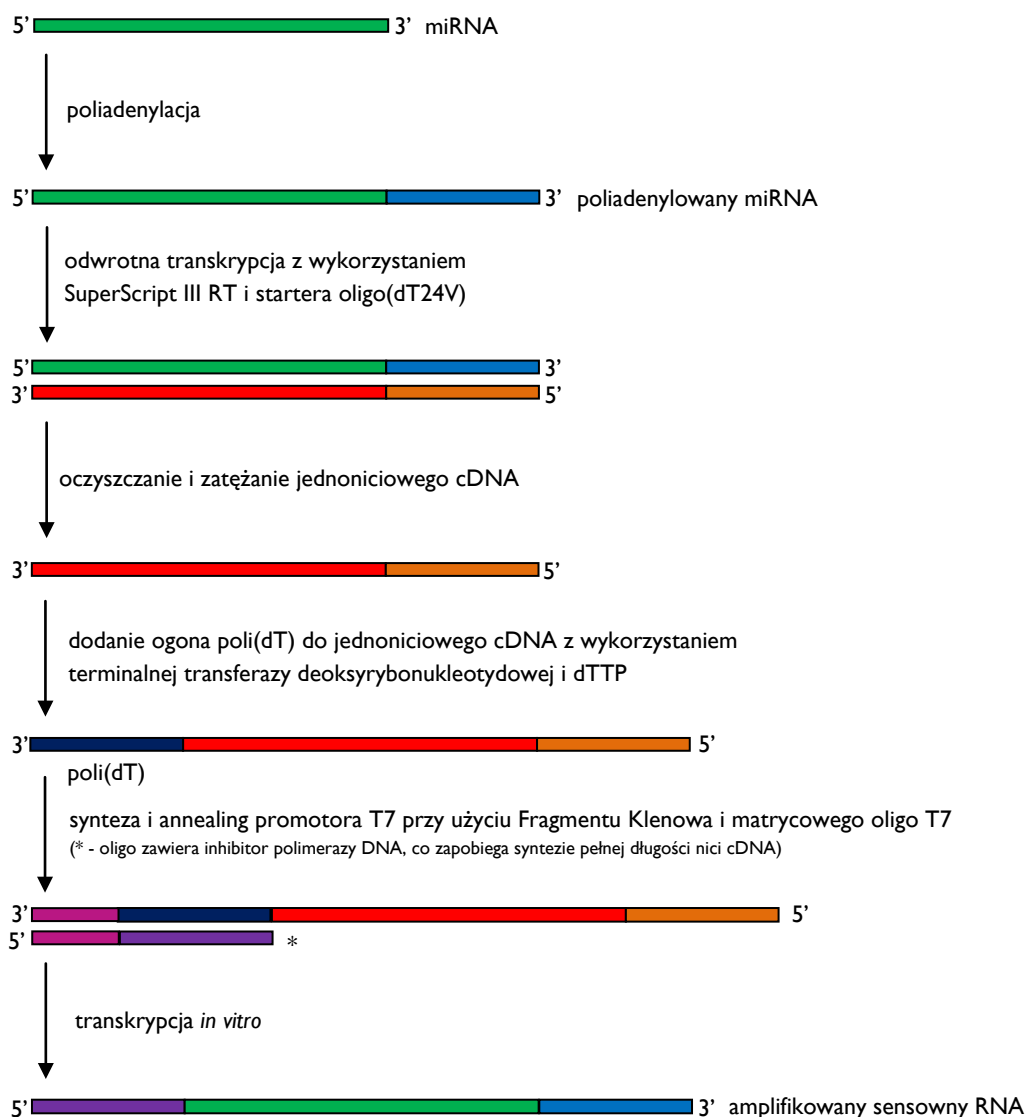
Tabela 24. Jakościowa i ilościowa analiza spektrofotometryczna niskocząsteczkowych RNA uzyskanych po frakcjonowaniu i wytrącaniu z dodatkiem liniowego akrylamidu.

Próbka	A ₂₆₀	Rozc.	V [μl]	c [ng/μl]	Masa [μg]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
HL60_1	0,14	XI	20	28	0,56	1,75	1,95
HL60_2	0,14	XI	20	27	0,54	1,72	1,92
HL60_3	0,35	XI	20	16	0,32	1,97	2,01
HeLa_1	0,32	XI	20	14	0,25	2,03	2,07
HeLa_2	0,30	XI	20	13	0,26	1,81	2,00
HeLa_3	0,33	XI	20	13	0,26	1,80	2,02

Analizując powyższe wyniki można stwierdzić, iż frakcjonowanie niskocząsteczkowych RNA (powodujące odrzucenie tRNA i innych RNA o długości 60-120 nt, a stanowiących większość cząsteczek w próbce) powoduje redukcję ilości RNA do 2,5-5,6% masy początkowej. Stężenia RNA wynoszące od kilkunastu do kilkudziesięciu ng/μl znajdują się na granicy wykrywalności metod spektrofotometrycznych, przez co odczyt może być obciążony błędem. Co więcej, uzyskane masy niskocząsteczkowych RNA (250-560 ng) są niewystarczające do znakowania. Wobec tego zdecydowano się przetestować procedurę amplifikacji niskocząsteczkowych RNA, co miało doprowadzić do uzyskania dużych ilości liniowo powielonych niskocząsteczkowych RNA.. Procedura amplifikacji, zastosowana z myślą o dalszych eksperymentach mikromacierzowych, została schematycznie przedstawiona na Rysunku 14.

Niskocząsteczkowy RNA był poliadenylowany aby umożliwić przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji ze starterem oligo(dT). Uzyskany jednoniciowy cDNA poddawano następnie politymidylacji, zaś do końca 5' cDNA dołączano syntetyzowany „*de novo*” promotor T7. Wprowadzenie sekwencji promotora T7 powinno pozwolić uzyskać odpowiednią ilość RNA metodą transkrypcji *in vitro*. Końcowym produktem reakcji była zatem zamplifikowanego pula poliadenylowanego sensownego RNA.

Do amplifikacji każdorazowo używano 500 ng niskocząsteczkowego RNA z linii HeLa i HL-60. Całość mieszaniny po transkrypcji *in vitro* używano następnie do znakowania.



Rysunek 14. Schemat amplifikacji niskocząsteczkowych RNA.

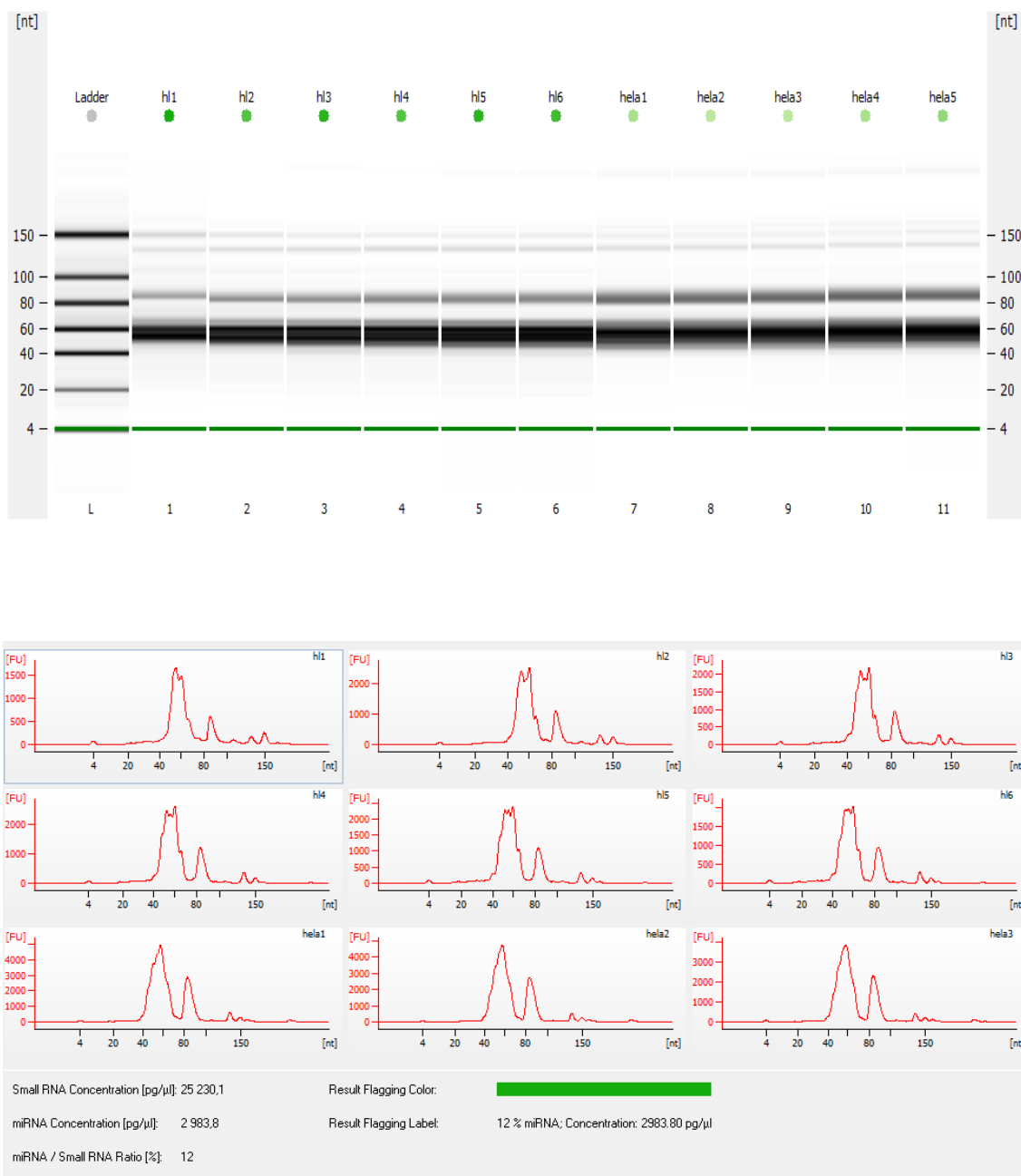
5.3. Analiza jakościowa i ilościowa niskocząsteczkowych RNA

Krytycznym momentem w eksperymencie mikromacierzowym jest zawsze ocena jakości oraz stężenia przeznaczonego do hybrydyzacji RNA. Ponieważ mikromacierze umożliwiają zarówno analizę jakościową jak i ilościową, stąd zbyt duży stopień degradacji materiału może negatywnie wpływać na uzyskane wyniki. W przypadku miRNA zdegradowane prekursorzy (pri-miRNA i pre-miRNA) mogłyby być wykrywane jako dojrzałe miRNA. Dlatego też zdecydowano, by przed analizą

mikromacierzową uzyskiwane próbki RNA każdorazowo poddawane były ocenie metodą elektroforezy kapilarnej przy użyciu platformy Bioanalyzer 2100 (Agilent) opartej o technologię Lab-On-Chip. Technologia Lab-on-Chip wykorzystuje do rozdziału RNA szklane lub polimerowe chipy analityczne wypełnione złożami o mikrokapilarnej strukturze. Na złoża nanoszone są niewielkie ilości (pikolitrowe) analizowanych roztworów RNA. Następnie stosując odpowiednie ciśnienie bądź pole elektryczne wymusza się ruch cząsteczek RNA w kapilarach. Dodanie do roztworu znacznika fluorescencyjnego pozwala określić zarówno ilość jak i jakość RNA. Dzięki zastosowanemu oprogramowaniu uzyskane wyniki pomiaru fluorescencji umożliwiają stworzenie zarówno elektroforogramu charakteryzującego badaną próbkę jak i sztucznego obrazu żelu, który moglibyśmy uzyskać analizując próbkę RNA metodą klasycznej elektroforezy. Z uwagi na fakt, iż w elektroforezie kapilarnej użyte jest znacznie silniejsze pole niż w przypadku elektroforezy w żelu agarozowym, krótkie fragmenty RNA nie tworzą struktur drugorzędowych, co znacząco polepsza rozdzielczość analizy. Określenie stężenia polega na pomiarze fluorescencji barwnika interkalującego z RNA. Metoda ta charakteryzuje się wysoką czułością (podobną do analizy riboGreen), gdyż ewentualne zanieczyszczenia w postaci genomowego DNA, fenolu itp., wykazujących absorpcję w paśmie 260 i 230 nm, nie zawyżają wyniku pomiaru.

Alternatywnie, do pomiaru stężenia RNA wykorzystywano metody spektrofotometryczne, dokonując pomiaru przy użyciu spektrofotometru Nanodrop. Pomimo że czułość tej metody była niższa od uzyskiwanej przy zastosowaniu opisanej powyżej metody stosowaną ją gdy ze względu na małą ilość wyizolowanego RNA występowała konieczność odzyskania próbki po jej jakościowej i ilościowej ocenie. Przykładowe wyniki analiz preparatów niskocząsteczkowych RNA przedstawia Rysunek 15.

5. Wyniki i dyskusja



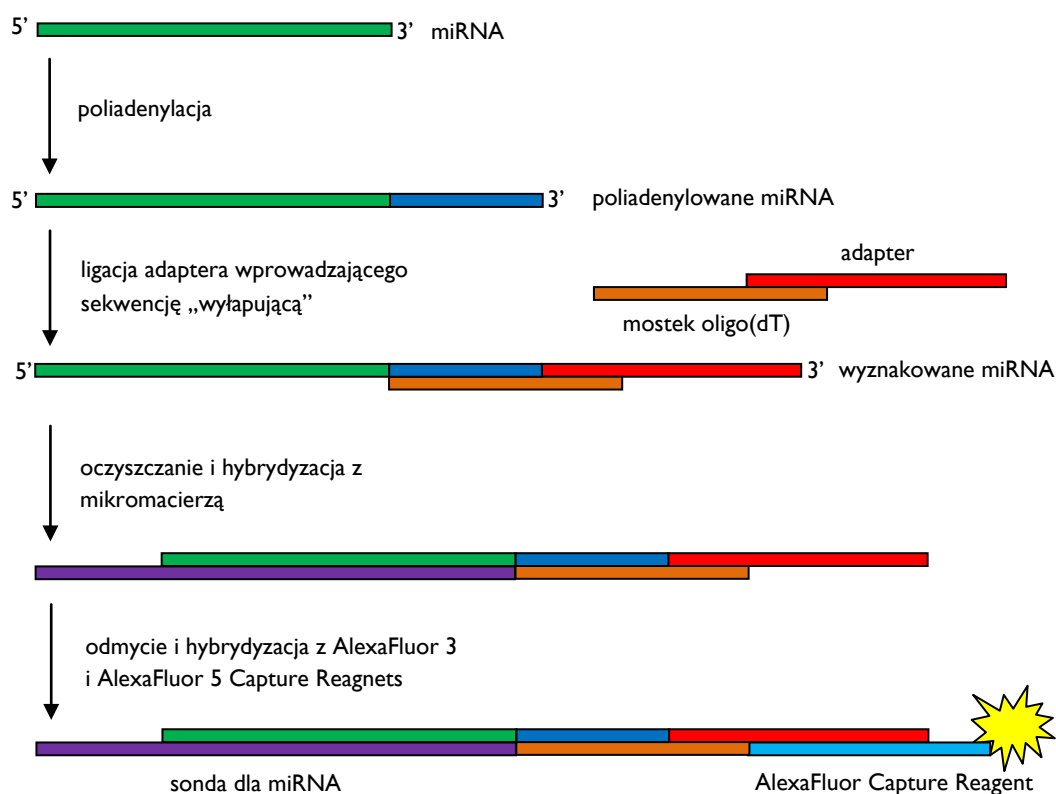
Rysunek 15. – Przykładowe wyniki analizy jakościowej i ilościowej niskocząsteczkowych RNA. W górnym panelu przedstawiono syntetyczny żel dla 6 próbek RNA izolowanych z komórek HL60 i 5 z komórek HeLa. W dolnym panelu pokazano elektroforogramy uzyskane dla tych próbek. Widoczna jest wysoka powtarzalność analiz, a także wysoka jakość preparatu, brak śladów degradacji.

5.4. Znakowanie niskocząsteczkowych RNA

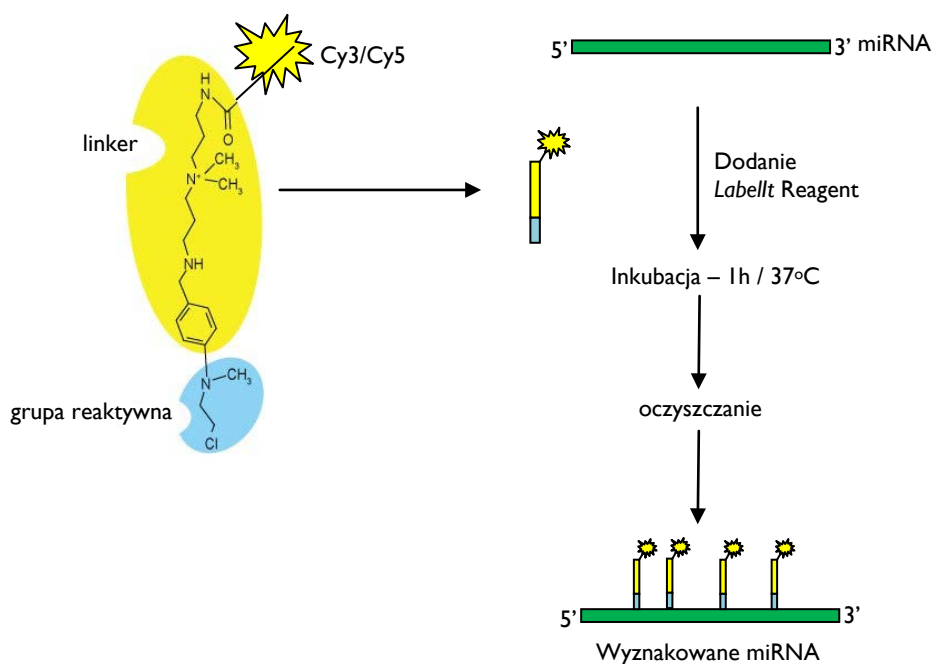
Po opracowaniu metody pozyskiwania odpowiedniej jakości preparatów zawierających niskocząsteczkowe RNA podjęto badania zmierzające do stworzenia efektywnej metody znakowania RNA i hybrydizacji z mikromacierzami. Zdecydowano

5. Wyniki i dyskusja

się wypróbować dwie techniki różniące się sposobem dołączania fluoroforu do cząsteczek RNA. Metoda enzymatyczna (*Invitrogen*) opierała się na poliadenylacji RNA, co umożliwiło następnie ligację do poliadenylowanego końca 3' dwóch adapterów. Produkty ligacji hybrydowano do mikromacierzy, następnie po odmyciu niezwiązanych cząsteczek wykonywano drugą hybryzację z oligonukleotydem skoniugowanym z fluoroforem (odpowiednio Alexa 546 i 647), który był komplementarny do jednego z adapterów dołączonych do miRNA. Natomiast druga metoda, zwana znakowaniem chemicznym (*Mirus*), polegała na bezpośrednim przyłączaniu fluoroforu poprzez alkilację atomu azotu reszt guanidynowych i cytydynowych obecnych w niskocząsteczkowych RNA. Stosowany w tym celu czynnik alkilujący był skoniugowany z fluoroforem. W przypadku znakowania chemicznego użytymi fluoroforami były cyjaniny 3 i 5. Schematy obu typów znakowania przedstawiono na Rysunkach 16 i 17.

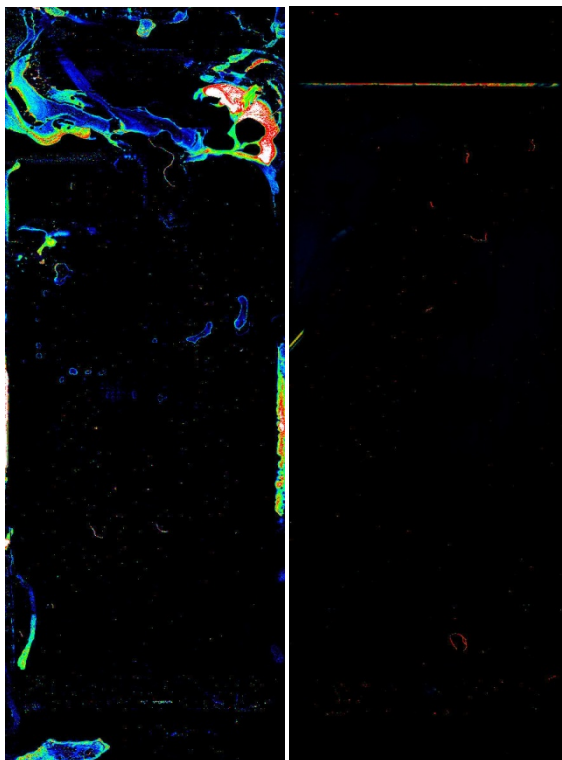


Rysunek 16. Schemat znakowania enzymatycznego miRNA.



Rysunek 17. Schemat znakowania chemicznego miRNA.

W przeprowadzonych testach wykorzystano niskocząsteczkowy RNA uzyskany z linii komórkowych HL60 i HeLa wg protokołów opisanych w rozdziale Metody pkt. 4.4.1. i 4.4.2. Hybrydyzację wyznakowanego RNA przeprowadzono zgodnie z procedurami przedstawionymi w rozdziale Metody pkt 4.6.2. i 4.6.3. W przypadku obu metod znakowaniu poddano 1 μg niskocząsteczkowego RNA. Przykładowe skany mikromacierzy przedstawione na Rysunku 18 pozwalają stwierdzić, że znakowanie chemiczne zachodziło z niezadowalającą wydajnością. Zdecydowanie lepsze rezultaty uzyskano stosując znakowanie enzymatyczne, dlatego też w dalszych eksperymentach skupiono się na optymalizacji tej metody.

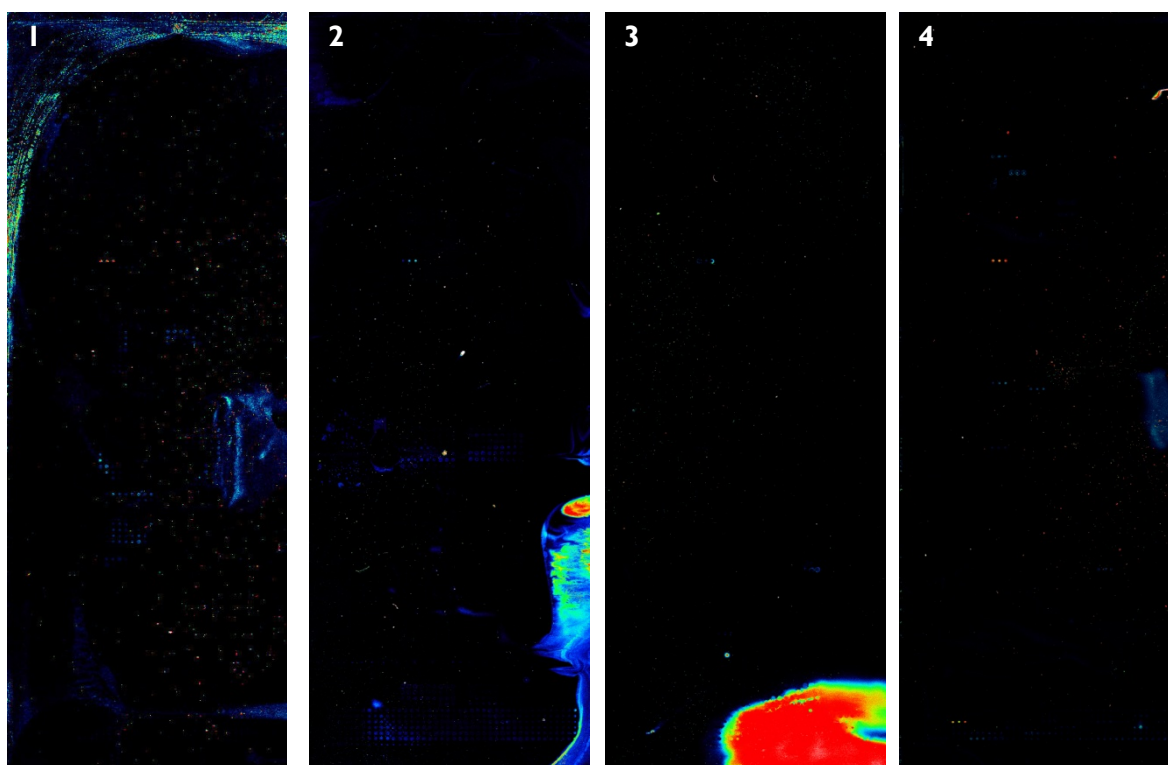


Rysunek 18. Po lewej, skan mikromacierzy hybrydowanej z próbką znakowaną chemicznie – 1 μg niskocząsteczkowego RNA z linii komórkowej HL60 znakowanego Cy3, rozdzielczość 50 μm , PMT 70. Po prawej, skan mikromacierzy hybrydowanej z próbką znakowaną chemicznie – 1 μg niskocząsteczkowego RNA z linii komórkowej HeLa znakowanego Cy5, rozdzielczość 50 μm , PMT 40. Brak sygnałów hybrydacyjnych wskazujący na nieefektywne znakowanie próbki.

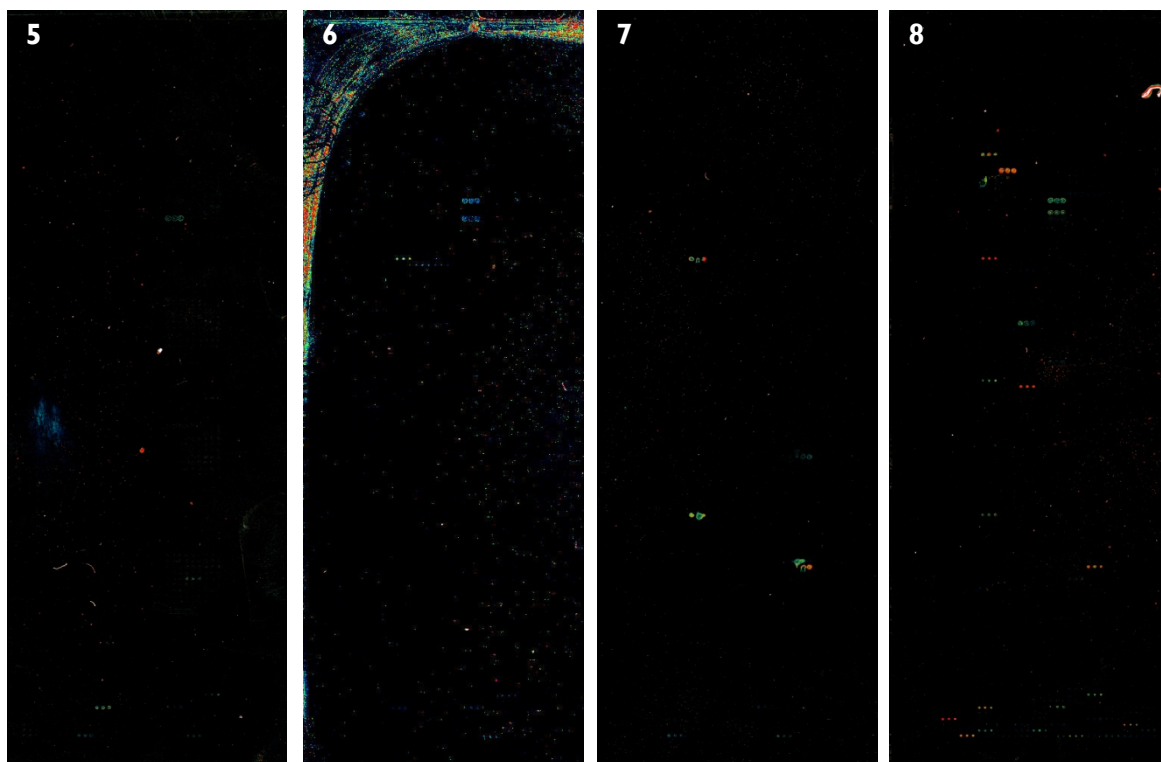
W kolejnych eksperymentach zdecydowano się sprawdzić, czy: (i) frakcjonowanie niskocząsteczkowego RNA polepsza jakość hybrydyzacji, (ii) czy wytrącanie niskocząsteczkowego RNA z dodatkiem liniowego akrylamidu może powodować utratę niskokopijnych miRNA, (iii) czy amplifikacja niskocząsteczkowego RNA jest konieczna dla uzyskania zadowalających wyników hybrydyzacji. Hybrydowano po 1 μg niskocząsteczkowych RNA wg protokołu przedstawionego w rozdziale Metody pkt 4.6.2. Eksperymenty wykonano w sposób przedstawiony w Tabeli 25. Uzyskane skany macierzy przedstawiono na Rysunkach 19-21.

Tabela 25. Schemat eksperymentu

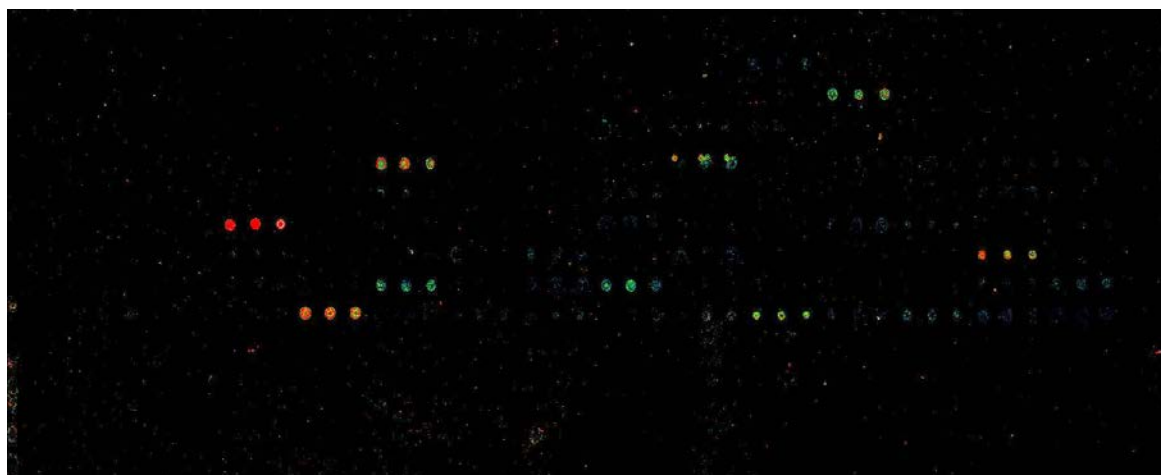
Numer próby	Próbka	Fluorofor	Frakcjonowanie	Amplifikacja
1	HL-60	Alexa 546	+	+
2	HL-60	Alexa 546	+	-
3	HL-60	Alexa 546	-	+
4	HL-60	Alexa 546	-	-
5	HeLa	Alexa 647	+	+
6	HeLa	Alexa 647	+	-
7	HeLa	Alexa 647	-	+
8	HeLa	Alexa 647	-	-



Rysunek 19. 1 – 500 ng niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HL60, amplifikowanego, frakcjonowanego i znakowanego Alexa 546, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 2 – 1 μg niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HL60, frakcjonowanego i znakowanego Alexa 546, rozdzielczość 50 μm , PMT 70; 3 – 500 ng niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HL60, amplifikowanego, niefrakcjonowanego i znakowanego Alexa 546, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 4 – 1 μg niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HL60, niefrakcjonowanego i znakowany Alexa 546, rozdzielczość 10 μm , PMT 70.



Rysunek 20. 5 – 500 ng niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HeLa, amplifikowanego, frakcjonowanego i znakowanego Alexą 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 6 – 1 μg niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HL60, frakcjonowanego i znakowanego Alexą 647, rozdzielczość 50 μm , PMT 70; 7 – 500 ng niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HL60, amplifikowanego, niefrakcjonowanego i znakowanego Alexą 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 8 – 1 μg niskocząsteczkowego RNA izolowanego z linii komórkowej HeLa, niefrakcjonowanego i znakowanego Alexą 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70.



Rysunek 21. Powiększony fragment mikromacierzy 8 przedstawionej na rys. 20 – widać wyraźne, specyficzne sygnały hybrydyzacji (różnice w intensywności fluorescencji pomiędzy sondami oraz zbliżoną fluorescencję dla wszystkich 3 powtórzeń danej sondy).

Wyniki powyższego eksperymentu świadczą, że zarówno frakcjonowanie, wytrącanie jak i amplifikacja wyizolowanych niskocząsteczkowego RNA negatywnie wpływa na jego znakowanie, a następnie hybrydyzację z mikromacierzą. Najprawdopodobniej dzieje się tak gdyż miRNA stanowią zaledwie niewielki procent znajdujących się w próbce cząsteczek. Część miRNA może być traconych podczas procedury frakcjonowania, a następnie wytrącania, co niekorzystnie wpływa na końcowy efekt eksperymentu mikromacierzowego. Dodatkowo stwierdzono, że procedura amplifikacji nie wpływa znacząco na polepszenie wyniku analizy, co w połączeniu z jej wysokimi kosztami powoduje, że nie jest ona rekomendowana.

Zoptymalizowana ścieżka eksperymentu zakładała zatem izolację niskocząsteczkowego RNA przy użyciu zestawu mirVana miRNA Isolation Kit (*Ambion*), znakowanie 1 µg RNA metodą enzymatyczną, a następnie hybrydyzację wyznakowanego materiału z mikromacierzą (szczegółowe procedury opisane zostały w rozdziale Metody w punktach 4.2.2., 4.4.1., 4.6.1. oraz 4.6.2.). Aby stwierdzić jak opracowana metodyka sprawdza się w praktyce wykorzystano ją do przeprowadzenia analizy akumulacji miRNA w komórkach jednojądrzastych krwi i szpiku pobranych od pacjentów cierpiących na ostrą białaczkę szpikową oraz zdrowych dawców.

5.5. Analiza akumulacji miRNA w komórkach jednojądrzastych pobranych od pacjentów z ostrą białaczką szpikową typu M1 i M2

5.5.1. Próbki kliniczne

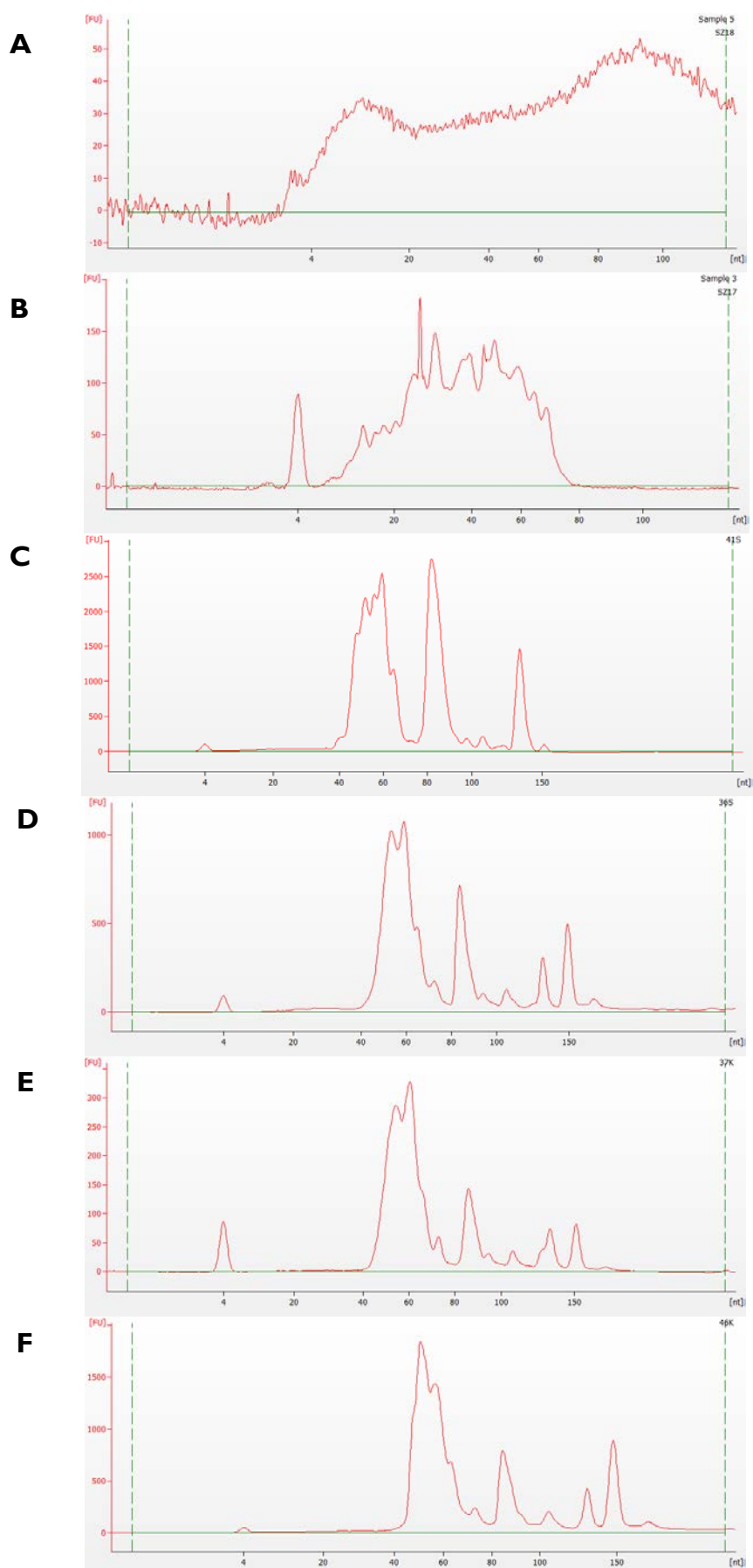
Preparaty krwi i szpiku uzyskano dzięki współpracy z Katedrą Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Próbki pobierano od osób z ostrą białaczką szpikową (AML) typu M1 lub M2 w trzech różnych stadiach choroby: w momencie zdiagnozowania AML M1 lub M2 (t_0); po zakończeniu pierwszej serii chemioterapii (t_1); w momencie stwierdzenia wznowy (t_2).

Badania przeprowadzone zostały zgodnie z zasadami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej. Zgodę na ich przeprowadzenie, w ramach realizacji projektu nr PBZ-MNiI-

2/1/2005, wydała Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Ogólna charakterystyka pacjentów i próbek, które zostały użyte w badaniach przedstawiona została w Załącznikach 3 i 4. Preparaty z krwi i szpiku pobierano do probówek zawierających antykoagulant (EDTA). Następnie zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Metody pkt. 4.1.2. uzyskiwane były komórki jednojądrzaste. Z komórek tych izolowano niskocząsteczkowy RNA (patrz Metody pkt. 4.2.2.), poddawano go znakowaniu (patrz Metody pkt. 4.4.1.) i hybrydyzacji z mikromacierzą (patrz Metody pkt. 4.6.1. i 4.6.2.).

5.5.2. Analiza jakościowa i ilościowa RNA

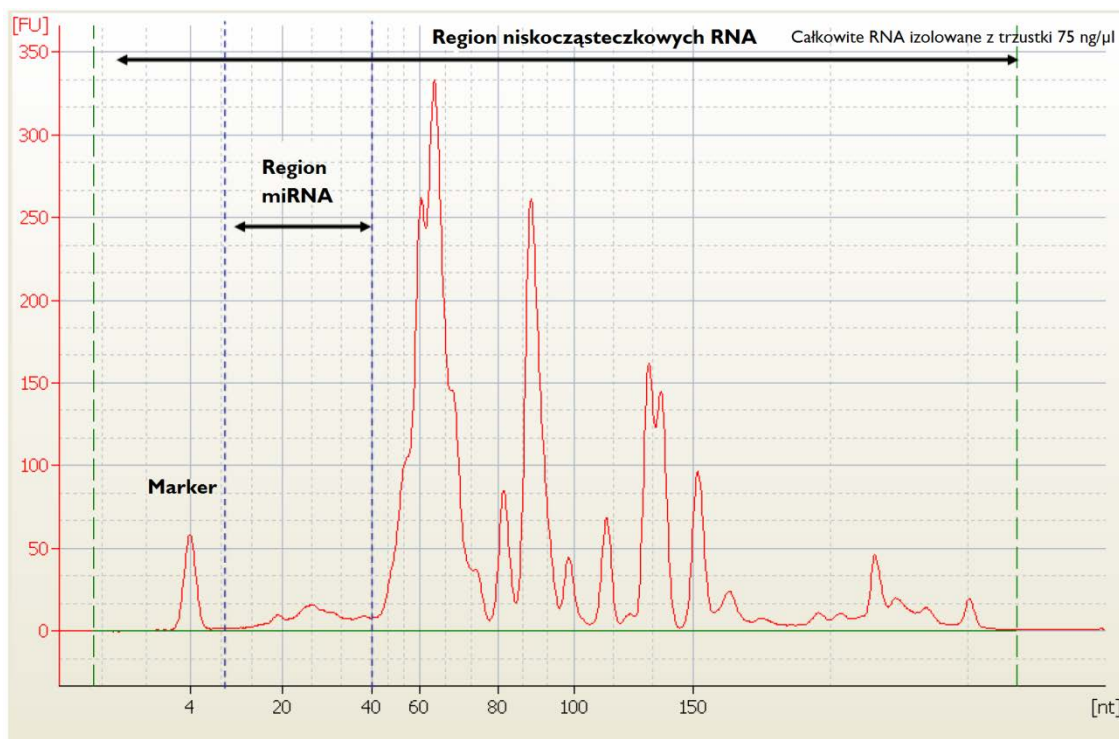
Analiza ilościowa i jakościowa wyizolowanego niskocząsteczkowego RNA przeprowadzana była metodą elektroforezy kapilarnej przy wykorzystaniu aparatu Bioanalyzer 2100 (Metody pkt. 4.3.). Zarówno jakość jak i ilość uzyskanych próbek była zróżnicowana. Szczególnie mało materiału uzyskiwano w przypadku próbek pobranych w czasie t_1 (po chemioterapii). W większości nie nadawały się one do analiz mikromacierzowych. Przykładowe elektroforogramy preparatów niskocząsteczkowego RNA przedstawiono na Rysunku 22. Wzorcowy elektroforogram dla analizy niskocząsteczkowych RNA przedstawiono na rysunku 23.



Rysunek 22. Przykładowe elektroforogramy niskocząsteczkowego RNA izolowanego z próbek klinicznych. Elektroforogramy A i B wykazują wysoki stopień fragmentacji i degradacji RNA, natomiast

5. Wyniki i dyskusja

elektroforogramy C – F charakteryzują się prawidłową morfologią pików i wskazują na brak degradacji RNA w próbce oraz jej wysoką jakość i czystość.



Rysunek 23. Wzorcowy elektroforogram. Zaznaczono rejon miRNA, niskocząsteczkowych RNA oraz markera wewnętrznego. Widać charakterystyczną morfologię pików, ich wyraźne rozdzielanie i brak szumów²⁰⁸.

5.5.3. Eksperymenty mikromacierzowe

Analizę akumulacji miRNA przeprowadzono dla wszystkich próbek, z których udało się wyizolować wystarczającą ilość dobrej jakości niskocząsteczkowego RNA (lista preparatów została przedstawiona w Załączniku 4). RNA pochodzący z próbek klinicznych znakowano Alexą 647, natomiast RNA referencyjny, pochodzący z linii komórkowej HL60, znakowano Alexą 546. Hybrydyzacje próbek pobranych od pacjentów 1-13 przeprowadzono metodą automatyczną (w hybrydyzatorze HybArray 12), natomiast dla pozostałych metodą manualną przy wykorzystaniu komór hybrydyzacyjnych (*Corning*). Analizą objęto dwa zbiory próbek:

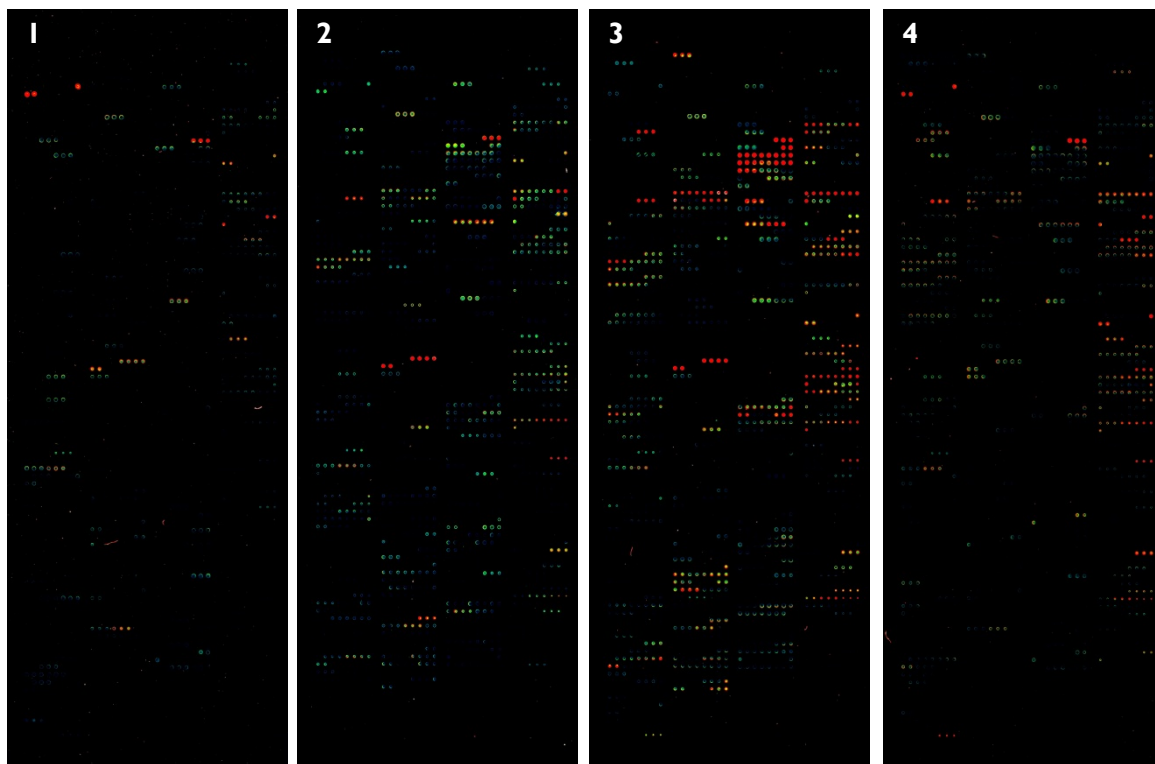
- pierwszy obejmował próbki pobrane w czasie t_0 od 24 pacjentów (5 z AML M1 i 19 AML M2). Dla pacjentów z AML M2 uzyskano 18

²⁰⁸ BECKER, C., *Methods*, (2010), s. 237.

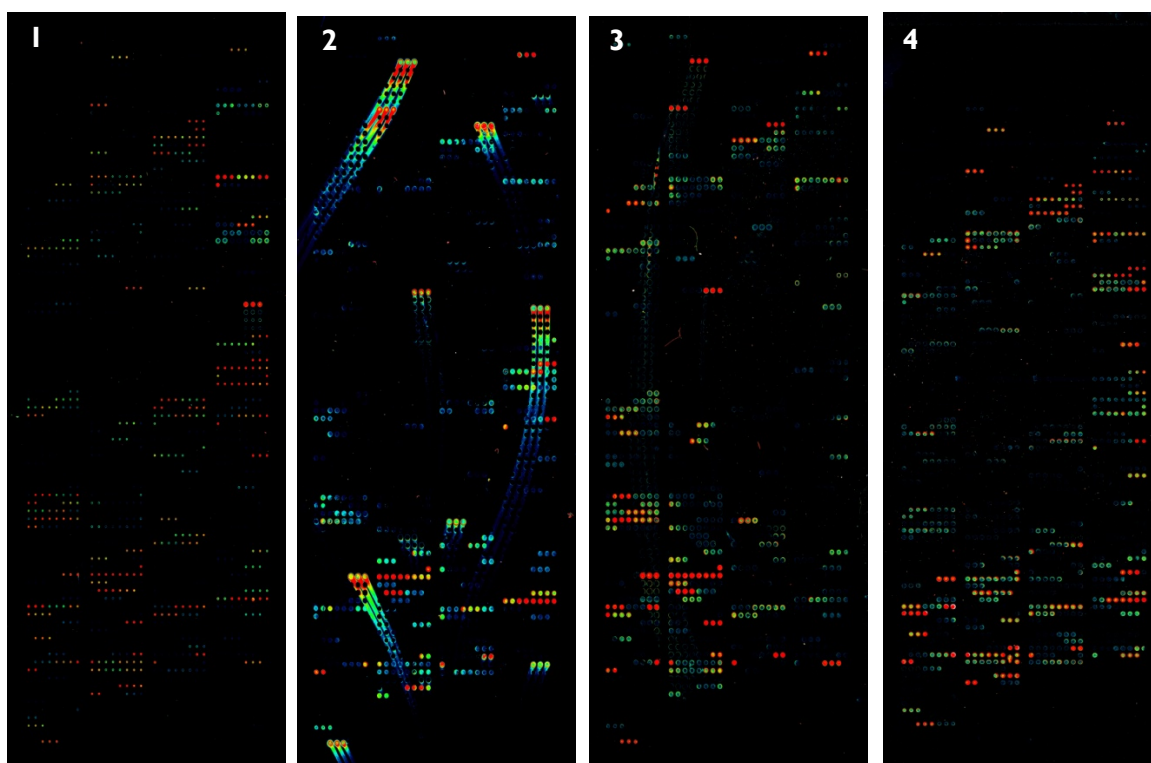
preparatów pochodzących ze szpiku i 17 z krwi, w większości w dwóch powtórzeniach technicznych. Dla pacjentów z AML M1 uzyskano 5 preparatów pochodzących ze szpiku i 4 z krwi. Dla większości próbek analiza została wykonana w dwóch powtórzeniach technicznych.

- drugi obejmował próbki pobrane w czasie t_2 (wznowa) od 4 pacjentów z AML M2. Dla wszystkich uzyskano preparaty pochodzące zarówno ze szpiku jak i krwi obwodowej. Dla większości próbek analiza została wykonana w dwóch powtórzeniach technicznych.

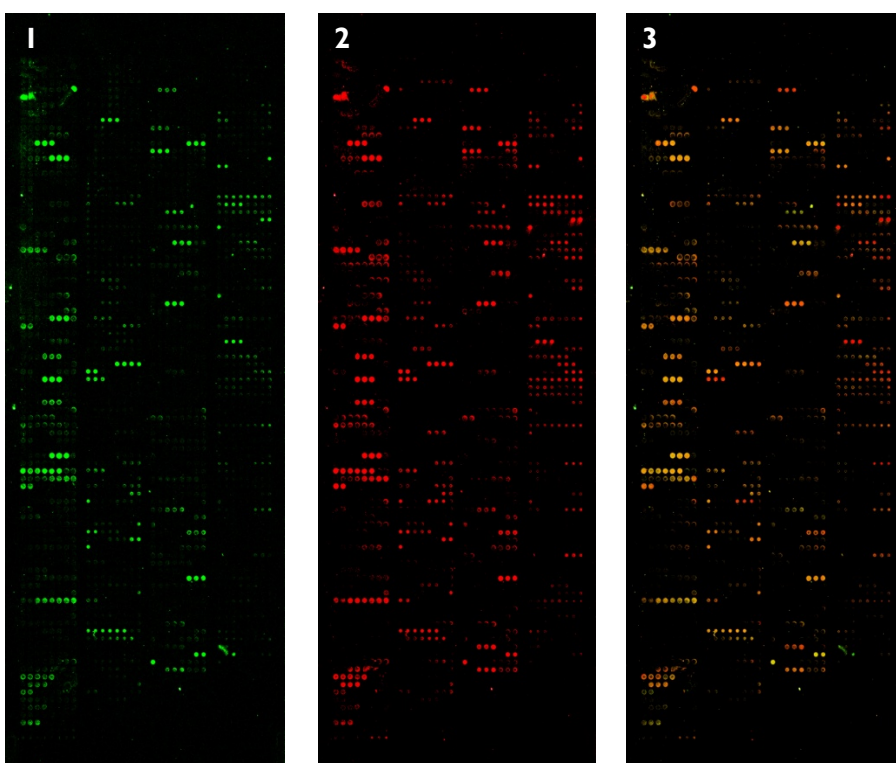
W wypadku czasu t_1 (po chemioterapii) z uwagi na małą ilość materiału, w połączeniu najczęściej z jego niedostateczną jakością, wykonano jedynie jedną udaną hybrydyzację, z tego powodu wykluczono tę próbkę z dalszych analiz jako niereprezentatywną. Łącznie analizie poddano 46 mikromacierzy. Przykładowe skany mikromacierzy przedstawiono na Rysunkach 23-25.



Rysunek 23. 1 – Pacjent 3 t_0 - krew, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 2 – Pacjent 6 t_0 - szpik, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 3 – Pacjent 7 t_0 - szpik, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 4 – Pacjent 12 t_2 - szpik, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70



Rysunek 24. 1 – Pacjent 12 t0 - krew, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 2 – Pacjent 14 t0 - szpik, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 3 – Pacjent 16 t0 - szpik, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 4 – Pacjent 17 t0 - krew, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70.



Rysunek 25. 1 – HL60, Al. 546, rozdzielczość 10 μm , PMT 70; 2 – Pacjent 20 t0 - krew, Al. 647, rozdzielczość 10 μm , PMT 70, 3 – obraz zbiorczy powstały poprzez nałożenie obu skanów.

5.6. Analiza wyników hybrydyzacji mikromacierzy

5.6.1. Wstępna analiza bioinformatyczna

Aby wykonać analizy wyższego rzędu konieczna była wstępna obróbka danych. Przy wykorzystaniu informacji zawartych w pliku GAL, generowanym podczas drukowania mikromacierzy, przekształcano obrazy mikromacierzy na dane liczbowe. Posłużono się w tym celu oprogramowaniem GenePix Pro v. 6.0. Na tym etapie dokonywano także pierwszej analizy jakościowej. W przypadku drukowanych macierzy średnica i położenie plamek mogą różnić się od założonych, zapisanych w pliku GAL, a poszczególne mikromacierze również nieznacznie różnią się od siebie. Czasami wiąże się to z koniecznością ręcznego dopasowania szablonu mikromacierzy do konkretnego skanu. Przed rozpoczęciem analizy ilościowej każdy obraz został dokładnie sprawdzony pod względem zgodności z szablonem. Następnie każdej plamce przydzielono odpowiednią etykietę jakości (ang. *flag*): „dobrą”, „złą” lub „brak”. Przyjęto założenie, że etykietę „dobrą” przypisuje się plamce, której morfologia jest prawidłowa, a intensywność sygnału jest co najmniej dwukrotnie większa od intensywności lokalnego tła. Wszystkie plamki nieoznakowane jako „dobre” były automatycznie pomijane w dalszych analizach. Dla każdej mikromacierzy generowano plik GPR (ang. *GenePix Results*), który zawiera tzw. surowe dane i jest wykorzystywany jako wejściowy w analizach wyższego rzędu. W nagłówku pliku GPR zawarte są informacje dotyczące m.in.: nazwy pliku źródłowego (skanu macierzy), typu skanera, rozdzielczości, temperatury i czasu skanowania, długości fali lasera użytego w trakcie skanowania itp. Wyniki hybrydyzacji zawarte są poniżej i posegregowane w kolumnach. Każda sonda opisana jest serią wartości opisujących m.in.: (i) identyfikator i lokalizację sondy (numer submacierzy, rzędu i kolumny oraz współrzędne na szkiełku); (ii) średnicę plamki (μm); (iii) osobno dla każdej długości fali lasera dane określające: medianę intensywności fluorescencji plamki, średnią ważoną intensywności fluorescencji plamki, odchylenie standardowe intensywności fluorescencji plamki, medianę intensywności fluorescencji lokalnego tła, średnią ważoną intensywności fluorescencji lokalnego tła, odchylenie standardowe intensywności fluorescencji lokalnego tła, procent pikseli plamki o intensywności fluorescencji większej o jedno odchylenie standardowe od intensywności fluorescencji

lokalnego tła, procent pikseli plamki o intensywności fluorescencji większej o dwa odchylenia standardowe od intensywności fluorescencji lokalnego tła, procent wysyconych pikseli w plamce; (iv) stosunek median i średnich ważonych intensywności fluorescencji plamek przy różnych długościach fali lasera po odjęciu intensywności fluorescencji lokalnego tła; (v) sumę median i średnich ważonych intensywności fluorescencji plamki dla poszczególnych długości fali po odjęciu odpowiadających intensywności fluorescencji lokalnego tła; (vi) logarytm naturalny stosunku median; (vii) typ etykiety jakości przyporządkowanej do danej plamki.

Analiza mikromacierzy dedykowanych miRNA różni się w kilku istotnych szczegółach od badania akumulacji mRNA przy wykorzystaniu mikromacierzy ekspresyjnych, co związane jest ze specyfiką samych mikromacierzy. Szczególnie ważny jest fakt, że w porównaniu chociażby z mikromacierzami genomowymi czy ekspresyjnymi ilość sond na mikromacierzy dedykowanej badaniu miRNA, jest stosunkowo niewielka, rzędu kilku tysięcy w porównaniu z kilkudziesięcioma tysiącami w przypadku analizy mRNA. Co więcej, z uwagi na wysoką specyficzność ekspresji genów miRNA (pod względem miejsca i czasu) ilość sygnałów w badanych komórkach może być niska. Według danych literaturowych jedynie 15 ludzkich miRNA charakteryzuje się akumulacją na podobnym poziomie w 40 badanych tkankach²⁰⁹.

Analiza wyższego rzędu wymagała zatem dobrania odpowiednich metod i testów statystycznych, jak również zastosowania właściwego oprogramowania. Jako podstawowe środowisko do obliczeń statystycznych i wizualizacji wyników wybrano język programowania obiektowego GNU R²¹⁰ (<http://cran.r-project.org>). Jego możliwości zostały rozszerzone i są wciąż systematycznie rozwijane w postaci pakietów dedykowanych analizie danych mikromacierzowych, dostępnych w ramach projektu Bioconductor (www.bioconductor.org)²¹¹. Użycie powyższych rozwiązań dostarcza bogatego spektrum technik statystycznych i graficznych, umożliwiając m.in.: klasyczne testy statystyczne, analizę skupień, modelowanie liniowe i nieliniowe, tworzenie szerokiej gamy wykresów itp. Nie bez znaczenia jest również fakt, że zarówno GNU R, jak i Bioconductor są tzw. oprogramowaniem otwartym, dostępnym bez konieczności wykupu licencji, a rozprowadzanym w postaci kodu źródłowego.

²⁰⁹ LIANG, Y., *BMC Genomics*, (2007), s. 166.

²¹⁰ R Core Team, (2012)

²¹¹ GENTLEMAN, R. C., *Genome Biol.*, (2004), s. 80.

Otwartość kodu umożliwia także łatwe tworzenie przez zaawansowanych użytkowników dedykowanych pakietów rozszerzających możliwości podstawowej wersji bazowej oprogramowania, do których dołączana jest obszerna dokumentacja. Obie wyżej wspomniane platformy programistyczne są coraz częściej stosowane, czego dowodem jest wciąż rosnąca liczba cytowań.

Z danych literaturowych^{212,213,214} dobitnie wynika, że kluczowym etapem w analizie mikromacierzy dedykowanych miRNA jest wybór metody normalizacji danych. W niniejszej pracy zdecydowano się wykorzystać metodę VSN - **Variance stabilization and calibration for microarray data**²¹⁵, do normalizacji danych w obrębie mikromacierzy, oraz metodę SCALE do normalizacji danych pomiędzy macierzami. Metoda VSN jest oparta na wcześniej opisanym w literaturze estymatorze maksymalnego prawdopodobieństwa dla stochastycznego modelu danych mikromacierzowych²¹⁶. W tym modelu różnice między znormalizowanymi wartościami intensywności fluorescencji są analogiczne do powszechnie stosowanych w innych metodach normalizacyjnych „znormalizowanych wartości stosunku logarytmów intensywności”. Jednak główną zaletą metody VSN jest fakt, że w odróżnieniu od innych modeli wariancja znormalizowanych wartości jest niezależna od ich średniej ważonej, co skutkuje bardziej czułym i specyficznym wykryciem różnicowej akumulacji danych transkryptów w badanych populacjach. Natomiast algorytm SCALE bazuje na statystyce określanej jako mediana odchyłeń wartości bezwzględnych (MAD – *ang. median absolute deviation*). Jest to odporna statystycznie metoda określania rozrzutu wartości zmiennych. W porównaniu do odchylenia standardowego statystyka MAD jest mniej wrażliwa na występowanie obserwacji odstających (*ang. outliers*), przez co lepiej nadaje się do analizy zbiorów danych, które mogą charakteryzować się dużą zmiennością osobniczą²¹⁷. W przypadku analizy uzyskanych przez mnie danych z uwagi na fakt, że kanał kontrolny (Al. 546 – próbka kontrolna z HL-60) był mniej jednorodny i cechował się obecnością mocniejszego w obawie, by nie zaburzył procesu normalizacji zdecydowano usunąć go z analizy i potraktować wszystkie mikromacierze jako jednokanałowe (Al. 647 – próbka badana AML).

²¹² PRADERVAND, S., *RNA*, (2009), s. 493.

²¹³ BARGAJE, R., *RNA*, (2010), s. 16.

²¹⁴ MEYER, S.U., *Biotechnol Lett.*, (2010), s. 1777.

²¹⁵ HUBER, W., *Bioinformatics*, (2002), s. 96.

²¹⁶ HUBER, W., *Statistical app.*, (2003), s. 3.

²¹⁷ DUDOIT, S., *Stat. Sin.*, (2002), s. 111.

5.6.2. Schemat analizy

Przed przystąpieniem do obliczeń, po otwarciu nowej sesji w R, konieczne jest wczytanie wszystkich wykorzystywanych pakietów przy użyciu polecenia „library”. W przypadku analiz przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy były to pakiety: `limma`²¹⁸, `marray`²¹⁹, `arrayQuality`²²⁰, `vsn` oraz `RColorBrewer`²²¹.

```
library(limma)
library(marray)
library(arrayQuality)
library(vsn)
library(RColorBrewer)
```

W dalszej kolejności należało (i) stworzyć, a następnie zdefiniować plik „targets”, zawierający listę wszystkich plików GPR, które będą analizowane oraz (ii) wczytać go poleceniami „targets_file” i/lub „readTargets”, przykładowo:

```
targets_file="targets_amlm1_amlm2.txt"
targets<- readTargets(targets_file)
```

Pierwsze 10 wierszy jednego z używanych plików „targets”

FileName	Sample	Origin	Cy3	Cy5
12bm.gpr	12	bm	ref	AML.M2
12bm_01.gpr	12	bm	ref	AML.M2
15bm_01.gpr	15	bm	ref	AML.M2
15bm_02.gpr	15	bm	ref	AML.M2
16bm_01.gpr	16	bm	ref	AML.M2
16pb_01.gpr	16	pb	ref	AML.M2
19bm_01.gpr	19	bm	ref	AML.M2
19bm_02.gpr	19	bm	ref	AML.M2
19pb_01.gpr	19	pb	ref	AML.M2
19pb_02.gpr	19	pb	ref	AML.M2

²¹⁸ SMYTH, G. K., *Bioinformatics and Comp. Sol.*, (2005), s. 397.

²¹⁹ YANG Y.H., (2009), <http://www.maths.usyd.edu.au/u/jeany/>.

²²⁰ PAQUET A., (2010), <http://arrays.ucsf.edu/>.

²²¹ NEUWIRTH E., (2011), <http://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>.

Kolejnym etapem jest wczytanie danych (plików GPR) i określenie, które kolumny z plików GPR są niezbędne w dalszych fazach obliczeń, m.in. kolumny opisujące: intensywności fluorescencji plamek i tła, nazwy i rozmieszczenie sond itp. Możliwe jest także odfiltrowanie wszystkich sond, do które zostały przypisane etykiety (patrz pkt 5.6.1.) „zła” lub „brak”. Służy do tego polecenie „read.maimages”, przykładowo:

```
raw.data=read.maimages(targets,source="genepix",columns=list(R="F650
Mean",G="F650 Mean",Rb="B650 Median",Gb="B650
Median"),annotation=c("Block","Row","Column","ID","Name"),wt.fun=wtflags(weight=0, cutoff=-50))
```

Z uwagi na wcześniejszą decyzję o wykluczeniu kanału kontrolnego z analizy konieczne jest także usunięcie danych dla nieanalizowanego kanału kontrolnego.

```
raw.data$G<-NULL
raw.data$Gb<-NULL
```

Po wczytaniu danych warto sprawdzić ich jakość, korzystając z narzędzi graficznych, jakie oferuje Bioconductor. Jednym z nich jest wykres pudełkowy (ang. *boxplot*) określający jakość tła, na którym zaznaczono wartości intensywności fluorescencji głównych (bez korekcji tła) w poszczególnych mikromacierzach i wartości intensywności tła. Przykładowo:

```
fgbg = cbind(raw.data$R, raw.data$Rb)
png(filename = "boxplot_background_quality.png", bg = "white")
boxplot(log2(fgbg) ~ col(fgbg), col = c(rep("pink", ncol(raw.data)),
rep("orange", ncol(raw.data))))
dev.off()
```

Następnie tworzono wykres pudełkowy dla intensywności fluorescencji (przed normalizacją):

```
boxplot_raw='boxplot_surowe_dane'
title=sprintf("%s.png", boxplot_raw)
png(filename = title, bg = "white")
boxplot((log2(raw.data$R)),col='darkblue', xlim=c(0,60), ylim=c(0,20))
dev.off()
```

oraz gęstości rozmieszczenia tych intensywności:

```
density_plots_raw='wykresy_gestosci_dla_surowych_danych'  
title=sprintf("%s.png", density_plots_raw)  
png(filename = title, bg = "white")  
plotDensities(raw.data)  
dev.off()
```

Analiza powyższych wykresów pozwala znaleźć macierze, które znacząco odbiegają od innych lub też charakteryzują się obecnością zbyt wysokiej fluorescencji tła. Takie macierze usuwano z późniejszych analiz. Pozostały zbiór, liczący 13 mikromacierzy, poddano normalizacji wewnętrznej, w ramach poszczególnych macierzy, przy wykorzystaniu polecenia `vsn2`:

```
data.norm=vsn2(raw.data$R)
```

W celu określenia wpływu normalizacji na dane, generowano kolejny wykres pudełkowy, już dla znormalizowanych wartości:

```
boxplot_norm='boxplot_dane_po_normalizacji_vsn'  
title=sprintf("%s.png", boxplot_norm)  
png(filename = title, bg = "white")  
boxplot(as.data.frame(data.norm@hx), main="VSN Normalized  
Intensities", col='darkblue')  
dev.off()
```

Z uwagi na specyfikę pakietu `vsn` użytego do normalizacji konieczne było przypisanie danym po normalizacji nazw miRNA, co uzyskano poleceniem:

```
rownames(data.norm@hx) <- raw.data$genes$Name  
data.norm@hx <- data.norm@hx [order(rownames(data.norm@hx)), ]
```

Po przypisaniu nazw miRNA można było przystąpić do normalizacji zewnętrznej (między macierzami) przy wykorzystaniu metody SCALE:

```
data.norm.scale=normalizeBetweenArrays(data.norm@hx, method="scale")
```

Wykonano kolejny wykres pudełkowy dla wartości intensywności fluorescencji po obu normalizacjach:

```
boxplot_scale='boxplot_dane_po_normalizacji_scale'  
title=sprintf("%s.png", boxplot_scale)  
png(filename = title, bg = "white")  
boxplot(as.data.frame(data.norm.scale), main="Normalized Intensities-  
SCALE", col='darkblue')  
dev.off()
```

Następnie tworzono obiekt typu `pData`, poprzez przypisanie odpowiednich nazw próbkom celem przeprowadzenia analizy porównawczej. Przykładowo:

```
pData <- data.frame(population = c('pb', 'pb', 'bm', 'pb', 'pb', 'bm',  
'pb', 'bm', 'pb', 'pb', 'bm', 'pb', 'bm', 'pb'))
```

gdzie 'pb' znaczy próbkę pochodzącą z krwi obwodowej (ang. *peripheral blood*), a „bm” ze szpiku (ang. *bone marrow*).

W dalszym etapie zdefiniowano tzw. macierz porównań. Ponieważ nie analizowano kanału referencyjnego można w tym miejscu podstawić dowolne wyrażenie.

```
design<-modelMatrix(targets, ref="ref")
```

Wartości intensywności replik sond powtórzonych w danej macierzy uśredniano na podstawie ich nazwy:

```
set_summary<-avereps(data.norm.scale, ID=raw.data$genes$Name)
```

Na podstawie macierzy porównań dopasowano odpowiedni do eksperymentu model liniowy, celem wykonania analizy różnic w akumulacji miRNA w porównywanych zbiorach macierzy. Wykorzystano empiryczną poprawkę Bayes'a

dla testowań wielokrotnych aby zwiększyć czułość wykrywania różnicujących miRNA w badanych zbiorach poprzez usunięcie wyników fałszywie pozytywnych:

```
fit <- lmFit(set_summary, design)
contrast.matrix<-makeContrasts(pb-bm,bm-pb, levels=design)
fit2<-contrasts.fit(fit,contrast.matrix)
fit2<-eBayes(fit2)
```

Jako rezultat otrzymujemy „listę rankingową” sond wykazujących różny poziom akumulacji w badanych zbiorach.

```
gene_list=topTable(fit2,adjust="fdr", number=882)
```

Z listy usunięto miejsca puste (opisane jako „buffer” oraz „empty”), a wyniki zapisano do pliku.

```
miRs <- grep("miR", gene_list$ID)
final_gene_list <- gene_list[miRs, ]
final_gene_list$ID
write.csv(final_gene_list, file="lista_rankingowa_miRNA.csv")
```

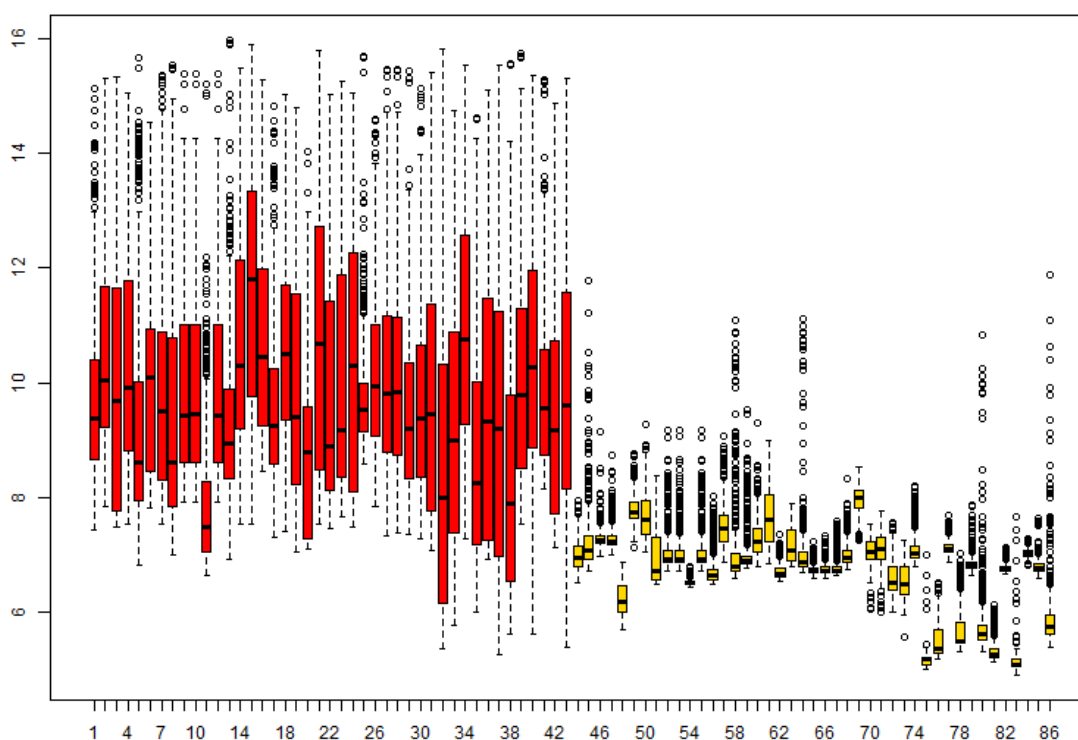
Następnie przeprowadzono filtrację listy rankingowej miRNA wykazujących różnicową akumulację. Za różnicujące przyjęto miRNA o wartościach „adj. p-value” (wartości p-value po poprawce dla wielokrotnego testowania, liczonej metodą Benjamini i Hochberg) mniejszych niż 0,05, czyli istotne statystycznie. Wyniki filtracji zapisywano do pliku.

```
filtration=topTable(fit2, coef=1, adjust=fixpval, number=maxgene,
p.value=pval)
filtration_final<-filtration[miRs,]
write.csv(filtration_final, file="lista_roznicujacych_miRNA.csv")
```

5.6.3. Analiza różnicowa próbek klinicznych

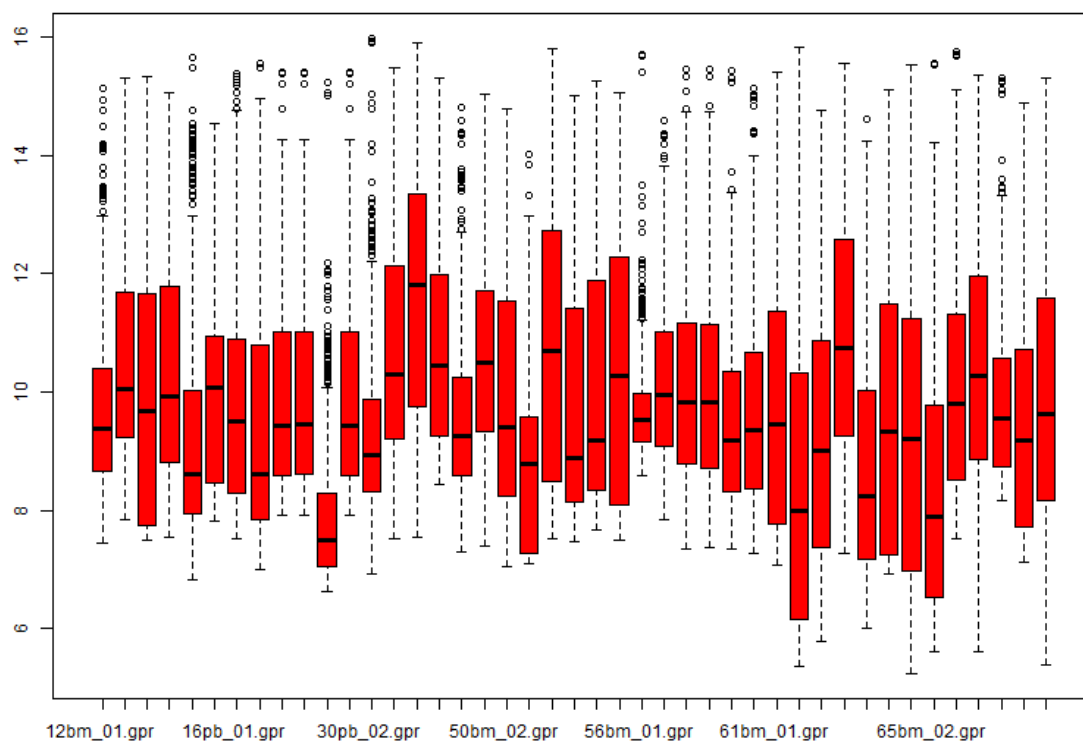
5.6.3.1. Analiza jakości mikromacierzy

Wykres pudełkowy jest bardzo dobrym sposobem wizualizacji danych mikromacierzowych, stosowanym m. in. do oceny ich jakości. Każdy ze słupków odpowiada intensywności fluorescencji plamek bądź tła z jednej macierzy. Na wykresie zaznaczono maksymalne i minimalne wartości, jak również kwartył górny, dolny i medianę. Grubszą poziomą kreską oznaczona jest mediana, a w prostokącie znajdują się wartości zawarte pomiędzy górnym i dolnym kwartyłem. Zaletą wykresu pudełkowego jest zobrazowanie różnic między zbiorami wartości bez rozpatrywania ich rozkładu statystycznego. Kółkami oznaczone są obserwacje odstające (ang. *outliers*). Do pierwszej analizy jakości i spójności danych wykorzystano pełen zestaw 46 mikromacierzy. Wykresy pudełkowe dla intensywności fluorescencji plamek oraz tła dla „surowych” danych (przed normalizacją) przedstawiono na Wykresach 3 i 4.



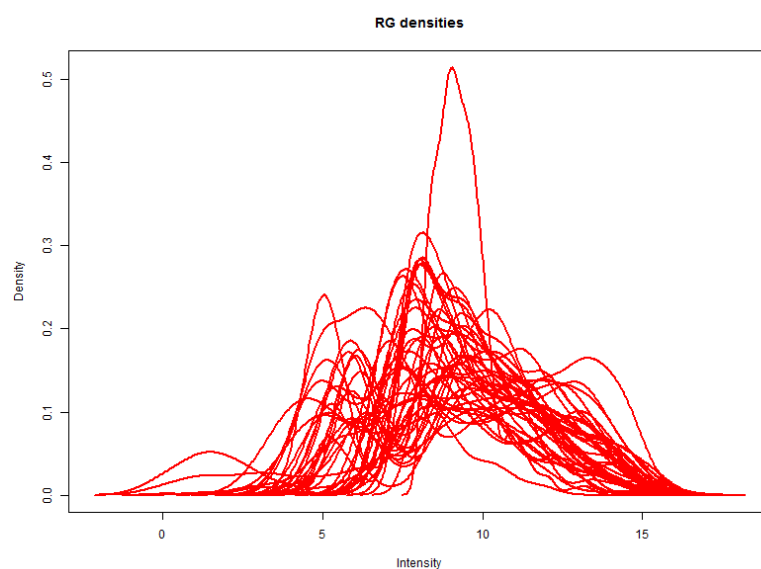
Wykres 3. Wykres pudełkowy dla danych surowych (przed normalizacją), uzyskanych po hybrydyzacji 43 mikromacierzy. Czerwone pudełka obrazują wartości intensywności sond (ang. *foreground intensities*) dla poszczególnych macierzy, natomiast żółte – wartości fluorescencji tła (ang. *background intensities*) dla tych samych macierzy, ułożone w identycznej kolejności.

5. Wyniki i dyskusja



Wykres 4. Wykres pudełkowy wartości fluorescencji sond przed normalizacją dla wyselekcjonowanego zbioru mikromacierzy.

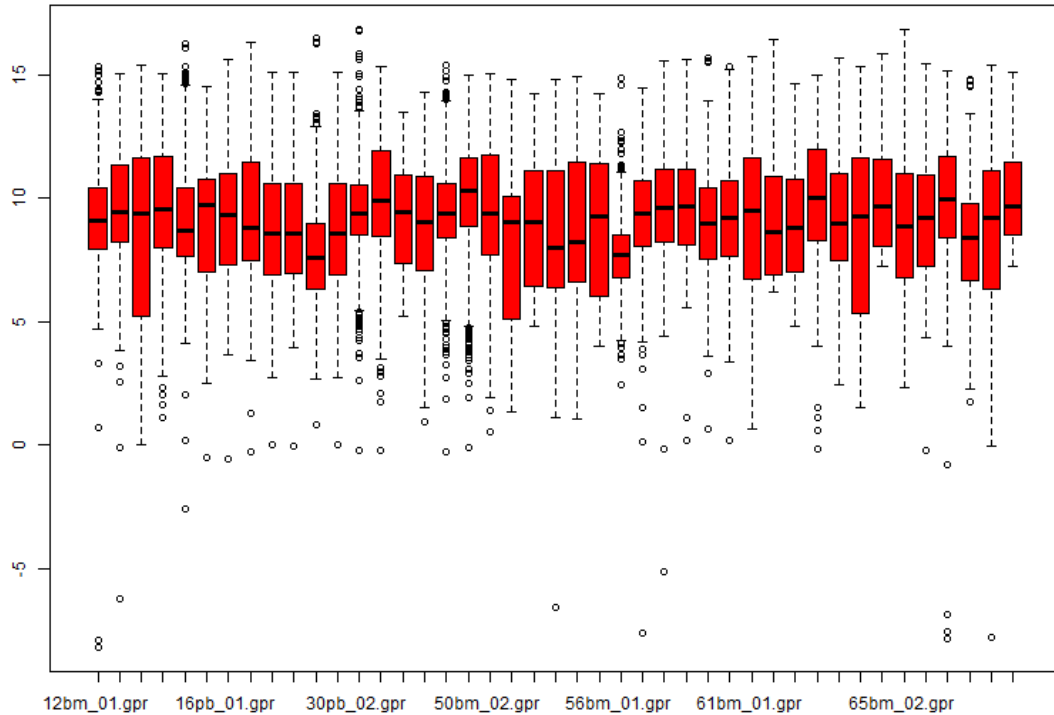
Natomiast wykres gęstości dla „surowych” danych przedstawiono na Wykresie 5.



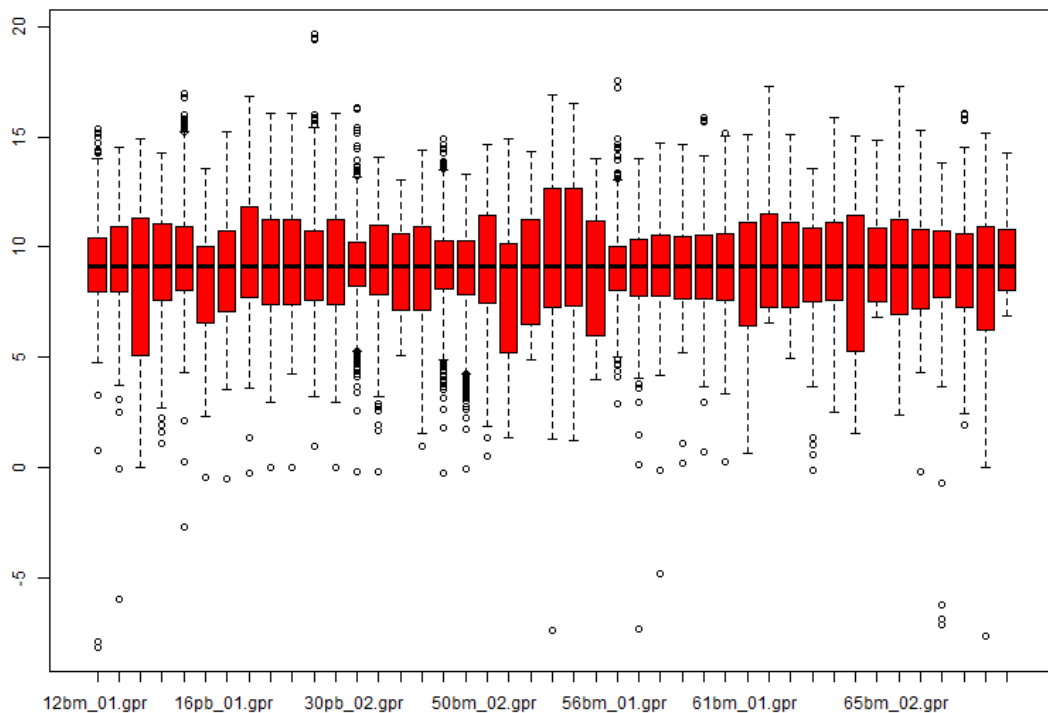
Wykres 5. Wykres rozkładu gęstości (ang. density plot) intensywności fluorescencji sond dla danych przed normalizacją, pochodzących z hybrydyzacji 43 mikromacierzy.

5. Wyniki i dyskusja

Kształt powyższych wykresów wskazuje na występowanie znaczącej ilości wartości odbiegających od średniej (*outliers*), przynajmniej w przypadku części macierzy, a także niejednorodności samych macierzy (różny rozmiar „pudełka”), co pozwala stwierdzić, że dostępne dane zdecydowanie wymagają normalizacji. Wpływ kolejnych normalizacji na dane przedstawiono na Wykresach 5 i 6.



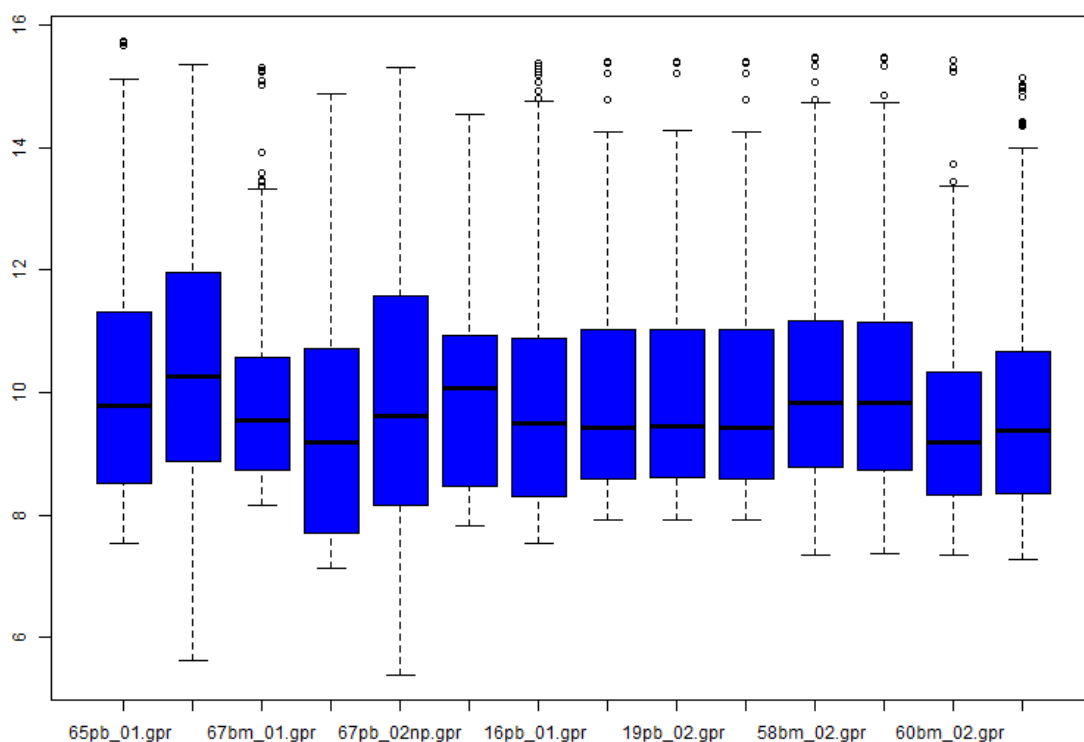
Wykres 6. Wykres pudełkowy „boxplot” wartości fluorescencji sond po normalizacji VSN.



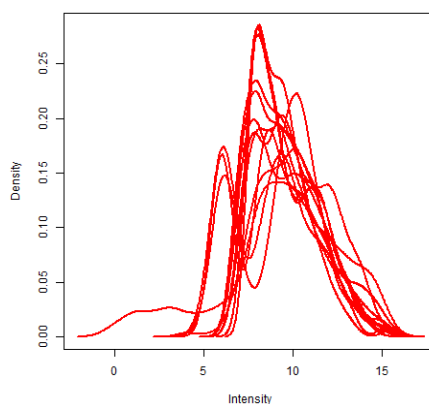
Wykres 7. Wykres pudełkowy „boxplot” wartości fluorescencji sond po normalizacji SCALE.

5. Wyniki i dyskusja

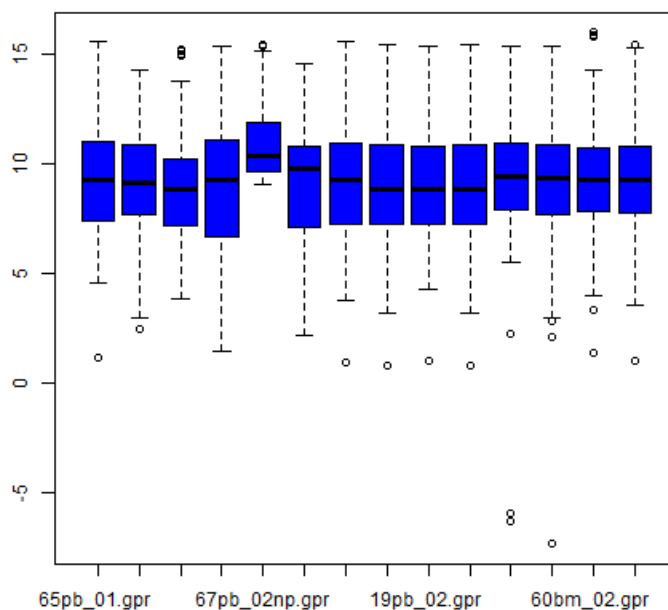
Wykresy po normalizacji wykazują, że obie metody normalizacji sprawdzają się na używanym zbiorze danych. Mediany wartości intensywności zostały prawidłowo wyrównane dla wszystkich analizowanych macierzy. Tym niemniej także po normalizacji SCALE część z nich wykazywała wciąż zdecydowanie zbyt dużą liczbę wartości odstających od znormalizowanych median. Dlatego też zdecydowano się ograniczyć populację macierzy do analiz wyższego rzędu. Ostatecznie wybrano 13 macierzy charakteryzujących się najlepszą spójnością danych, co przedstawiono odpowiednio na wykresach 7-10.



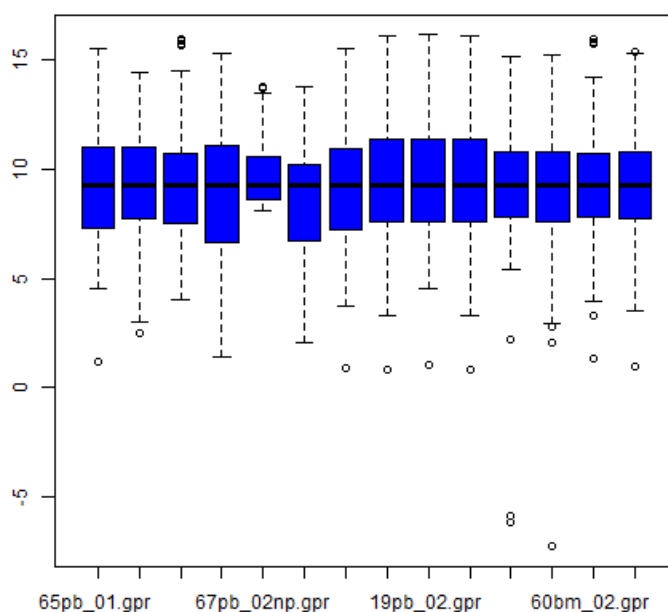
Wykres 8. Wykres pudełkowy „boxplot” wartości fluorescencji sond przed normalizacją (13 macierzy).



Wykres 9. Wykres rozkładu gęstości (ang. *density plot*) intensywności fluorescencji sond dla danych przed normalizacją, pochodzących z hybrydyzacji 13 mikromacierzy..



Wykres 10. Wykres pudełkowy wartości fluorescencji sond po normalizacji VSN (13 macierzy).



Wykres 11. Wykres pudełkowy wartości fluorescencji sond po normalizacji SCALE (13 macierzy).

5.6.3.2. Analiza różnicowa

Celem pierwszej z wykonanych analiz było określenie czy istnieją istotne różnice między profilem akumulacji miRNA w szpiku i krwi obwodowej pacjentów z AML (analiza bez podziału na podtypy M1 i M2). Po przeanalizowaniu wyżej opisanego zestawu mikromacierzy nie wykazano znaczących statystycznie różnic pomiędzy tymi grupami. Wyniki te są zgodne z oczekiwanymi. Wiadomo bowiem, że

podczas ostrej fazy choroby ponad 80-90% komórek tak szpiku, jak i krwi obwodowej stanowią zmienione nowotworowo jednojądrowe komórki blastyczne. Akumulacja miRNA w tych komórkach powinna być podobna niezależnie od tego czy pochodzą one ze szpiku czy krwi obwodowej. Uzyskane wyniki sugerują zatem, że dla celów diagnostycznych nie jest konieczna kłopotliwa aspiracja szpiku poprzez punkcję łądźwiową, która może być z powodzeniem zastąpiona pobraniem próbki krwi obwodowej.

Nie stwierdzono także istotnych różnic między profilami miRNA między próbkami pochodzącymi od pacjentów po pierwszej diagnozie a próbkami pobranymi podczas wznowy, a także między tymi, którzy osiągnęli remisję całkowitą, a tymi, którzy nie weszli w remisję, tym samym nie odpowiadając na chemioterapię. Brak znaczących różnic pomiędzy próbkami pobranymi w czasie pierwszej diagnozy (t_0) i we wznowie (t_2) pozostają w spójności z teorią, że nawrót choroby nie jest spowodowany wytworzeniem nowej zmienionej nowotworowej linii klonalnej różniącej się na poziomie molekularnym od linii pierwotnej, lecz raczej rozplemem linii, która pozostała w organizmie pacjenta po pierwszej fazie chemioterapii. Brak różnic na poziomie miRNA pomiędzy pacjentami opornymi na leczenie, a tymi, którzy uzyskali remisję całkowitą, nie pozwala w chwili obecnej odpowiedzieć na pytanie, czy miRNA mogą determinować oporność na zastosowaną klasyczną chemioterapię.

Podobnie w przypadku AML podtypów M1 oraz M2 nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic przy przyjętym stopniu ufności. Mimo iż miRNA wpływają na różnicowanie się komórek szlaku hematopoetycznego, różnice molekularne pomiędzy AML M1 i M2 nie są duże, a komórki nowotworowe w przypadku ostrej białaczki szpikowej M1 i M2 charakteryzują się niskim i podobnym stopniem dojrzewania. Wartym zauważenia jest fakt, że brak istotnych różnic w powyższych analizach jest skutkiem wykorzystania poprawki Benjamini i Hochberg w celu usunięcia wyników fałszywie pozytywnych. W przypadku pominięcia tej funkcji badane zbiory wykazują 29 różnicujących miRNA, przy poziomie istotności $p=0,05$, a 8 przy $p=0,01$.

5.7. Podsumowanie

Zastosowanie metod mikromacierzowych do analizy miRNA umożliwiło kompleksowe określenie profili ich akumulacji w ludzkich tkankach, zarówno w stanach fizjologicznych jak i patologicznych. Wykorzystanie mikromacierzy pozwoliło także ustalić charakterystyki akumulacji miRNA w różnych tkankach większości organizmów modelowych, takich jak mysz domowa²²², szczur²²³, *Caerhnohabditis elegans*²²⁴, *Arabidopsis thaliana*²²⁵ czy *Drosophila melanogaster*²²⁶. Pierwsze mikromacierze dedykowane wykrywaniu miRNA powstały już w 2004 roku^{227,228,229,230}, przy czym różniły się zasadniczo metodami znakowania RNA. Techniki znakowania obejmowały m.in.: amplifikację konkatamerów miRNA z losowymi starterami znakowanymi na końcu 5' cyjaniną 3, lub też starterami sprzęganymi z biotyną. Detekcja odbywała się poprzez wzbudzenie fluorescencji promieniem lasera, w przypadku biotynylowanych starterów zastosowano modyfikowaną fluoroforem streptawidynę.

W późniejszym czasie pojawiły się komercyjnie dostępne platformy do mikromacierzowego profilowania miRNA. W większości przypadków były one podobne do używanego przeze mnie systemu. Występujące drobne różnice polegały głównie na zastosowaniu innych barwników fluorescencyjnych np. Cy3 i Cy5. Obecne na rynku dostępne są także mikromacierze zawierające sondy LNA²³¹, w których nukleotydy charakteryzują się obecnością mostka łączącego tlen w pozycji 2' z węglem w pozycji 4'. Mostek ten blokuje rybozę w konformacji 3'-endo, co zmieniając ułożenie przestrzenne pierścienia fosfocukrowego oligonukleotydu ułatwia wiązanie wyznakowanej próby, szczególnie w przypadku małych cząsteczek, w tym miRNA^{232,233}. Patent na LNA posiada duńska firma Exiqon, która w swojej platformie

²²² Yan, N., *Reproduction*, (2007), s. 73.

²²³ WANG, Y., *BMC genomics*, (2007), s. 29.

²²⁴ HE, H., *Nuc. Acid Res.*, (2006), s. 2976.

²²⁵ LIU, H. H., *RNA*, (2008), s. 836.

²²⁶ YANG, M., *BMC genomics*, (2008), s. 83.

²²⁷ THOMSON, J.M., *Nat Methods*, (2004), s. 47.

²²⁸ LIU, C.G., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2004), s. 9740.

²²⁹ BABAK, T., *RNA*, (2004), s. 1813.

²³⁰ MISKA, E.A., *Genome Biol.*, (2004), s. 68.

²³¹ KOSHKIN A., *Tetrahedron*, (1998), s. 3607.

²³² KAUR, H., *Biochemistry*, (2006), s. 7347.

²³³ CASTOLDI, M., *Nat Protoc*, (2008), s. 321.

mikromacierzowej wprowadza także inny sposób znakowania miRNA polegający na usunięciu 5'-fosforanu przez zasadową fosfatazę bydłą (CIP – ang. *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*), a następnie bezpośrednie enzymatyczne przyłączenie fluoroformu do końca 3' miRNA.

Wszystkie wyżej wspomniane rozwiązania zakładają jednoczesną hybrydyzację dwóch próbek, kontrolnej i badanej, z tą samą mikromacierzą. Alternatywę proponuje firma Agilent, której rozwiązanie opiera się na syntezie sond nową metodą fotolitografii. Umożliwia ona zwiększenie gęstości sond na mikromacierzy, nawet do ok. 1 miliona na jednym szkiełku podstawowym. Procedura znakowania jest podobna do zastosowanej w przypadku mikromacierzy LNA, z tą różnicą, że tylko jedna próbka jest hybrydyzowana z mikromacierzą. miRNA znakowane jest cyjaniną 3 skoniugowaną z cytydyną (Cy3-pCp-).

W ostatnich latach pojawiły się pierwsze publikacje opisujące profile akumulacji miRNA w AML. Do najważniejszych należy zaliczyć prace Dixon-McIver²³⁴ i Garzona²³⁵, opisujące związek specyficznych profili miRNA z kariotypem, a także pracę Marucciego²³⁶ pokazującą obraz miRNA w cytogenetycznie prawidłowej AML. Badano także relacje pomiędzy profilem miRNA a innymi specyficznymi fenotypami molekularnymi AML²³⁷ oraz mutacjami w genie nukleofozminy – Garzon²³⁸.

Warty zauważenia jest fakt, że we wszystkich powyżej wymienionych badaniach przyjęto klasyfikację WHO dla podzielenia pacjentów/próbek na podgrupy, co w praktyce uniemożliwia porównanie uzyskanych przez mnie wyników w z danymi literaturowymi. W przypadku tych badań grupą kontrolną były zazwyczaj próbki uzyskane od zdrowych osób. Porównywano też przypadki AML z kariotypem normalnym i zmutowanym, lub przypadki AML ze specyficzną mutacją bez tej mutacji. W moim przypadku zmiana klasyfikacji próbek do danych subpopulacji mikromacierzy spowodowałaby inne wyniki, a tym samym inne wnioski.

²³⁴ DIXON-MCIVER, A., *PLoS One*, (2008), s. 2141.

²³⁵ GARZON, R., *Blood*, (2008), s. 3184.

²³⁶ MARCUCCI, G., *N Engl J Med*, (2008), s. 1919.

²³⁷ JONGEN-LAVRENCIC, M., *Blood*, (2008), s. 5078.

²³⁸ GARZON, R., *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2008), s. 3945.

Wyniki niniejszej pracy pokazują, że mikromacierze DNA mogą być z powodzeniem wykorzystane w analizie akumulacji ludzkich miRNA. Opracowano pełną ścieżkę obejmującą wszystkie etapy eksperymentu mikromacierzowego: projektowanie i wykonanie mikromacierzy, izolacja i znakowanie RNA (w tym miRNA), hybrydyzację i skanowanie mikromacierzy, a także analizę bioinformatyczną uzyskanych danych. Szczególnie wart zauważenia jest fakt opracowania ścieżki analizy bioinformatycznej wyższego rzędu. Przy niewielkich modyfikacjach może ona posłużyć do analizy dowolnych niskocząsteczkowych RNA, oczywiście po wprowadzeniu modyfikacji adekwatnych do danego eksperymentu.

Tym niemniej należy zdawać sobie sprawę, że wszelkie wyniki analiz mikromacierzowych muszą być dodatkowo walidowane innymi metodami, takimi jak qRT-PCR. Następnie uzyskane wyniki powinny być potwierdzane przez analizy funkcjonalne, by można było wyciągać wnioski odnośnie wpływu poszczególnych miRNA na dany proces biologiczny. Mikromacierze DNA są wygodnym narzędziem znajdującym zastosowanie w badaniach przesiewowych. Są one szczególnie przydatne na wstępnych etapach eksperymentu, gdyż umożliwiają przeprowadzenie analiz globalnych, pozwalających wychwycić różnice pomiędzy wieloma grupami próbek jednocześnie. Ponadto ilość danych mikromacierzowych deponowanych w bazach wciąż rośnie, umożliwiając kompleksowe analizy bioinformatyczne miRNA w coraz szerszym kontekście biologicznym.

Reasumując opisane badania należy stwierdzić, że przedstawione w rozdziale drugim cele pracy zostały zrealizowane, a proponowane przeze mnie metody mogą być wykorzystane do analizy profili akumulacji miRNA w komórkach ludzkich.

6. Bibliografia

- 1 CANTOR, C. R. HUGO physical mapping. *Nature* **345**, 106, doi:10.1038/345106a0 (1990).
- 2 WATSON, J. D. The human genome project: past, present, and future. *Science* **248**, 44-49 (1990).
- 3 VENTER, J. C. A part of the human genome sequence. *Science* **299**, 1183-1184, doi:10.1126/science.299.5610.1183 (2003).
- 4 www.sanger.ac.uk/HGP/draft2000/mainrelease.shtml
- 5 FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811, doi:10.1038/35888 (1998).
- 6 NAPOLI, C., LEMIEUX, C. & JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* **2**, 279-289, doi:10.1105/tpc.2.4.279 (1990).
- 7 VAN BLOKLAND, R. *et al.*, Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal*. **6**, 861-77 (1994)
- 8 JORGENSEN, R. A. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression States. *Science* **268**, 686-691, doi:10.1126/science.268.5211.686 (1995).
- 9 ROMANO, N. & MACINO, G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology* **6**, 3343-3353 (1992).
- 10 BAULCOMBE, D. C. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *The Plant cell* **8**, 1833-1844, doi:10.1105/tpc.8.10.1833 (1996).
- 11 RATCLIFF, F., HARRISON, B. D. & BAULCOMBE, D. C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560 (1997).
- 12 MORITA, T., MOCHIZUKI, Y. & AIBA, H. Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4858-4863, doi:10.1073/pnas.0509638103 (2006).
- 13 MAKAROVA, K. S., GRISHIN, N. V., SHABALINA, S. A., WOLF, Y. I. & KOONIN, E. V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct* **1**, 7, doi:10.1186/1745-6150-1-7 (2006).
- 14 MALONE, C. D. *et al.* Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell* **137**, 522-535, doi:10.1016/j.cell.2009.03.040 (2009).

- 15 LEE, R. C., FEINBAUM, R. L. & AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854 (1993).
- 16 TOMARI, Y. & ZAMORE, P. D. Perspective: machines for RNAi. *Genes & development* **19**, 517-529, doi:10.1101/gad.1284105 (2005).
- 17 LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-858, doi:10.1126/science.1064921 (2001).
- 18 LAU, N. C., LIM, L. P., WEINSTEIN, E. G. & BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-862, doi:10.1126/science.1065062 (2001).
- 19 MALONE, C. D. & HANNON, G. J. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* **136**, 656-668, doi:10.1016/j.cell.2009.01.045 (2009).
- 20 MEISTER, G. & TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349, doi:10.1038/nature02873 (2004).
- 21 HAMMOND, S. M., BERNSTEIN, E., BEACH, D. & HANNON, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-296, doi:10.1038/35005107 (2000).
- 22 LIPPMAN, Z. & MARTIENSSEN, R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364-370, doi:10.1038/nature02875 (2004).
- 23 BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
- 24 BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233, doi:10.1016/j.cell.2009.01.002 (2009).
- 25 NAKAYASHIKI, H. & NGUYEN, Q. B. RNA interference: roles in fungal biology. *Current opinion in microbiology* **11**, 494-502, doi:10.1016/j.mib.2008.10.001 (2008).
- 26 BENTWICH, I. *et al.* Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics* **37**, 766-770, doi:10.1038/ng1590 (2005).
- 27 FRIEDMAN, R. C., FARH, K. K., BURGE, C. B. & BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* **19**, 92-105, doi:10.1101/gr.082701.108 (2009).
- 28 AMBROS, V. *et al.* A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277-279 (2003).
- 29 GRIFFITHS-JONES, S., GROCOCK, R. J., VAN DONGEN, S., BATEMAN, A. & ENRIGHT, A. J. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* **34**, D140-144, doi:10.1093/nar/gkj112 (2006).
- 30 LEE, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* **23**, 4051-4060, doi:10.1038/sj.emboj.7600385 (2004).
- 31 LEE, R. C. & AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 862-864, doi:10.1126/science.1065329 (2001).
- 32 RODRIGUEZ, A., GRIFFITHS-JONES, S., ASHURST, J. L. & BRADLEY, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* **14**, 1902-1910, doi:10.1101/gr.2722704 (2004).

6. Bibliografia

- 33 CAI, X., HAGEDORN, C. H. & CULLEN, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957-1966, doi:10.1261/rna.7135204 (2004).
- 34 WEBER, M. J. New human and mouse microRNA genes found by homology search. *The FEBS journal* **272**, 59-73, doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04389.x (2005).
- 35 KIM, Y. K. & KIM, V. N. Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal* **26**, 775-783, doi:10.1038/sj.emboj.7601512 (2007).
- 36 BASKERVILLE, S. & BARTEL, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* **11**, 241-247, doi:10.1261/rna.7240905 (2005).
- 37 ALTUVIA, Y. *et al.* Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic acids research* **33**, 2697-2706, doi:10.1093/nar/gki567 (2005).
- 38 ZHOU, X., RUAN, J., WANG, G. & ZHANG, W. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS computational biology* **3**, e37, doi:10.1371/journal.pcbi.0030037 (2007).
- 39 LANDGRAF, P. *et al.* A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* **129**, 1401-1414, doi:10.1016/j.cell.2007.04.040 (2007).
- 40 WITTEN, D., TIBSHIRANI, R., GU, S. G., FIRE, A. & LUI, W. O. Ultra-high throughput sequencing-based small RNA discovery and discrete statistical biomarker analysis in a collection of cervical tumours and matched controls. *BMC biology* **8**, 58, doi:10.1186/1741-7007-8-58 (2010).
- 41 CHIANG, H. R. *et al.* Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes & development* **24**, 992-1009, doi:10.1101/gad.1884710 (2010).
- 42 LEE, Y., JEON, K., LEE, J. T., KIM, S. & KIM, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* **21**, 4663-4670 (2002).
- 43 SMALHEISER, N. R. EST analyses predict the existence of a population of chimeric microRNA precursor-mRNA transcripts expressed in normal human and mouse tissues. *Genome biology* **4**, 403, doi:10.1186/gb-2003-4-7-403 (2003).
- 44 FALLER, M. & GUO, F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochimica et biophysica acta* **1779**, 663-667, doi:10.1016/j.bbagr.2008.08.005 (2008).
- 45 LEE, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419, doi:10.1038/nature01957 (2003).
- 46 GREGORY, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235-240, doi:10.1038/nature03120 (2004).
- 47 LANDTHALER, M., YALCIN, A. & TUSCHL, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current biology : CB* **14**, 2162-2167, doi:10.1016/j.cub.2004.11.001 (2004).

- 48 HAN, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* **18**, 3016-3027, doi:10.1101/gad.1262504 (2004).
- 49 DENLI, A. M., TOPS, B. B., PLASTERK, R. H., KETTING, R. F. & HANNON, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-235, doi:10.1038/nature03049 (2004).
- 50 GREGORY, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235-240, doi:10.1038/nature03120 (2004).
- 51 OKAMURA, K., HAGEN, J. W., DUAN, H., TYLER, D. M. & LAI, E. C. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell* **130**, 89-100, doi:10.1016/j.cell.2007.06.028 (2007).
- 52 RUBY, J. G., JAN, C. H. & BARTEL, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **448**, 83-86, doi:10.1038/nature05983 (2007).
- 53 LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, J. E. & KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-98, doi:10.1126/science.1090599 (2004).
- 54 YI, R., QIN, Y., MACARA, I. G. & CULLEN, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* **17**, 3011-3016, doi:10.1101/gad.1158803 (2003).
- 55 BOHNSACK, M. T., CZAPLINSKI, K. & GORLICH, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185-191 (2004).
- 56 GWIZDEK, C. *et al.* Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase III transcripts to the cell cytoplasm. Terminal minihelix and RNA export. *The Journal of biological chemistry* **276**, 25910-25918, doi:10.1074/jbc.M100493200 (2001).
- 57 YI, R., DOEHLE, B. P., QIN, Y., MACARA, I. G. & CULLEN, B. R. Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* **11**, 220-226, doi:10.1261/rna.7233305 (2005).
- 58 GATIGNOL, A., BUCKLER-WHITE, A., BERKHOUT, B. & JEANG, K. T. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* **251**, 1597-1600 (1991).
- 59 CHENDRIMADA, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-744, doi:10.1038/nature03868 (2005).
- 60 SCHWARZ, D. S. & ZAMORE, P. D. Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes & development* **16**, 1025-1031, doi:10.1101/gad.992502 (2002).
- 61 KROL, J. *et al.* Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *The Journal of biological chemistry* **279**, 42230-42239, doi:10.1074/jbc.M404931200 (2004).
- 62 KHVOROVA, A., REYNOLDS, A. & JAYASENA, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216 (2003).
- 63 SCHWARZ, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208 (2003).

6. Bibliografia

- 64 OKAMURA, K., CHUNG, W. J. & LAI, E. C. The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell Cycle* **7**, 2840-2845 (2008).
- 65 MURCHISON, E. P. & HANNON, G. J. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Current opinion in cell biology* **16**, 223-229, doi:10.1016/j.ceb.2004.04.003 (2004).
- 66 MOURELATOS, Z. *et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development* **16**, 720-728, doi:10.1101/gad.974702 (2002).
- 67 HOCK, J. & MEISTER, G. The Argonaute protein family. *Genome biology* **9**, 210, doi:10.1186/gb-2008-9-2-210 (2008).
- 68 MARTINEZ J. *et al.* RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & development* **18**, 975-980, doi:10.1101/gad.1187904 (2004).
- 69 CHENDRIMADA, T. P. *et al.* MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**, 823-828, doi:10.1038/nature05841 (2007).
- 70 SEN, G. L. & BLAU, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature cell biology* **7**, 633-636, doi:10.1038/ncb1265 (2005).
- 71 GRIMSON, A. *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell* **27**, 91-105, doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017 (2007).
- 72 ESQUELA-KERSCHER, A. & SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer* **6**, 259-269, doi:10.1038/nrc1840 (2006).
- 73 YANG, J. S. & LAI, E. C. Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates. *Cell Cycle* **9**, 4455-4460 (2010).
- 74 VASUDEVAN, S., TONG, Y. & STEITZ, J. A. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931-1934, doi:10.1126/science.1149460 (2007).
- 75 CHATTERJEE, S. & GROSSHANS, H. Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **461**, 546-549, doi:10.1038/nature08349 (2009).
- 76 CHAN, S. P. & SLACK, F. J. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA biology* **3**, 97-100 (2006).
- 77 KAI, Z. S. & PASQUINELLI, A. E. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nature structural & molecular biology* **17**, 5-10, doi:10.1038/nsmb.1762 (2010).
- 78 ZHAO, X. *et al.* MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **65**, 612-626, doi:10.1016/j.neuron.2010.02.018 (2010).
- 79 KOUTSOULIDOU, A., MASTROYIANNPOULOS, N. P., FURLING, D., UNEY, J. B. & PHYLACTOU, L. A. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC developmental biology* **11**, 34, doi:10.1186/1471-213X-11-34 (2011).
- 80 TAM, W. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* **274**, 157-167 (2001).

6. Bibliografia

- 81 FARAONI, I., ANTONETTI, F. R., CARDONE, J. & BONMASSAR, E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochimica et biophysica acta* **1792**, 497-505, doi:10.1016/j.bbadis.2009.02.013 (2009).
- 82 BRAR, S. S. *et al.* Activation-induced deaminase, AID, is catalytically active as a monomer on single-stranded DNA. *DNA repair* **7**, 77-87, doi:10.1016/j.dnarep.2007.08.002 (2008).
- 83 BORCHERT, G. M., HOLTON, N. W. & LARSON, E. D. Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155. *BMC cancer* **11**, 347, doi:10.1186/1471-2407-11-347 (2011).
- 84 CALAME, K. MicroRNA-155 function in B Cells. *Immunity* **27**, 825-827, doi:10.1016/j.immuni.2007.11.010 (2007).
- 85 RODRIGUEZ, A. *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* **316**, 608-611, doi:10.1126/science.1139253 (2007).
- 86 SONKOLY, E. *et al.* MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of allergy and clinical immunology* **126**, 581-589 e581-520, doi:10.1016/j.jaci.2010.05.045 (2010).
- 87 KUROWSKA-STOLARSKA, M. *et al.* MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 11193-11198, doi:10.1073/pnas.1019536108 (2011).
- 88 MARTIN, M. M. *et al.* The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microrna-155 binding. *The Journal of biological chemistry* **282**, 24262-24269, doi:10.1074/jbc.M701050200 (2007).
- 89 CELOTTO, G. *et al.* Interplay between miR-155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives. *American journal of hypertension* **24**, 241-246, doi:10.1038/ajh.2010.211 (2011).
- 90 LU, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834-838, doi:10.1038/nature03702 (2005).
- 91 CALIN, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2999-3004, doi:10.1073/pnas.0307323101 (2004).
- 92 TAKAMIZAWA, J. *et al.* Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research* **64**, 3753-3756, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0637 (2004).
- 93 LEE, Y. S. & DUTTA, A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes & development* **21**, 1025-1030, doi:10.1101/gad.1540407 (2007).
- 94 BULLRICH, F. *et al.* Characterization of the 13q14 tumor suppressor locus in CLL: identification of ALT1, an alternative splice variant of the LEU2 gene. *Cancer research* **61**, 6640-6648 (2001).
- 95 KROGER, N. *et al.* Deletion of chromosome band 13q14 as detected by fluorescence in situ hybridization is a prognostic factor in patients with multiple

- myeloma who are receiving allogeneic dose-reduced stem cell transplantation. *Blood* **103**, 4056-4061, doi:10.1182/blood-2003-12-4435 (2004).
- 96 CAMPS, J. *et al.* Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leukemia research* **30**, 923-934, doi:10.1016/j.leukres.2005.11.013 (2006).
- 97 DONG, J. T., BOYD, J. C. & FRIERSON, H. F., JR. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *The Prostate* **49**, 166-171 (2001).
- 98 CALIN, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15524-15529, doi:10.1073/pnas.242606799 (2002).
- 99 DOHNER, H. *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine* **343**, 1910-1916, doi:10.1056/NEJM200012283432602 (2000).
- 100 OSCIER, D. G. *et al.* Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* **100**, 1177-1184 (2002).
- 101 CIMMINO, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13944-13949, doi:10.1073/pnas.0506654102 (2005).
- 102 IORIO, M. V. *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research* **65**, 7065-7070, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783 (2005).
- 103 RAMKISSOON, S. H. *et al.* Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leukemia research* **30**, 643-647, doi:10.1016/j.leukres.2005.09.001 (2006).
- 104 KLUIVER, J. *et al.* Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer* **45**, 147-153, doi:10.1002/gcc.20273 (2006).
- 105 KLUIVER, J. *et al.* BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *The Journal of pathology* **207**, 243-249, doi:10.1002/path.1825 (2005).
- 106 TSUCHIYA, Y., NAKAJIMA, M., TAKAGI, S., TANIYA, T. & YOKOI, T. MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer research* **66**, 9090-9098, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1403 (2006).
- 107 HE, H. *et al.* The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 19075-19080, doi:10.1073/pnas.0509603102 (2005).
- 108 HE, L. *et al.* A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-833, doi:10.1038/nature03552 (2005).
- 109 TAGAWA, H., KARUBE, K., TSUZUKI, S., OHSHIMA, K. & SETO, M. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer science* **98**, 1482-1490, doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00531.x (2007).

- 110 O'DONNELL, K. A., WENTZEL, E. A., ZELLER, K. I., DANG, C. V. & MENDELL, J. T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **435**, 839-843, doi:10.1038/nature03677 (2005).
- 111 BERNSTEIN, E. *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics* **35**, 215-217, doi:10.1038/ng1253 (2003).
- 112 WANG, Y., MEDVID, R., MELTON, C., JAENISCH, R. & BLELLOCH, R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics* **39**, 380-385, doi:10.1038/ng1969 (2007).
- 113 WANG, Y. *et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nature genetics* **40**, 1478-1483, doi:10.1038/ng.250 (2008).
- 114 COBB, B. S. *et al.* A role for Dicer in immune regulation. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2519-2527, doi:10.1084/jem.20061692 (2006).
- 115 COBB, B. S. *et al.* T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1367-1373, doi:10.1084/jem.20050572 (2005).
- 116 O'CARROLL, D. *et al.* A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes & development* **21**, 1999-2004, doi:10.1101/gad.1565607 (2007).
- 117 GARZON, R. *et al.* MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5078-5083, doi:10.1073/pnas.0600587103 (2006).
- 118 ZHAO, H., KALOTA, A., JIN, S. & GEWIRTZ, A. M. The c-myc proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. *Blood* **113**, 505-516, doi:10.1182/blood-2008-01-136218 (2009).
- 119 WANG, Q. *et al.* MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* **111**, 588-595, doi:10.1182/blood-2007-05-092718 (2008).
- 120 HAN, Y. C. *et al.* microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *The Journal of experimental medicine* **207**, 475-489, doi:10.1084/jem.20090831 (2010).
- 121 BISSELS, U. *et al.* Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* **29**, 847-857, doi:10.1002/stem.627 (2011).
- 122 NAVARRO, F. *et al.* miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. *Blood* **114**, 2181-2192, doi:10.1182/blood-2009-02-205062 (2009).
- 123 OOI, A. G. *et al.* MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21505-21510, doi:10.1073/pnas.1016218107 (2010).

- 124 LABBAYE, C. *et al.* A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. *Nature cell biology* **10**, 788-801, doi:10.1038/ncb1741 (2008).
- 125 LU, J. *et al.* MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Developmental cell* **14**, 843-853, doi:10.1016/j.devcel.2008.03.012 (2008).
- 126 GEORGANTAS, R. W., 3rd *et al.* CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 2750-2755, doi:10.1073/pnas.0610983104 (2007).
- 127 ROMANIA, P. *et al.* MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors. *British journal of haematology* **143**, 570-580, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07382.x (2008).
- 128 BRUCHOVA, H., YOON, D., AGARWAL, A. M., MENDELL, J. & PRCHAL, J. T. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Experimental hematology* **35**, 1657-1667, doi:10.1016/j.exphem.2007.08.021 (2007).
- 129 FELLI, N. *et al.* MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18081-18086, doi:10.1073/pnas.0506216102 (2005).
- 130 FAZI, F. *et al.* A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* **123**, 819-831, doi:10.1016/j.cell.2005.09.023 (2005).
- 131 FELLI, N. *et al.* MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica* **94**, 479-486, doi:10.3324/haematol.2008.002345 (2009).
- 132 ROSA, A. *et al.* The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 19849-19854, doi:10.1073/pnas.0706963104 (2007).
- 133 DORE, L. C. *et al.* A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3333-3338, doi:10.1073/pnas.0712312105 (2008).
- 134 ZHAN, M., MILLER, C. P., PAPAYANNOPOULOU, T., STAMATOYANNOPOULOS, G. & SONG, C. Z. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Experimental hematology* **35**, 1015-1025, doi:10.1016/j.exphem.2007.03.014 (2007).
- 135 LIAO, R. *et al.* MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *Journal of cellular biochemistry* **104**, 805-817, doi:10.1002/jcb.21668 (2008).
- 136 FONTANA, L. *et al.* MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nature cell biology* **9**, 775-787, doi:10.1038/ncb1613 (2007).

- 137 CHEN, C. *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research* **33**, e179, doi:10.1093/nar/gni178 (2005).
- 138 CHEN, Y., GELFOND, J. A., MCMANUS, L. M. & SHIREMAN, P. K. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC genomics* **10**, 407, doi:10.1186/1471-2164-10-407 (2009).
- 139 LAO, K. *et al.* Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple miRNA species in small samples. *Biochemical and biophysical research communications* **343**, 85-89, doi:10.1016/j.bbrc.2006.02.106 (2006).
- 140 SHINGARA, J. *et al.* An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA* **11**, 1461-1470, doi:10.1261/rna.2610405 (2005).
- 141 KLOOSTERMAN, W. P., WIENHOLDS, E., KETTING, R. F. & PLASTERK, R. H. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic acids research* **32**, 6284-6291, doi:10.1093/nar/gkh968 (2004).
- 142 FLYNT, A. S., LI, N., THATCHER, E. J., SOLNICA-KREZEL, L. & PATTON, J. G. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nature genetics* **39**, 259-263, doi:10.1038/ng1953 (2007).
- 143 MEISTER, G., LANDTHALER, M., DORSETT, Y. & TUSCHL, T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* **10**, 544-550 (2004).
- 144 CHOI, W. Y., GIRALDEZ, A. J. & SCHIER, A. F. Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science* **318**, 271-274, doi:10.1126/science.1147535 (2007).
- 145 KLEIN, M. E. *et al.* Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nature neuroscience* **10**, 1513-1514, doi:10.1038/nn2010 (2007).
- 146 KLOOSTERMAN, W. P., LAGENDIJK, A. K., KETTING, R. F., MOULTON, J. D. & PLASTERK, R. H. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS biology* **5**, e203, doi:10.1371/journal.pbio.0050203 (2007).
- 147 YOU, Y., MOREIRA, B. G., BEHLKE, M. A. & OWCZARZY, R. Design of LNA probes that improve mismatch discrimination. *Nucleic acids research* **34**, e60, doi:10.1093/nar/gkl175 (2006).
- 148 KAUR, H., ARORA, A., WENGEL, J. & MAITI, S. Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry* **45**, 7347-7355, doi:10.1021/bi060307w (2006).
- 149 BUERMANS, H. P., ARIYUREK, Y., VAN OMMEN, G., DEN DUNNEN, J. T. & T HOEN, P. A. New methods for next generation sequencing based microRNA expression profiling. *BMC genomics* **11**, 716, doi:10.1186/1471-2164-11-716 (2010).
- 150 JONSTRUP, S. P., KOCH, J. & KJEMS, J. A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification. *RNA* **12**, 1747-1752, doi:10.1261/rna.110706 (2006).

- 151 NILSSON, M., BARBANY, G., ANTON, D. O., GERTOW, K. & LANDEGREN, U. Enhanced detection and distinction of RNA by enzymatic probe ligation. *Nature biotechnology* **18**, 791-793, doi:10.1038/77367 (2000).
- 152 NILSSON, M. *et al.* Making ends meet in genetic analysis using padlock probes. *Human mutation* **19**, 410-415, doi:10.1002/humu.10073 (2002).
- 153 RAMKISSOON, S. H., MAINWARING, L. A., SLOAND, E. M., YOUNG, N. S. & KAJIGAYA, S. Nonisotopic detection of microRNA using digoxigenin labeled RNA probes. *Molecular and cellular probes* **20**, 1-4, doi:10.1016/j.mcp.2005.07.004 (2006).
- 154 WHEELER, D. A. *et al.* The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* **452**, 872-876, doi:10.1038/nature06884 (2008).
- 155 ZHENG, Z. *et al.* Titration-free massively parallel pyrosequencing using trace amounts of starting material. *Nucleic acids research* **38**, e137, doi:10.1093/nar/gkq332 (2010).
- 156 MARGULIES, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380, doi:10.1038/nature03959 (2005).
- 157 LEY, T. J. *et al.* DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* **456**, 66-72, doi:10.1038/nature07485 (2008).
- 158 DEO, M., YU, J. Y., CHUNG, K. H., TIPPENS, M. & TURNER, D. L. Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 2538-2548, doi:10.1002/dvdy.20847 (2006).
- 159 OBAD, S. *et al.* Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature genetics* **43**, 371-378, doi:10.1038/ng.786 (2011).
- 160 Gilles, P. N., Wu, D. J., Foster, C. B., Dillon, P. J. & Chanock, S. J. Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. *Nature biotechnology* **17**, 365-370, doi:10.1038/7921 (1999).
- 161 Heller, M. J., Forster, A. H. & Tu, E. Active microelectronic chip devices which utilize controlled electrophoretic fields for multiplex DNA hybridization and other genomic applications. *Electrophoresis* **21**, 157-164, doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<157::AID-ELPS157>3.0.CO;2-E (2000).
- 162 PEASE, A. C. *et al.* Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5022-5026 (1994).
- 163 BARONE, A. D. *et al.* Photolithographic synthesis of high-density oligonucleotide probe arrays. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **20**, 525-531, doi:10.1081/NCN-100002328 (2001).
- 164 NUWAYSIR, E. F. *et al.* Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome research* **12**, 1749-1755, doi:10.1101/gr.362402 (2002).

- 165 BARBULOVIC-NAD, I. *et al.* Bio-microarray fabrication techniques--a review. *Critical reviews in biotechnology* **26**, 237-259, doi:10.1080/07388550600978358 (2006).
- 166 COLVIN, G. A. & ELFENBEIN, G. J. The latest treatment advances for acute myelogenous leukemia. *Medicine and health, Rhode Island* **86**, 243-246 (2003).
- 167 ELSE, M. *et al.* Long remissions in hairy cell leukemia with purine analogs: a report of 219 patients with a median follow-up of 12.5 years. *Cancer* **104**, 2442-2448, doi:10.1002/cncr.21447 (2005).
- 168 VALBUENA, J. R. *et al.* T-cell prolymphocytic leukemia involving extramedullary sites. *American journal of clinical pathology* **123**, 456-464, doi:10.1309/93P4-2RNG-5XBG-3KBE (2005).
- 169 KAUSHANSKY, K. & WILLIAMS, W. J. *Williams hematology*. 8th edn, (McGraw-Hill Medical, 2010).
- 170 MOSKOWITZ, C., DUTCHER, J. P. & WIERNIK, P. H. Association of thyroid disease with acute leukemia. *American journal of hematology* **39**, 102-107 (1992).
- 171 WILLEMS, E., VALDES-SOCIN, H., BETEA, D., BECKERS, A. & BEGUIN, Y. Association of acute leukemia and autoimmune polyendocrine syndrome in two kindreds. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **17**, 1912-1914, doi:10.1038/sj.leu.2403064 (2003).
- 172 PERRY, M. C. *The chemotherapy source book*. 4th edn, (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2008).
- 173 MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G. & GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews* **56**, 185-229, doi:10.1124/pr.56.2.6 (2004).
- 174 YATES, J. W., WALLACE, H. J., JR., ELLISON, R. R. & HOLLAND, J. F. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer chemotherapy reports. Part 1* **57**, 485-488 (1973).
- 175 SHARATHKUMAR, A. *et al.* Malignant hematological disorders in children with Wolf-Hirschhorn syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* **119A**, 194-199, doi:10.1002/ajmg.a.20080 (2003).
- 176 GONZALEZ, C. H. *et al.* The WT syndrome--a "new" autosomal dominant pleiotropic trait of radial/ulnar hypoplasia with high risk of bone marrow failure and/or leukemia. *Birth defects original article series* **13**, 31-38 (1977).
- 177 FIALKOW, P. J., JANSSEN, J. W. & BARTRAM, C. R. Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy. *Blood* **77**, 1415-1417 (1991).
- 178 FERRARIS, A. M. *et al.* Clonal origin of cells restricted to monocytic differentiation in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* **64**, 817-820 (1984).
- 179 GREAVES, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. *British journal of cancer* **67**, 413-423 (1993).

- 180 TURHAN, A. G. *et al.* Highly purified primitive hematopoietic stem cells are PML-RARA negative and generate nonclonal progenitors in acute promyelocytic leukemia. *Blood* **85**, 2154-2161 (1995).
- 181 VAN LOM, K. *et al.* Clonality analysis of hematopoietic cell lineages in acute myeloid leukemia and translocation (8;21): only myeloid cells are part of the malignant clone. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **11**, 202-205 (1997).
- 182 VAN RHENEN, A. *et al.* The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood* **110**, 2659-2666, doi:10.1182/blood-2007-03-083048 (2007).
- 183 LOOK, A. T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**, 1059-1064 (1997).
- 184 PABST, T. & MUELLER, B. U. Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML. *Oncogene* **26**, 6829-6837, doi:10.1038/sj.onc.1210765 (2007).
- 185 KELLY, L. M. & GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. *Annual review of genomics and human genetics* **3**, 179-198, doi:10.1146/annurev.genom.3.032802.115046 (2002).
- 186 ADAMS, J. M. & CORY, S. Oncogene co-operation in leukaemogenesis. *Cancer surveys* **15**, 119-141 (1992).
- 187 BASHEY, A. *et al.* Mutational activation of the N-ras oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of N-ras mutation in AML pathogenesis. *Blood* **79**, 981-989 (1992).
- 188 PREISLER, H. D., KINNIBURGH, A. J., WEI-DONG, G. & KHAN, S. Expression of the protooncogenes c-myc, c-fos, and c-fms in acute myelocytic leukemia at diagnosis and in remission. *Cancer research* **47**, 874-880 (1987).
- 189 BUESO-RAMOS, C. E. *et al.* The human MDM-2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* **82**, 2617-2623 (1993).
- 190 MORI, N. *et al.* Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome and overt leukemia. *Leukemia research* **19**, 869-875 (1995).
- 191 WEIDE, R. *et al.* The role of decreased retinoblastoma protein expression in acute myelomonocytic and monoblastic leukemias. *Leukemia & lymphoma* **17**, 135-137, doi:10.3109/10428199509051713 (1995).
- 192 RIDGE, S. A., WORWOOD, M., OSCIER, D., JACOBS, A. & PADUA, R. A. FMS mutations in myelodysplastic, leukemic, and normal subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 1377-1380 (1990).
- 193 MENSSSEN, H. D. *et al.* Presence of Wilms' tumor gene (wt1) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **9**, 1060-1067 (1995).
- 194 WILLMAN, C. L. & WHITTAKER, M. H. The molecular biology of acute myeloid leukemia. Proto-oncogene expression and function in normal and neoplastic myeloid cells. *Clinics in laboratory medicine* **10**, 769-796 (1990).

- 195 VIGON, I. *et al.* Expression of the c-mpl proto-oncogene in human hematologic malignancies. *Blood* **82**, 877-883 (1993).
- 196 MILLS, K. Gene expression profiling for the diagnosis and prognosis of acute myeloid leukaemia. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**, 4605-4616 (2008).
- 197 SCHLENK, R. F. *et al.* Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **358**, 1909-1918, doi:10.1056/NEJMoa074306 (2008).
- 198 RENNEVILLE, A. *et al.* Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **22**, 915-931, doi:10.1038/leu.2008.19 (2008).
- 199 LIBURA, M. *et al.* FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* **102**, 2198-2204, doi:10.1182/blood-2003-01-0162 (2003).
- 200 SMALL, D. Targeting FLT3 for the treatment of leukemia. *Seminars in hematology* **45**, S17-21, doi:10.1053/j.seminhematol.2008.07.007 (2008).
- 201 DOHNER, K. *et al.* Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* **106**, 3740-3746, doi:10.1182/blood-2005-05-2164 (2005).
- 202 SCHOLL, C., GILLILAND, D. G. & FROHLING, S. Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* **35**, 336-345, doi:10.1053/j.seminoncol.2008.04.004 (2008).
- 203 DULBECCO, R. & FREEMAN, G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-397 (1959).
- 204 XIE, X. *et al.* Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **434**, 338-345, doi:10.1038/nature03441 (2005).
- 205 GOFF, L. A. *et al.* Rational probe optimization and enhanced detection strategy for microRNAs using microarrays. *RNA biology* **2**, 93-100 (2005).
- 206 CHIU, S. K. *et al.* Synergistic effects of epoxy- and amine-silanes on microarray DNA immobilization and hybridization. *The Biochemical journal* **374**, 625-632, doi:10.1042/BJ20030486 (2003).
- 207 CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**, 156-159, doi:10.1006/abio.1987.9999 (1987).
- 208 BECKER, C., HAMMERLE-FICKINGER, A., RIEDMAIER, I. & PFAFFL, M. W. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods* **50**, 237-243, doi:10.1016/j.ymeth.2010.01.010 (2010).
- 209 LIANG, Y., RIDZON, D., WONG, L. & CHEN, C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC genomics* **8**, 166, doi:10.1186/1471-2164-8-166 (2007).

- 210 R CORE TEAM (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- 211 GENTLEMAN, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* **5**, R80, doi:10.1186/gb-2004-5-10-r80 (2004).
- 212 PRADERVAND, S. *et al.* Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. *RNA* **15**, 493-501, doi:10.1261/rna.1295509 (2009).
- 213 BARGAJE, R., HARIHARAN, M., SCARIA, V. & PILLAI, B. Consensus miRNA expression profiles derived from interplatform normalization of microarray data. *RNA* **16**, 16-25, doi:10.1261/rna.1688110 (2010).
- 214 MEYER, S. U., PFAFFL, M. W. & ULBRICH, S. E. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnology letters* **32**, 1777-1788, doi:10.1007/s10529-010-0380-z (2010).
- 215 HUBER, W., VON HEYDEBRECK, A., SULTMANN, H., POUSTKA, A. & VINGRON, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**, S96-104 (2002).
- 216 HUBER, W., VON HEYDEBRECK, A., SUELTMANN, H., POUSTKA, A. & VINGRON, M. Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data. *Statistical applications in genetics and molecular biology* **2**, Article3, doi:10.2202/1544-6115.1008 (2003).
- 217 DUDOIT, S., YANG Y. H., CALLOW M. J., SPEED T. P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica*, 12(1), 111-139, (2002).
- 218 SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor.*, Springer, New York, 397-420, (2005).
- 219 YANG Y.H. marray: Exploratory analysis for two-color spotted microarray data. R package version 1.34.0. <http://www.maths.usyd.edu.au/u/jeany/>, (2009).
- 220 PAQUET A. arrayQuality: Assessing array quality on spotted arrays. R package version 1.34.0. <http://arrays.ucsf.edu/>, (2010).
- 221 NEUWIRTH E. RColorBrewer: ColorBrewer palettes. R package version 1.0-5. <http://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>, (2011).
- 222 YAN, N. *et al.* A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction* **134**, 73-79, doi:10.1530/REP-07-0056 (2007).
- 223 WANG, Y. *et al.* Identification of rat lung-specific microRNAs by microRNA microarray: valuable discoveries for the facilitation of lung research. *BMC genomics* **8**, 29, doi:10.1186/1471-2164-8-29 (2007).
- 224 HE, H. *et al.* Profiling *Caenorhabditis elegans* non-coding RNA expression with a combined microarray. *Nucleic acids research* **34**, 2976-2983, doi:10.1093/nar/gkl371 (2006).
- 225 LIU, H. H., TIAN, X., LI, Y. J., WU, C. A. & ZHENG, C. C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **14**, 836-843, doi:10.1261/rna.895308 (2008).

- 226 YANG, M., LEE, J. E., PADGETT, R. W. & EDERY, I. Circadian regulation of a limited set of conserved microRNAs in *Drosophila*. *BMC genomics* **9**, 83, doi:10.1186/1471-2164-9-83 (2008).
- 227 THOMSON, J. M., PARKER, J., PEROU, C. M. & HAMMOND, S. M. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nature methods* **1**, 47-53, doi:10.1038/nmeth704 (2004).
- 228 LIU, C. G. *et al.* An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9740-9744, doi:10.1073/pnas.0403293101 (2004).
- 229 BABAK, T., ZHANG, W., MORRIS, Q., BLENCOWE, B. J. & HUGHES, T. R. Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA* **10**, 1813-1819, doi:10.1261/rna.7119904 (2004).
- 230 MISKA, E. A. *et al.* Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome biology* **5**, R68, doi:10.1186/gb-2004-5-9-r68 (2004).
- 231 KOSHKIN A.A., *et al.* LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, **54**, 3607-3630, (1998).
- 232 KAUR, H., ARORA, A., WENGEL, J. & MAITI, S. Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry* **45**, 7347-7355, doi:10.1021/bi060307w (2006).
- 233 CASTOLDI, M., SCHMIDT, S., BENES, V., HENTZE, M. W. & MUCKENTHALER, M. U. miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes. *Nature protocols* **3**, 321-329, doi:10.1038/nprot.2008.4 (2008).
- 234 DIXON-MCIVER, A. *et al.* Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PloS one* **3**, e2141, doi:10.1371/journal.pone.0002141 (2008).
- 235 GARZON, R. *et al.* MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 3183-3189, doi:10.1182/blood-2007-07-098749 (2008).
- 236 MARCUCCI, G. *et al.* MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **358**, 1919-1928, doi:10.1056/NEJMoa074256 (2008).
- 237 JONGEN-LAVRENCIC, M., SUN, S. M., DIJKSTRA, M. K., VALK, P. J. & LOWENBERG, B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 5078-5085, doi:10.1182/blood-2008-01-133355 (2008).
- 238 GARZON, R. *et al.* Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3945-3950, doi:10.1073/pnas.0800135105 (2008).

7. Załączniki

Załącznik I. – Lista sond użytych do drukowania mikromacierzy

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
Sondy dla potencjalnych miRNA				
HMP_PREDICTED_MI R100	44	78,2	GAGAAATTTTCAGGGCTACTGAGAGAAATTTTCAGGG CTACTGA	UCAGUAGCCUGAAAAUUU CUC
HMP_PREDICTED_MI R102	42	88,8	TGAATCCTTGCCCAGGTGCATTGAATCCTTGCCCAG GTGCAT	AUGCACCUGGGCAAGGAUU CA
HMP_PREDICTED_MI R103	42	85	GAGCTGAGTGAGCACAAACAGAGCTGAGTGGAGC ACAAACA	UGUUUGUGCUCCACUCAGC UC
HMP_PREDICTED_MI R104	44	72,4	TTGTTCAACCAGTTACTAATCTTTGTTCAACCAGTTAC TAATCT	AGAUUAGUAACUGGUUGAA CAA
HMP_PREDICTED_MI R105	44	86,5	AGTGCCCGGCATTAAGGGCTAAGCTGCCGGCATT AAGGGCTA	UAGCCUUUAUUGCCGGCA GCU
HMP_PREDICTED_MI R108	44	69,6	CCAAATAGCTTTTTAAATAGACCAAATAGCTTTTTA AATAGA	UCUAUUUAAAAGCUAAUU UGG
HMP_PREDICTED_MI R109	44	75,3	AACCCAATATCAACATATCACAACCCAATATCAAACA TATCAC	GUGAUUUGUUUGAUUUGG GUU
HMP_PREDICTED_MI R110	44	78,5	CCAAGAAATAGCCTTTCAACACCAAGAAATAGCCTT TCAAACA	UGUUUGAAAGGCUUUUCU UGG
HMP_PREDICTED_MI R112	34	87,3	ACCCCGTGCCACTGTGTACCCCGTGCCACTGTGT CATGTCATAAGCCATTATTTCCATGTCATAAGCCATT TATTTT	ACACAGUGGCACGGGGU
HMP_PREDICTED_MI R113	44	75,8	TTGGGAGACCCTGGTCTGCACTTTGGGAGACCCTG GTCTGCACT	GAAUAAAUGGCUUUAUGAC AUG
HMP_PREDICTED_MI R114	44	89,1	CTAATGACCGCAGAAAGCCATTCTAATGACCGCAGA AAGCCATT	AGUGCAGACCAGGGUCUCC CAA
HMP_PREDICTED_MI R119	44	83,1	AAACATCACTGCAAGTCTTAACAAACATCACTGCAAG TCTTAAC	AAUGGCUUUCUGCGGUCAU UAG
HMP_PREDICTED_MI R12	44	76,5	CATTCAACAACATTTAATGAGCATTCAACAACATTT AATGAG	GUAAGAGCUUGCAGUGAUG UUU
HMP_PREDICTED_MI R120	44	75,2	AGCCTATGGAATTCAGTTCTCAAGCCTATGGAATTCA GTTCTCA	CUCAUUAAAUGUUUGUUGA AUG
HMP_PREDICTED_MI R121	44	79,2	AAGAAGTGCACCATGTTTGTAAAGTGCACCATG TTTGTTT	UGAGAACUGAAUCCAUAG GCU
HMP_PREDICTED_MI R124	44	79,4	TGCCTGGCACCTACACACTAATGCCTGGCACCTACA CACTAA	AAACAACAUGGUGCACUU CUU
HMP_PREDICTED_MI R127	42	83,6	TGCTAAATGATCCCCTGGTGCTGCTAAATGATCCCCT GGTGC	UUAGUGUGUAGGUGCCAGG CA
HMP_PREDICTED_MI R128	42	85,7	CCAATTAAGTCTTTAAATAAACCAATTAAGTCTTTA AATAAA	GCACCAGGGGAUCAUUUAG CA
HMP_PREDICTED_MI R129	44	67,5	CACCTCACTGCCTGCAGACAACACTTCACTGCCTGC AGACAA	UUUUAUUAAAAGACUUAU UGG
HMP_PREDICTED_MI R131	42	86,2	CGTTCCTGATAAGTGAATAAACGTTCTGATAAGTG AATAAAA	UUGUCUGCAGGCAGUGAAG UG
HMP_PREDICTED_MI R132	44	74,3	GCAGTTCAGAAAATTAATAGAGCAGTTCAGAAAATT AAATAGA	UUUUUAUCACUUUUCAGGA ACG
HMP_PREDICTED_MI R135	44	71,4	GTTCTCCAATACCTAGGCACAAGTTCTCCAATACCTA GGCACAA	UCUAUUUAAUUUUCUGAAC UGC
HMP_PREDICTED_MI R137	44	79,1	TAGGGTCACACAGGATGTGAATTAGGGTCACACAGG ATGTGAAT	UUGUGCCUAGGUUUUGGAG AAC
HMP_PREDICTED_MI R139	44	81,9	ACAAGGATGAATCTTTGTTACTACAAGGATGAATCTTT GTTACT	AUUCACAUCCUGUGUGACC CUA
HMP_PREDICTED_MI R140	44	73,1	CAGAAGTGTCCCGCTGCTACAGAAGTGTCCCGCT GCTA	AGUAACAAGAUUCAUCCU UGU
HMP_PREDICTED_MI R141	40	84,2	AGGTTACCCGAGCAACTTTCAGGTTACCCGAGCAA CTTTGC	UAGCAGCGGGAACAGUUUC G
HMP_PREDICTED_MI R142	42	84,3	GAGGGGAGTTTTCTTTCAAAGGAGGGGAGTTTTCT TTCAAAG	GCAAAGUUGCUCGGGUAA CU
HMP_PREDICTED_MI R143	44	79,3		CUUUUGAAAGAAAACUCC CUC

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
HMP_PREDICTED_MI R144	44	81,2	ATCCTTGAATAGGTGTGTTGCAATCCTTGAATAGGTG TGTTGCA	UGCAACACACCUAUUCAAG GAU
HMP_PREDICTED_MI R145	44	81,4	TTTACAGGGTGGCCATTTAAATTTACAGGGTGGCCC ATTTAAA	UUUAAAUGGGCCACCCUGU AAA
HMP_PREDICTED_MI R146	44	78,2	CAAAGAGCATGATATTTGACAGCAAAGAGCATGATAT TTGACAG	CUGUCAAAUAUCAUGCUCU UUG
HMP_PREDICTED_MI R149	44	75,9	GGTCAATTTTACCTCTCAGGTGGTCAATTTTACCTC TCAGGT	ACCUGAGAGGUAAAUAUUG ACC
HMP_PREDICTED_MI R150	44	87,6	TCAGGCCATCAGCAGCTGCTATTCAGGCCATCAGCA GCTGCTAT	AUAGCAGCUGCUGAUGGCC UGA
HMP_PREDICTED_MI R151	42	86,6	CCAGGAATTGATGACCAGCTGCCAGGAATTGATGAC CAGCTG	CAGCUGGUCAUCAAUUCCU GG
HMP_PREDICTED_MI R152	42	81,9	AGGACCCAGAGAACAACCTCAGAGGCCAGAGAAC AACTCAG	CUGAGUUGUUCUCUGGGUC CU
HMP_PREDICTED_MI R153	42	83,3	ACCTAGGGATCGTCAAAGGGAACCTAGGGATCGTCA AAGGGA	UCCCUUUGACGAUCCUAG GU
HMP_PREDICTED_MI R154	44	78,5	TTTCCTCTGCAAACAGTTGTAATTTCTCTGCAAACA GTTGTAA	UUACAACUGUUUGCAGAGG AAA
HMP_PREDICTED_MI R155	44	66,4	TTTAGTCAATATCAAGATTTATTTAGTCAATATCAAGA TTTAT	AUAAAUCUUGAUUUGACU AAA
HMP_PREDICTED_MI R156	34	86,3	AAGCTTCCCGGGCAGCTAAGCTTCCCGGGCAGCT	AGCUGCCCGGAAGCUU
HMP_PREDICTED_MI R157	44	93,8	TGCCCATGGACTGCATGGTCTTGCCCATGGACTGC ATGGTGCT	AGCACCAUGCAGUCCAUGG GCA
HMP_PREDICTED_MI R158	42	87,8	GCTGATTGCCTCTGTGCCAATGCTGATTGCCTCTGT GCCAAT	AUUGGCACAGAGGCAAUCA GC
HMP_PREDICTED_MI R160	44	93,5	AACGCCGGGGCCACGTTGCTAAAACGCCGGGGCCA CGTTGCTAA	UUAGCAACGUGGCCCGGC GUU
HMP_PREDICTED_MI R161	44	83,6	CGAAAGGAGATTGGCCATGTACGAAAGGAGATTGG CCATGTAA	UUACAUGGCCAAUCUCCUU UCG
HMP_PREDICTED_MI R162	44	75,6	TTCTACTGAAATCTGACAATCTTCTACTGAAATCT GACAATC	GAUUGUCAGAUUUCAGUAG GAA
HMP_PREDICTED_MI R163	44	77,4	GAAAGACCCCATTTAACTTGAAGAAAGACCCCATTTA ACTTGAA	UUCAGAUAAAUGGGGUCU UUC
HMP_PREDICTED_MI R164	44	77,5	TGAACAATCCAGATAATTGCTTTGAACAATCCAGATA ATTGCTT	AAGCAAUUAUCUGGAUUGU UCA
HMP_PREDICTED_MI R165	36	87,9	TCCCCTGCAAGTGGTGCTTCCCCTGCAAGTGGTGCT	AGCACCACUUGCAGGGGA
HMP_PREDICTED_MI R166	40	91,5	TCCCACACCCAAGGCTTGCATCCCACACCCAAGGC TTGCA	UGCAAGCCUUGGGUGUGG GA
HMP_PREDICTED_MI R167	42	84,4	GAAACCAAGTATGGGTCGCCTGAAACCAAGTATGGG TCGCCT	AGGCGACCAUACUUGGUU UC
HMP_PREDICTED_MI R168	44	77,7	TGTGTGCAATTACCCATTTTATTGTGTGCAATTACCCA TTTTAT	AUAAAAUGGGUAAUUGCAC ACA
HMP_PREDICTED_MI R170	44	69,6	ATTTAAAAGGCTTTTAAATGATATTTAAAAGGCTTTTAA ATGAT	AUCAUUUAAAAGCCUUUUA AAU
HMP_PREDICTED_MI R171	44	73,8	ATAGTAGACCGTATAGCGTACGATAGTAGACCGTATAG CGTACG	CGUACGUUACGGUCUAC UAU
HMP_PREDICTED_MI R172	42	92,9	ACTGGGGCTGCATGCTGCTCAACTGGGGCTGCATG CTGCTCA	UGAGCAGCAUGCAGCCCA GU
HMP_PREDICTED_MI R173	44	68,9	CTACTGTTAATGACCTATTTCTCTACTGTTAATGACCT ATTTCT	AGAAAUAGGUCAUUAACAG UAG
HMP_PREDICTED_MI R174	44	73,3	CCTAAATACCTGGTATTGAGACCTAAATACCTGGTAT TTGAGA	UCUCAAAUACCAGGUUUUU AGG
HMP_PREDICTED_MI R176	44	69,7	CTTTGACAGCATTTTAAATTATACTTTGACAGCATTTTA ATTATA	UAUAAUUAAAUGCUGUCA AAG
HMP_PREDICTED_MI R177	44	77	GAACACACCAAGGATAATTTCTGAACACACCAAGGAT AATTTCT	AGAAAUUUCCUUGGUGUG UUC
HMP_PREDICTED_MI R179	44	70,9	AGTTATGAAATGTCATCAATAAAGTTATGAAATGTCAT CAATAA	UUAUUGAUGACAUUUCUA ACU
HMP_PREDICTED_MI R180	42	82,1	CACAGGAAGTGGCCTTCAATACACAGGAAGTGGCCT TCAATA	UAUUGAAGGCCACUCCUG UG
HMP_PREDICTED_MI R181	44	81,6	ATTGTTTGCACCTCTGCCAGTTTATTGTTTGCACCTCG CCAGTTT	AAACUGGCAGAGUGCAAAC AAU
HMP_PREDICTED_MI R182	44	81,2	GAGCTGAACTCAAACCAATGGAGCTGAACTCAA ACCAAATG	CAUUGGUUUUGAGUUCAG CUC
HMP_PREDICTED_MI R183	44	73,8	TCITTATTGCAAAGTCAGTATGTCTTTATTGCAAAGTC AGTATG	CAUACUGACUUUGCAAUA AGA
HMP_PREDICTED_MI R184	44	83,7	AACCCTAGGAGAGGGTGCCATTAACCCTAGGAGAGG GTGCCATT	AAUGGCACCCUCUCCUAGG GUU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
HMP_PREDICTED_MI R186	42	83,4	ATTCTGCCCTGGATATGCATATTTCTGCCCTGGATATGCAT	AUGCAUUAUCCAGGGGCGAUAU
HMP_PREDICTED_MI R187	38	89,2	AACCAAGCAGCCGGGCAGTAACCAAGCAGCCGGGCAGT	ACUGCCCCGUGCUUGGUU
HMP_PREDICTED_MI R189	42	92,4	AGCAGGGCTCCCTCACCAGCAAGCAGGGCTCCCTCACCAGCA	UGCUGGUGAGGGAGCCUCU
HMP_PREDICTED_MI R190	44	74,8	ATAAGGATTTTAGGGGCATTAATAAGGATTTTAGGGGCATTA	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
HMP_PREDICTED_MI R191	40	101,9	CGCCGCCCCGCACCTGCTGCCGCCGCCCGCACCTGCTGC	GCAGCAGGUGCGGGGCGCG
HMP_PREDICTED_MI R192	42	84,1	ACATCTCGGGGATCATCATGTACATCTCGGGGATCATCATGT	ACAUGAUGAUCCCCGAGAU
HMP_PREDICTED_MI R194	44	80,2	GGGCCCTATATTAATGGACCAAGGGCCCTATATTAATGGACCA	UUGGUCCAUUAAUUAAGGGCCC
HMP_PREDICTED_MI R196	44	78	AGTAAAGCCAAGTAGTGCATGAAGTAAAGCCAAGTAGTGCATGA	UCAUGCACUACUUGGCUUUACU
HMP_PREDICTED_MI R197	44	69,7	AAGAAGGACCTTGAATAAATAAGAAGGACCTTGAATAAATA	UAUUUUAUACAAGGUCCUUCU
HMP_PREDICTED_MI R198	42	83,2	CCAGATGCTAAGCACTGGAAGCCAGATGCTAAGCACCTGGAAG	CUUCCAGUGCUUAGCAUCUGG
HMP_PREDICTED_MI R199	44	77,3	TAACCACCTCTCCAAGTACCAAATAACCACTCTCCAAGTACCAAA	UUUGGUACUUGGAGAGUGGUUA
HMP_PREDICTED_MI R200	44	80,7	TTAACAGGCAGTTCTGCTGCTATTAACAGGCAGTTCTGCTGCTA	UAGCAGCAGAACUGCCUGUUA
HMP_PREDICTED_MI R201	44	74	ACGGTTTTACCAGACAGATTAACGGTTTTACCAGACAGTATTA	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU
HMP_PREDICTED_MI R202	42	84,9	AGAAGTGCACCGGAATGTTTAGAAGTGCACCGCGAATGTTT	AAACAUUCGCGGUGCACUUCU
HMP_PREDICTED_MI R203	40	85,6	TTAAGAGCCCGCTTTGCCTTTAAGAGCCCGCTTTGCCT	AGGCAAAGCCGGCUCUUAUA
HMP_PREDICTED_MI R205	44	75,3	ATCCACGTTTTAAATACCAAAGTCCACGTTTTAAATAACCAAG	CUUUGGUUUUAAAACGUGGAU
HMP_PREDICTED_MI R206	42	85,9	TGCCTCCCACACACAGCTTTATGCCTCCCACACACACAGCTTTA	UAAAGCUGUGUGUGGGAGGCA
HMP_PREDICTED_MI R207	44	92	TTCCCGGCACCAGCACAAAGTTTCCCGGCACCAACCAAAAGT	ACUUUGUGUGGUGCCGGGGAA
HMP_PREDICTED_MI R208	44	85,5	CAATCAGAGGCAATCAAGCACACAATCAGAGGCAATCAAGCACA	UGUGCUUGAUUGCCUCUGAUUG
HMP_PREDICTED_MI R209	44	72,7	TAATTCTAAAGCAAAGCACATAATTCTAAAGACAAAGCACAA	UUGUGCUUUGUCUUUAGAAUUA
HMP_PREDICTED_MI R210	42	84,5	GGTTGTGAGGAACAGAAGTGCAGTTGTCAGGAACAAGAGTGC	GCACUUCUGUUCUGACAAACC
HMP_PREDICTED_MI R211	44	80,5	TACAGATGGATACCGTGAATTTACAGATGGATACCGTGAATT	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA
HMP_PREDICTED_MI R212	44	80,6	ACTTGATCAAACAGAGCACAACTTGATCAAACAGAGCACAAAC	GUUGUGCUCUGUUUGAUCAAGU
HMP_PREDICTED_MI R213	44	80,9	TTTTCTCCTGACTGATTGCACTTTTTCTCCTGACTGACTGACT	AGUGCAAUCAGUCAGGAGAAA
HMP_PREDICTED_MI R214	44	76,3	TTAAAATGACATGGATAATGCATTAATGACATGGATAATGCA	UGCAUUUAUCCAUGUCAUUUUA
HMP_PREDICTED_MI R215	40	85,6	AGAAGCGCCTTTGGCAGCTAAGAAGCGCCTTTGGCAGCTA	UAGCUGCCAAAGGGCGUUCU
HMP_PREDICTED_MI R216	44	79,8	TACCTGCACTATGAGCACTTTGACCTGCACTATGAGCACTTTG	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUA
HMP_PREDICTED_MI R218	44	80	GTCATGATCATCCCACACTAATGTCATGATCATCCCACTAAT	AUUAGUGUGGAUGAUCAUGAC
HMP_PREDICTED_MI R219	42	92,4	TGGCACCTATGCCACCAGCATGGCACCTATGCCCAACAGCA	UGCUGGUGGGCAUAGGUGCCA
HMP_PREDICTED_MI R220	44	79,3	GCTTTGACAATATCATTGCACTGCTTTGACAATATCATTGCACT	AGUGCAAUGAUUUGUCAAAAGC
HMP_PREDICTED_MI R222	42	84,1	GTGGGCATCTACACTTGCCTGTGGGCATCTACACTTGCCT	AGUGCAAUGUAGAUGCCGAC
HMP_PREDICTED_MI R223	42	87,3	ACCTGCTGCCACTGGCACTTAACCTGCTGCCACTGGCACTTA	UAAUGCCAGUGGCAGCAGGU
HMP_PREDICTED_MI R224	44	78	GGCATGAATTTATTGTGCAATAGGCATGAATTTATTGTGCAATA	UAUUGCACAAUAAUUAUUAU
HMP_PREDICTED_MI R225	36	83	GCTGGCAGGGAAGTAGTGGCTGGCAGGGAAGTAGTG	CACUACUCCUGCCAGC
HMP_PREDICTED_MI R226	42	82,1	ATAACACCTACGAGCACTGCCATAACACCTACGAGCACTGCC	GGCAGUGCUCGUAGGUGUUAU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
HMP_PREDICTED_MI R227	44	75,3	AGTCACAGCATCCATTAATAAAAGTCACAGCATCCAT TAATAAA	UUUUAUUUAUGGAUGCUGUG ACU
HMP_PREDICTED_MI R228	44	78,3	ATGAGAAGACTGTCACAATCAAATGAGAAGACTGTCA CAATCAA	UUGAUUGUGACAGUCUUCU CAU
HMP_PREDICTED_MI R229	44	78,7	CTGCCAAACCAATTAATACCTCCTGCCAAACCAATTA ATACCTC	GAGGUUUUAUUUGGUUUGG CAG
HMP_PREDICTED_MI R23	42	80	AGAGGAGAGCCGTGTATGACTAGAGGAGAGCCGTGT ATGACT	AGUCAUACACGGCUCUCCU CU
HMP_PREDICTED_MI R230	44	74,3	TCATATTTTAGTTCTGCACTGATCATATTTTAGTTCTGC ACTGA	UCAGUGCAGAACUAAAAUA UGA
HMP_PREDICTED_MI R231	44	76,9	CACATAACAGGTGCTCAAATAACACATAACAGGTGCT CAAATAA	UUUUUUGAGCACCUGUUUU GUG
HMP_PREDICTED_MI R232	44	74,7	TAGAGATTGTTTCAACACTGAATAGAGATTGTTTCAAC ACTGAA	UUCAGUGUUGAAACAAUCU CUA
HMP_PREDICTED_MI R234	44	81,2	GTCTCCACAGAAACTTTTGTCCGTCTCCACAGAAAC TTTTGTCC	GGACAAAAGUUUCUGUGGA GAC
HMP_PREDICTED_MI R235	44	90,4	ACCCGGTCTGCCAGAAGCTGCTACCCGGTCTGCCA GAAGCTGCT	AGCAGCUUCUGGCAGACCG GGU
HMP_PREDICTED_MI R236	44	83,3	TTCAATAGGGCATAGGTGCCAATTCAATAGGGCATAG GTGCCAA	UUGGCACCUAUGCCCUAUU GAA
HMP_PREDICTED_MI R237	44	75,9	CTCCAAAGAACATTACTGTGATCTCCAAAGAACATTA CTGTGAT	AUCACAGUAAUGUUCUUUG GAG
HMP_PREDICTED_MI R239	44	78,8	ATCAATGCTATGTGATCTGCATATCAATGCTATGTGAT CTGCAT	AUGCAGAUACAUAGCAUU GAU
HMP_PREDICTED_MI R240	44	85	TCACCCCAAAGTTGTGGCAATATCACCCCAAAGTTG TGGCAATA	UAUUGCCACAACUUUGGGG UGA
HMP_PREDICTED_MI R241	44	85,2	ATGTGACAGAGCCAAGCACAAAATGTGACAGAGCCA AGCACAAA	UUUGUCUUGGCUCUGUCA CAU
HMP_PREDICTED_MI R242	44	79,9	ACCTACACTGAACTGCCAAAAACCTACACTGAACT GCCAAAA	UUUUGGCAGUUUCAGUGUA GGU
HMP_PREDICTED_MI R243	40	86,7	TTACCAAGGGCGACTCGCATTTACCAAGGGCGACTC GCAT	AUGCAGUCGCCCUUGGUA A
HMP_PREDICTED_MI R245	44	74,8	ATAAGATTTTAGGGGCATTAATAAGATTTTAGGG GCATTA	UAAUGCCCUUAAAAUCCU UAU
HMP_PREDICTED_MI R246	44	74,7	CCCCTATGTAATAAATGTGCTACCCGTATGTAATAAT GTGCTA	UAGCACAUUUUAUCAUAC GGG
HMP_PREDICTED_MI R247	44	66,9	TTAAGTTTGAAGTACATAGTTAAGTTTGAAGT ACATAG	CUAUGUACUUUCAAACU UAA
HMP_PREDICTED_MI R249	44	81,4	AAAGCATACCAGCTGAACCAAAAAGCATACCAGCT GAACCAAA	UUUGGUUCAGCUGGUUAGC UUU
HMP_PREDICTED_MI R250	44	86,4	CACAAGTTCCTGCAATGCACACACAAGTTCCTGCA AATGCACA	UGUGCAUUUGCAGGAACUU GUG
HMP_PREDICTED_MI R252	44	76,4	AAAAGAGACCTTCATATGCAAAAAAGAGACCTTCAT ATGCAAA	UUUGCAUUAAGAGGUCUCU UUU
HMP_PREDICTED_MI R253	44	76,4	TAAGTGCCTAGATGCACCTTATAACTGCCTAGATG CACCTTA	UAAAGGUGCAUCUAGUGCAG UUA
HMP_PREDICTED_MI R254	44	80,2	AAGCATATTTCTCCACTGTGAAAGCATATTTCTCCC ACTGTGA	UCACAGUGGGAGAAUAUG CUU
HMP_PREDICTED_MI R255	42	88,3	TCCTGATGGTGAAGTGCCTAATCCTGATGGTGAAG TGCCAA	UUGGCACUUCGACCAUCAG GA
HMP_PREDICTED_MI R256	44	72,8	CATAATTACAGAAAATTGCACTCATAATTACAGAAAAT TGCCT	AGUGCAAUUUCUGUAAUU AUG
HMP_PREDICTED_MI R257	44	69,8	ACACTTAGCAGTTGTATTATAACCTTAGCAGTTGT ATTATA	UAUAAUACAACCUGCUAAG UGU
HMP_PREDICTED_MI R258	36	87,6	TCACCCGAGGGCGCACTTATCACCCGAGGGCGCACTTA	UAAGUGCGCCUCGGGUGA
HMP_PREDICTED_MI R26	44	78,1	ACAGGCCATCTGTGTATATTCACAGGCCATCTGTGT TATATTC	GAUUAUACACAGAUGGCC UGU
HMP_PREDICTED_MI R30	38	89,4	AGGCCGGGACGAGTGAATAGGCCGGGACGAGTGC AAT	AUUGCACUCGUCCCGCCU
HMP_PREDICTED_MI R43	42	84,5	GTACAAACCACAGTGTGCTGCGTACAAACCACAGTG TGCTGC	GCAGCACACUGGGUUUGU AC
HMP_PREDICTED_MI R52	44	77,3	AATGAAAGCCTACCATGTACAAAATGAAAGCCTACCA TGTAACA	UUGUACAUGGUAGGCUUUC AUU
HMP_PREDICTED_MI R54	44	81,1	ACCAGCTAACAACTACTGCCAACAGCTAACAAATAC ACTGCCA	UGGCAGUGUAUUGUUAGCU GGU
HMP_PREDICTED_MI R56	44	82,9	AAAATCTCTGCAGGCAAATGTGAAAATCTCTGCAGG CAAATGTG	CACAUUUGCCUGCAGAGAU UUU
HMP_PREDICTED_MI R61	44	78,7	AAGAGGTTTCCCGTGTATGTTTAAAGAGTTTCCCGTG TATGTTT	AAACAUACACGGGAAACCU CUU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
HMP_PREDICTED_MI R64	44	80,6	ATGGGACATCCTACATATGCAATGGGACATCCTACA TATGCAA	UUGCAUAUGUAGGAUGUCC CAU
HMP_PREDICTED_MI R65	44	71	AGAGAACCATTACCATTACTAAAGAGAACCATTACCAT TACTAA	UUAGUAAUGGUAUUGGUUC UCU
HMP_PREDICTED_MI R74	44	85,9	CCCACCGACAACAATGAATGTTCCACCGACAACAA TGAATGTT	AACAUUCAUUGUUGCGGU GGG
HMP_PREDICTED_MI R78	34	88,2	GCTCCAGGCAGCCAAAGCTCCAGGCAGCCCAA	UUUGGGCUGCCUGGAGC
HMP_PREDICTED_MI R88	34	86,8	CCCACGCACCAGGGTAACCCACGCACCAGGGTAA	UUACCCUGGUGCGUGGG
HMP_PREDICTED_MI R89	44	71,7	ATGTTCAAATAAGCTTTTGTAAATGTTCAAATAAGCTT TTGTAA	UUACAAAAGCUUAUUUGAA CAU
HMP_PREDICTED_MI R90	44	74,3	TTTTTTTCAACTTGTACAGCTTTTTTTTCAACTTGT TACAGC	GCUGUAACAAGUUGAAAA AAA
HMP_PREDICTED_MI R92	44	80,3	AAACAAAGCACCTCTCCAAAAAAACAAAGCACCTC TCCAAAAA	UUUUUGGAGAGGUGCUUUG UU
HMP_PREDICTED_MI R93	44	83,6	GCTAACAAGGAATGCTGCCAAAGCTAACAGGAATG CTGCCAAA	UUUGGCAGCAUCCUUGUU AGC
Sondy specyficzne dla ludzkich miRNA				
hsa_miR_105	40	80,5	ACAGGAGTCTGAGCATTTGAACAGGAGTCTGAGCAT TTGA	UCAAAUGCUAGACUCCUG U
hsa_miR_106a	44	78,1	CTACCTGCACTGTAAGCACTTTCTACCTGCACTGTAA GCACTTT	AAAGUGCUUACAGUGCAGG UAG
hsa_miR_10b	44	78,2	ACAAATTCGGTTCTACAGGGTAACAAATTCGGTTCTA CAGGGTA	UACCCUGUAGAACCAGAAU UGU
hsa_miR_130b	44	86,2	GCAAGCCCAGACCGCAAAAAGCAAGCCCAGACCGC AAAAA	UUUUUGCGGUCUGGGCUU GC
hsa_miR_133b	42	84,8	TAGTGGTTGAAGGGGACCAATAGCTGGTTGAAGGG GACCAA	UUGGUCCCUUACACCAGC UA
hsa_miR_146b	44	79,2	AGCCTATGGAATTCAGTTCTCAAGCCTATGGAATTCA GTTCTCA	UGAGAACUGAAUUCUAG GCU
hsa_miR_147	40	84,9	GCAGAAGCATTTCCACACACGCAGAAAGCATTTCCAC ACAC	GUGUGUGGAAUGCUUCUG C
hsa_miR_151	42	79,5	CCTCAAGGAGCTTCACTAGCCTCAAGGAGCTTCA GTCTAG	CUAGACUGAAGCUCCUUGA GG
hsa_miR_154*	44	75,7	AATAGGTCAACCGTGTATGATTATAGGTCAACCGTG TATGATT	AAUCAUACCGGUUGACCU AUU
hsa_miR_15b	44	80,8	CTACGCGTATTCTTAAGCAATACTACGCGTATTCTTAA GCAATA	UAUUGCUUAAGAAUACGCG UAG
hsa_miR_181a	42	86,9	ACAAGTGCCTTCACTGCAGTACAAGTGCCTTCACTG CAGT	ACUGCAGUGAAGGCACUUG U
hsa_miR_181d	44	85,9	AACCCACCGACAACAATGAATGAACCCACCGACAAC AATGAATG	CAUUCAUUGUUGUCGGUGG GUU
hsa_miR_182*	42	77	TAGTTGGCAAGTCTAGAACCATAGTTGGCAAGTCTAG AACCA	UGGUUCUAGACUUGCCAAC UA
hsa_miR_18b	44	76,4	TAAGTGCCTAGATGCACCTTATAACTGCCTAGATG CACCTTA	UAAGGUGCAUCUAGUGCAG UUA
hsa_miR_191*	38	89,1	GGGACGAAATCCAAGCGCAGGGACGAAATCCAAGC GCA	UGCGCUUGGAUUUCGUCCC
hsa_miR_193b	42	89,3	AAAGCGGACTTTGAGGGCCAAAAGCGGACTTTG AGGGCCA	UGGCCCUCAAAGUCCCGCU UU
hsa_miR_197	40	87	TGGGTGGAGAAGGTGGTGAATGGGTGGAGAAGGTG GTGAA	UUCACCACCUUCCACCC A
hsa_miR_198	36	80,6	CCTATCTCCCTCTGGACCTATCTCCCTCTGGAC	GUCCAGAGGGGAGAUAGG
hsa_miR_200a*	42	84,2	TCCAGCACTGTCCGGTAAGATTCCAGCACTGTCCGG TAAGAT	AUCUUACCGGACAGUGCUG GA
hsa_miR_202	44	80,7	TTTTCCCATGCCCTATACCTCTTTTCCCATGCCCTAT ACCTCT	AGAGGUUAJAGGGCAUGGGA AAA
hsa_miR_202*	44	70,8	AAAGAAGTATATGCATAGGAAAAAGAAGTATATGCAT AGGAAA	UUUCCUAUGCAUUAUCUUC UUU
hsa_miR_20b	44	78,2	CTACCTGCACTATGAGCACTTTCTACCTGCACTATGA GCACTTT	AAAGUGCUCAUAGUGCAGG UAG
hsa_miR_211	42	86,5	AGGCGAAGGATGACAAAGGGAAGGCGAAGGATGAC AAAGGGA	UCCCUUUGUCAUCCUUCGC CU
hsa_miR_217	44	83,9	ATCCAATCAGTTCCTGATGCAGATCCAATCAGTTCCT GATGCAG	CUGCAUCAGGAACUGAUUG GAU
hsa_miR_22	44	81,3	ACATGGTTAGATCAAGCACAAACATGGTTAGATCAAG CACAA	UUUGCUUGAUCUAACCAU GU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_220	42	81,1	AAAGTGTACAGATACGGTGTGGAAAGTGTACAGATACG GTGTGG	CCACACCGUAUCUGACACU UU
hsa_miR_299_3p	44	82,6	AAGCGGTTTACCATCCCACATAAAGCGGTTTACCATC CCACATA	UAUGUGGGAUGGUAACCG CUU
hsa_miR_302a*	44	77,2	AAAGCAAGTACATCCACGTTTAAAAGCAAGTACATCC ACGTTTA	UAAACGUGGAUGUACUUGC UUU
hsa_miR_302b	44	74,3	CTACTAAAACATGGAAGCACTTCTACTAAAACATGGA AGCACTT	AAGUGCUUCCAUGUUUUAG UAG
hsa_miR_302b*	44	76,5	AGAAAGCACTTCCATGTTAAAGAGAAAGCACTTCCAT GTTAAAG	CUUUACAUGGAAGUGCUU UCU
hsa_miR_302c	44	83,5	CCACTGAAACATGGAAGCACTTCCACTGAAACATGG AAGCACTT	AAGUGCUUCCAUGUUUCAG UGG
hsa_miR_302c*	42	83,3	CAGCAGGTACCCCCATGTTAACAGCAGGTACCCCCA TGTTAA	UUAACAUGGGGUACCUGC UG
hsa_miR_302d	44	80,2	ACACTCAAACATGGAAGCACTTACACTCAAACATGG AAGCACTT	AAGUGCUUCCAUGUUUGAG UGU
hsa_miR_30e_3p	44	81,1	GCTGTTAAACATCCGACTGAAAGGCTGTTAAACATCCG ACTGAAAG	CUUUCAGUCGGAUGUUUAC AGC
hsa_miR_30e_5p	40	77,7	TCCAGTCAAGGATGTTTACATCCAGTCAAGGATGTTT ACA	UGUAAACAUCUUGACUGG A
hsa_miR_31	40	85,8	CAGTATGCCAGCATCTTGCCAGCTATGCCAGCATCT TGC	GCAAGAUGCUGGCAUAGCU G
hsa_miR_326	34	87,6	TGGAGGAAGGGCCAGATGGAGGAAGGGCCAGGA GGAAGGGCCAGGA	UCUGGGCCUUCUCCCA
hsa_miR_329	44	77,1	AAAGAGGTTAACAGGTGTGTTAAAGAGGTTAACAG GTGTGTT	AACACACUGGUUAAACCUC UUU
hsa_miR_345	38	81,4	CCTGGACTAGGAGTCAAGCACTGGACTAGGAGTCA GCA	UGCUGACUCCUAGUCCAGG
hsa_miR_362	44	81	TCACACCTAGGTTCCAAGGATTTACACCTAGGTTCC AAGGATT	AAUCCUUGGAACCUAGGUG UGA
hsa_miR_367	44	80,5	TCACCATTGCTAAAGTGAATTTACCATTGCTAAAG TGCAATT	AAUUGCACUUUAGCAAUGG UGA
hsa_miR_368	44	76,8	AAACGTGGAATTTCTCTATGTAACGTGGAATTTCC TCTATGT	ACAUAGAGGAAAUUCCACG UUU
hsa_miR_369_3p	42	69,2	AAAGATCAACCATGTATTATAAGATCAACCATGTAT TATT	AAUAAUACAUGGUUGAUUCU UU
hsa_miR_369_5p	44	81,7	GCGAATATAACACGGTCGATCTGCGAATATAACACGG TCGATCT	AGAUCGACCGUGUUUAUU CGC
hsa_miR_370	34	88,1	CAGGTTCCACCCACAGCAAGTTCCACCCACAGCA GCA	UGCGGGGUGGAACCGUG
hsa_miR_371	42	87,5	ACACTCAAAGATGGCGGCACACACTCAAAGATGG CGGCAC	GUGCCGCCAUUUUUGAGU GU
hsa_miR_372	42	87	ACGCTCAAATGTCGAGCACTACGCTCAAATGTCGC AGCACT	AGUGCUGCGACAUUUGAGC GU
hsa_miR_373	44	83,8	ACACCCAAAATCGAAGCACTTACACCCAAAATCG AAGCACTT	AAGUGCUUCGAUUUUGGGG UGU
hsa_miR_373*	42	87,5	GAAAGCGCCCCATTTGAGTGAAGCGCCCCATT TTGAGT	ACUCAAAUGGGGGCGCUU UC
hsa_miR_374	44	67,7	CACTTATCAGGTTGATTATAACTTATCAGGTTGTAT TATAA	UUUAAUACAACCUGAUAA GUG
hsa_miR_376b	44	74,8	AACATGGATTTTCTCTATGATAACATGGATTTTCTC TATGAT	AUCAUAGAGGAAAUCU GUU
hsa_miR_379	38	72,7	TACGTTCCATAGTCTACCATACGTTCCATAGTCTACCA AGCCACAATCACCTTCTGATCTAGCCACAATCACCTT CTGATCT	UGGUAGACUUGGAACGUA AGAUUUGUGGUGAUUGUG GCU
hsa_miR_384	40	69,1	TATGAACAATTTCTAGGAATATGAACAATTTCTAGGA AT	AUUCUAGAAAUGUUAU A
hsa_miR_409_3p	42	85,8	AGGGGTTACCGAGCAACATTAGGGGTTACCGAGC AACATT	AAUGUUGCUCGGUGAACCC CU
hsa_miR_409_5p	42	85,4	TGCAAAGTTGCTCGGGTAACTGCAAAGTTGCTCGG GTAACC	GGUUACCGAGCAACUUUG CA
hsa_miR_422a	40	81,9	GCCTTCTGACCCTAAGTCCAGCCTTCTGACCCTAAG TCCA	UGGACUUAGGGUCAGAAGG C
hsa_miR_422b	40	84	GCCTTCTGACTCCAAGTCCAGCCTTCTGACTCCAAG TCCA	UGGACUUGGAGUCAGAAGG C
hsa_miR_423	42	91,3	TGAGGGGCTCAGACCGAGCTTGAGGGGCTCAGA CCGAGCT	AGCUCGGUCUGAGGCCCU CA
hsa_miR_424	44	82,5	TTCAAACATGAATTGCTGCTGTTCAAACATGAATT GCTGCTG	CAGCAGCAAUUAUGUUUU GAA
hsa_miR_429	44	74	ACGGTTTTACCAGACAGTATTAACGGTTTTACCAGAC AGTATTA	UAAUACUGUCUGGUA CGU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_432	42	84,1	CCACCCAATGACCTACTCCAACCACCCAATGACCTA CTCCAA	UUGGAGUAGGUCAUUGGGU GG
hsa_miR_432*	40	86,7	AGACATGGAGGAGCCATCCAAGACATGGAGGAGCCA TCCA	UGGAUGGCUCUCCAUGUC U
hsa_miR_451	44	74,5	AAACTCAGTAATGGTAACGGTTAAACTCAGTAATGGT AACGGTT	AACCGUUACCAUUCUGAG UUU
hsa_miR_452*	42	79,3	CTTCTTTGCAGATGAGACTGACTTCTTGCAGATGAG ACTGA	UCAGUCUCAUCUGCAAAGA AG
hsa_miR_453	40	85	GAACTCACCACGGACAACCTGAACTCACCACGGAC AACCT	AGGUUGUCCGUGGUGAGUU C
hsa_miR_485_3p	40	81,7	AGAGGAGAGCCGTGTATGACAGAGGAGAGCCGTGTA TGAC	GUCAUACACGGCUCUCCUC U
hsa_miR_485_5p	42	86,1	AATTCATCACGGCCAGCCTCTAATTCATCACGGCCA GCCTCT	AGAGGCUGGCCGUGAUGAA UU
hsa_miR_488	42	82,2	TTGAGAGTGCCATTATCTGGGTTGAGAGTGCCATTAT CTGGG	CCCAGAUAAUGGCACUCUC AA
hsa_miR_489	44	80,5	CTGCCGTATATGTGATGTCCTCTGCCGTATATGTGAT GTCCT	AGUGACAUCACAUUACGG C
hsa_miR_490	40	83,5	AGCATGGAGTCTCCAGGTTAGCATGGAGTCTCCCA GGTT	AACCGGAGGACUCCAUGC U
hsa_miR_491	42	89,1	TCCTCATGGAAGGGTTCCCATCCTCATGGAAGGGT TCCCA	UGGGGAACCCUCCAUGAG GA
hsa_miR_492	42	85,3	AAGAATCTTGCCCGCAGGTCAAGAATCTTGCCCG CAGGTC	GACCUGCGGGACAAGAUUC UU
hsa_miR_493	44	77,3	AATGAAAGCCTACCATGTACAAAATGAAAGCCTACCA TGTACAA	UUGUACAUGGUAGGCUUUC AUU
hsa_miR_494	44	78,7	AAGAGGTTTCCCGTGATGTTAAGAGGTTTCCCGTG TATGTTT	AAACAUCACGGGAAACCU CUU
hsa_miR_495	44	79,4	AAAGAAGTGCACCATGTTTGTAAAGAAGTGCACCAT GTTTGTT	AACAAACUUGGUGCACUUC UUU
hsa_miR_496	44	75,7	AAGAGGTTTCCCGTGATGTTAAGAGGTTTCCCGTG TATGTTT	AAACAUCACGGGAAACCU CUU
hsa_miR_497	42	86,6	ACAAACCACAGTGTGCTGCTGACAAACCACAGTGTG CTGCTG	CAGCAGCACACUGUGUUU GU
hsa_miR_498	42	88,3	AAAACGCCCCCTGGCTTGA AAAAACGCCCCCTG GCTTGAA	UUCAAGCCAGGGGGGCUUU UU
hsa_miR_499	44	74,2	TAAACATCACTGCAAGTCTTATTAACATCACTGCAA GTCTTA	UAAGACUUGCAGUGAUGUU UAA
hsa_miR_500	42	86,1	AGAATCCTTGCCAGGTGCATAGAAATCCTTGCCAG GTGCAT	AUGCACCUGGGCAAGGAUU CU
hsa_miR_501	42	85,2	TCTCACCCAGGGACAAGGATTCTCACCCAGGGACA AAGGAT	AUCCUUUGUCCUGGGUGA GA
hsa_miR_502	42	80,3	TAGCACCCAGATAGCAAGGATTAGCACCCAGATAGCA AGGAT	AUCCUUGCUAUCUGGGUGC UA
hsa_miR_503	44	87,9	TGCAGAAGTGTCCCGCTGCTATGCAGAACTGTCC CGTGCTA	UAGCAGCGGGAACAGUUUC GCA
hsa_miR_504	42	80	ATAGAGTGCAGACCAGGGTCTATAGAGTGCAGACCA GGGTCT	AGACCCUGGUCUGCACUCU AU
hsa_miR_505	42	82,9	GAGGAAACCAGCAAGTGTGAGAGGAAACCAGCAA GTGTTGA	UCAACACUUGCUGGUUUC UC
hsa_miR_506	42	78,2	TCTACTCAGAAGGGTGCTTATCTACTCAGAAGGGTG CCTTA	UAAGGCACCCUUCUGAGUA GA
hsa_miR_507	42	81,8	TTCACTCCAAAAGGTGCAAAATCACTCCAAAAGGT GCAAAA	UUUUGCACCUUUUGGAGUG AA
hsa_miR_508	44	76,1	TCTACTCCAAAAGGCTACAATCTCTACTCCAAAAGGC TACAATC	GAUUGUAGCCUUUUGGAGU AGA
hsa_miR_509	42	79,6	TCTACCCACAGACGTACCAATCTACCCACAGACGTA CCAAT	AUUGGUACGUCUGGGGUA GA
hsa_miR_510	42	85,1	TGTGATTGCCACTCTCCTGAGTGTGATTGCCACTCT CCTGAG	CUCAGGAGAGUGGCAAUCA CA
hsa_miR_511	42	82,7	TGACTGCAGAGCAAAGACTGACTGCAGAGCAAA AGACAC	GUGUCUUUUGCUCUGCAGU CA
hsa_miR_512_3p	42	81,6	GACCTCAGCTATGACAGCACTGACCTCAGCTATGAC AGCACT	AGUGCUGUCAUAGCUGAGG UC
hsa_miR_512_5p	42	83,5	AAAGTGCCCTCAAGGCTGAGTAAAGTGCCCTCAAGG CTGAGT	ACUCAGCCUUGAGGGCACU UU
hsa_miR_513	44	80,1	ATAAATGACACCTCCCTGTGAATAAATGACACCTCC CTGTGAA	UUCACAGGGAGGUGUCAUU UAU
hsa_miR_514	40	72,9	CTACTCACAGAAGTGTCAATCTACTCACAGAAGTGTCA AT	AUUGACACUUCUGUGAGUA G

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_515_3p	42	85,2	ACGCTCCAAAAGAAGGCACTCACGCTCCAAAAGAA GGCACTC	GAGUGCCUUCUUUUGGAGC GU
hsa_miR_515_5p	44	80,1	CAGAAAGTGCTTTCTTTGGAGCAGAAAGTGCTTC TTTTGGAG	CUCCAAAAGAAAGCACUUU CUG
hsa_miR_516_3p	36	80,6	ACCCTCTGAAAGGAAGCAACCTCTGAAAGGAAGCA	UGCUCUUUCAGAGGGU
hsa_miR_516_5p	44	76,5	AAAGTGCTTCTTACCTCCAGATAAAGTGCTTCTACC TCCAGAT	AUCUGGAGGUAAGAGCAC UUU
hsa_miR_517*	42	77,5	AGACAGTGCTTCCATCTAGAGAGACAGTGCTTCCAT CTAGAG	CUCUAGAUGGAAGCACUGU CU
hsa_miR_517a	44	82,2	AACACTCTAAAGGGATGCACGAAACACTCTAAAGGG ATGCACGA	UCGUGCAUCCUUUAGAGU GUU
hsa_miR_517b	44	82,2	AACACTCTAAAGGGATGCACGAAACACTCTAAAGGG ATGCACGA	UCGUGCAUCCUUUAGAGU GUU
hsa_miR_517c	44	78,5	ACACTCTAAAGGATGCACGATACACTCTAAAGGAT GCACGAT	AUCGUGCAUCCUUUAGAG UGU
hsa_miR_518a	42	87,4	TCCAGCAAAGGGAAGCGCTTTCCAGCAAAGGGAA GCGCTTT	AAAGCGCUUCCUUUGCUG GA
hsa_miR_518a_2*	40	84,4	AAAGGCTTCCCTTTGCAGAAAAGGGCTTCCCTTTG CAGA	UCUGCAAAGGAAGCCUU U
hsa_miR_518b	42	81,9	ACCTCTAAAGGGAGCGCTTTACCTCTAAAGGGGAG CGCTTT	AAAGCGCUUCCUUUAGAG GU
hsa_miR_518c	44	80,2	CACTCTAAAGAGAAGCGCTTGCCTCTAAAGAGAA GCGCTTTG	CAAAGCGCUUCUUUAGA GUG
hsa_miR_518c*	42	84	CAGAAAGTGCTTCCCTCCAGACAGAAAGTGCTTCCC TCCAGA	UCUGGAGGGAAGCACUUUC UG
hsa_miR_518d	40	86,5	GCTCCAAAGGGAAGCGCTTTGCTCCAAAGGGAAGC GCTTT	AAAGCGCUUCCUUUGGAG C
hsa_miR_518e	42	83,5	ACACTCTGAAGGAAGCGCTTACACTCTGAAGGGAA GCGCTT	AAAGCGCUUCCUUCAGAGU GU
hsa_miR_518f	42	78,3	TCCTCTAAAGAGAAGCGCTTTCTCTAAAGAGAAGC GCTTT	AAAGCGCUUCUUUAGAG GA
hsa_miR_518f*	44	77,7	AGAGAAAGTGCTTCCCTCTAGAAGAGAAAGTGCTTC CCTCTAGA	UCUAGAGGGAAGCACUUUC UCU
hsa_miR_519a	44	76,3	GTAACACTCTAAAGGATGCACGTAACACTCTAAAG GATGCAC	GUGCAUCCUUUAGAGUGU UAC
hsa_miR_519b	44	75,8	AAACCTCTAAAGGATGCCTTAAACCTCTAAAGGA TGCACTT	AAGUGCAUCCUUUAGAGG UUU
hsa_miR_519c	44	73,9	ATCCTCTAAAAAGATGCCTTTATCCTCTAAAAAGATG CACTTT	AAAGUGCAUCCUUUAGAG GAU
hsa_miR_519d	44	78,4	ACACTCTAAAGGGAGGCCTTTACACTCTAAAGGGA GGCACTTT	AAAGUGCCUCCUUUAGAG UGU
hsa_miR_519e	44	76,3	ACACTCTAAAGGAGGCCTTTACACTCTAAAGGAG GCCTTT	AAAGUGCCUCCUUUAGAG UGU
hsa_miR_519e*	44	82,2	GAAAGTGCTCCCTTTGGAGAAGAAAGTGCTCCCTT TTGGAGAA	UUCUCCAAAAGGAGCACU UUC
hsa_miR_520a	44	81,4	ACAGTCCAAAGGGAAGCACTTTACAGTCCAAAGGGA AGCACTTT	AAAGUGCUUCCUUUGGAC UGU
hsa_miR_520a*	42	76,7	AGAAAGTACTTCCCTCTGGAGAGAAAGTACTTCCCTC TGGAG	CUCCAGAGGGAAGUACUUU CU
hsa_miR_520b	42	77,6	CCCTCTAAAGGAAGCACTTTCCCTCTAAAGGAAG CACTTT	AAAGUGCUUCCUUUAGAG GG
hsa_miR_520c	44	76,8	AACCTCTAAAGGAAGCACTTAAACCTCTAAAGGA AGCACTT	AAGUGCUUCCUUUAGAGG GUU
hsa_miR_520d	44	81,4	AACCCACCAAGAGAAGCACTTAAACCCACCAAGAG AAGCACTT	AAGUGCUUCUUUGGUGG GUU
hsa_miR_520d*	44	80,3	AGAAAGGGCTTCCCTTTGTAGAAGAAAGGGCTTCCC TTGTAGA	UCUACAAAGGGAAGCCUU UCU
hsa_miR_520e	42	80,7	CCCTCAAAAAGGAAGCACTTTCCCTCAAAAAGGAAG CACTTT	AAAGUGCUUCCUUUAGAG GG
hsa_miR_520f	44	76,8	AACCTCTAAAGGAAGCACTTAAACCTCTAAAGGA AGCACTT	AAGUGCUUCCUUUAGAGG GUU
hsa_miR_520g	44	76,3	ACACTCTAAAGGGAAGCACTTTACACTCTAAAGGGA GCCTTT	AAAGUGCUUCCUUUAGAG UGU
hsa_miR_520h	44	76,3	ACTCTAAAGGGAAGCACTTTGTACTCTAAAGGGAAG CACTTTGT	ACAAGUGCUUCCUUUAG AGU
hsa_miR_521	44	79,4	ACACTCTAAAGGGAAGTGCGTTACACTCTAAAGGGA AGTGCGTT	AACGCACUCCUUUAGAG UGU
hsa_miR_522	44	75,7	AACACTCTAAAGGGAACATTTAACTCTAAAGGGA ACCATTT	AAAUGGUUCCUUUAGAGU GUU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_523	40	82	CCTCTATAGGGAAGCGCTTCCTCTATAGGGAAGCG CGTT	AACGCGCUUCCCUUAGAG G
hsa_miR_524	40	84,8	ACTCCAAGGGAAGCGCCTTACTCCAAGGGAAGC GCCTT	AAGGCGCUUCCCUUUGGAG U
hsa_miR_524*	44	79	GAGAAAGTGCTTCCTTTGTAGGAGAAAGTGCTTCC CTTTGTAG	CUACAAAGGGAAGCACUUU CUC
hsa_miR_525	42	83,5	AGAAAGTGCATCCCTCTGGAGAGAAAGTGCATCCCT CTGGAG	CUCCAGAGGGAUGCACUUU CU
hsa_miR_525*	40	83,5	GCTCTAAAGGGAAGCGCCTTCTCTAAAGGGAAGCG CCTT	AAGGCGCUUCCCUUAGAG C
hsa_miR_526a	42	76,8	AGAAAGTGCTTCCTCTAGAGAGAAAGTGCTTCCT CTAGAG	CUCUAGAGGGAAGCACUUU CU
hsa_miR_526b	44	81,3	AACAGAAAGTGCTTCCTCAAGAACAGAAAGTGCTT CCCTCAAG	CUUGAGGGAAGCACUUUCU GUU
hsa_miR_526b*	42	78,2	GCCTCTAAAGGAAGCACTTTGCCTCTAAAGGAAG CACTTT	AAAGUGCUUCCUUUAGAG GC
hsa_miR_526c	42	81,2	AACAGAAAGCGCTTCCTCTAAACAGAAAGCGCTTC CCTCTA	UAGAGGGAAGCGCUUCUG UU
hsa_miR_527	42	84,8	AGAAAGGGCTTCCTTTGCAGAGAAAGGGCTTCCT TTGCAG	CUGCAAAGGGAAGCCUUU CU
hsa_miR_95	44	79,3	TGCTCAATAAATACCCGTTGAATGCTCAATAAATACC GTTGAA	UUCAACGGGUUUUUUUGA GCA
hsa_miR_96	44	82,6	GCAAAAATGTGCTAGTGCCAAAGCAAAAATGTGCTA GTGCCAAA	UUUGGCACUAGCACAUUUU UGC
Sondy specyficzne dla mysich miRNA				
mmu_let_7a	42	68,2	ACTATACAACCTACTACCTCAACTATACAACCTACTAC CTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUAUA GU
mmu_let_7f	40	63,9	ACTATACAATCTACTACCTCACTATACAATCTACTACCT C	GAGGUAGUAGAUUGUAUAG U
mmu_miR_106a	44	79,7	TACCTGCACTGTAGCACTTTGTACCTGCACTGTTAG CACTTTG	CAAAGUGCUAACAGUGCAG GUA
mmu_miR_124a	38	88,1	GCATTCACCGCGTGCCTTAGCATTACCCGCGTGCCT TA	UAAGGCACGCGGUGAAUGC
mmu_miR_127	38	86,7	CAAGCTCAGACGGATCCGACAAGCTCAGACGGATCC GA	UCGGAUCCGUCUGAGCUUG
mmu_miR_133b	42	84,8	TAGCTGGTTGAAGGGGACCAATAGCTGGTTGAAGGG GACCAA	UUGGUCCCUUACACCAGC UA
mmu_miR_136	44	81,4	TCCATCATCAAACAATGGAGTCCATCATCAAACA AATGGAG	CUCCAUUUGUUUGAUGAU GGA
mmu_miR_138	34	78,6	GATTCACAACACCAGCTGATTCACAACACCAGCT CTACCATAGGGTAAAACCACTGCTACCATAGGGTAAA ACCACTG	AGCUGGUGUUGUGAAUC CAGUGGUUUUACCCUAGG UAG
mmu_miR_140*	44	84,6	TCCGTGGTTCTACCCTGTGGTATCCGTGGTTCTACCC TGTGGTA	UACCACAGGGUAGAACCAC GGA
mmu_miR_141	44	76,3	CCATCTTTACCAGACAGTGTACCATCTTTACCAGAC AGTGTTA	UAAACAGUCUGGUAAAGA UGG
mmu_miR_142_3p	44	72,5	CCATAAAGTAGGAAACTACACCATAAAGTAGGAAA CACTACA	UGUAGUGUUUCCUACUUUA UGG
mmu_miR_142_5p	40	68,4	GTAGTGCTTTCTACTTTATGGTAGTGCTTTCTACTTTAT G	CAUAAAGUAGAAAGCACUA C
mmu_miR_151	40	80,4	CCTCAAGGAGCCTCAGTCTACCTCAAGGAGCCTCAG TCTA	UAGACUGAGGCUCCUUGAG G
mmu_miR_153	44	77,7	GATCACTTTGTGACTATGCAAGTCACTTTTGTGACT ATGCAA	UUGCAUAGUCACAAAAGUG AUC
mmu_miR_192	36	73,5	TGTCAATTCATAGGTCAGTGTCAATTCATAGGTCAG GAGAA	CUGACCUAUGAAUUGACA
mmu_miR_199a*	44	77,4	AACCAATGTGCAGACTACTGTAACCAATGTGCAGAC TACTGTA	UACAGUAGUCUGCACAUUG GUU
mmu_miR_201	42	74,2	AGAACAATGCCTTACTGAGTAAGAACAATGCCTTACT GAGTA	UACUCAGUAAGGCAUUGUU CU
mmu_miR_202	42	82,6	TCTTCCCATGCGCTATACCTCTCTTCCCATGCGCTAT ACCTC	GAGGUUAGCGCAUGGGAA GA
mmu_miR_203	42	74,2	CTAGTGGTCTAAACATTTCACTAGTGGTCTAAACA TTTCA	UGAAAUGUUUAGGACCACU AG
mmu_miR_207	40	85,1	AGGGAGGAGAGCCAGGAGAAAGGGAGGAGCCAG GAGAA	UUCUCCUGGCUCUCCUCCC U
mmu_miR_293	42	83,9	ACACTACAACTCTGCGGCACACTACAACTCTG CGGCAC	GUGCCGAGAUUUGUAGU GU
mmu_miR_294	44	80,4	ACACACAAAAGGGAAGCACTTTACACACAAAAGGGA AGCACTTT	AAAGUGCUUCCCUUUGUG UGU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
mmu_miR_295	44	70,4	AGACTCAAAAGTAGTAGCACTTAGACTCAAAGTAGT AGCACTT	AAGUGCUACUACUUUUGAG UCU
mmu_miR_297	42	84	CATGCACATGCACACATACATCATGCACATGCACACA TACAT	AUGUAUGUGUGCAUGUGCA UG
mmu_miR_30e*	42	78,7	CTGTAAACATCCGACTGAAAGCTGTAACATCCGACT GAAAG	CUUUCAGUCGGAUGUUUAC AG
mmu_miR_324_5p	38	85,2	CACCAATGCCCTAGGGGATCACCAATGCCCTAGGGG AT	AUCCCUAGGGCAUUGGUG
mmu_miR_344	42	79,3	ACAGTCAGGCTTTGGCTAGATACAGTCAGGCTTTGG CTAGAT	AUCUAGCCAAAGCCUGACU GU
mmu_miR_350	44	81,7	TGAAAGTGTATGGGCTTTGTGATGAAAGTGTATGGGC TTTGTGA	UCACAAAGCCCAUACACUU UCA
mmu_miR_370	40	89,6	AACCAGGTTCCACCCAGCAAACCAGGTTCCACCC CAGCA	UGCUGGGUGGAACCUUG UU
mmu_miR_376b	44	75,3	AAAGTGGATGTTCTCTATGATAAAGTGGATGTTCTT CTATGAT	AUCAUAGAGGAACAUCAC UUU
mmu_miR_379	42	76,4	CCTACGTTCCATAGTCTACCACCTACGTTCCATAGTC TACCA	UGGUAGACUAUGGAACGUA GG
mmu_miR_383	42	83,9	AGCCACAGTCACCTTCTGATCAGCCACAGTCACCTT CTGATC	GAUCAGAAGGUGACUGUG CU
mmu_miR_384	40	73	TGTGAACAATTTCTAGGAATTTGTAACAATTTCTAGG AAT	AUUCUAGAAAUUGUUCAC A
mmu_miR_409	42	85,8	AAGGGGTTCCACCGAGCAACATAAGGGGTTCCACCGAG CAACAT	AUGUUGCUCGGUGAACCC UU
mmu_miR_411	44	83,1	ACTGAGGGTTAGTGGACCGTGTACTGAGGGTTAGTG GACCGTGT	ACACGGUCCACUAACCCUC AGU
mmu_miR_433_5p	44	80,3	GAATAATGACAGGCTCACCGTAGAATAATGACAGGCT CACCGTA	UACGGUGAGCCUGUCAUUA UUC
mmu_miR_434_3p	42	83	GGAGTCGAGTGATGGTTCAAAGGAGTCGAGTGATGG TTCAAA	UUUGAACCAUCACUCGACU CC
mmu_miR_434_5p	42	85,9	GGTTCAAACCATGAGTCGAGCGGTTCAAACCATGAG TCGAGC	GCUCGACUCAUGGUUUGAA CC
mmu_miR_463	40	76,4	TGATGGACAACAAATTAGGTTGATGGACAACAAATTA GGT	ACCUAUUUUGUUGUCCAUC A
mmu_miR_464	44	72,5	TATCTCACAGAATAAATTGTTATCTCACAGAATAAAA CTTGGT	ACCAAGUUUUAUCUGUGAG AUA
mmu_miR_465	44	79,2	TCACATCAGTGCCATTCTAAATTCACATCAGTGCCAT TCTAAAT	AUUUJAGAAUGGCACUGAUG UGA
mmu_miR_466	44	76,4	GTCTTATGTGTGCGTGTATGTAGTCTTATGTGTGCGT GTATGTA	UACAUACACGCACACAUAA GAC
mmu_miR_467	44	70,3	GTGTAGGTGTGTGTATGTATGTGTAGGTGTGTGTAT GTATAT	AUAUACAUACACACACCUAC AC
mmu_miR_468	44	82,9	AGACACACGCACATCAGTCATAAGACACACGCACAT CAGTCATA	UAUGACUGAUGUGCGUGUG UCU
mmu_miR_469	44	80,4	ACACCAAGATCAATGAAAGAGGACACCAAGATCAAT GAAAGAGG	CCUCUUUCAUUGAUCUUGG UGU
mmu_miR_470	42	86,9	TCACCAGTGCCAGTCCAAGAATCACCAGTGCCAGTC CAAGAA	ACGUAGUAUAGUGCUUUUC ACA
mmu_miR_471	44	73,5	TGTGAAAAGCACTATACTACGTTGTGAAAAGCACTAT ACTACGT	ACGUAGUAUAGUGCUUUUC ACA
mmu_miR_9	44	72,8	CATACAGCTAGATAACCAAAGACATACAGCTAGATAAC CAAAGA	UCUUUGGUUAUCUAGCUGU AUG
mmu_miR_99a	40	80,5	ACAAGATCGGATCTACGGGTACAAGATCGGATCTACG GGT	ACCCGUAGAUCGUAUCUUG U
Sondy specyficzne dla szczurzych miRNA				
rno_miR_140*	40	83,9	TGTCCGTGGTTCTACCCTGTTGTCGGTGGTTCTACC CTGT	ACAGGGUAGAACCACGGAC A
rno_miR_151	42	78,6	CTCAAGGAGCCTCAGTCTAGTCTCAAGGAGCCTCAG TCTAGT	ACUAGACUGAGGCUCCUUG AG
rno_miR_151*	42	78	TACTAGACTGTGAGCTCCTCGTACTAGACTGTGAGCT CCTCG	CGAGGAGCUCACAGUCUAG UA
rno_miR_20*	42	78,7	TGTAAGTGCTCGTAATGCAGTTGTAAGTGCTCGTAAT GCAGT	ACUGCAUUACGAGCACUUA CA
rno_miR_297	44	82,3	CATGCATACATGCACACATACATGCATACATGCAC ACATACA	UGUAUGUGUGCAUGUAUGC AUG
rno_miR_327	36	86,2	ACCCTCATGCCCTCAAGACCCTCATGCCCTCAAG CAAAGA	CUUGAGGGGCAUGAGGGU GUGGUGUCUAGUUAUUU U
rno_miR_333	40	73,5	AAAAGTAACTAGCACACCACAAAGTAACTAGCACAC CAC	

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_336	42	75,4	AGACTAGATATGGAAGGGTGAAGACTAGATATGGAAG GGTGA	UCACCCUCCAUAUCUAGU CU
rno_miR_343	40	91,5	TCTGGGCACACGGAGGGAGATCTGGGCACACGGAG GGAGA	UCUCCCUCCGUGUGCCCAG A
rno_miR_344	42	82,8	ACGGTCAGGCTTTGGCTAGATACGGTCAGGCTTTGG CTAGAT	AUCUAGCCAAAGCCUGACC GU
rno_miR_347	38	92,9	TGGGCGACCCAGAGGGACATGGGCGACCCAGAGGG ACA	UGUCCUCUGGGUCGCCC A
rno_miR_349	42	80,3	AGAGGTTAAGACAGCAGGGCTAGAGGTTAAGACAGC AGGGCT	AGCCUCGUCUUAACCU CU
rno_miR_350	44	82,1	GTGAAAGTGTATGGCTTTGTGGTAAAGTGTATGG GCTTTGTG	CACAAAGCCAUACACUUU CAC
rno_miR_352	42	68,5	TACTATGCAACCTACTACTCTTACTATGCAACCTACTA CTCT	AGAGUAGUAGGUUGCAUAG UA
rno_miR_421	42	79,5	CAACAAACATTTAATGAGGCCCAACAAACATTTAATG AGGCC	GGCCUCAUAAAUGUUUGU UG
rno_miR_7*	44	81	TATGGCAGACTGTGATTTGTTGTATGGCAGACTGTGA TTTGTTG	CAACAAUCACAGUCUGCC AUA
Sondy wspólne dla ludzkich i mysich miRNA				
hsa_let_7g	42	69,7	ACTGTACAACCTACTACCTCAACTGTACAACCTACTAC CTCA	UGAGGUAGUAGUUUGUACA GU
mmu_let_7g	42	69,7	ACTGTACAACCTACTACCTCAACTGTACAACCTACTAC CTCA	UGAGGUAGUAGUUUGUACA GU
hsa_miR_1	42	69,5	TACATACTTCTTTACATTCCATACATACTTCTTTACATT CCA	UGGAAUGUAAAGAAGUAUG UA
mmu_miR_1	42	69,5	TACATACTTCTTTACATTCCATACATACTTCTTTACATT CCA	UGGAAUGUAAAGAAGUAUG UA
hsa_miR_148a	44	78,1	ACAAAGTTCTGTAGTGCCTGAACAAAGTTCTGTAGT GCACTGA	UCAGUGCACUACAGAACUU UGU
mmu_miR_148a	44	78,1	ACAAAGTTCTGTAGTGCCTGAACAAAGTTCTGTAGT GCACTGA	UCAGUGCACUACAGAACUU UGU
hsa_miR_149	40	85,1	AGTGAAGACACGGAGCCAGAAGTGAAGACACGGAG CCAGA	UCUGGCUCGGUGUCUUCAC U
mmu_miR_149	40	85,1	AGTGAAGACACGGAGCCAGAAGTGAAGACACGGAG CCAGA	UCUGGCUCGGUGUCUUCAC U
hsa_miR_15a	44	80,2	CACAAACCATTATGTGCTGCTACACAAACCATTATGT GCTGCTA	UAGCAGCACAUAAUGGUUU GUG
mmu_miR_15a	44	80,2	CACAAACCATTATGTGCTGCTACACAAACCATTATGT GCTGCTA	UAGCAGCACAUAAUGGUUU GUG
hsa_miR_182	44	81,7	TGTGAGTTCTACCATTGCCAAATGTGAGTTCTACCAT TGCCAAA	UUUGGCAAUGGUAGAACUC ACA
mmu_miR_17_3p	44	81,7	TGTGAGTTCTACCATTGCCAAATGTGAGTTCTACCAT TGCCAAA	UUUGGCAAUGGUAGAACUC ACA
mmu_miR_182	44	81,7	TGTGAGTTCTACCATTGCCAAATGTGAGTTCTACCAT TGCCAAA	UUUGGCAAUGGUAGAACUC ACA
hsa_miR_188	42	88	ACCCTCCACCATGCAAGGGATACCCTCCACCATGCA AGGGAT	AUCCCUUGCAUGGUGGAGG GU
mmu_miR_188	42	88	ACCCTCCACCATGCAAGGGATACCCTCCACCATGCA AGGGAT	AUCCCUUGCAUGGUGGAGG GU
hsa_miR_189	44	78,8	ACTGATATCAGCTCAGTAGGCAACTGATATCAGCTCA GTAGGCA	UGCCUACUGAGCUGAUUAC AGU
mmu_miR_189	44	78,8	ACTGATATCAGCTCAGTAGGCAACTGATATCAGCTCA GTAGGCA	UGCCUACUGAGCUGAUUAC AGU
hsa_miR_224	44	76,7	TAAACGGAACCACTAGTGACTTTAAACGGAACCACTA GTGACTT	AAGUCACUAGUGGUUCCGU UUA
mmu_miR_224	44	76,7	TAAACGGAACCACTAGTGACTTTAAACGGAACCACTA GTGACTT	AAGUCACUAGUGGUUCCGU UUA
hsa_miR_302a	44	77,2	TCACCAAAACATGGAAGCACTTTACCAAAACATGG AAGCACTT	AAGUGCUUCCAUGUUUUGG UGA
mmu_miR_302	44	77,2	TCACCAAAACATGGAAGCACTTTACCAAAACATGG AAGCACTT	AAGUGCUUCCAUGUUUUGG UGA
hsa_miR_361	44	78,1	GTACCCCTGGAGATTCTGATAAGTACCCCTGGAGATT CTGATAA	UUUACAGAAUCUCCAGGGG UAC
mmu_miR_361	44	78,1	GTACCCCTGGAGATTCTGATAAGTACCCCTGGAGATT CTGATAA	UUUACAGAAUCUCCAGGGG UAC
hsa_miR_363	44	80,5	TTACAGATGGATACCGTGAATTTACAGATGGATACC GTGCAAT	AUUGCACGGUAUCCAUCUG UAA
mmu_miR_363	44	80,5	TTACAGATGGATACCGTGAATTTACAGATGGATACC GTGCAAT	AUUGCACGGUAUCCAUCUG UAA

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_375	44	91,9	TCACGCGAGCCGAACGAACAAATCACGCGAGCCGA ACGAACAAA	UUUGUUCGUUCGGCUCGC GUGA
mmu_miR_375	44	91,9	TCACGCGAGCCGAACGAACAAATCACGCGAGCCGA ACGAACAAA	UUUGUUCGUUCGGCUCGC GUGA
hsa_miR_377	44	79,4	ACAAAAGTTGCCTTTGTGTGATACAAAAGTTGCCTTT GTGTGAT	AUCACACAAAGGCAACUUU UGU
mmu_miR_377	44	79,4	ACAAAAGTTGCCTTTGTGTGATACAAAAGTTGCCTTT GTGTGAT	AUCACACAAAGGCAACUUU UGU
hsa_miR_378	42	85,9	ACACAGGACCTGGAGTCAGGAACACAGGACCTGGA GTCAGGA	UCCUGACUCCAGGUCCUGU GU
mmu_miR_378	42	85,9	ACACAGGACCTGGAGTCAGGAACACAGGACCTGGA GTCAGGA	UCCUGACUCCAGGUCCUGU GU
hsa_miR_380_5p	42	86,2	GCGCATGTTCTATGGTCAACCGCGCATGTTCTATGGT CAACC	GGUUGACCAUAGAACAUGC GC
mmu_miR_380_5p	42	86,2	GCGCATGTTCTATGGTCAACCGCGCATGTTCTATGGT CAACC	GGUUGACCAUAGAACAUGC GC
hsa_miR_381	44	79,1	ACAGAGAGCTTGCCCTTGATAACAGAGAGCTTGCC CTTGATA	UAUACAAGGGCAAGCUCUC UGU
mmu_miR_381	44	79,1	ACAGAGAGCTTGCCCTTGATAACAGAGAGCTTGCC CTTGATA	UAUACAAGGGCAAGCUCUC UGU
hsa_miR_382	42	84,7	CGAATCCACCACGAACAACCTCGAATCCACCACGAA CAACTT	AAGUUGUUCGUGGUGGAUU CG
mmu_miR_382	42	84,7	CGAATCCACCACGAACAACCTCGAATCCACCACGAA CAACTT	AAGUUGUUCGUGGUGGAUU CG
hsa_miR_410	44	75,7	AACAGGCCATCTGTGTTATATTAACAGGCCATCTGTG TTATATT	AAUUAACACAGAUGGCCU GUU
mmu_miR_410	44	75,7	AACAGGCCATCTGTGTTATATTAACAGGCCATCTGTG TTATATT	AAUUAACACAGAUGGCCU GUU
hsa_miR_412	42	86,1	ACGGCTAGTGGACCAGGTGAAACGGCTAGTGGACCA GGTGAA	UUCACCUGGUCCACUAGCC GU
mmu_miR_412	42	86,1	ACGGCTAGTGGACCAGGTGAAACGGCTAGTGGACCA GGTGAA	UUCACCUGGUCCACUAGCC GU
hsa_miR_425	38	88,6	CGGACACGACATCCCGATCGGACACGACATCCCG AT	AUCGGGAAUUGUCGUGCCG G
mmu_miR_425	38	88,6	CGGACACGACATCCCGATCGGACACGACATCCCG AT	AUCGGGAAUUGUCGUGCCG G
hsa_miR_452	44	81,7	GTCTCAGTTTCCTCTGCAAACAGTCTCAGTTTCCTC TGCAAACA	UGUUUGCAGAGGAAACUGA GAC
mmu_miR_452	44	81,7	GTCTCAGTTTCCTCTGCAAACAGTCTCAGTTTCCTC TGCAAACA	UGUUUGCAGAGGAAACUGA GAC
hsa_miR_7	44	76,4	CAACAAAATCACTAGTCTCCACAACAAAATCACTAG TCTTCCA	UGGAAGACUAGUGAUUUUG UUG
mmu_miR_7	44	76,4	CAACAAAATCACTAGTCTCCACAACAAAATCACTAG TCTTCCA	UGGAAGACUAGUGAUUUUG UUG
hsa_miR_9*	40	71,1	ACTTTCGGTTATCTAGCTTTACTTTCGGTTATCTAGCT TT	AAAGCUAGUAACCGAAAG U
mmu_miR_9*	40	71,1	ACTTTCGGTTATCTAGCTTTACTTTCGGTTATCTAGCT TT	AAAGCUAGUAACCGAAAG U
Sondy wspólne dla ludzkich i szczurzych miRNA				
hsa_let_7a	44	69,1	AACTATACAACCTACTACCTCAAACCTATACAACCTACT ACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUAUA GUU
rno_let_7a	44	69,1	AACTATACAACCTACTACTACCTCAAACCTATACAACCTACT ACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUAUA GUU
hsa_let_7f	44	67	AACTATACAATCTACTACTACCTCAAACCTATACAATCTACTA CCTCA	UGAGGUAGUAGAUUGUAUA GUU
rno_let_7f	44	67	AACTATACAATCTACTACTACCTCAAACCTATACAATCTACTA CCTCA	UGAGGUAGUAGAUUGUAUA GUU
hsa_miR_124a	44	91	TGGCATTACCGCGTGCCTTAATGGCATTACCGCG TGCCTTAA	UUAAGGCACGCGGUGAAUG CCA
hsa_miR_125b	44	91	TGGCATTACCGCGTGCCTTAATGGCATTACCGCG TGCCTTAA	UUAAGGCACGCGGUGAAUG CCA
rno_miR_124a	44	91	TGGCATTACCGCGTGCCTTAATGGCATTACCGCG TGCCTTAA	UUAAGGCACGCGGUGAAUG CCA
hsa_miR_127	44	90,3	AGCCAAGCTCAGACGGATCCGAAGCCAAGCTCAGA CGGATCCGA	UCGGAUCCGUCUGAGCUUG GCU
rno_miR_127	44	90,3	AGCCAAGCTCAGACGGATCCGAAGCCAAGCTCAGA CGGATCCGA	UCGGAUCCGUCUGAGCUUG GCU
hsa_miR_136	44	81,4	TCCATCATCAAACAATGGAGTCCATCATCAAACA AATGGAG	CUCCAUUUUUUGAUGAU GGA

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_136	44	81,4	TCCATCATCAAACAAATGGAGTCCATCATCAAACA AATGGAG	CUCCAUUUUUUGAUGAU GGA
hsa_miR_138	34	78,6	GATTCACAACACCAGCTGATTCACAACACCAGCT	AGCUGGUGUUUGUGAAUC
rno_miR_138	34	78,6	GATTCACAACACCAGCTGATTCACAACACCAGCT	AGCUGGUGUUUGUGAAUC
hsa_miR_140	42	74,1	CTACCATAGGGTAAAACCACTCTACCATAGGGTAAAA CCACT	AGUGUUUUUACCCUUAUGGU AG
rno_miR_140	42	74,1	CTACCATAGGGTAAAACCACTCTACCATAGGGTAAAA CCACT	AGUGUUUUUACCCUUAUGGU AG
hsa_miR_141	44	76,3	CCATCTTTACCAGACAGTGTACCATCTTTACCAGAC AGTGTTA	U AACACUGUCUGGUAAGA UGG
rno_miR_141	44	76,3	CCATCTTTACCAGACAGTGTACCATCTTTACCAGAC AGTGTTA	U AACACUGUCUGGUAAGA UGG
hsa_miR_142_3p	44	71,6	TCCATAAAGTAGGAAACACTACTCCATAAAGTAGGAA ACACTAC	GUAGUGUUUCCUACUUUUU GGA
rno_miR_142_3p	44	71,6	TCCATAAAGTAGGAAACACTACTCCATAAAGTAGGAA ACACTAC	GUAGUGUUUCCUACUUUUU GGA
hsa_miR_142_5p	40	68,4	GTAGTGCTTTCTACTTTATGGTAGTGCTTTCTACTTTAT G	CAUAAAGUAGAAAGCACUA C
rno_miR_142_5p	40	68,4	GTAGTGCTTTCTACTTTATGGTAGTGCTTTCTACTTTAT G	CAUAAAGUAGAAAGCACUA C
hsa_miR_153	40	76,5	TCACTTTTGTGACTATGCAATCACTTTTGTGACTATGC AA	UUGCAUAGUCACAAAAGUG A
rno_miR_153	40	76,5	TCACTTTTGTGACTATGCAATCACTTTTGTGACTATGC AA	UUGCAUAGUCACAAAAGUG A
hsa_miR_192	42	81	GGCTGTCAATTCATAGGTGAGGGCTGTCAATTCATAG GTCAG	CUGACCUAUGAAUUGACAG CC
rno_miR_192	42	81	GGCTGTCAATTCATAGGTGAGGGCTGTCAATTCATAG GTCAG	CUGACCUAUGAAUUGACAG CC
hsa_miR_203	44	75,7	CTAGTGGTCTAAACATTTACCTAGTGGTCTAAAC ATTCAC	GUGAAAUGUUUAGGACCAC UAG
rno_miR_203	44	75,7	CTAGTGGTCTAAACATTTACCTAGTGGTCTAAAC ATTCAC	GUGAAAUGUUUAGGACCAC UAG
hsa_miR_324_5p	40	84	ACACCAATGCCCTAGGGGATACCAATGCCCTAGG GGAT	AUCCCCUAGGGCAUUGGUG U
rno_miR_324_5p	40	84	ACACCAATGCCCTAGGGGATACCAATGCCCTAGG GGAT	AUCCCCUAGGGCAUUGGUG U
hsa_miR_9	44	72,8	TCATACAGCTAGATAACCAAAGTCATACAGCTAGATAA CCAAAG	CUUUUGUUUUCUAGCUGUA UGA
rno_miR_9	44	72,8	TCATACAGCTAGATAACCAAAGTCATACAGCTAGATAA CCAAAG	CUUUUGUUUUCUAGCUGUA UGA
hsa_miR_99a	42	83,8	CACAAGATCGGATCTACGGGTCAAGATCGGATCTA CGGGT	ACCCGUAGAUCCGAUCUUG UG
rno_miR_99a	42	83,8	CACAAGATCGGATCTACGGGTCAAGATCGGATCTA CGGGT	ACCCGUAGAUCCGAUCUUG UG
Sondy wspólne dla mysich i szczurzych miRNA				
mmu_let_7d*	42	80,2	AGAAAGGCAGCAGGTCGTATAAGAAAGGCAGCAGGT CGTATA	UAUACGACCUGCUGCCUUU CU
rno_let_7d*	42	80,2	AGAAAGGCAGCAGGTCGTATAAGAAAGGCAGCAGGT CGTATA	UAUACGACCUGCUGCCUUU CU
mmu_miR_101b	44	72,5	CTTCAGCTATCACAGTACTGTACTTCAGCTATCACAG TACTGTA	UACAGUACUGUGAUAGCUG AAG
rno_miR_101b	44	72,5	CTTCAGCTATCACAGTACTGTACTTCAGCTATCACAG TACTGTA	UACAGUACUGUGAUAGCUG AAG
mmu_miR_10b	44	81,6	ACACAAATTCGGTTCTACAGGGACACAAATTCGGTTC TACAGGG	CCCUGUAGAACCGAAUUUG UGU
rno_miR_10b	44	81,6	ACACAAATTCGGTTCTACAGGGACACAAATTCGGTTC TACAGGG	CCCUGUAGAACCGAAUUUG UGU
mmu_miR_129_3p	44	82,3	ATGCTTTTTGGGGTAAGGGCTTATGCTTTTTGGGGTA AGGGCTT	AAGCCUUUACCCAAAAAAG CAU
rno_miR_129*	44	82,3	ATGCTTTTTGGGGTAAGGGCTTATGCTTTTTGGGGTA AGGGCTT	AAGCCUUUACCCAAAAAAG CAU
mmu_miR_129_5p	42	88,4	AGCAAGCCCAGACCGCAAAAAGCAAGCCCAGACC GCAAAAA	UUUUUGCGGUCUGGGCUU GCU
rno_miR_129	42	88,4	AGCAAGCCCAGACCGCAAAAAGCAAGCCCAGACC GCAAAAA	UUUUUGCGGUCUGGGCUU GCU
mmu_miR_137	44	74	CTACGCGTATTCTTAAGCAATACTACGCGTATTCTTAA GCAATA	UAUUGCUUAGAUAJACGCG UAG
rno_miR_137	44	74	CTACGCGTATTCTTAAGCAATACTACGCGTATTCTTAA GCAATA	UAUUGCUUAGAUAJACGCG UAG

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
mmu_miR_181c	44	82,3	ACTCACCGACAGGTTGAATGTTACTCACCGACAGGT TGAATGTT	AACAUUCAACCUUGUCGGUG AGU
rno_miR_181c	44	82,3	ACTCACCGACAGGTTGAATGTTACTCACCGACAGGT TGAATGTT	AACAUUCAACCUUGUCGGUG AGU
mmu_miR_211	44	84,4	AGGCAAAGGATGACAAAGGGAAAGGCAAAGGATGA CAAAGGGAA	UUCCUUUGUCAUCCUUUG CCU
rno_miR_211	44	84,4	AGGCAAAGGATGACAAAGGGAAAGGCAAAGGATGA CAAAGGGAA	UUCCUUUGUCAUCCUUUG CCU
mmu_miR_217	42	84,3	ATCCAGTCAGTTCCTGATGCAATCCAGTCAGTTCCT GATGCA	UGCAUCAGGAACUGACUGG AU
rno_miR_217	42	84,3	ATCCAGTCAGTTCCTGATGCAATCCAGTCAGTTCCT GATGCA	UGCAUCAGGAACUGACUGG AU
mmu_miR_24	42	86,9	TGTTCTGCTGAACTGAGCCATGTTCTGCTGAACT GAGCCA	UGGUCAGUUCAGCAGGAA CA
rno_miR_24	42	86,9	TGTTCTGCTGAACTGAGCCATGTTCTGCTGAACT GAGCCA	UGGUCAGUUCAGCAGGAA CA
mmu_miR_290	44	81,6	AAAAAGTGCCCCATAGTTTGAAAAAGTGCCCCA TAGTTTGA	UCAAAUAUGGGGGCACUU UUU
rno_miR_290	44	81,6	AAAAAGTGCCCCATAGTTTGAAAAAGTGCCCCA TAGTTTGA	UCAAAUAUGGGGGCACUU UUU
mmu_miR_291_3p	44	84	GCACACAAAGTGGAAGCACTTGCACACAAAGTGA AGCACTTT	AAAGUGCUUCCACUUUGUG UGC
rno_miR_291_3p	44	84	GCACACAAAGTGGAAGCACTTGCACACAAAGTGA AGCACTTT	AAAGUGCUUCCACUUUGUG UGC
mmu_miR_291_5p	42	82,5	AGAGAGGGCCTCCACTTTGATAGAGAGGGCCTCCAC TTTGAT	AUCAAAUGGAGGCCUCU CU
rno_miR_291_5p	42	82,5	AGAGAGGGCCTCCACTTTGATAGAGAGGGCCTCCAC TTTGAT	AUCAAAUGGAGGCCUCU CU
mmu_miR_292_3p	44	87,5	ACACTCAAACCTGGCGGCACTACACTCAAACCTG GCGGCACT	AGUGCCGCCAGUUUUGAG UGU
rno_miR_292_3p	44	87,5	ACACTCAAACCTGGCGGCACTACACTCAAACCTG GCGGCACT	AGUGCCGCCAGUUUUGAG UGU
mmu_miR_292_5p	42	85,2	CAAAAGAGCCCCAGTTTGAGCAAAGAGCCCCA GTTTGAG	CUCAAAUGGGGGCUCUUU UG
rno_miR_292_5p	42	85,2	CAAAAGAGCCCCAGTTTGAGCAAAGAGCCCCA GTTTGAG	CUCAAAUGGGGGCUCUUU UG
mmu_miR_298	38	82,9	GGAAGAACAGCCCTCTCTGGAAGAACAGCCCTCC TCT	AGAGGAGGGCUGUUCUUC C
rno_miR_298	38	82,9	GGAAGAACAGCCCTCTCTGGAAGAACAGCCCTCC TCT	AGAGGAGGGCUGUUCUUC C
mmu_miR_299	44	82,3	ATGTATGTGGGACGGTAAACCAATGTATGTGGGACGG TAAACCA	UGGUUUACCGUCCCAUA CAU
rno_miR_299	44	82,3	ATGTATGTGGGACGGTAAACCAATGTATGTGGGACGG TAAACCA	UGGUUUACCGUCCCAUA CAU
mmu_miR_300	42	85,4	GAAGAGAGCTTGCCCTTGATGAAGAGAGCTTGCCC TTGCAT	AUGCAAGGGCAAGCUCUCU UC
rno_miR_300	42	85,4	GAAGAGAGCTTGCCCTTGATGAAGAGAGCTTGCCC TTGCAT	AUGCAAGGGCAAGCUCUCU UC
mmu_miR_30e	40	77,7	TCCAGTCAAGGATGTTTACATCCAGTCAAGGATGTTT ACA	UGUAAACAUCUUGACUGG A
rno_miR_30e	40	77,7	TCCAGTCAAGGATGTTTACATCCAGTCAAGGATGTTT ACA	UGUAAACAUCUUGACUGG A
mmu_miR_31	42	84,1	AGCTATGCCAGCATCTTGCCCTAGCTATGCCAGCATCT TGCCT	AGGCAAGAUUGGCAUAG CU
rno_miR_31	42	84,1	AGCTATGCCAGCATCTTGCCCTAGCTATGCCAGCATCT TGCCT	AGGCAAGAUUGGCAUAG CU
mmu_miR_322	40	85,7	TGTTGCAGCGCTTCATGTTTTGTTGCAGCGCTTCAT GTTT	AAACAUGAAGCGUGCAAC A
rno_miR_322	40	85,7	TGTTGCAGCGCTTCATGTTTTGTTGCAGCGCTTCAT GTTT	AAACAUGAAGCGUGCAAC A
mmu_miR_326	38	87,5	ACTGGAGGAAGGGCCAGAACTGGAGGAAGGGCCC AGA	UCUGGGCCUUCUCCAGU
rno_miR_326	38	87,5	ACTGGAGGAAGGGCCAGAACTGGAGGAAGGGCCC AGA	UCUGGGCCUUCUCCAGU
mmu_miR_329	44	78,6	AAAAAGGTTAGCTGGGTGTGTTAAAAAGGTTAGCTG GGTGTGTT	AACACACCAGCUAACCUU UUU
rno_miR_329	44	78,6	AAAAAGGTTAGCTGGGTGTGTTAAAAAGGTTAGCTG GGTGTGTT	AACACACCAGCUAACCUU UUU
mmu_miR_341	42	91,7	ACTGACCGACCGACCGATCGAACTGACCGACCGAC CGATCGA	UCGAUCGGUCGGUCGGUCA GU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_341	42	91,7	ACTGACCGACCGACCGATCGAACTGACCGACCGAC CGATCGA	UCGAUCGGUCGGUCGGUCA GU
mmu_miR_345	38	82,7	ACTGGACTAGGGGTGAGCAACTGGACTAGGGGTGAG CA	UGCUGACCCCUAGUCCAGU
rno_miR_345	38	82,7	ACTGGACTAGGGGTGAGCAACTGGACTAGGGGTGAG CA	UGCUGACCCCUAGUCCAGU
mmu_miR_351	38	85,4	AGGCTCAAAGGGCTCCTCAAGGCTCAAAGGGCTCC TCA	UGAGGAGCCCUUUGAGCCU
rno_miR_351	38	85,4	AGGCTCAAAGGGCTCCTCAAGGCTCAAAGGGCTCC TCA	UGAGGAGCCCUUUGAGCCU
mmu_miR_424	44	84,6	TCCAAAACATGAATTGCTGCTGTCCAAAACATGAATT GCTGCTG	CAGCAGCAAUUAUGUUUU GGA
rno_miR_424	44	84,6	TCCAAAACATGAATTGCTGCTGTCCAAAACATGAATT GCTGCTG	CAGCAGCAAUUAUGUUUU GGA
mmu_miR_429	44	77,3	ACGGCATTACCAGACAGTATTAACGGCATTACCAGAC AGTATTA	UAAUACUGUCUGGUAUUGC CGU
rno_miR_429	44	77,3	ACGGCATTACCAGACAGTATTAACGGCATTACCAGAC AGTATTA	UAAUACUGUCUGGUAUUGC CGU
mmu_miR_451	44	74,5	AACTCAGTAATGGTAACGGTTTAACTCAGTAATGGTA ACGGTTT	AAACCGUUACCAUACUGA GUU
rno_miR_451	44	74,5	AACTCAGTAATGGTAACGGTTTAACTCAGTAATGGTA ACGGTTT	AAACCGUUACCAUACUGA GUU
mmu_miR_96	44	82,5	AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAAAGCAAAAATGTGCT AGTGCCAA	UUGGCACUAGCACAUUUUU GCU
rno_miR_96	44	82,5	AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAAAGCAAAAATGTGCT AGTGCCAA	UUGGCACUAGCACAUUUUU GCU
Sondy wspólne dla ludzkich, mysich i szczurzych miRNA				
hsa_let_7b	44	78,3	AACCACACAACCTACTACCTCAAACCACACAACCTAC TACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUGUG GUU
mmu_let_7b	44	78,3	AACCACACAACCTACTACCTCAAACCACACAACCTAC TACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUGUG GUU
rno_let_7b	44	78,3	AACCACACAACCTACTACCTCAAACCACACAACCTAC TACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUGUG GUU
hsa_let_7c	44	74,5	AACCATACAACCTACTACCTCAAACCATACAACCTAC TACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUAUG GUU
mmu_let_7c	44	74,5	AACCATACAACCTACTACCTCAAACCATACAACCTAC TACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUAUG GUU
rno_let_7c	44	74,5	AACCATACAACCTACTACCTCAAACCATACAACCTAC TACCTCA	UGAGGUAGUAGGUUGUAUG GUU
hsa_let_7d	42	71,4	ACTATGCAACCTACTACCTCTACTATGCAACCTACTAC CTCT	AGAGGUAGUAGGUUGCAUA GU
mmu_let_7d	42	71,4	ACTATGCAACCTACTACCTCTACTATGCAACCTACTAC CTCT	AGAGGUAGUAGGUUGCAUA GU
rno_let_7d	42	71,4	ACTATGCAACCTACTACCTCTACTATGCAACCTACTAC CTCT	AGAGGUAGUAGGUUGCAUA GU
hsa_let_7e	42	72,9	ACTATACAACCTCTACCTCAACTATACAACCTCTAC CTCA	UGAGGUAGGAGGUUGUAUA GU
mmu_let_7e	42	72,9	ACTATACAACCTCTACCTCAACTATACAACCTCTAC CTCA	UGAGGUAGGAGGUUGUAUA GU
rno_let_7e	42	72,9	ACTATACAACCTCTACCTCAACTATACAACCTCTAC CTCA	UGAGGUAGGAGGUUGUAUA GU
hsa_let_7i	42	75,8	ACAGCACAACTACTACCTCAACAGCACAACTACTA CCTCA	UGAGGUAGUAGUUUGUGCU GU
mmu_let_7i	42	75,8	ACAGCACAACTACTACCTCAACAGCACAACTACTA CCTCA	UGAGGUAGUAGUUUGUGCU GU
rno_let_7i	42	75,8	ACAGCACAACTACTACCTCAACAGCACAACTACTA CCTCA	UGAGGUAGUAGUUUGUGCU GU
hsa_miR_100	42	83,6	CACAAGTTCGGATCTACGGGTCACAAGTTCGGATCT ACGGGT	ACCCGUAGAUCCGAACUUG UG
mmu_miR_100	42	83,6	CACAAGTTCGGATCTACGGGTCACAAGTTCGGATCT ACGGGT	ACCCGUAGAUCCGAACUUG UG
rno_miR_100	42	83,6	CACAAGTTCGGATCTACGGGTCACAAGTTCGGATCT ACGGGT	ACCCGUAGAUCCGAACUUG UG
hsa_miR_101	44	70	CTTCAGTTATCACAGTACTGTACTTCAGTTATCACAGT ACTGTA	UACAGUACUGUGUAUACUG AAG
mmu_miR_101a	44	70	CTTCAGTTATCACAGTACTGTACTTCAGTTATCACAGT ACTGTA	UACAGUACUGUGUAUACUG AAG
rno_miR_101	44	70	CTTCAGTTATCACAGTACTGTACTTCAGTTATCACAGT ACTGTA	UACAGUACUGUGUAUACUG AAG

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_103	42	81,1	TCATAGCCCTGTACAATGCTGTCATAGCCCTGTACAA TGCTG	CAGCAUUGUACAGGGCUAU GA
mmu_miR_103	42	81,1	TCATAGCCCTGTACAATGCTGTCATAGCCCTGTACAA TGCTG	CAGCAUUGUACAGGGCUAU GA
rno_miR_103	42	81,1	TCATAGCCCTGTACAATGCTGTCATAGCCCTGTACAA TGCTG	CAGCAUUGUACAGGGCUAU GA
hsa_miR_106b	42	79,5	ATCTGCACTGTCAGCACTTTAATCTGCACTGTCAGCA CTTTA	UAAAGUGCUGACAGUGCAG AU
mmu_miR_106b	42	79,5	ATCTGCACTGTCAGCACTTTAATCTGCACTGTCAGCA CTTTA	UAAAGUGCUGACAGUGCAG AU
rno_miR_106b	42	79,5	ATCTGCACTGTCAGCACTTTAATCTGCACTGTCAGCA CTTTA	UAAAGUGCUGACAGUGCAG AU
hsa_miR_107	42	81,1	TGATAGCCCTGTACAATGCTGTGATAGCCCTGTACAA TGCTG	CAGCAUUGUACAGGGCUAU CA
mmu_miR_107	42	81,1	TGATAGCCCTGTACAATGCTGTGATAGCCCTGTACAA TGCTG	CAGCAUUGUACAGGGCUAU CA
rno_miR_107	42	81,1	TGATAGCCCTGTACAATGCTGTGATAGCCCTGTACAA TGCTG	CAGCAUUGUACAGGGCUAU CA
hsa_miR_10a	44	81,7	CACAAATTCGGATCTACAGGGTCACAAATTCGGATCT ACAGGGT	ACCCUGUAGAUCCGAAUUU GUG
mmu_miR_10a	44	81,7	CACAAATTCGGATCTACAGGGTCACAAATTCGGATCT ACAGGGT	ACCCUGUAGAUCCGAAUUU GUG
rno_miR_10a	44	81,7	CACAAATTCGGATCTACAGGGTCACAAATTCGGATCT ACAGGGT	ACCCUGUAGAUCCGAAUUU GUG
hsa_miR_122a	44	83,8	ACAAACACCATTGTCACACTCCACAAACACCATTGT CACACTCC	GGAGUGUGACAAUGGUGUU UGU
mmu_miR_122a	44	83,8	ACAAACACCATTGTCACACTCCACAAACACCATTGT CACACTCC	GGAGUGUGACAAUGGUGUU UGU
rno_miR_122a	44	83,8	ACAAACACCATTGTCACACTCCACAAACACCATTGT CACACTCC	GGAGUGUGACAAUGGUGUU UGU
hsa_miR_125a	42	81,8	CACAGGTTAAAGGGTCTCAGGCACAGGTTAAAGGGT CTCAGG	CCUGAGACCCUUUAACCG UG
mmu_miR_125a	42	81,8	CACAGGTTAAAGGGTCTCAGGCACAGGTTAAAGGGT CTCAGG	CCUGAGACCCUUUAACCG UG
rno_miR_125a	42	81,8	CACAGGTTAAAGGGTCTCAGGCACAGGTTAAAGGGT CTCAGG	CCUGAGACCCUUUAACCG UG
hsa_miR_126	42	77,1	GCATTATTACTCACGGTACGAGCATTATTACTCACGGT ACGA	UCGUACCGUGAGUAAUAAU GC
mmu_miR_126_3p	42	77,1	GCATTATTACTCACGGTACGAGCATTATTACTCACGGT ACGA	UCGUACCGUGAGUAAUAAU GC
rno_miR_126	42	77,1	GCATTATTACTCACGGTACGAGCATTATTACTCACGGT ACGA	UCGUACCGUGAGUAAUAAU GC
hsa_miR_126*	42	76,7	TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGTCACAAGTTAGGGTC TCAGGG	CCCUGAGACCCUAACUUGU GA
mmu_miR_125b	42	76,7	TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGTCACAAGTTAGGGTC TCAGGG	CCCUGAGACCCUAACUUGU GA
rno_miR_125b	42	76,7	TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGTCACAAGTTAGGGTC TCAGGG	CCCUGAGACCCUAACUUGU GA
hsa_miR_128a	44	82,8	CGCGTACCAAAAAGTAATAATGCGCGTACCAAAAAGTAA TAATG	CAUUUUUACUUUUGGUACG CG
mmu_miR_126_5p	44	82,8	CGCGTACCAAAAAGTAATAATGCGCGTACCAAAAAGTAA TAATG	CAUUUUUACUUUUGGUACG CG
rno_miR_126*	44	82,8	CGCGTACCAAAAAGTAATAATGCGCGTACCAAAAAGTAA TAATG	CAUUUUUACUUUUGGUACG CG
hsa_miR_128b	42	83,8	GAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAAGAGACCGGTT CACTGTG	CACAGUGAACCGGUCUCUU UC
mmu_miR_128b	42	83,8	GAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAAGAGACCGGTT CACTGTG	CACAGUGAACCGGUCUCUU UC
rno_miR_128b	42	83,8	GAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAAGAGACCGGTT CACTGTG	CACAGUGAACCGGUCUCUU UC
hsa_miR_129	40	88,7	AAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAAGAGACCGGTT CACTGTGA	UCACAGUGAACCGGUCUCU UUU
mmu_miR_128a	40	88,7	AAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAAGAGACCGGTT CACTGTGA	UCACAGUGAACCGGUCUCU UUU
rno_miR_128a	40	88,7	AAAAGAGACCGGTTCACTGTGAAAAGAGACCGGTT CACTGTGA	UCACAGUGAACCGGUCUCU UUU
hsa_miR_130a	44	82	ATGCCCTTTTAACATTGCACTGATGCCCTTTTAACATT GCACTG	CAGUGCAAUGUUAAAAGGG CAU
mmu_miR_130a	44	82	ATGCCCTTTTAACATTGCACTGATGCCCTTTTAACATT GCACTG	CAGUGCAAUGUUAAAAGGG CAU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_130a	44	82	ATGCCCTTTTAACATTGCACTGATGCCCTTTTAACATT GCACTG	CAGUGCAAUGUAAAAGGG CAU
hsa_miR_132	42	83,4	CGACCATGGCTGTAGACTGTTGACCATGGCTGTAG ACTGTT	AACAGUCUACAGCCAUGGU CG
mmu_miR_132	42	83,4	CGACCATGGCTGTAGACTGTTGACCATGGCTGTAG ACTGTT	AACAGUCUACAGCCAUGGU CG
rno_miR_134	42	83,4	CGACCATGGCTGTAGACTGTTGACCATGGCTGTAG ACTGTT	AACAGUCUACAGCCAUGGU CG
hsa_miR_133a	44	88,1	ATGCCCTTTCATCATTGCACTGATGCCCTTTCATCAT TGCCTG	CAGUGCAAUGAUGAAAGGG CAU
mmu_miR_130b	44	88,1	ATGCCCTTTCATCATTGCACTGATGCCCTTTCATCAT TGCCTG	CAGUGCAAUGAUGAAAGGG CAU
rno_miR_130b	44	88,1	ATGCCCTTTCATCATTGCACTGATGCCCTTTCATCAT TGCCTG	CAGUGCAAUGAUGAAAGGG CAU
hsa_miR_134	44	84,9	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAACAGCTGGTTGAA GGGGACCAA	UUGGUCCCCUUAACCAGC UGU
mmu_miR_133a	44	84,9	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAACAGCTGGTTGAA GGGGACCAA	UUGGUCCCCUUAACCAGC UGU
rno_miR_133a	44	84,9	ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAACAGCTGGTTGAA GGGGACCAA	UUGGUCCCCUUAACCAGC UGU
hsa_miR_135a	44	75,8	TCACATAGGAATAAAAAGCCATTACATAGGAATAAAA AGCCAT	AUGGCUUUUUUAUCCUAUG UGA
mmu_miR_135a	44	75,8	TCACATAGGAATAAAAAGCCATTACATAGGAATAAAA AGCCAT	AUGGCUUUUUUAUCCUAUG UGA
rno_miR_135a	44	75,8	TCACATAGGAATAAAAAGCCATTACATAGGAATAAAA AGCCAT	AUGGCUUUUUUAUCCUAUG UGA
hsa_miR_135b	40	77,5	CCTCTGGTCAACCAGTCACACCTCTGGTCAACCAGT CACA	UGUGACUGGUUGACCAGAG G
mmu_miR_134	40	77,5	CCTCTGGTCAACCAGTCACACCTCTGGTCAACCAGT CACA	UGUGACUGGUUGACCAGAG G
rno_miR_132	40	77,5	CCTCTGGTCAACCAGTCACACCTCTGGTCAACCAGT CACA	UGUGACUGGUUGACCAGAG G
hsa_miR_137	44	74	CACATAGGAATGAAAAGCCATACACATAGGAATGAAA AGCCATA	UAUGGCUUUUUAUCCUAU GUG
mmu_miR_135b	44	74	CACATAGGAATGAAAAGCCATACACATAGGAATGAAA AGCCATA	UAUGGCUUUUUAUCCUAU GUG
rno_miR_135b	44	74	CACATAGGAATGAAAAGCCATACACATAGGAATGAAA AGCCATA	UAUGGCUUUUUAUCCUAU GUG
hsa_miR_139	36	78,2	AGACACGTGCACTGTAGAAGACACGTGCACTGTAGA G	UCUACAGUGCACGUGUCU
mmu_miR_139	36	78,2	AGACACGTGCACTGTAGAAGACACGTGCACTGTAGA G	UCUACAGUGCACGUGUCU
rno_miR_139	36	78,2	AGACACGTGCACTGTAGAAGACACGTGCACTGTAGA G	UCUACAGUGCACGUGUCU
hsa_miR_143	44	81,3	TGAGCTACAGTGCTTCATCTCATGAGCTACAGTGCTT CATCTCA	UGAGAUGAAGCACUGUAGC UCA
mmu_miR_143	44	81,3	TGAGCTACAGTGCTTCATCTCATGAGCTACAGTGCTT CATCTCA	UGAGAUGAAGCACUGUAGC UCA
rno_miR_143	44	81,3	TGAGCTACAGTGCTTCATCTCATGAGCTACAGTGCTT CATCTCA	UGAGAUGAAGCACUGUAGC UCA
hsa_miR_144	44	63,7	CTAGTACATCATCTATACTGTACTAGTACATCATCTATA CTGTA	UACAGUAUAGAUGAUGUAC UAG
mmu_miR_144	44	63,7	CTAGTACATCATCTATACTGTACTAGTACATCATCTATA CTGTA	UACAGUAUAGAUGAUGUAC UAG
rno_miR_144	44	63,7	CTAGTACATCATCTATACTGTACTAGTACATCATCTATA CTGTA	UACAGUAUAGAUGAUGUAC UAG
hsa_miR_145	42	82,8	AAGGGATTCTGGGAAAACGAAGGGATTCTGGGA AAACTG	CAGUUUCCAGGAAUCCC UU
mmu_miR_145	42	82,8	AAGGGATTCTGGGAAAACGAAGGGATTCTGGGA AAACTG	CAGUUUCCAGGAAUCCC UU
rno_miR_145	42	82,8	AAGGGATTCTGGGAAAACGAAGGGATTCTGGGA AAACTG	CAGUUUCCAGGAAUCCC UU
hsa_miR_146a	44	82,3	AACCCATGGAATTCAGTTCTCAAACCCATGGAATTCA GTTCTCA	UGAGAACUGAAUCCAUGG GUU
mmu_miR_146	44	82,3	AACCCATGGAATTCAGTTCTCAAACCCATGGAATTCA GTTCTCA	UGAGAACUGAAUCCAUGG GUU
rno_miR_146	44	82,3	AACCCATGGAATTCAGTTCTCAAACCCATGGAATTCA GTTCTCA	UGAGAACUGAAUCCAUGG GUU
hsa_miR_148b	44	81,6	ACAAAGTTCTGTGATGCACTGAACAAAGTTCTGTGAT GCACTGA	UCAGUGCAUCACAGAACUU UGU
mmu_miR_148b	44	81,6	ACAAAGTTCTGTGATGCACTGAACAAAGTTCTGTGAT GCACTGA	UCAGUGCAUCACAGAACUU UGU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_148b	44	81,6	ACAAAGTTCTGTGATGCACTGAACAAAGTTCTGTGATGCACTGA	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
hsa_miR_150	42	82,8	ACTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGTGGTACAAGGGTTGGGAGA	UCUCCCAACCCUUGUACCA GU
mmu_miR_150	42	82,8	ACTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGTGGTACAAGGGTTGGGAGA	UCUCCCAACCCUUGUACCA GU
rno_miR_150	42	82,8	ACTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGTGGTACAAGGGTTGGGAGA	UCUCCCAACCCUUGUACCA GU
hsa_miR_152	42	86,3	CCCAAGTTCTGTCATGCACTGCCAAGTTCTGTCATGCACTG	CAGUGCAUGACAGAACUUG GG
mmu_miR_152	42	86,3	CCCAAGTTCTGTCATGCACTGCCAAGTTCTGTCATGCACTG	CAGUGCAUGACAGAACUUG GG
rno_miR_152	42	86,3	CCCAAGTTCTGTCATGCACTGCCAAGTTCTGTCATGCACTG	CAGUGCAUGACAGAACUUG GG
hsa_miR_154	42	84,9	CGAAGGCAACACGGATAACCTCGAAGGCAACACGGATAACCT	AGGUUAUCCGUGUUGCCUU CG
mmu_miR_154	42	84,9	CGAAGGCAACACGGATAACCTCGAAGGCAACACGGATAACCT	AGGUUAUCCGUGUUGCCUU CG
rno_miR_154	42	84,9	CGAAGGCAACACGGATAACCTCGAAGGCAACACGGATAACCT	AGGUUAUCCGUGUUGCCUU CG
hsa_miR_16	44	81,9	CGCCAATATTTACGTGCTGCTACGCCAATATTTACGTGCTGCTA	UAGCAGCACGUAAAAUUG GCG
mmu_miR_16	44	81,9	CGCCAATATTTACGTGCTGCTACGCCAATATTTACGTGCTGCTA	UAGCAGCACGUAAAAUUG GCG
rno_miR_16	44	81,9	CGCCAATATTTACGTGCTGCTACGCCAATATTTACGTGCTGCTA	UAGCAGCACGUAAAAUUG GCG
hsa_miR_17_3p	40	82	TGTAACCATGATGTGCTGCTATGTAACCATGATGTGCTGCTA	UAGCAGCACAUCAUGGUUU ACA
mmu_miR_15b	40	82	TGTAACCATGATGTGCTGCTATGTAACCATGATGTGCTGCTA	UAGCAGCACAUCAUGGUUU ACA
rno_miR_15b	40	82	TGTAACCATGATGTGCTGCTATGTAACCATGATGTGCTGCTA	UAGCAGCACAUCAUGGUUU ACA
hsa_miR_17_5p	44	76,8	ACTACCTGCACTGTAAGCACTTACTACCTGCACTGTAAGCACTT	AAGUGCUUACAGUGCAGGU AGU
mmu_miR_17_5p	44	76,8	ACTACCTGCACTGTAAGCACTTACTACCTGCACTGTAAGCACTT	AAGUGCUUACAGUGCAGGU AGU
rno_miR_17	44	76,8	ACTACCTGCACTGTAAGCACTTACTACCTGCACTGTAAGCACTT	AAGUGCUUACAGUGCAGGU AGU
hsa_miR_181b	42	88,2	CCCACCGACAGCAATGAATGTCCCACCGACAGCAATGAATGT	ACAUUCAUUGCUGUCGGUG GG
mmu_miR_181b	42	88,2	CCCACCGACAGCAATGAATGTCCCACCGACAGCAATGAATGT	ACAUUCAUUGCUGUCGGUG GG
rno_miR_181b	42	88,2	CCCACCGACAGCAATGAATGTCCCACCGACAGCAATGAATGT	ACAUUCAUUGCUGUCGGUG GG
hsa_miR_181c	44	82,3	ACTCACCGACAGCGTTGAATGACTCACCGACAGCGTTGAATG	CAUUCAACGCUGUCGGUGA GU
mmu_miR_181a	44	82,3	ACTCACCGACAGCGTTGAATGACTCACCGACAGCGTTGAATG	CAUUCAACGCUGUCGGUGA GU
rno_miR_181a	44	82,3	ACTCACCGACAGCGTTGAATGACTCACCGACAGCGTTGAATG	CAUUCAACGCUGUCGGUGA GU
hsa_miR_183	44	82,3	CAGTGAATTCTACCAGTGCCATCAGTGAATTCTACCATGTGCCAT	AUGGCACUGGUAGAAUUCA CUG
mmu_miR_183	44	82,3	CAGTGAATTCTACCAGTGCCATCAGTGAATTCTACCATGTGCCAT	AUGGCACUGGUAGAAUUCA CUG
rno_miR_183	44	82,3	CAGTGAATTCTACCAGTGCCATCAGTGAATTCTACCATGTGCCAT	AUGGCACUGGUAGAAUUCA CUG
hsa_miR_184	42	82	ACCCTTATCAGTTCTCCGTCCACCCTTATCAGTTCTCCGTCC	GGACGGAGAACUGAUAAGG GU
mmu_miR_184	42	82	ACCCTTATCAGTTCTCCGTCCACCCTTATCAGTTCTCCGTCC	GGACGGAGAACUGAUAAGG GU
rno_miR_184	42	82	ACCCTTATCAGTTCTCCGTCCACCCTTATCAGTTCTCCGTCC	GGACGGAGAACUGAUAAGG GU
hsa_miR_185	36	79,1	GAACTGCCTTTCTCTCCAGAACTGCCTTTCTCTCCAAGCTTT	CUGGAGAGAAAGGCAGUU
mmu_miR_185	36	79,1	GAACTGCCTTTCTCTCCAGAACTGCCTTTCTCTCCAAGCTTT	CUGGAGAGAAAGGCAGUU
rno_miR_185	36	79,1	GAACTGCCTTTCTCTCCAGAACTGCCTTTCTCTCCAAGCTTT	CUGGAGAGAAAGGCAGUU
hsa_miR_186	44	81	AGCCAAAAGGAGAATTCTTTGAGCCAAAAGGAGAATTCTTTG	CAAAGAAUUCUUUUUGG GCU
mmu_miR_186	44	81	AGCCAAAAGGAGAATTCTTTGAGCCAAAAGGAGAATTCTTTG	CAAAGAAUUCUUUUUGG GCU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_186	44	81	AGCCCAAAAGGAGAATTCTTTGAGCCCAAAAGGAGA ATTCTTTG	CAAAGAAUUCUCCUUUUGG GCU
hsa_miR_187	40	87,6	GGCTGCAACACAAGACACGAGGCTGCAACACAAGA CACGA	UCGUGUCUUGUGUUGCAGC C
mmu_miR_187	40	87,6	GGCTGCAACACAAGACACGAGGCTGCAACACAAGA CACGA	UCGUGUCUUGUGUUGCAGC C
rno_miR_187	40	87,6	GGCTGCAACACAAGACACGAGGCTGCAACACAAGA CACGA	UCGUGUCUUGUGUUGCAGC C
hsa_miR_18a	44	76,5	TATCTGCACTAGATGCACCTTATATCTGCACTAGATGC ACCTTA	UAAGGUGCAUCUAGUGCAG AUA
mmu_miR_18	44	76,5	TATCTGCACTAGATGCACCTTATATCTGCACTAGATGC ACCTTA	UAAGGUGCAUCUAGUGCAG AUA
rno_miR_18	44	76,5	TATCTGCACTAGATGCACCTTATATCTGCACTAGATGC ACCTTA	UAAGGUGCAUCUAGUGCAG AUA
hsa_miR_190	44	67,2	ACCTAATATATCAAACATATCAACCTAATATATCAAACA TATCA	UGAUUUGUUUGAUUAUUA GGU
mmu_miR_190	44	67,2	ACCTAATATATCAAACATATCAACCTAATATATCAAACA TATCA	UGAUUUGUUUGAUUAUUA GGU
rno_miR_190	44	67,2	ACCTAATATATCAAACATATCAACCTAATATATCAAACA TATCA	UGAUUUGUUUGAUUAUUA GGU
hsa_miR_191	42	84	AGCTGCTTTGGGATTCCGTTAGCTGCTTTGGGATT CCGTT	AACGGAAUCCCAAAAGCAG CU
mmu_miR_191	42	84	AGCTGCTTTGGGATTCCGTTAGCTGCTTTGGGATT CCGTT	AACGGAAUCCCAAAAGCAG CU
rno_miR_191	42	84	AGCTGCTTTGGGATTCCGTTAGCTGCTTTGGGATT CCGTT	AACGGAAUCCCAAAAGCAG CU
hsa_miR_193a	42	82,4	CTGGGACTTTGTAGGCCAGTTCTGGGACTTTGTAGG CCAGTT	AACUGGCCUACAAAGUCCC AG
mmu_miR_193	42	82,4	CTGGGACTTTGTAGGCCAGTTCTGGGACTTTGTAGG CCAGTT	AACUGGCCUACAAAGUCCC AG
rno_miR_193	42	82,4	CTGGGACTTTGTAGGCCAGTTCTGGGACTTTGTAGG CCAGTT	AACUGGCCUACAAAGUCCC AG
hsa_miR_194	44	83,6	TCCACATGGAGTTGCTGTTACATCCACATGGAGTTGC TGTTACA	UGUACAGCAACUCCAUGU GGA
mmu_miR_194	44	83,6	TCCACATGGAGTTGCTGTTACATCCACATGGAGTTGC TGTTACA	UGUACAGCAACUCCAUGU GGA
rno_miR_194	44	83,6	TCCACATGGAGTTGCTGTTACATCCACATGGAGTTGC TGTTACA	UGUACAGCAACUCCAUGU GGA
hsa_miR_195	42	79,4	GCCAATATTTCTGTGCTGCTAGCCAATATTTCTGTGC TGCTA	UAGCAGCACAGAAUUAUUG GC
mmu_miR_195	42	79,4	GCCAATATTTCTGTGCTGCTAGCCAATATTTCTGTGC TGCTA	UAGCAGCACAGAAUUAUUG GC
rno_miR_195	42	79,4	GCCAATATTTCTGTGCTGCTAGCCAATATTTCTGTGC TGCTA	UAGCAGCACAGAAUUAUUG GC
hsa_miR_196a	42	75,2	CCAACAACATGAAACTACCTACCAACAACATGAAACT ACCTA	UAGGUAGUUUCAUGUUGUU GG
mmu_miR_196a	42	75,2	CCAACAACATGAAACTACCTACCAACAACATGAAACT ACCTA	UAGGUAGUUUCAUGUUGUU GG
rno_miR_196a	42	75,2	CCAACAACATGAAACTACCTACCAACAACATGAAACT ACCTA	UAGGUAGUUUCAUGUUGUU GG
hsa_miR_196b	42	76,3	CCAACAACAGGAAACTACCTACCAACAACAGGAAAC TACCTA	UAGGUAGUUUCCUGUUGUU GG
mmu_miR_196b	42	76,3	CCAACAACAGGAAACTACCTACCAACAACAGGAAAC TACCTA	UAGGUAGUUUCCUGUUGUU GG
rno_miR_196b	42	76,3	CCAACAACAGGAAACTACCTACCAACAACAGGAAAC TACCTA	UAGGUAGUUUCCUGUUGUU GG
hsa_miR_199a	42	77,6	GAACAGGTAGTCTGAACACTGGAACAGGTAGTCTGA ACACTG	CAGUGUUCAGACUACCUGU UC
mmu_miR_199a	42	77,6	GAACAGGTAGTCTGAACACTGGAACAGGTAGTCTGA ACACTG	CAGUGUUCAGACUACCUGU UC
rno_miR_199a	42	77,6	GAACAGGTAGTCTGAACACTGGAACAGGTAGTCTGA ACACTG	CAGUGUUCAGACUACCUGU UC
hsa_miR_19a	44	79,3	TCAGTTTTGCATAGATTTGCACTCAGTTTTGCATAGAT TTGCAC	GUGCAAUUCUAUGCAAAC UGA
mmu_miR_19a	44	79,3	TCAGTTTTGCATAGATTTGCACTCAGTTTTGCATAGAT TTGCAC	GUGCAAUUCUAUGCAAAC UGA
rno_miR_19a	44	79,3	TCAGTTTTGCATAGATTTGCACTCAGTTTTGCATAGAT TTGCAC	GUGCAAUUCUAUGCAAAC UGA
hsa_miR_19b	44	84,6	TCAGTTTTGCATGGATTTGCACTCAGTTTTGCATGGA TTTGCAC	GUGCAAUCCUAGCAAAC UGA

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
mmu_miR_19b	44	84,6	TCAGTTTTGCATGGATTGCACTCAGTTTTGCATGGA TTTGCAC	GUGCAAUCCAUGCAAAAC UGA
rno_miR_19b	44	84,6	TCAGTTTTGCATGGATTGCACTCAGTTTTGCATGGA TTTGCAC	GUGCAAUCCAUGCAAAAC UGA
hsa_miR_200a	44	77,3	ACATCGTTACCAGACAGTGTTAACATCGTTACCAGAC AGTGTTA	UAACACUGUCUGGUAACGA UGU
mmu_miR_200a	44	77,3	ACATCGTTACCAGACAGTGTTAACATCGTTACCAGAC AGTGTTA	UAACACUGUCUGGUAACGA UGU
rno_miR_200a	44	77,3	ACATCGTTACCAGACAGTGTTAACATCGTTACCAGAC AGTGTTA	UAACACUGUCUGGUAACGA UGU
hsa_miR_200b	44	78,1	GTCATCATTACCAGGCAGTATTGTCATCATTACCAGG CAGTATT	AAUACUGCCUGGUAUUGAU GAC
mmu_miR_200b	44	78,1	GTCATCATTACCAGGCAGTATTGTCATCATTACCAGG CAGTATT	AAUACUGCCUGGUAUUGAU GAC
rno_miR_200b	44	78,1	GTCATCATTACCAGGCAGTATTGTCATCATTACCAGG CAGTATT	AAUACUGCCUGGUAUUGAU GAC
hsa_miR_200c	44	80,8	CCATCATTACCCGGCAGTATTACCATCATTACCCGGC AGTATTA	UAAUACUGCCGGGUAUUGA UGG
mmu_miR_200c	44	80,8	CCATCATTACCCGGCAGTATTACCATCATTACCCGGC AGTATTA	UAAUACUGCCGGGUAUUGA UGG
rno_miR_200c	44	80,8	CCATCATTACCCGGCAGTATTACCATCATTACCCGGC AGTATTA	UAAUACUGCCGGGUAUUGA UGG
hsa_miR_204	44	82,5	AGGCATAGGATGACAAAGGGAAAGGCATAGGATGAC AAAGGGAA	UUCCUUUGUCAUCCUAUG CCU
mmu_miR_204	44	82,5	AGGCATAGGATGACAAAGGGAAAGGCATAGGATGAC AAAGGGAA	UUCCUUUGUCAUCCUAUG CCU
rno_miR_204	44	82,5	AGGCATAGGATGACAAAGGGAAAGGCATAGGATGAC AAAGGGAA	UUCCUUUGUCAUCCUAUG CCU
hsa_miR_205	42	85,3	AGACTCCGGTGAATGAAGGAAGACTCCGGTGAAT GAAGGA	UUCCUUAUCCACCGGAG UC
mmu_miR_205	42	85,3	AGACTCCGGTGAATGAAGGAAGACTCCGGTGAAT GAAGGA	UUCCUUAUCCACCGGAG UC
rno_miR_205	42	85,3	AGACTCCGGTGAATGAAGGAAGACTCCGGTGAAT GAAGGA	UUCCUUAUCCACCGGAG UC
hsa_miR_206	44	81,8	CCACACACTTCCTTACATTCCACCACACACTTCCTTA CATTCCA	UGGAAUGUAAGGAAGUGUG UGG
mmu_miR_206	44	81,8	CCACACACTTCCTTACATTCCACCACACACTTCCTTA CATTCCA	UGGAAUGUAAGGAAGUGUG UGG
rno_miR_206	44	81,8	CCACACACTTCCTTACATTCCACCACACACTTCCTTA CATTCCA	UGGAAUGUAAGGAAGUGUG UGG
hsa_miR_208	44	76,9	ACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATACAAGCTTTTTGCTC GTCTTAT	AUAAGACGAGCAAAAAGCU UGU
mmu_miR_208	44	76,9	ACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATACAAGCTTTTTGCTC GTCTTAT	AUAAGACGAGCAAAAAGCU UGU
rno_miR_208	44	76,9	ACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATACAAGCTTTTTGCTC GTCTTAT	AUAAGACGAGCAAAAAGCU UGU
hsa_miR_20a	44	74,4	CTACCTGCACTATAAGCACTTTCTACCTGCACTATAAG CACTTT	AAAGUGCUGUAUAGUGCAGG UAG
mmu_miR_20	44	74,4	CTACCTGCACTATAAGCACTTTCTACCTGCACTATAAG CACTTT	AAAGUGCUGUAUAGUGCAGG UAG
rno_miR_20	44	74,4	CTACCTGCACTATAAGCACTTTCTACCTGCACTATAAG CACTTT	AAAGUGCUGUAUAGUGCAGG UAG
hsa_miR_21	44	74,9	TCAACATCAGTCTGATAAGCTATCAACATCAGTCTGA TAAGCTA	UAGCUUAUCAGACUGAUGU UGA
mmu_miR_21	44	74,9	TCAACATCAGTCTGATAAGCTATCAACATCAGTCTGA TAAGCTA	UAGCUUAUCAGACUGAUGU UGA
rno_miR_21	44	74,9	TCAACATCAGTCTGATAAGCTATCAACATCAGTCTGA TAAGCTA	UAGCUUAUCAGACUGAUGU UGA
hsa_miR_210	42	94,9	TCAGCCGCTGTACACGCACATCAGCCGCTGTCAC ACGCACA	UGUGCGUGGACAGCGGCU GA
mmu_miR_210	42	94,9	TCAGCCGCTGTACACGCACATCAGCCGCTGTCAC ACGCACA	UGUGCGUGGACAGCGGCU GA
rno_miR_210	42	94,9	TCAGCCGCTGTACACGCACATCAGCCGCTGTCAC ACGCACA	UGUGCGUGGACAGCGGCU GA
hsa_miR_212	40	82,8	GCCGTGACTGGAGACTGTTAGCCGTGACTGGAGACT GTTA	UAACAGUCCAGUCACGG C
mmu_miR_212	40	82,8	GCCGTGACTGGAGACTGTTAGCCGTGACTGGAGACT GTTA	UAACAGUCCAGUCACGG C
rno_miR_212	40	82,8	GCCGTGACTGGAGACTGTTAGCCGTGACTGGAGACT GTTA	UAACAGUCCAGUCACGG C

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_213	42	85,5	GGTACAATCAACGGTCGATGGGGTACAATCAACGGT CGATGG	CCAUCGACCGUUGAUUGUA CC
mmu_miR_213	42	85,5	GGTACAATCAACGGTCGATGGGGTACAATCAACGGT CGATGG	CCAUCGACCGUUGAUUGUA CC
rno_miR_213	42	85,5	GGTACAATCAACGGTCGATGGGGTACAATCAACGGT CGATGG	CCAUCGACCGUUGAUUGUA CC
hsa_miR_214	40	89,8	TGCCTGTCTGTGCCTGCTGTTGCCTGTCTGTGCCTG CTGT	ACAGCAGGCACAGACAGGC A
mmu_miR_214	40	89,8	TGCCTGTCTGTGCCTGCTGTTGCCTGTCTGTGCCTG CTGT	ACAGCAGGCACAGACAGGC A
rno_miR_214	40	89,8	TGCCTGTCTGTGCCTGCTGTTGCCTGTCTGTGCCTG CTGT	ACAGCAGGCACAGACAGGC A
hsa_miR_216	42	81,9	CACAGTTGCCAGCTGAGATTACACAGTTGCCAGCTG AGATTA	UAAUCUCAGCUGGCAACUG UG
mmu_miR_216	42	81,9	CACAGTTGCCAGCTGAGATTACACAGTTGCCAGCTG AGATTA	UAAUCUCAGCUGGCAACUG UG
rno_miR_216	42	81,9	CACAGTTGCCAGCTGAGATTACACAGTTGCCAGCTG AGATTA	UAAUCUCAGCUGGCAACUG UG
hsa_miR_218	42	78,7	ACATGGTTAGATCAAGCACAAACATGGTTAGATCAAG CACAA	UUGUGCUUGAUCUAACCAU GU
mmu_miR_218	42	78,7	ACATGGTTAGATCAAGCACAAACATGGTTAGATCAAG CACAA	UUGUGCUUGAUCUAACCAU GU
rno_miR_218	42	78,7	ACATGGTTAGATCAAGCACAAACATGGTTAGATCAAG CACAA	UUGUGCUUGAUCUAACCAU GU
hsa_miR_219	42	82,5	AGAATTGCGTTTGGACAATCAAGAATTGCGTTTGGAC AATCA	UGAUUGUCCAACGCAAUU CU
mmu_miR_219	42	82,5	AGAATTGCGTTTGGACAATCAAGAATTGCGTTTGGAC AATCA	UGAUUGUCCAACGCAAUU CU
rno_miR_219	42	82,5	AGAATTGCGTTTGGACAATCAAGAATTGCGTTTGGAC AATCA	UGAUUGUCCAACGCAAUU CU
hsa_miR_221	44	80,6	ACAGTTCTTCAACTGGCAGCTTACAGTTCTTCAACTG GCAGCTT	AAGCUGCCAGUUGAAGAAC UGU
mmu_miR_221	44	80,6	ACAGTTCTTCAACTGGCAGCTTACAGTTCTTCAACTG GCAGCTT	AAGCUGCCAGUUGAAGAAC UGU
rno_miR_221	44	80,6	ACAGTTCTTCAACTGGCAGCTTACAGTTCTTCAACTG GCAGCTT	AAGCUGCCAGUUGAAGAAC UGU
hsa_miR_222	42	78,9	AGACCCAGTAGCCAGATGTAGAGACCCAGTAGCCAG ATGTAG	CUACAUCUGGCUACUGGGU CU
mmu_miR_222	42	78,9	AGACCCAGTAGCCAGATGTAGAGACCCAGTAGCCAG ATGTAG	CUACAUCUGGCUACUGGGU CU
rno_miR_222	42	78,9	AGACCCAGTAGCCAGATGTAGAGACCCAGTAGCCAG ATGTAG	CUACAUCUGGCUACUGGGU CU
hsa_miR_223	42	79,8	AAACCCAGCAGACAATGTAGCTAAACCCAGCAGACA ATGTAGCT	AGCUACAUUGUCUGCUGGG UUU
mmu_miR_223	42	79,8	AAACCCAGCAGACAATGTAGCTAAACCCAGCAGACA ATGTAGCT	AGCUACAUUGUCUGCUGGG UUU
rno_miR_223	42	79,8	AAACCCAGCAGACAATGTAGCTAAACCCAGCAGACA ATGTAGCT	AGCUACAUUGUCUGCUGGG UUU
hsa_miR_23a	42	85,8	GGGGTATTTGACAAACTGACAGGGGTATTTGACAAAC TGACA	UGUCAGUUUGUCAAAUACC CC
mmu_miR_23a	42	85,8	GGGGTATTTGACAAACTGACAGGGGTATTTGACAAAC TGACA	UGUCAGUUUGUCAAAUACC CC
rno_miR_23a	42	85,8	GGGGTATTTGACAAACTGACAGGGGTATTTGACAAAC TGACA	UGUCAGUUUGUCAAAUACC CC
hsa_miR_23b	42	83,6	GGTAATCCCTGGCAATGTGATGGTAATCCCTGGCAAT GTGAT	AUCACAUUGCCAGGGAUUA CC
mmu_miR_23b	42	83,6	GGTAATCCCTGGCAATGTGATGGTAATCCCTGGCAAT GTGAT	AUCACAUUGCCAGGGAUUA CC
rno_miR_23b	42	83,6	GGTAATCCCTGGCAATGTGATGGTAATCCCTGGCAAT GTGAT	AUCACAUUGCCAGGGAUUA CC
hsa_miR_24	42	86,9	GGAAATCCCTGGCAATGTGATGGAAATCCCTGGCAA TGTGAT	AUCACAUUGCCAGGGAUUU CC
mmu_miR_24	42	86,9	GGAAATCCCTGGCAATGTGATGGAAATCCCTGGCAA TGTGAT	AUCACAUUGCCAGGGAUUU CC
rno_miR_24	42	86,9	GGAAATCCCTGGCAATGTGATGGAAATCCCTGGCAA TGTGAT	AUCACAUUGCCAGGGAUUU CC
hsa_miR_25	42	84,1	TCAGACCGAGACAAGTGAATTCAGACCGAGACAAG TGCAAT	AUUGCACUUGUCUCGGUCU GA
mmu_miR_25	42	84,1	TCAGACCGAGACAAGTGAATTCAGACCGAGACAAG TGCAAT	AUUGCACUUGUCUCGGUCU GA

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_25	42	84,1	TCAGACCGAGACAAGTGCAATTCAGACCGAGACAAGTGCAAT	AUUGCACUUGUCUCGGUCUGA
hsa_miR_26a	42	77,2	GCCTATCCTGGATTACTTGAAGCCTATCCTGGATTACTTGAA	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC
mmu_miR_26a	42	77,2	GCCTATCCTGGATTACTTGAAGCCTATCCTGGATTACTTGAA	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC
rno_miR_26a	42	77,2	GCCTATCCTGGATTACTTGAAGCCTATCCTGGATTACTTGAA	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC
hsa_miR_26b	44	73,2	AACCTATCCTGAATTACTTGAAAACCTATCCTGAATTA	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGUU
mmu_miR_26b	44	73,2	AACCTATCCTGAATTACTTGAAAACCTATCCTGAATTA	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGUU
rno_miR_26b	44	73,2	AACCTATCCTGAATTACTTGAAAACCTATCCTGAATTA	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGUU
hsa_miR_27a	42	84,2	GCGGAACCTAGCCACTGTGAAGCGGAACTTAGCCAC	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
mmu_miR_27a	42	84,2	GCGGAACCTAGCCACTGTGAAGCGGAACTTAGCCAC	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
rno_miR_27a	42	84,2	GCGGAACCTAGCCACTGTGAAGCGGAACTTAGCCAC	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
hsa_miR_27b	42	80,7	GCAGAACTTAGCCACTGTGAAGCAGAACTTAGCCAC	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
mmu_miR_27b	42	80,7	GCAGAACTTAGCCACTGTGAAGCAGAACTTAGCCAC	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
rno_miR_27b	42	80,7	GCAGAACTTAGCCACTGTGAAGCAGAACTTAGCCAC	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
hsa_miR_28	44	77,9	CTCAATAGACTGTGAGCTCCTTCTCAATAGACTGTGAGCTCCTT	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG
mmu_miR_28	44	77,9	CTCAATAGACTGTGAGCTCCTTCTCAATAGACTGTGAGCTCCTT	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG
rno_miR_298	44	77,9	CTCAATAGACTGTGAGCTCCTTCTCAATAGACTGTGAGCTCCTT	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG
hsa_miR_296	42	90,6	ACAGGATTGAGGGGGGCCCTACAGGATTGAGGGGGGGCCCT	AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU
mmu_miR_296	42	90,6	ACAGGATTGAGGGGGGCCCTACAGGATTGAGGGGGGGCCCT	AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU
rno_miR_296	42	90,6	ACAGGATTGAGGGGGGCCCTACAGGATTGAGGGGGGGCCCT	AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU
hsa_miR_29a	42	81,4	AACCGATTCAGATGGTGCTAAACCGATTCAGATGGTGCTA	UAGCACCAUUGAAAUCGGUU
mmu_miR_29a	42	81,4	AACCGATTCAGATGGTGCTAAACCGATTCAGATGGTGCTA	UAGCACCAUUGAAAUCGGUU
rno_miR_29a	42	81,4	AACCGATTCAGATGGTGCTAAACCGATTCAGATGGTGCTA	UAGCACCAUUGAAAUCGGUU
hsa_miR_29b	44	79,6	AACACTGATTTCAAATGGTGCTAACTGATTTCAAATGGTGCT	AGCACCAUUGAAAUCAGUGUU
mmu_miR_29b	44	79,6	AACACTGATTTCAAATGGTGCTAACTGATTTCAAATGGTGCT	AGCACCAUUGAAAUCAGUGUU
rno_miR_29b	44	79,6	AACACTGATTTCAAATGGTGCTAACTGATTTCAAATGGTGCT	AGCACCAUUGAAAUCAGUGUU
hsa_miR_29c	40	80,3	ACCGATTTCAAATGGTGCTAAACCGATTTCAAATGGTGCTA	UAGCACCAUUGAAAUCGGU
mmu_miR_29c	40	80,3	ACCGATTTCAAATGGTGCTAAACCGATTTCAAATGGTGCTA	UAGCACCAUUGAAAUCGGU
rno_miR_29c	40	80,3	ACCGATTTCAAATGGTGCTAAACCGATTTCAAATGGTGCTA	UAGCACCAUUGAAAUCGGU
hsa_miR_301	44	76	GCTTTGACAATACTATTGCACTGCTTTGACAATACTATTGCACT	AGUGCAAUAGUUAUUGUCAAGAGC
mmu_miR_301	44	76	GCTTTGACAATACTATTGCACTGCTTTGACAATACTATTGCACT	AGUGCAAUAGUUAUUGUCAAGAGC
rno_miR_301	44	76	GCTTTGACAATACTATTGCACTGCTTTGACAATACTATTGCACT	AGUGCAAUAGUUAUUGUCAAGAGC
hsa_miR_30a_3p	42	85,5	GCTGCAAACATCCGACTGAAAGCTGCAAACATCCGACTGAAA	UUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
mmu_miR_30a_3p	42	85,5	GCTGCAAACATCCGACTGAAAGCTGCAAACATCCGACTGAAA	UUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
rno_miR_30a_3p	42	85,5	GCTGCAAACATCCGACTGAAAGCTGCAAACATCCGACTGAAA	UUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
hsa_miR_30a_5p	44	80,9	CTTCCAGTCGAGGATGTTTACACTTCCAGTCGAGGATGTTTACA	UGUAAACAUCUCCGACUGGAAG

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
mmu_miR_30a_5p	44	80,9	CTTCCAGTCGAGGATGTTTACACTTCCAGTCGAGGATGTTTACA	UGUAAACAUCCUCGACUGG AAG
rno_miR_30a_5p	44	80,9	CTTCCAGTCGAGGATGTTTACACTTCCAGTCGAGGATGTTTACA	UGUAAACAUCCUCGACUGG AAG
hsa_miR_30b	44	76,4	AGCTGAGTGTAGGATGTTTACAAGCTGAGTGTAGGATGTTTACA	UGUAAACAUCCUACACUCA GCU
mmu_miR_30b	44	76,4	AGCTGAGTGTAGGATGTTTACAAGCTGAGTGTAGGATGTTTACA	UGUAAACAUCCUACACUCA GCU
rno_miR_30b	44	76,4	AGCTGAGTGTAGGATGTTTACAAGCTGAGTGTAGGATGTTTACA	UGUAAACAUCCUACACUCA GCU
hsa_miR_30c	44	77	GCTGAGAGTGTAGGATGTTTACGCTGAGAGTGTAGGATGTTTAC	GUAAACAUCCUACACUCUC AGC
mmu_miR_30c	44	77	GCTGAGAGTGTAGGATGTTTACGCTGAGAGTGTAGGATGTTTAC	GUAAACAUCCUACACUCUC AGC
rno_miR_30c	44	77	GCTGAGAGTGTAGGATGTTTACGCTGAGAGTGTAGGATGTTTAC	GUAAACAUCCUACACUCUC AGC
hsa_miR_30d	42	83,2	CTTCCAGTCGGGGATGTTTACCTTCCAGTCGGGGATGTTTAC	GUAAACAUCCCCGACUGGA AG
mmu_miR_30d	42	83,2	CTTCCAGTCGGGGATGTTTACCTTCCAGTCGGGGATGTTTAC	GUAAACAUCCCCGACUGGA AG
rno_miR_30d	42	83,2	CTTCCAGTCGGGGATGTTTACCTTCCAGTCGGGGATGTTTAC	GUAAACAUCCCCGACUGGA AG
hsa_miR_32	40	74,3	GCAACTTAGTAATGTGCAATGCAACTTAGTAATGTGC AAT	AUUGCACAUUACUAAGUUG C
mmu_miR_32	40	74,3	GCAACTTAGTAATGTGCAATGCAACTTAGTAATGTGC AAT	AUUGCACAUUACUAAGUUG C
rno_miR_32	40	74,3	GCAACTTAGTAATGTGCAATGCAACTTAGTAATGTGC AAT	AUUGCACAUUACUAAGUUG C
hsa_miR_320	44	88,1	TTCGCCCTCTCAACCCAGCTTTTTTCGCCCTCTCAAC CCAGCTTT	AAAGCUGGGUUGAGAGGGC GAA
mmu_miR_320	44	88,1	TTCGCCCTCTCAACCCAGCTTTTTTCGCCCTCTCAAC CCAGCTTT	AAAGCUGGGUUGAGAGGGC GAA
rno_miR_320	44	88,1	TTCGCCCTCTCAACCCAGCTTTTTTCGCCCTCTCAAC CCAGCTTT	AAAGCUGGGUUGAGAGGGC GAA
hsa_miR_323	42	83,4	AGAGGTCGACCGTGTAAATGTGAGAGGTCGACCGTGT AATGTG	CACAUUACACGGUCGACCU CU
mmu_miR_323	42	83,4	AGAGGTCGACCGTGTAAATGTGAGAGGTCGACCGTGT AATGTG	CACAUUACACGGUCGACCU CU
rno_miR_323	42	83,4	AGAGGTCGACCGTGTAAATGTGAGAGGTCGACCGTGT AATGTG	CACAUUACACGGUCGACCU CU
hsa_miR_324_3p	36	88,4	AGCAGCACCTGGGGCAGTAGCAGCACCTGGGGCAG T	ACUGCCCCAGGUGCUGCU
mmu_miR_324_3p	36	88,4	AGCAGCACCTGGGGCAGTAGCAGCACCTGGGGCAG T	ACUGCCCCAGGUGCUGCU
rno_miR_324_3p	36	88,4	AGCAGCACCTGGGGCAGTAGCAGCACCTGGGGCAG T	ACUGCCCCAGGUGCUGCU
hsa_miR_328	42	92,2	ACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAACGGAAGGGCAGAG AGGGCCA	UGGCCUCUCUGCCCUUCC GU
mmu_miR_328	42	92,2	ACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAACGGAAGGGCAGAG AGGGCCA	UGGCCUCUCUGCCCUUCC GU
rno_miR_328	42	92,2	ACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAACGGAAGGGCAGAG AGGGCCA	UGGCCUCUCUGCCCUUCC GU
hsa_miR_33	38	79,7	CAATGCAACTACAATGCACCAATGCAACTACAATGCA C	GUGCAUUGUAGUUGCAUUG
mmu_miR_33	38	79,7	CAATGCAACTACAATGCACCAATGCAACTACAATGCA C	GUGCAUUGUAGUUGCAUUG
rno_miR_33	38	79,7	CAATGCAACTACAATGCACCAATGCAACTACAATGCA C	GUGCAUUGUAGUUGCAUUG
hsa_miR_331	38	81,2	TTCTAGGATAGGCCAGGGTTCTAGGATAGGCCAG GG	CCCUGGGCCUAUCCUAGAA
mmu_miR_331	38	81,2	TTCTAGGATAGGCCAGGGTTCTAGGATAGGCCAG GG	CCCUGGGCCUAUCCUAGAA
rno_miR_331	38	81,2	TTCTAGGATAGGCCAGGGTTCTAGGATAGGCCAG GG	CCCUGGGCCUAUCCUAGAA
hsa_miR_335	44	77	ACATTTTTCGTTATTGCTCTTGACATTTTTCGTTATTG CTCTTG	CAAGAGCAAUACGAAAAA UGU
mmu_miR_335	44	77	ACATTTTTCGTTATTGCTCTTGACATTTTTCGTTATTG CTCTTG	CAAGAGCAAUACGAAAAA UGU
rno_miR_335	44	77	ACATTTTTCGTTATTGCTCTTGACATTTTTCGTTATTG CTCTTG	CAAGAGCAAUACGAAAAA UGU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_338	44	83,2	TCAACAAAATCACTGATGCTGGTCAACAAAATCACTGATGCTGG	CCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA
mmu_miR_338	44	83,2	TCAACAAAATCACTGATGCTGGTCAACAAAATCACTGATGCTGG	CCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA
rno_miR_338	44	83,2	TCAACAAAATCACTGATGCTGGTCAACAAAATCACTGATGCTGG	CCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGA
hsa_miR_339	42	89	TGAGCTCCTGGAGGACAGGGATGAGCTCCTGGAGGACAGGGA	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCA
mmu_miR_339	42	89	TGAGCTCCTGGAGGACAGGGATGAGCTCCTGGAGGACAGGGA	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCA
rno_miR_339	42	89	TGAGCTCCTGGAGGACAGGGATGAGCTCCTGGAGGACAGGGA	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCA
hsa_miR_340	44	76,3	GGCTATAAAGTAACTGAGACGGGGCTATAAAGTAACTGAGACGG	CCGUCUCAGUUACUUUAUAGCC
mmu_miR_340	44	76,3	GGCTATAAAGTAACTGAGACGGGGCTATAAAGTAACTGAGACGG	CCGUCUCAGUUACUUUAUAGCC
rno_miR_340	44	76,3	GGCTATAAAGTAACTGAGACGGGGCTATAAAGTAACTGAGACGG	CCGUCUCAGUUACUUUAUAGCC
hsa_miR_342	42	88,6	ACGGGTGCGATTTCTGTGTGAACGGGTGCGATTCTGTGTGA	UCACACAGAAAUCGCACCCGU
mmu_miR_342	42	88,6	ACGGGTGCGATTTCTGTGTGAACGGGTGCGATTCTGTGTGA	UCACACAGAAAUCGCACCCGU
rno_miR_342	42	88,6	ACGGGTGCGATTTCTGTGTGAACGGGTGCGATTCTGTGTGA	UCACACAGAAAUCGCACCCGU
hsa_miR_34a	42	80,6	AACAACCAGCTAAGACACTGCAACAACCAGCTAAGCACTGC	GCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU
mmu_miR_34a	42	80,6	AACAACCAGCTAAGACACTGCAACAACCAGCTAAGCACTGC	GCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU
rno_miR_34a	42	80,6	AACAACCAGCTAAGACACTGCAACAACCAGCTAAGCACTGC	GCAGUGUCUUAGCUGGUUGUU
hsa_miR_34c	44	78,2	CAATCAGCTAACTACTGCCTCAATCAGCTAACTACTGCCT	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG
mmu_miR_34c	44	78,2	CAATCAGCTAACTACTACTGCCTCAATCAGCTAACTACTACTGCCT	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG
rno_miR_34c	44	78,2	CAATCAGCTAACTACTACTGCCTCAATCAGCTAACTACTACTGCCT	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG
hsa_miR_365	44	74,8	ATAAGGATTTTAGGGGCATTAATAAGGATTTTAGGGGCATTA	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
mmu_miR_365	44	74,8	ATAAGGATTTTAGGGGCATTAATAAGGATTTTAGGGGCATTA	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
rno_miR_365	44	74,8	ATAAGGATTTTAGGGGCATTAATAAGGATTTTAGGGGCATTA	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
hsa_miR_431	42	92,7	TGCATGACGGCCTGCAAGACATGCATGACGGCCTGCAAGACA	UGUCUUGCAGGCCGUCUAUGCA
mmu_miR_431	42	92,7	TGCATGACGGCCTGCAAGACATGCATGACGGCCTGCAAGACA	UGUCUUGCAGGCCGUCUAUGCA
rno_miR_431	42	92,7	TGCATGACGGCCTGCAAGACATGCATGACGGCCTGCAAGACA	UGUCUUGCAGGCCGUCUAUGCA
hsa_miR_433	44	88,1	ACACCGAGGAGCCCATCATGATACACCGAGGAGCCCATCATGAT	AUCAUGAUGGGCUCUCUGUGU
mmu_miR_433_3p	44	88,1	ACACCGAGGAGCCCATCATGATACACCGAGGAGCCCATCATGAT	AUCAUGAUGGGCUCUCUGUGU
rno_miR_433	44	88,1	ACACCGAGGAGCCCATCATGATACACCGAGGAGCCCATCATGAT	AUCAUGAUGGGCUCUCUGUGU
hsa_miR_448	44	80,6	ATGGGACATCCTACATATGCAAATGGGACATCCTACATATGCAA	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCAU
mmu_miR_448	44	80,6	ATGGGACATCCTACATATGCAAATGGGACATCCTACATATGCAA	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCAU
rno_miR_448	44	80,6	ATGGGACATCCTACATATGCAAATGGGACATCCTACATATGCAA	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCCAU
hsa_miR_449	44	81,1	ACCAGCTAACAATACACTGCCAACCAGCTAACAATACACTGCCA	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
mmu_miR_449	44	81,1	ACCAGCTAACAATACACTGCCAACCAGCTAACAATACACTGCCA	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
rno_miR_449	44	81,1	ACCAGCTAACAATACACTGCCAACCAGCTAACAATACACTGCCA	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
hsa_miR_92	40	86,7	AGGCCGGGACAAGTGCAATAAGGCCGGGACAAGTGCAATA	UAUUGCACUUGUCCCGCCU
mmu_miR_92	40	86,7	AGGCCGGGACAAGTGCAATAAGGCCGGGACAAGTGCAATA	UAUUGCACUUGUCCCGCCU

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
rno_miR_92	40	86,7	AGGCCGGGACAAGTGCATAAGGCCGGGACAAGTGC CAATA	UAUUGCACUUGUCCCGGCC U
hsa_miR_93	42	83,4	CTACCTGCACGAACAGCACTTCTACCTGCACGAACA GCACTT	AAGUGCUGUUCGUGCAGGU AG
mmu_miR_93	42	83,4	CTACCTGCACGAACAGCACTTCTACCTGCACGAACA GCACTT	AAGUGCUGUUCGUGCAGGU AG
rno_miR_93	42	83,4	CTACCTGCACGAACAGCACTTCTACCTGCACGAACA GCACTT	AAGUGCUGUUCGUGCAGGU AG
hsa_miR_98	44	70,1	AACAATACAACCTACTACCTCAAACAATACAACCTACT ACCTCA	UGAGGUAGUAAGUUGUAUU GUU
mmu_miR_98	44	70,1	AACAATACAACCTACTACCTCAAACAATACAACCTACT ACCTCA	UGAGGUAGUAAGUUGUAUU GUU
rno_miR_98	44	70,1	AACAATACAACCTACTACCTCAAACAATACAACCTACT ACCTCA	UGAGGUAGUAAGUUGUAUU GUU
hsa_miR_99b	38	83,5	CAAGGTCGGTTCTACGGGTCAAGGTCGGTTCTACGG GT	ACCCGUAGAACCGACCUUG
mmu_miR_99b	38	83,5	CAAGGTCGGTTCTACGGGTCAAGGTCGGTTCTACGG GT	ACCCGUAGAACCGACCUUG
rno_miR_99b	38	83,5	CAAGGTCGGTTCTACGGGTCAAGGTCGGTTCTACGG GT	ACCCGUAGAACCGACCUUG
Sondy podobne u człowieka, myszy i szczura, zawierające 1 różnicę w sekwencji wykrywanej (1 mismatch)				
hsa_miR_155	44	77,9	CCCCTATCACGATTAGCATTAAACCCTATCACGATTAG CATTAA	UUA AUGCUAAUCGUGAUAG GGG
mmu_miR_155	44	75,9	CCCCTATCACAAATTAGCATTAAACCCTATCACAAATTAG CATTAA	UUA AUGCUAAUUGUGAUAG GGG
hsa_miR_199b	44	74,1	GAACAGATAGTCTAAACACTGGGAACAGATAGTCTA AACACTGG	CCAGUGUUUAGACUAUCUG UUC
mmu_miR_199b	44	76,2	GAACAGGATAGTCTAAACACTGGGAACAGGATAGTCTA AACACTGG	CCAGUGUUUAGACUAACUG UUC
hsa_miR_215	42	76,1	GTCTGTCAAATTCATAGGTCATGTCTGTCAAATTCATAG GTCAT	AUGACCUAUGAAUUGACAG AC
mmu_miR_215	42	76,1	GTCTGTCAAATTCATAGGTCATGTCTGTCAAATTCATAG GTCAT	AUGACCUAUGAUUUGACAG AC
hsa_miR_330	42	89,5	TCTCTGCAGGCCGTGTGCTTTTCTCTGCAGGCCGT TGCTTT	AAAGCACACGGCCUGCAGA GA
mmu_miR_330	42	88,4	TCTCTGCAGGCCCTGTGCTTTTCTCTGCAGGCCCTG TGCTTT	AAAGCACAGGCCUGCAGA GA
rno_miR_330	42	88,4	TCTCTGCAGGCCCTGTGCTTTTCTCTGCAGGCCCTG TGCTTT	AAAGCACAGGCCUGCAGA GA
hsa_miR_337	44	80,2	AAAGGCATCATATAGGAGCTGAAAGGCATCATATAG GAGCTGG	CCAGCUCCUAUUGAUGCC UUU
mmu_miR_337	44	78,6	AAAGGCATCATATAGGAGCTGAAAAGGCATCATATAG GAGCTGA	UCAGCUCCUAUUGAUGCC UUU
rno_miR_337	44	78,6	AAAGGCATCATATAGGAGCTGAAAAGGCATCATATAG GAGCTGA	UCAGCUCCUAUUGAUGCC UUU
hsa_miR_34b	44	81,6	CAATCAGCTAATGACACTGCCTCAATCAGCTAATGAC ACTGCCT	AGGCAGUGUCAUUGCUGA UUG
mmu_miR_34b	44	77,6	CAATCAGCTAATTACTGCCTCAATCAGCTAATTAC ACTGCCT	AGGCAGUGUAAUUGCUGA UUG
rno_miR_34b	44	77,6	CAATCAGCTAATTACTGCCTCAATCAGCTAATTAC ACTGCCT	AGGCAGUGUAAUUGCUGA UUG
hsa_miR_376a	42	76,5	ACGTGGATTTTCTCTATGATACGTGGATTTTCTCT ATGAT	AUCAUAGAGGAAAUCCAC GU
mmu_miR_376a	42	78,6	ACGTGGATTTTCTCTACGATACGTGGATTTTCTCT ACGAT	AUCGUAGAGGAAAUCCAC GU
hsa_miR_380_3p	44	73	AAGATGTGGACCATAATTACATAAAGATGTGGACCATA TTACATA	UAUGUAUUGGUCCACAU CUU
mmu_miR_380_3p	44	73,5	AAGATGTGGACCATACTACATAAAGATGTGGACCATA CTACATA	UAUGUAGUUGGUCCACAU CUU
mmu_miR_7b	40	76	AACAAAATCACAAAGTCTTCCAACAAAATCACAAAGTC TTCC	GGAAGACUUGUGAUUUUGU U
rno_miR_7b	40	76	AACAAAATCACAAAGTCTTCCAACAAAATCACAAAGTC TTCC	GGAAGACUUGUGAUUUUGU U
rno_miR_7	40	72,5	AACAAAATCACTAGTCTTCCAACAAAATCACTAGTC TTCC	GGAAGACUAGUGAUUUUGU U
Sondy podobne u człowieka, myszy i szczura, zawierające 2 różnice w sekwencji wykrywanej (2 mismatch'e)				

7. Załączniki

Nazwa sondy	Dł. [nt]	T _m [°C]	Sekwencja sondy	Sekwencja wykrywana
hsa_miR_325	44	72,9	ACACTTACTG G ACACCTACTAGACACTTACTG G ACA CCTACTAG	CUAGUAGGUG U CCAGUAAG UGU
mmu_miR_325	44	73,1	ACACTTACTG A GCACCTACTAGACACTTACTG A GCA CCTACTAG	CUAGUAGGUG C UCAGUAAG UGU
rno_miR_325	44	73,1	ACACTTACTG A GCACCTACTAGACACTTACTG A GCA CCTACTAG	CUAGUAGGUG C UCAGUAAG UGU
hsa_miR_346	42	94,6	AGAGGCAGGCAT T GCGGGCAGAAGAGGCAGGCAT G CGGGCAGA	UCUGCCCC C AUGCCUGCC UCU
mmu_miR_346	42	92,4	AGAGGCAGGC A CTCAGGCAGAAGAGGCAGGC A CT CAGGCAGA	UCUGCCCC A GUGCCUGCC UCU
rno_miR_346	42	92,4	AGAGGCAGGC A CTCAGGCAGAAGAGGCAGGC A CT CGGGCAGA	UCUGCCCC A GUGCCUGCC UCU
Sondy kontrolne				
Alexa 5 Test Feature	44	77,3	N/A	N/A
Alexa 5 Test Feature	44	77,3	N/A	N/A
Alexa 5 Test Feature	44	77,3	N/A	N/A
Alexa 5 Test Feature	44	77,3	N/A	N/A
Alexa 5 Test Feature	44	80,5	N/A	N/A
NcodeControl 1	42	73,9	N/A	N/A
NcodeControl 2	42	79,7	N/A	N/A
NcodeControl 3	40	85,9	N/A	N/A
NcodeControl 4	40	88,3	N/A	N/A
NcodeControl 5	40	91,7	N/A	N/A
NcodeControl 6	40	78,4	N/A	N/A
NcodeControl 7	40	82,8	N/A	N/A
NcodeControl 8	40	81,7	N/A	N/A
NcodeControl 9	40	83,1	N/A	N/A
NcodeControl 10	40	87,7	N/A	N/A

Załącznik 2. Lista sond „predicted” walidowanych w MiRBase

Nazwa	dł. [nt]	Tm	Sekwencja sondy
HMP_PREDICTED_MIR100	44	78,2	GAGAAATTTTCAGGGCTACTGAGAGAAATTTTCAGGGCTACTGA
HMP_PREDICTED_MIR102 - hsa-miR-502	42	88,8	TGAATCCTTGCCAGGTGCATTGAATCCTTGCCAGGTGCAT
HMP_PREDICTED_MIR103	42	85	GAGCTGAGTGGAGCACAACAGAGCTGAGTGGAGCACAACA
HMP_PREDICTED_MIR104 - hsa-miR-582	44	72,4	TTGTTCAACCAGTTACTAATCTTTGTTCAACCAGTTACTAATCT
HMP_PREDICTED_MIR105	44	86,5	AGCTGCCGGCATTAAAGGGCTAAGCTGCCGGCATTAAAGGGCTA
HMP_PREDICTED_MIR108	44	69,6	CCAAATAGCTTTTTAAATAGACCAATAGCTTTTTAAATAGA
HMP_PREDICTED_MIR109 - hsa-miR-190b	44	75,3	AACCCAATATCAAACATATCACAACCCAATATCAAACATATCAC
HMP_PREDICTED_MIR110 - hsa-miR-488	44	78,5	CCAAGAAATAGCCTTTCAAACACCAAGAAATAGCCTTTCAAACA
HMP_PREDICTED_MIR112	34	87,3	ACCCCGTGCCACTGTGTACCCCGTGCCACTGTGT
HMP_PREDICTED_MIR113	44	75,8	CATGTCATAAGCCATTTATTTCCATGTCATAAGCCATTTATTTTC
HMP_PREDICTED_MIR114 - hsa-miR-504	44	89,1	TTGGGAGACCCTGGTCTGCACTTTGGGAGACCCTGGTCTGCACT
HMP_PREDICTED_MIR119	44	83,1	CTAATGACCGCAGAAAGCCATTCTAATGACCGCAGAAAGCCATT
HMP_PREDICTED_MIR12	44	76,5	AAACATCACTGCAAGTCTTAACAACATCACTGCAAGTCTTAAC
HMP_PREDICTED_MIR120 - rno-miR-421	44	75,2	CATTCAACAAACATTTAATGAGCATTCACAACATTTAATGAG
HMP_PREDICTED_MIR121 - hsa-miR-146b	44	79,2	AGCCTATGGAATTCAGTTCTCAAGCCTATGGAATTCAGTTCTCA
HMP_PREDICTED_MIR124 - hsa-miR-495	44	79,4	AAGAAGTGCACCATGTTTGTTTAAGAAGTGCACCATGTTTGT
HMP_PREDICTED_MIR127	42	83,6	TGCCTGGCACCTACACACTAATGCCTGGCACCTACACACTAA
HMP_PREDICTED_MIR128	42	85,7	TGCTAAATGATCCCCTGGTGTGCTAAATGATCCCCTGGTGC
HMP_PREDICTED_MIR129	44	67,5	CCAATTAAGTCTTTTAAATAAACCAATTAAGTCTTTTAAATAAA
HMP_PREDICTED_MIR131	42	86,2	CACTTCACTGCCTGCAGACAACACTTCACTGCCTGCAGACAA
HMP_PREDICTED_MIR132	44	74,3	CGTTCCTGATAAGTGAATAAACGTTCTGATAAGTGAATAAAA
HMP_PREDICTED_MIR135	44	71,4	GCAGTTCAGAAAATTAATAGAGCAGTTCAGAAAATTAATAGA
HMP_PREDICTED_MIR137	44	79,1	GTTCTCCAATACCTAGGCACAAGTCTCCAATACCTAGGCACAA
HMP_PREDICTED_MIR139	44	81,9	TAGGGTCACACAGGATGTGAATTAGGGTCACACAGGATGTGAAT
HMP_PREDICTED_MIR140 - hsa-miR-802	44	73,1	ACAAGGATGAATCTTTGTTACTACAAGGATGAATCTTTGTTACT
HMP_PREDICTED_MIR141 - hsa-miR-503	40	84,2	CAGAACTGTTCCCGCTGCTACAGAAGTGTCCCGCTGCTA
HMP_PREDICTED_MIR142 - hsa-miR-409	42	84,3	AGGTTACCCGAGCAACTTTGCAGGTTACCCGAGCAACTTTGC
HMP_PREDICTED_MIR143	44	79,3	GAGGGGAGTTTTCTTTCAAAGGAGGGGAGTTTTCTTTCAAAG
HMP_PREDICTED_MIR144 - hsa-miR-362	44	81,2	ATCCTTGAATAGGTGTGTTGCAATCCTTGAATAGGTGTGTTGCA
HMP_PREDICTED_MIR145	44	81,4	TTTACAGGGTGGCCCATTTAAATTTACAGGGTGGCCCATTTAAA
HMP_PREDICTED_MIR146	44	78,2	CAAAGAGCATGATATTTGACAGCAAAGAGCATGATATTTGACAG
HMP_PREDICTED_MIR149	44	75,9	GGTCAATATTTACCTCTCAGGTGGTCAATATTTACCTCTCAGGT

7. Załączniki

Nazwa	dl. [nt]	Tm	Sekwencja sondy
HMP_PREDICTED_MIR150	44	87,6	TCAGGCCATCAGCAGCTGCTATTACAGGCCATCAGCAGCTGCTAT
HMP_PREDICTED_MIR151	42	86,6	CCAGGAATTGATGACCAGCTGCCAGGAATTGATGACCAGCTG
HMP_PREDICTED_MIR152	42	81,9	AGGACCCAGAGAACAACCTCAGAGACCCAGAGAACAACCTCAG
HMP_PREDICTED_MIR153	42	83,3	ACCTAGGGATCGTCAAAGGGAACCTAGGGATCGTCAAAGGGA
HMP_PREDICTED_MIR154 - hsa-miR-452	44	78,5	TTTCCTCTGCAAACAGTTGTAATTTCTCTGCAAACAGTTGTAA
HMP_PREDICTED_MIR155	44	66,4	TTTAGTCAATATCAAGATTTATTTTAGTCAATATCAAGATTTAT
HMP_PREDICTED_MIR156	34	86,3	AAGCTTCCCGGGCAGCTAAGCTTCCCGGGCAGCT
HMP_PREDICTED_MIR157 - gga-miR-455	44	93,8	TGCCCATGGACTGCATGGTGCTTGCCCATGGACTGCATGGTGCT
HMP_PREDICTED_MIR158	42	87,8	GCTGATTGCCTCTGTGCCAATGCTGATTGCCTCTGTGCCAAT
HMP_PREDICTED_MIR160	44	93,5	AACGCCGGGGCCACGTTGCTAAACGCCGGGGCCACGTTGCTAA
HMP_PREDICTED_MIR161 - hsa-miR-496	44	83,6	CGAAAGGAGATTGCCATGTAACGAAAGGAGATTGCCATGTAA
HMP_PREDICTED_MIR162	44	75,6	TTCTACTGAAATCTGACAATCTTCTACTGAAATCTGACAATC
HMP_PREDICTED_MIR163	44	77,4	GAAAGACCCCATTTAACTTGAAGAAAGACCCCATTTAACTTGAA
HMP_PREDICTED_MIR164	44	77,5	TGAACAATCCAGATAATTGCTTTGAACAATCCAGATAATTGCTT
HMP_PREDICTED_MIR165	36	87,9	TCCCCTGCAAGTGGTGCTTCCCCTGCAAGTGGTGCT
HMP_PREDICTED_MIR166 - hsa-miR-532-3p	40	91,5	TCCCACACCCAAGGCTTGCATCCCACACCCAAGGCTTGCA
HMP_PREDICTED_MIR167 - hsa-miR-551b	42	84,4	GAAACCAAGTATGGTGCGCTGAAACCAAGTATGGTGCGCT
HMP_PREDICTED_MIR168	44	77,7	TGTGTGCAATTACCCATTTATTGTGTGCAATTACCCATTTAT
HMP_PREDICTED_MIR170 - oan-miR-1327	44	69,6	ATTTAAAAGGCTTTTAAATGATATTTAAAAGGCTTTTAAATGAT
HMP_PREDICTED_MIR171 - hsa-miR-411	44	73,8	ATAGTAGACCGTATAGCGTACGATAGTAGACCGTATAGCGTACG
HMP_PREDICTED_MIR172	42	92,9	ACTGGGGCTGCATGCTGCTCAACTGGGGCTGCATGCTGCTCA
HMP_PREDICTED_MIR173	44	68,9	CTACTGTTAATGACCTATTTCTCTACTGTTAATGACCTATTTCT
HMP_PREDICTED_MIR174	44	73,3	CCTAAATACCTGGTATTTGAGACCTAAATACCTGGTATTTGAGA
HMP_PREDICTED_MIR176	44	69,7	CTTTGACAGCATTTTAATTATACTTTGACAGCATTTTAATTATA
HMP_PREDICTED_MIR177 - hsa-miR-539	44	77	GAACACACCAAGGATAATTTCTGAACACACCAAGGATAATTTCT
HMP_PREDICTED_MIR179	44	70,9	AGTTATGAAATGTCATCAATAAAGTTATGAAATGTCATCAATAA
HMP_PREDICTED_MIR180	42	82,1	CACAGGAAGTGGCCTTCAATACACAGGAAGTGGCCTTCAATA
HMP_PREDICTED_MIR181 - mmu-miR-759	44	81,6	ATTGTTTGCCTCTGCCAGTTTATTGTTTGCCTCTGCCAGTTT
HMP_PREDICTED_MIR182	44	81,2	GAGCTGAACTCAAACCAAATGGAGCTGAACTCAAACCAAATG
HMP_PREDICTED_MIR183	44	73,8	TCTTTATTGCAAAGTCAGTATGCTTTATTGCAAAGTCAGTATG
HMP_PREDICTED_MIR184	44	83,7	AACCCTAGGAGAGGGTGCCATTAACCCTAGGAGAGGGTGCCATT
HMP_PREDICTED_MIR186	42	83,4	ATTCTGCCCTGGATATGCATATTCTGCCCTGGATATGCAT
HMP_PREDICTED_MIR187	38	89,2	AACCAAGCAGCCGGGCAGTAACCAAGCAGCCGGGCAGT
HMP_PREDICTED_MIR189	42	92,4	AGCAGGGCTCCCTCACCAGCAAGCAGGGCTCCCTCACCAGCA

7. Załączniki

Nazwa	dl. [nt]	Tm	Sekwencja sondy
HMP_PREDICTED_MIR190 - hsa-miR-365	44	74,8	ATAAGGATTTTTAGGGGCATTAATAAGGATTTTTAGGGGCATTA
HMP_PREDICTED_MIR191	40	101,9	CGCCGCCCCGCACCTGCTGCCGCCGCCCGCACCTGCTGC
HMP_PREDICTED_MIR192 - hsa-miR-542-5p	42	84,1	ACATCTCGGGGATCATCATGTACATCTCGGGGATCATCATGT
HMP_PREDICTED_MIR194	44	80,2	GGGCCCTATATTAATGGACCAAGGGCCCTATATTAATGGACCAA
HMP_PREDICTED_MIR196	44	78	AGTAAAGCCAAGTAGTGATGAAGTAAAGCCAAGTAGTGATGA
HMP_PREDICTED_MIR197	44	69,7	AAGAAGGACCTTGTAATAAATAAAGAAGGACCTTGTAATAAATA
HMP_PREDICTED_MIR198	42	83,2	CCAGATGCTAAGCACTGGAAGCCAGATGCTAAGCACTGGAAG
HMP_PREDICTED_MIR199	44	77,3	TAACCACTCTCCAAGTACCAAATAACCACTCTCCAAGTACCAAA
HMP_PREDICTED_MIR200	44	80,7	TTAACAGGCAGTTCTGCTGTATTAAACAGGCAGTTCTGCTGCTA
HMP_PREDICTED_MIR201 - hsa-miR-429	44	74	ACGGTTTTTACCAGACAGTATAACGGTTTTTACCAGACAGTATTA
HMP_PREDICTED_MIR202 - hsa-miR-543	42	84,9	AGAAGTGCACCGCGAATGTTTAGAAGTGCACCGCGAATGTTT
HMP_PREDICTED_MIR203	40	85,6	TTAAGAGCCCCGCTTTGCCTTTAAGAGCCCCGCTTTGCCT
HMP_PREDICTED_MIR205	44	75,3	ATCCACGTTTTAAATACCAAAGATCCACGTTTTAAATACCAAAG
HMP_PREDICTED_MIR206 - gga-miR-1586	42	85,9	TGCCTCCCACACACAGCTTTATGCCTCCCACACACAGCTTTA
HMP_PREDICTED_MIR207	44	92	TTCCCCGGCACCAGCACAAAGTTTCCCCGGCACCAGCACAAAGT
HMP_PREDICTED_MIR208	44	85,5	CAATCAGAGGCAATCAAGCACACAATCAGAGGCAATCAAGCACAA
HMP_PREDICTED_MIR209	44	72,7	TAATTCTAAAGACAAAGCACATAATTCTAAAGACAAAGCACAA
HMP_PREDICTED_MIR210	42	84,5	GGTTGTCAGGAACAGAAGTGGCGTTGTCAGGAACAGAAGTGC
HMP_PREDICTED_MIR211 - hsa-miR-363	44	80,5	TACAGATGGATACCGTGAATTTACAGATGGATACCGTGAATTT
HMP_PREDICTED_MIR212	44	80,6	ACTTGATCAAACAGAGCACAACTTGATCAAACAGAGCACAAAC
HMP_PREDICTED_MIR213	44	80,9	TTTTCTCCTGACTGATTGCACTTTTTCTCCTGACTGATTGCACT
HMP_PREDICTED_MIR214	44	76,3	TTAAAATGACATGGATAATGCATTTAAAATGACATGGATAATGCA
HMP_PREDICTED_MIR215 - hsa-miR-1251	40	85,6	AGAAGCGCCTTTGGCAGCTAAGAAGCGCCTTTGGCAGCTA
HMP_PREDICTED_MIR216 - hsa-miR-20b	44	79,8	TACCTGCACTATGAGCACTTTGTACCTGCACTATGAGCACTTTG
HMP_PREDICTED_MIR218	44	80	GTCATGATCATCCCACACTAATGTCATGATCATCCCACACTAAT
HMP_PREDICTED_MIR219	42	92,4	TGGCACCTATGCCACCAGCATGGCACCTATGCCACCAGCA
HMP_PREDICTED_MIR220 - hsa-miR-301b	44	79,3	GCTTTGACAATATCATTGCACTGCTTTGACAATATCATTGCACT
HMP_PREDICTED_MIR222	42	84,1	GTCGGCATCTACACTTGCACTGTCGGCATCTACACTTGCACT
HMP_PREDICTED_MIR223	42	87,3	ACCTGCTGCCACTGGCACTTAACCTGCTGCCACTGGCACTTA
HMP_PREDICTED_MIR224 - mmu-miR-1902	44	78	GGCATGAATTTATTGTGCAATAGGCATGAATTTATTGTGCAATA
HMP_PREDICTED_MIR225	36	83	GCTGGCAGGGAAGTAGTGGCTGGCAGGGAAGTAGTG
HMP_PREDICTED_MIR226	42	82,1	ATAACACCTACGAGCACTGCCATAACACCTACGAGCACTGCC
HMP_PREDICTED_MIR227	44	75,3	AGTCACAGCATCCATTAATAAAAGTCACAGCATCCATTAATAAA
HMP_PREDICTED_MIR228	44	78,3	ATGAGAAGACTGTCACAATCAAATGAGAAGACTGTCACAATCAA

7. Załączniki

Nazwa	dl. [nt]	Tm	Sekwencja sondy
HMP_PREDICTED_MIR229	44	78,7	CTGCCAAACCAATTAACTCCTGCCAAACCAATTAACTCCTC
HMP_PREDICTED_MIR23 - hsa-miR-485	42	80	AGAGGAGAGCCGTGTATGACTAGAGGAGAGCCGTGTATGACT
HMP_PREDICTED_MIR230	44	74,3	TCATATTTTAGTTCTGCACTGATCATATTTTAGTTCTGCACTGA
HMP_PREDICTED_MIR231 - hsa-miR-1264	44	76,9	CACATAACAGGTGCTCAAATAACACATAACAGGTGCTCAAATAA
HMP_PREDICTED_MIR232 - hsa-miR-653	44	74,7	TAGAGATTGTTTCAACACTGAATAGAGATTGTTTCAACACTGAA
HMP_PREDICTED_MIR234	44	81,2	GTCTCCACAGAAACTTTTGTCCGTCTCCACAGAAACTTTTGTCC
HMP_PREDICTED_MIR235	44	90,4	ACCCGGTCTGCCAGAAGCTGCTACCCGGTCTGCCAGAAGCTGCT
HMP_PREDICTED_MIR236 - hsa-miR-192*	44	83,3	TTCAATAGGGCATAGGTGCCAATTCAATAGGGCATAGGTGCCAA
HMP_PREDICTED_MIR237	44	75,9	CTCCAAAGAACATTACTGTGATCTCCAAAGAACATTACTGTGAT
HMP_PREDICTED_MIR239	44	78,8	ATCAATGCTATGTGATCTGCATATCAATGCTATGTGATCTGCAT
HMP_PREDICTED_MIR240	44	85	TCACCCCAAAGTTGTGGCAATATCACCCCAAAGTTGTGGCAATA
HMP_PREDICTED_MIR241 - hsa-miR-96	44	85,2	ATGTGACAGAGCCAAGCACAAAATGTGACAGAGCCAAGCACAAA
HMP_PREDICTED_MIR242	44	79,9	ACCTACACTGAAACTGCCAAAACTTACACTGAAACTGCCAAAA
HMP_PREDICTED_MIR243	40	86,7	TTACCAAGGGCGACTCGCATTTACCAAGGGCGACTCGCAT
HMP_PREDICTED_MIR245 hsa-miR-365	44	74,8	ATAAGGATTTTATAGGGCATTAAATAGGATTTTATAGGGCATTAA
HMP_PREDICTED_MIR246	44	74,7	CCCGTATGTAATAAATGTGCTACCCGTATGTAATAAATGTGCTA
HMP_PREDICTED_MIR247	44	66,9	TTAAGTTTTGAAAAGTACATAGTTAAGTTTTGAAAAGTACATAG
HMP_PREDICTED_MIR249	44	81,4	AAAGCATACCAGCTGAACCAAAAAAGCATACCAGCTGAACCAAAA
HMP_PREDICTED_MIR250 - mmu-miR-466f	44	86,4	CACAAGTTCCTGCAAATGCACACACAAGTTCCTGCAAATGCACA
HMP_PREDICTED_MIR252	44	76,4	AAAAGAGACCTTCATATGCAAAAAAGAGACCTTCATATGCAAAA
HMP_PREDICTED_MIR253 - hsa-miR-18b	44	76,4	TAACTGCAC TAGATGCACCTTATAACTGCAC TAGATGCACCTTA
HMP_PREDICTED_MIR254	44	80,2	AAGCATATTTCTCCCACTGTGAAAGCATATTTCTCCCACTGTGA
HMP_PREDICTED_MIR255	42	88,3	TCCTGATGGT CGAAGTGCCAATCCTGATGGT CGAAGTGCCAA
HMP_PREDICTED_MIR256	44	72,8	CATAATTACAGAAAATTGCACTCATAATTACAGAAAATTGCACT
HMP_PREDICTED_MIR257 - hsa-miR-374b	44	69,8	ACACTTAGCAGGTTGTATTATAACTTAGCAGGTTGTATTATA
HMP_PREDICTED_MIR258	36	87,6	TCACCCGAGGCGCACTTATCACCCGAGGCGCACTTA
HMP_PREDICTED_MIR26 - hsa-miR-410	44	78,1	ACAGGCCATCTGTGTTATATTACAGGCCATCTGTGTTATATTC
HMP_PREDICTED_MIR30 - hsa-miR-92b	38	89,4	AGGCCGGGACGAGTGCAATAGGCCGGGACGAGTGCAAT
HMP_PREDICTED_MIR43 - hsa-miR-497	42	84,5	GTACAAACCACAGTGTGCTGCGTACAAACCACAGTGTGCTGC
HMP_PREDICTED_MIR52 - hsa-miR-493*	44	77,3	AATGAAAGCCTACCATGTACAAAATGAAAGCCTACCATGTACAA
HMP_PREDICTED_MIR54 - hsa-miR-449a	44	81,1	ACCAGCTAACATACTGCAACACAGCTAACATACTGCAAC
HMP_PREDICTED_MIR56 - hsa-miR-216b	44	82,9	AAAATCTCTGCAGGCAAATGTGAAAATCTCTGCAGGCAAATGTG
HMP_PREDICTED_MIR61 - hsa-miR-494	44	78,7	AAGAGGTTTCCCGTGTATGTTAAGAGGTTTCCCGTGTATGTTT
HMP_PREDICTED_MIR64 - hsa-miR-448	44	80,6	ATGGGACATCCTACATATGCAAATGGGACATCCTACATATGCAA

7. Załączniki

Nazwa	dł. [nt]	Tm	Sekwencja sondy
HMP_PREDICTED_MIR65 - hsa-miR-451	44	71	AGAGAACCATTACCATTACTAAAGAGAACCATTACCATTACTAA
HMP_PREDICTED_MIR74 - hsa-miR-181d	44	85,9	CCCACCGACAACAATGAATGTTCCCACCGACAACAATGAATGTT
HMP_PREDICTED_MIR78	34	88,2	GCTCCAGGCAGCCCAAAGCTCCAGGCAGCCCAAA
HMP_PREDICTED_MIR88	34	86,8	CCCACGCACCAGGGTAACCCACGCACCAGGGTAA
HMP_PREDICTED_MIR89	44	71,7	ATGTTCAAATAAGCTTTTGTAATGTTCAAATAAGCTTTTGTA
HMP_PREDICTED_MIR90	44	74,3	TTTTTTTTCAACTTGTTACAGCTTTTTTTTTCAACTTGTTACAGC
HMP_PREDICTED_MIR92	44	80,3	AAACAAAGCACCTCTCCAAAAAAACAAAGCACCTCTCCAAAA
HMP_PREDICTED_MIR93	44	83,6	GCTAACAAGGAATGCTGCCAAAGCTAACAAGGAATGCTGCCAAA

Załącznik 3. Lista pacjentów cierpiących na AML, od których pobrano aspiraty krwi i szpiku użyte w eksperymentach mikromacierzowych.

Lp.	wiek	płeć	Rozp.	Leuk * 10 ⁶ /ml	Diagnostyka genetyczna	Diagnostyka cytogen.	Remisja całkowita	Wznowa
1	40	M	M2	40,0	b/d	t(3:5)	TAK	NIE
2	53	K	M1	49,7	FLT3-ITD.	b/d	TAK	TAK
3	36	K	M2	86,1	b/d	del(16q)(g22)	TAK	TAK
4	64	K	M2	93,1	b/d	b/d	TAK	TAK
5	62	M	M2	15,4	ETO+	b/d	TAK	TAK
6	64	M	M2	74,4	b/d	b/d	NIE	NIE
7	45	M	M2	35,4	b/d	chr.9, 22-2,7%	TAK	TAK
8	25	M	M1	157,0	b/d	b/d	NIE	NIE
9	19	M	M2	26,4	b/d	b/d	TAK	TAK
10	55	K	M2	11,6	b/d	t8_21	NIE	NIE
11	21	M	M2	13,7	ETO+	t8_21	TAK	NIE
12	53	K	M1	57,4	b/d	inv3	NIE	NIE
13	65	K	M1	395,0	b/d	t8_21	NIE	NIE
14	52	K	M1	145,0	b/d	b/d	NIE	NIE
15	51	M	M1	11,8	b/d	b/d	NIE	NIE
16	44	K	M1	12,0	b/d	b/d	NIE	NIE
17	61	M	M2	147,0	FLT3-ITD	b/d	NIE	NIE
18	31	M	M2	12,6	b/d	Add16	NIE	NIE
19	53	M	M2	44,7	ETO+	b/d	TAK	TAK
20	78	M	M2	17,1	b/d	45XY -7(16)	NIE	NIE
21	59	M	M2	3,96	b/d	addycja 8	TAK	TAK
22	58	K	M2	10,6	b/d	15,17,8	NIE	NIE
23	36	M	M2	41,1	b/d	del6, del7	NIE	NIE
24	54	K	M2	11,2	b/d	del6, t8_21	B/D	B/D

Załącznik 4. Lista próbek niskocząsteczkowych RNA

Lp.	Wiek	Płeć	Rozp.	Pochodzenie	Czas	cRNA [ng/μl]	Ilość RNA [μg]
1	40	M	M2	Krew	T0	54	5,4
1	40	M	M2	Szpik	T0	47	4,7
2	53	K	M1	Krew	T0	32	3,2
2	53	K	M1	Szpik	T0	46	4,6
3	36	K	M2	Krew	T0	74	7,4
3	36	K	M2	Szpik	T0	108	10,8
4	64	K	M2	Krew	T0	56	5,6
4	64	K	M2	Szpik	T0	77	7,7
5	62	M	M2	Krew	T0	62	6,2
5	62	M	M2	Krew	T2	79	7,9
6	64	M	M2	Krew	T0	55	5,5
6	64	M	M2	Szpik	T0	69	6,9
7	45	M	M2	Krew	T0	59	5,9
7	45	M	M2	Szpik	T0	78	7,8
8	25	M	M1	Szpik	T0	22	2,2
8	25	M	M1	Szpik	T2	26	2,6
9	19	M	M2	Krew	T0	99	9,9
9	19	M	M2	Szpik	T0	124	12,4
10	55	K	M2	Krew	T0	77	7,7
10	55	K	M2	Szpik	T0	89	8,9
11	21	M	M2	Krew	T0	52	5,2
11	21	M	M2	Szpik	T0	69	6,9
12	53	K	M1	Krew	T0	17	1,7
12	53	K	M1	Szpik	T0	26	2,6
13	65	K	M1	Szpik	T0	24	2,4
13	65	K	M1	Szpik	T2	31	3,1
14	52	K	M1	Krew	T0	35	3,5
14	52	K	M1	Szpik	T0	44	4,4
15	51	M	M1	Krew	T0	29	2,9
15	51	M	M1	Szpik	T0	32	3,2
16	44	K	M1	Krew	T0	45	4,5
16	44	K	M1	Szpik	T0	55	5,5
17	61	M	M2	Krew	T0	18	1,8
17	61	M	M2	Szpik	T0	37	3,7
18	31	M	M2	Krew	T0	47	4,7
18	31	M	M2	Szpik	T0	59	5,9
19	53	M	M2	Krew	T0	101	10,1
19	53	M	M2	Szpik	T0	98	9,8

7. Załączniki

20	78	M	M2	Krew	T0	56	5,6
20	78	M	M2	Krew	T2	68	6,8
21	59	M	M2	Krew	T0	111	11,1
21	59	M	M2	Szpik	T0	98	9,8
22	58	K	M2	Krew	T0	56	5,6
22	58	K	M2	Szpik	T0	64	6,4
23	36	M	M2	Krew	T0	21	2,1
23	36	M	M2	Krew	T2	29	2,9
24	54	K	M2	Krew	T0	38	3,8
24	54	K	M2	Szpik	T0	44	4,4

Załącznik 5. Zgoda na wykorzystanie w pracy rysunków z publikacji

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 19, 2012

This is a License Agreement between Tomasz Magacz ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3017850015274
License date	Oct 28, 2012
Licensed content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Cancer
Licensed content title	Oncomirs [mdash] microRNAs with a role in cancer
Licensed content author	Aurora Esquela-Kerscher and Frank J. Slack
Licensed content date	Apr 1, 2006
Volume number	6
Issue number	4
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
High-res required	no
Figures	Figure 1 The biogenesis of microRNAs. Figure 2 MicroRNAs can function as tumour suppressors and oncogenes.
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	OPRACOWANIE METOD UMOŻLIWIAJĄCYCH WYKORZYSTANIE TECHNIK MIKROMACIERZOWYCH W RÓŻNICOWEJ ANALIZIE AKUMULACJI LUDZKICH MIKRORNA
Expected completion date	Dec 2012
Estimated size (number of pages)	140
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material

you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.