



Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej

Identyfikacja oraz wstępna charakterystyka białek
odpowiedzialnych za międzykomórkowy transport kwasów
nukleinowych u *Schmidtea mediterranea*

Identification and preliminary characterisation of proteins responsible for intercellular
transport of nucleic acids in *Schmidtea mediterranea*

mgr inż. Cezary Odrzygóźdź

Promotor
prof. dr hab. Marek Figlerowicz

Promotor pomocniczy
dr Natalia Koralewska

Poznań 2022

Rozprawa doktorska została wykonana w ramach uczestnictwa w projekcie *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”*, realizowanym wspólnie przez trzy jednostki:

- Politechnikę Poznańską,
- Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

w ramach Umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00-I011/16.

Projekt *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”* jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.



*Serdeczne podziękowania dla wszystkich tych,
którzy mieli swój wkład w powstanie tej pracy.*

*Prof. dr. hab. Markowi Figlerowiczowi,
za kierownictwo naukowe, dużą wyrozumiałość i ogromną życzliwość;*

*Dr Natalii Koralewskiej,
za opiekę naukową, ogromne wsparcie merytoryczne i cierpliwość;*

*Pracownikom Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej,
za współpracę i przyjazną atmosferę;*

*Rodzinie i przyjaciołom,
którzy zawsze służyli dobrym słowem i wsparciem.*

Dziękuję.

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	8
I. Wstęp.....	9
Wprowadzenie.....	9
I-1. Interferencja RNA.....	10
I-2. Molekularne podstawy transportu RNA w przebiegu procesu eRNAi	13
I-3. Organizm modelowy – <i>S. mediterranea</i>	17
II. Cel.....	22
III. MATERIAŁY I METODY.....	23
III-1. Materiały	23
III-1-1. Podstawowe bufony i roztwory	23
III-1-2. Hybrydyzacja in situ typu WISH (ang. <i>whole mount in situ hybridization</i>)	23
III-1-3. Pożywki bakteryjne	25
III-1-4. Żele.....	26
III-1-5. Bufory obciążające	27
III-1-6. Materiał biologiczny.....	27
III-1-7. Oligonukleotydy	28
III-1-8. Przeciwciała.....	30
III-1-9. Plazmidy.....	31
III-1-10. Zestawy odczynników	34
III-1-11. Spis odczynników i producentów wykorzystanych w pracy	34
III-2. Metody	36
III-2-1. Hodowla <i>S. mediterranea</i>	36
III-2-2. Izolacja RNA z organizmu <i>Schmidtea mediterranea</i>	36
III-2-3. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelach agarozowych	37
III-2-4. Łącuchowa reakcja polimerazy (PCR)	37
III-2-5. Oczyszczanie kwasów nukleinowych.....	38
III-2-6. Transkrypcja <i>in vitro</i>	39
III-2-7. Odwrotna transkrypcja	40
III-2-8. Przygotowywanie modyfikowanego pokarmu do indukcji RNAi	41
III-2-9. Indukcja RNAi poprzez karmienie zmodyfikowanym pokarmem	42
III-2-10. Indukcja RNAi u <i>S. mediterranea</i> poprzez mikroiniekcję dsRNA.....	42

III-2-11. Badanie poziomu akumulacji mRNA	43
III-2-12. Hybrydyzacja typu WISH	45
III-2-13. Hodowla komórek S2 <i>D. melanogaster</i>	47
III-2-14. Transformacja bakterii <i>E.coli</i>	47
III-2-15. Izolacja plazmidów w małej skali.....	48
III-2-16. Transfekcja komórek <i>Drosophila melanogaster</i> S2	48
III-2-17. Przygotowanie lizatów komórkowych.....	49
III-2-18. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	49
III-2-19. Identyfikacja białek metodą western blot	50
III-2-20. Oznaczenie retencji siRNA	51
III-2-21. Analiza filogenetyczna	51
IV. Wyniki	52
IV-1. Identyfikacja homologów SID-1 <i>C. elegans</i>	52
IV-2. Charakterystyka wzorów ekspresji genów kodujących Smed-SIDT1-3 na poziomie tkankowym, komórkowym i subkomórkowym.....	58
IV-3. Analiza <i>in silico</i> lokalizacji i struktury białek Smed-SIDT1-3	68
IV-4. Charakterystyka funkcjonalna genów <i>Smed-sidt1-3</i>	74
V. Dyskusja.....	93
VI. Wnioski.....	99
VII. Streszczenie/Abstract	100
VIII. Literatura.....	102
IX. Załączniki	110

Spis Rysunków

Rysunek I-1. Schemat przebiegu procesu RNAi.....	11
Rysunek I-2. Pobieranie egzogenego dsRNA w jelicie <i>C.elegans</i>	17
Rysunek I-3. Anatomia <i>S. mediterranea</i>	19
Rysunek I-4. Przebieg procesu regeneracji u <i>S. mediterranea</i>	20
Rysunek III-1. Wizualizacja sekwencji <i>Smed-sidt1-3</i>	30
Rysunek III-2. Graficzne przedstawienie plazmidu pAc5.1B-EGFP-DmDCP2-V5His6	32
Rysunek III-3. Graficzne przedstawienie plazmidu 21ADU42C_3180702_SIDT1_NO_EGFP	32
Rysunek III-4. Graficzne przedstawienie plazmidu 21ADU43C_3180703_SIDT2_NO_EGFP.....	33
Rysunek III-5. Graficzne przedstawienie plazmidu 21ADU44C_3180704_SIDT3_NO_EGFP.....	33
Rysunek III-6. Obrazowanie miejsca iniekcji.....	43

Rysunek IV-1. Lokalizacja chromosomowa potencjalnych homologów <i>Ce-sid-1</i> zidentyfikowanych w genomie <i>S. mediterranea</i>	53
Rysunek IV-2. Porównanie sekwencji izoform dd_Smed_v6_6063.....	54
Rysunek IV-3. Porównanie sekwencji izoform dd_Smed_v6_8231.....	55
Rysunek IV-4. Analiza jakościowa i ilościowa transkryptów <i>Smed-sidt1-3</i>	56
Rysunek IV-5. Drzewo filogenetyczne białek z rodziny SID-1.....	58
Rysunek IV-6. Zmiany poziomu ekspresji <i>Smed-sidt1-3</i> wzdłuż osi ciała <i>S. mediterranea</i>	59
Rysunek IV-7. Poziom ekspresji <i>Smed-sidt1-3</i> w trzech głównych typach komórek <i>S. mediterranea</i>	60
Rysunek IV-8. Lokalizacja tkankowa transkryptów <i>Smed-sidt1-3</i> wg atlasu PSCA	62
Rysunek IV-9. Lokalizacja tkankowa transkryptów <i>Smed-Sidt1-3</i> wg bazy danych Digiworm	63
Rysunek IV-10. Wizualizacja transkryptów metodą WISH oraz FISH	64
Rysunek IV-11. Tkankowy wzór ekspresji <i>Smed-sidt1</i>	65
Rysunek IV-12. Tkankowy wzór ekspresji <i>Smed-sidt2</i>	66
Rysunek IV-13. Tkankowy wzór ekspresji <i>Smed-sidt3</i>	67
Rysunek IV-14. Przewidywana topologia białek z rodziny SID-1	72
Rysunek IV-15. Modele struktury trzeciorzędowej białek z rodziny SID-1	73
Rysunek IV-16. Analiza stabilności ekspresji genów referencyjnych	75
Rysunek IV-17. Ocena wydajności wyciszania ekspresji genów <i>Smed-sidt1-3</i> z wykorzystaniem metody dojelitowej iniekcji dsRNA	75
Rysunek IV-18. Wydajność wyciszania ekspresji genów <i>Smed-sidt1-3</i>	76
Rysunek IV-19. Trwałość efektu wyciszenia ekspresji <i>Smed-sidt2</i> u wypławków,	77
Rysunek IV-20. Weryfikacja wpływu wyciszenia ekspresji <i>Smed-sidt1-3</i> na proces regeneracji	78
Rysunek IV-21. Poziom ekspresji genów <i>Smed-sidt</i> u <i>S. mediterranea</i> poddanych czynnikowi stresowemu – przerwanie ciągłości warstw ciała.....	79
Rysunek IV-22. Analiza poziomów ekspresji <i>Smed-sidt1-3</i> w ukł. z wyciszonym wybranym genem	80
Rysunek IV-23. Profile ekspresji genów <i>Smed-sidt1-3</i> w odpowiedzi na ranę punktową lub nastrzyknięcie obcym dsRNA	81
Rysunek IV- 24. Model $\Delta\beta$ -cat <i>S. mediterranea</i>	82
Rysunek IV- 25. Wyciszanie ekspresji genu β -cat poprzez karmienie <i>S. mediterranea</i> modyfikowanym pokarmem zawierającym dsRNA	83
Rysunek IV-26. Szczegółowy schemat eksperymentu weryfikującego zaangażowanie <i>Smed-sidt1-3</i> w proces transportu dsRNA.....	84
Rysunek IV-27. Wpływ inhibicji <i>Smed-sidt1</i> na zdolność <i>S. mediterranea</i> do pobierania ze środowiska i ogólnoustrojowego transportu dsRNA.....	85
Rysunek IV-28. Wpływ inhibicji <i>Smed-sidt2</i> na zdolność <i>S. mediterranea</i> do pobierania ze środowiska i ogólnoustrojowego transportu dsRNA.....	87
Rysunek IV-29. Wpływ inhibicji <i>Smed-sidt3</i> na zdolność <i>S. mediterranea</i> do pobierania ze środowiska i ogólnoustrojowego transportu dsRNA.....	88
Rysunek IV- 30. Schemat eksperymentu w komórkach S2 <i>D. melanogaster</i>	89

Rysunek IV-31. Ocena wydajności transfekcji komórek S2.....	90
Rysunek IV-32. Potwierdzenie efektywności transfekcji komórek S2 plazmidami zawierającymi sekwencje kodujące Smed-SIDT1-3	90
Rysunek IV-33. Analiza funkcjonalna Smed-SID1-3 w komórkach S2 <i>D. melanogaster</i>	

Spis Tabel

Tabela III-1. Zestawienie oligonukleotydów wykorzystywanych w pracy.....	28
Tabela III-2. Lista plazmidów wykorzystanych w badaniach.....	31
Tabela III-3. Podstawowe zestawy odczynników stosowane w pracy.....	34
Tabela III-4. Podstawowe odczynniki stosowane w pracy	34
Tabela III-5. Skład mieszaniny reakcyjnej degradacji DNA	37
Tabela III-6. Skład żelu agarozowego do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych	37
Tabela III-7. Skład mieszaniny do PCR.....	38
Tabela III-8. Warunki prowadzenia PCR dla produktów nie zawierających promotora T7	38
Tabela III-9. Warunki prowadzenia PCR dla produktów zawierających promotor T7.....	38
Tabela III-10. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji.....	39
Tabela III-11. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem UTP znakowanego digoksygeniną	40
Tabela III-12. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem UTP znakowanego fluoresceiną.....	40
Tabela III-13. Skład mieszaniny reakcyjnej A oraz B służącej odwrotnej transkrypcji	41
Tabela III-14. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji	41
Tabela III-15. Skład mieszanin modyfikowanego pokarmu do indukcji RNAi.....	42
Tabela III-16. Skład mieszaniny i warunki reakcji ddPCR.....	44
Tabela III-17. Skład mieszaniny RT-qPCR	45
Tabela III-18. Warunki RT-qPCR	45
Tabela III-19. Skład mieszaniny używanej do transfekcji komórek <i>D. melanogaster</i> S2.	48
Tabela III-20. Skład żelu poliakrylamidowego do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących	50
Tabela IV-1. Potencjalne homologii <i>Ce-sid-1</i> zidentyfikowane u <i>S. mediterranea</i>	53
Tabela IV-2. Uproszczona nomenklatura homologów <i>Ce-SID-1</i> zidentyfikowanych u <i>S. mediterranea</i> .	55
Tabela IV-3. Podsumowanie informacji związanych z lokalizacją tkankową transkryptów dla białek <i>Smed-SID1-3</i>	67
Tabela IV-4. Porównanie wielkości i ładunku homologów <i>Ce-SID-1</i>	68
Tabela IV-5. Przewidywana lokalizacja subkomórkowa homologów <i>Ce-SID-1</i>	69

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

- 3'UTR – 3'-końcowy region nieulegający translacji (ang. *3' untranslated region*)
- cDNA – DNA uzyskiwany na drodze odwrotnej transkrypcji (ang. *complementary DNA*)
- CRAC – motyw wiążący cholesterol (ang. *Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus sequence*)
- ddPCR – emulsyjny PCR (ang. *digital droplet PCR*)
- Dpc – dni po dekapitacji (ang. *days post-cutting*)
- Dpi – dni po iniekcji (ang. *days post-injections*)
- dsRNA – dwuniciowy RNA (ang. *double-stranded RNA*)
- ECD – domena zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular domain*)
- eRNAi – środowiskowa interferencja RNA (ang. *environmental RNA interference*)
- FBS – płodowa surowica bydłęca (ang. *fetal bovine serum*)
- GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*)
- HSV-1 – wirus opryszczki typu 1 (ang. *herpesvirus 1*)
- mRNA – RNA informacyjny (ang. *messenger RNA*)
- miRNA – mikroRNA (ang. *microRNA*)
- NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing*)
- ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)
- PAM – medium do hodowli *S. mediterranea* (ang. *Planarian Artificial Medium*)
- PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
- PTGS – potranskrypcyjne wyciszanie genów (ang. *posttranscriptional gene silencing*)
- RISC – kompleks wyciszający indukowany przez RNA (ang. *RNA induced silencing complex*)
- SDS-PAGE – elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (ang. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*)
- SID – gen związany z defektem w systemowej odpowiedzi RNAi (ang. *systemic interference defective gene*)
- siRNA – mały interferencyjny RNA (ang. *small interfering RNA*)
- srRNA – mały regulatorowy RNA (ang. *small regulatory RNA*)
- ssRNA – jednoniciowy RNA (ang. *single-stranded RNA*)
- WISH – hybrydyzacja *in situ* prowadzona na całym organizmie (ang. *whole mount in situ hybridization*)

I. Wstęp

Wprowadzenie

Rozwój oraz codzienne funkcjonowanie organizmów żywych uwarunkowane jest ich zdolnością do krótko- i długodystansowego transportu cząsteczek modulujących procesy zachodzące zarówno w pojedynczych komórkach, tkankach, jak i całych organach. Od ponad dwóch dekad, to jest od momentu odkrycia zjawiska interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) do grona tego typu molekuł zaliczane są regulatorowe RNA.

Cząsteczki RNA są obdarzonymi ładunkiem polianionami, nie mogą więc swobodnie przekraczać błon biologicznych, a ich przepływ pomiędzy komórkami lub pomiędzy kompartmentami komórkowymi wymaga udziału wyspecjalizowanych białek transporterowych. Dodatkowo, należy pamiętać, iż RNA może być nośnikiem informacji genetycznej (mRNA, genomowy RNA wirusów) lub bezpośrednio wpływać na proces ekspresji genów (tRNA, rRNA, regulatorowe RNA), stąd jego transport wewnątrzkomórkowy, jak i międzykomórkowy musi podlegać ścisłej kontroli i regulacji.

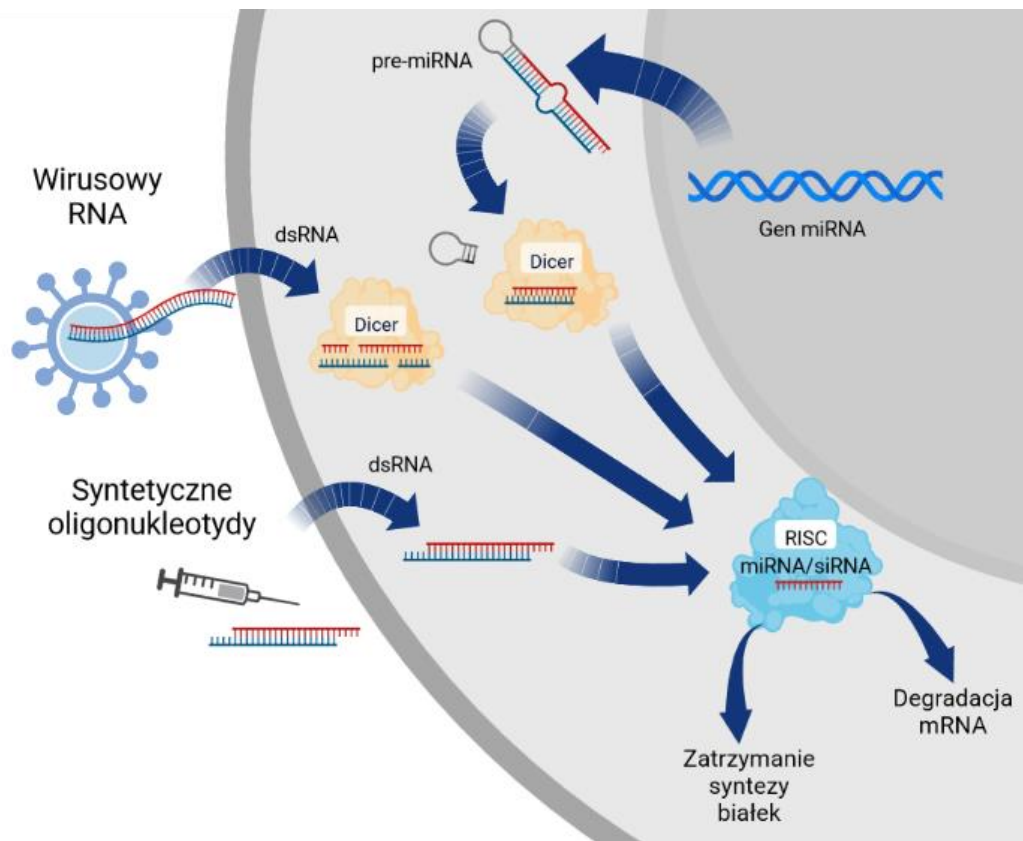
Biorąc powyższe pod uwagę, wielkie zainteresowanie oraz liczne dyskusje naukowców wzbudza fascynująca zdolność organizmów zwierzęcych do pobierania kwasów nukleinowych ze środowiska. Znaczenie biologiczne i ekologiczne tego zjawiska jest wciąż stosunkowo słabo poznane, podobnie jak podstawy molekularne importu RNA do komórek. Zdolność ta wykorzystana została do stworzenia szeregu przełomowych technik służących do badania funkcji genów. Techniki te znane są pod wspólną nazwą technologii wyciszania genów na drodze interferencji RNA.

I-1. Interferencja RNA

Jednym z podstawowych mechanizmów molekularnych umożliwiających regulację ekspresji genów i utrzymanie homeostazy organizmu jest interferencja RNA. Jest ona, zakonserwowanym ewolucyjnie procesem wyciszania genów inicjowanym przez dwuniciowe cząsteczki RNA (dsRNA, ang. *double-stranded RNA*). Przez wiele lat, obserwowano zjawisko wyciszania ekspresji genów w odpowiedzi na wprowadzenie do ustroju transgenów w różnych układach modelowych: u roślin nazywano ten efekt kosupresją lub potranskrypcyjnym wyciszaniem genów (PTGS, ang. *posttranscriptional gene silencing*) [1], u grzybów – tłumieniem genów (ang. *gene quelling*) [2]. Jednak podstawy molekularne tych zjawisk pozostawały nieuchwytnie. Przełomem okazały się badania Fire i Mello z wykorzystaniem *C. elegans*, które wykazały, że do wyciszenia ekspresji genu dochodzi na drodze degradacji mRNA inicjowanej przez dsRNA, w którym jedna z nici wykazuje komplementarność do fragmentu mRNA wyciszanego genu [3]. Znaczenie tych badań zostało docenione przyznaniem Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 2006 roku. Dziś wiemy, że RNAi jest zjawiskiem powszechnym wśród eukariontów [4]. Uważa się, że pierwotnie system ten służył do obrony gospodarza i jego genomu przed wirusami i ruchomymi elementami genetycznymi, po czym wyewoluował do poziomu jednego z podstawowych systemów kontroli ekspresji genów u zwierząt. Wykorzystanie zjawiska RNAi jako metody wyciszania genów umożliwiło wyjątkowy postęp w zrozumieniu ich funkcji w wielu organizmach oraz znalazło zastosowanie w różnorodnych gałęziach biotechnologii.

Trwające od ponad dwudziestu lat badania pozwoliły stosunkowo dobrze poznać mechanizmy molekularne leżące u podłoża zjawiska RNAi (Rysunek I-1). Wiadomo, iż jest to złożony, wieloetapowy proces angażujący szereg kompleksów enzymatycznych uczestniczących w: (i) biogenezie małych regulatorowych RNA (srRNA, ang. *small regulatory RNA*) z dwuniciowych lub częściowo dwuniciowych prekursorów, (ii) rozpoznaniu docelowych transkryptów za pomocą specyficznych sond w postaci srRNA, (iii) rekrutacji czynników degradujących lub modyfikujących mRNA w sposób uniemożliwiający translację. Dokładny skład wspomnianych kompleksów białkowych może się nieznacznie różnić w zależności od podkrólestwa, typu czy gromady, niemniej centralnymi enzymami zaangażowanymi w proces RNAi są: endorybonukleaza Dicer (lub białka typu Dicer) oraz białka Argonaute [5]. Dicer należy do rodziny RNaz III i odpowiada za dojrzewanie podstawowych typów srRNA: małych interferujących RNA

(siRNA, ang. *small interfering RNA*) powstających z dsRNA oraz mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*) wycinanych z prekursorów o strukturze typu spinki do włosów (ang. *hairpin*) [6]. Białka Argonaute stanowią oś kompleksów wyciszających (RISC, ang. *RNA-induced silencing complex*), w których siRNA lub miRNA pełnią rolę sond molekularnych umożliwiających rozpoznanie i związanie docelowych transkryptów [7].



Rysunek I-1. Schemat przebiegu procesu RNAi

Proces RNAi może być indukowane przez egzogenne cząsteczki RNA (wirusowy RNA, syntetyczne oligonukleotydy) lub endogenne RNA (pre-miRNA). W cytoplazmie stanowią one substrat dla rybonukleazy Dicer, która generuje z nich siRNA/miRNA. Cząsteczki te są następnie przekazywane do kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), w którym pełnią rolę sond molekularnych umożliwiających specyficzne rozpoznanie transkryptów podlegających regulacji poprzez degradację lub zahamowanie translacji.

Zjawisko RNAi wywoływane jest poprzez endogenne lub egzogenne RNA. Do grupy egzogennych RNA zaliczamy m.in. wirusowe RNA lub syntetyczne RNA. Na skutek funkcjonowania mechanizmu RNAi dochodzi do zatrzymania syntezy białek i/lub degradacji mRNA.

W przypadku wielu organizmów, zjawisko RNAi wydaje się mieć charakter komórkowy, tj. wyciszanie genów zachodzi jedynie w tych komórkach, w których syntetyzowane są srRNA lub w komórkach bezpośrednio eksponowanych na działanie

egzogenego dsRNA/srRNA. Niezwykłą właściwością RNAi u roślin oraz niektórych bezkręgowców, np. *C. elegans* jest jego systemowa natura: sygnały wyciszające mogą przekraczać granice komórkowe i rozprzestrzeniać się ogólnoustrojowo. Mimo że RNAi jako mechanizm komórkowy wydaje się być wysoce konserwatywny wśród eukariontów, zjawisko systemowego rozprzestrzeniania się sygnału indukującego RNAi już takie nie jest. Z drugiej strony znane są coraz liczniejsze przykłady transferu sygnału wyciszania genów pomiędzy organizmami [8,9]. Istnieje też szereg dowodów wskazujących, że cząsteczki kwasów nukleinowych inicjujące RNAi mogą być pobierane z pożywieniem, co sugeruje istnienie mechanizmu wymiany informacji między organizmami a ich środowiskiem za pomocą RNA jako cząsteczki sygnałowej.

Wyciszanie genów indukowane przez dsRNA przyjmowany z pożywieniem nazywane jest środowiskowym RNAi (eRNAi, ang. *environmental RNAi*) i obserwowane jest zarówno u organizmów wielokomórkowych jak i u jednokomórkowych takich jak pierwotniaki: *Paramecium* [10] i *Entamoeba histolytica* [11]. eRNAi stanowi podstawę techniki molekularnej powszechnie wykorzystywanej do badania funkcji genów w modelowych organizmach bezkręgowych, np. *C. elegans* czy *Schmidtea mediterranea*, znajduje ono również zastosowanie w walce z insektami będącymi szkodnikami roślin uprawnych. Przykładem jest odmiana genetycznie modyfikowanej kukurydzy MON87411 [12] (Monsanto), w której zjawisko RNAi wykorzystano do ochrony roślin przed korzeniową stonką kukurydzianą (*Diabrotica virgifera*, ang. *corn rootworm*) [13]. Larwy tego owada stanowią duże zagrożenie dla upraw kukurydzy. Zaatakowane rośliny słabiej rosną i wykazują mniejszą plenność. Zagrożenie jest tym większe, że w Ameryce Północnej i Południowej, występują populacje owada, które wykształciły oporność na najczęściej stosowane do tej pory insektycydy – endotoksyny *Bacillus thuringiensis* [14]. W roślinach MON87411 dochodzi do syntezy dsRNA zawierającego fragment sekwencji (~240 pz) transkryptu genu *Snf7 D. virgifera*. Białko Snf7 jest jednym z podstawowych komponentów III endosomalnego kompleksu sortującego odpowiedzialnego za transport (ESCRT III, ang. *endosomal sorting complex responsible for transport III*) [15]. Ekspozycja larw *D. virgifera* na dsRNA *Snf7* upośledza endogenną ekspresję tego genu w ich komórkach, prowadząc do śmierci owadów [16].

Znaczenie biologiczne istnienia mechanizmu eRNAi nie jest do końca wyjaśnione. Postuluje się, że w przypadku *C. elegans*, eRNAi umożliwia nicieniowi reagowanie na szczepy bakterii występujące w środowisku i dostosowywanie zachowania nicienia do dostępności pokarmu [17]. W przypadku pszczoły miodnej opisano ciekawy

mechanizm budowania odporności stadnej i horyzontalnego transferu informacji za pośrednictwem dsRNA i srRNA wydzielanego do mleczka, którym karmione są larwy [8].

I-2. Molekularne podstawy transportu RNA w przebiegu procesu eRNAi

Obecne rozumienie sposobu, w jaki cząsteczki dsRNA indukujące RNAi są pobierane przez zwierzęta ze środowiska, oparte jest przede wszystkim na wynikach przesiewowych badań genetycznych prowadzonych z wykorzystaniem *C. elegans*. Uważa się, że ze względu na nieprzepuszczalny oskórek (kutykulę) pokrywający prawie całą powierzchnię ciała nicienia, *C. elegans* może pobierać dsRNA jedynie przez światło jelita. Co więcej, dsRNA dostarczany z pożywieniem wywołuje u *C. elegans* efekt systemowy, który jest indukowany nawet przy braku ekspresji docelowego genu w jelicie [18]. Można zatem wnioskować, że indukcja RNAi przez dsRNA pochodzący ze środowiska zachodzi u *C. elegans* zgodnie z następującym schematem: (i) wychwytywanie dsRNA przez komórki jelita, (ii) eksport dsRNA lub sygnałów wyciszających (regulatorowych RNA powstających z dsRNA) z komórek jelitowych, (iii) import sygnałów wyciszających do innych tkanek a następnie komórek, (iv) ukierunkowane wyciszanie genów przez autonomiczną komórkową maszynę RNAi.

Analiza mutantów niezdolnych do odpowiedzi systemowej, ale z zachowaną zdolnością do wyciszania ekspresji genów na poziomie komórkowym, pozwoliła zidentyfikować w genomie *C. elegans* szereg genów związanych z tym fenotypem. Genom tym nadano wspólną nazwę SID (ang. *Systemic RNA Interference Defective*) [19]. Ich bardziej wnikliwa analiza wykazała, iż kodują one białka niezbędne do pobierania i/lub dystrybucji dsRNA w organizmie nicienia. Do tej pory najlepiej scharakteryzowanymi pod względem strukturalnym i funkcjonalnym są dwa geny: *sid-1* i *sid-2* oraz kodowane przez nie białka, odpowiednio SID-1 i SID-2.

Białko SID-1

Gen *sid-1* u *C. elegans* (*Ce-sid1*) koduje białko błonowe o długości 776 aminokwasów (aa) zbudowane z: N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej (ECD, ang. *extracellular domain*), 11 domen transmembranowych (TM), pętli cytoplazmatycznej pomiędzy TM1 i TM2 oraz krótkiej C-końcowej domeny cytoplazmatycznej [20]. Według przewidywań,

w obrębie ECD występują liczne miejsca *N*-glikozylacji, natomiast w obrębie pętli cytoplazmatycznej – miejsca fosforylacji (Ser/Thr) o potencjalnym znaczeniu regulatorowym dla funkcjonowania białka.

SID-1 funkcjonuje jak kanał/por błonowy umożliwiający pasywny transport cząsteczek RNA [20] przy czym rozpoznanie i związanie substratu odbywa się poprzez ECD. SID-1 wydajnie transportuje do wnętrza komórek dsRNA o długości 50-500 par zasad (pz) oraz jednoniciowe RNA o strukturze typu spinki (~60 nt pre-miRNA), jednak nie krótkie ssRNA (~25 nt), dsDNA, ani hybrydy RNA:DNA [20]. SID-1 nie wykazuje preferencji względem sekwencji, nie dyskryminuje również tyminy względem uracylu [20]. Ta ostatnia obserwacja wskazuje, iż rozróżnienie pomiędzy DNA i RNA odbywa się na podstawie cech strukturalnych (np. wielkość rowków helisy) i/lub obecności grupy hydroksylowej w pozycji 2' rybozy.

Zaburzone wchłanianie dsRNA przez komórki, w których dochodzi do ko-ekspresji niefunkcjonalnego mutantu SID-1^{S536I} oraz białka typu dzikiego, a także fakt, iż wydajność transportu jest zależna od stosunku obu białek, sugerują, że SID-1 funkcjonuje jako oligomer [20]. Szczegółowe analizy z wykorzystaniem komórek embrionalnych *C. elegans* oraz komórek S2 *D. melanogaster* z heterologiczną ekspresją *Ce-sid-1* wykazały prawie identyczną wrażliwość obu linii komórkowych na dsRNA [21]. Wyniki te sugerują, że komórki *C. elegans* nie wykazują ekspresji żadnych genów, które w wymierny sposób wzmacniałyby lub ograniczały transport dsRNA przez SID-1.

U *C. elegans* SID-1 występuje w błonie komórkowej większości komórek za wyjątkiem neuronów. Warto zauważyć, że neurony to jedyne komórki w ciele nicienia, które nie są obejmowane ogólnoustrojową odpowiedzią na dsRNA [22]. W neuronach *C. elegans* dochodzi do ekspresji genów zaangażowanych w biogenezę srRNA oraz etapy efektorowe RNAi są więc one zdolne do wyciszenia ekspresji genów poprzez produkowane w nich endogennie srRNA [23]. Wykazano, że ektopowa ekspresja *Ce-sid-1* uwrażliwia neurony na dsRNA pochodzenia zewnątrzkomórkowego [24]. Mutanty *Ce-sid-1* zachowują zdolność do wyciszenia genów na drodze RNAi na poziomie komórkowym, ale nie są zdolne do ogólnoustrojowej odpowiedzi na dsRNA podawany drogą pokarmową, wstrzykiwany do pseudocelomy lub dsRNA syntetyzowany *in vivo* z transgenów. Co więcej, już komórki pierwszej warstwy nabłonka jelit, tj. komórki bezpośrednio eksponowane na dsRNA przyjmowany z pożywieniem są w mutantach *Ce-sid-1* niewrażliwe na sygnały, które powinny indukować w nich RNAi [25], co wskazuje, że SID-1 u *C. elegans* uczestniczy nie tylko w systemowym

transporcie sygnałów wyciszających, ale również w pobieraniu ich ze światła jelita. Oprócz opisanych powyżej zaburzeń w zakresie RNAi, mutanty *Ce-sid-1* nie wykazują żadnych innych widocznych zmian fenotypowych, są zdrowe i płodne.

Homologii *Ce-sid1* identyfikowane są również u innych zwierząt [26,27]. Co ciekawe, występują sporadycznie w genomach bezkręgowców, natomiast są powszechne w genomach kręgowców, u których najczęściej obecne są w dwóch wariantach: *Sid1* i *Sid2* (ang. *SID-1 transmembrane family member 1/2*). Nie ma jednoznacznej korelacji między obecnością homologu *sid-1* w genomie a zdolnością danego gatunku do eRNAi lub RNAi na poziomie systemowym, np. u człowieka występują dwa (*SIDT-1* i *SIDT-2*) [28], a u *Bombyx mori* aż trzy (*sil-1-3*, ang. *sid-1-like protein 1-3*) homologi *Ce-sid-1* [29], a mimo to u organizmów tych nie stwierdzono zdolności do systemowej odpowiedzi na dsRNA pochodzący ze środowiska. Analizy filogenetyczne wskazują, że wyżej wymienione geny są bliższe ewolucyjnie *Ce-tag-130/chup-1*, tj. paralogowi *Ce-sid-1*, zaangażowanemu w transport cholesterolu, ale niezwiązanemu z transportem dsRNA [29,30]. Co ciekawe, analizy funkcjonalne ssaczych białek SIDT-1 i SIDT-2 wykazały, że łączą one obie funkcjonalności.

SIDT-1 występuje w błonie komórkowej [31] i w błonie endolizosomów [32], uczestnicząc w transporcie srRNA do cytoplazmy [26,28] oraz w międzykomórkowym transporcie cholesterolu [33]. *In vivo*, w modelu mysim wykazano, że SIDT-1 umożliwia pobieranie funkcjonalnych miRNA z żołądka, które następnie są transportowane do innych tkanek z udziałem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków błonowych [34]. SIDT-2 lokalizowany jest w błonie lizosomów, gdzie uczestniczy w imporcie RNA przeznaczonego do degradacji [35]. Myszy z niedoborem SIDT1 lub SIDT2 wykazują niższy poziom interferonu I (IFN I) w odpowiedzi na zakażenie wirusem opryszczki typu 1 (HSV-1, ang. *herpesvirus 1*) [32] i wirusem zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV) [36], co sugeruje ich zaangażowanie w odpowiedź indukowaną wirusowym dsRNA. Potwierdzeniem tej obserwacji może być również fakt, iż u myszy zakażonych HSV-1 dochodzi do podwyższenia ekspresji genu *SIDT1* w wątrobie [37].

Białko SID-2

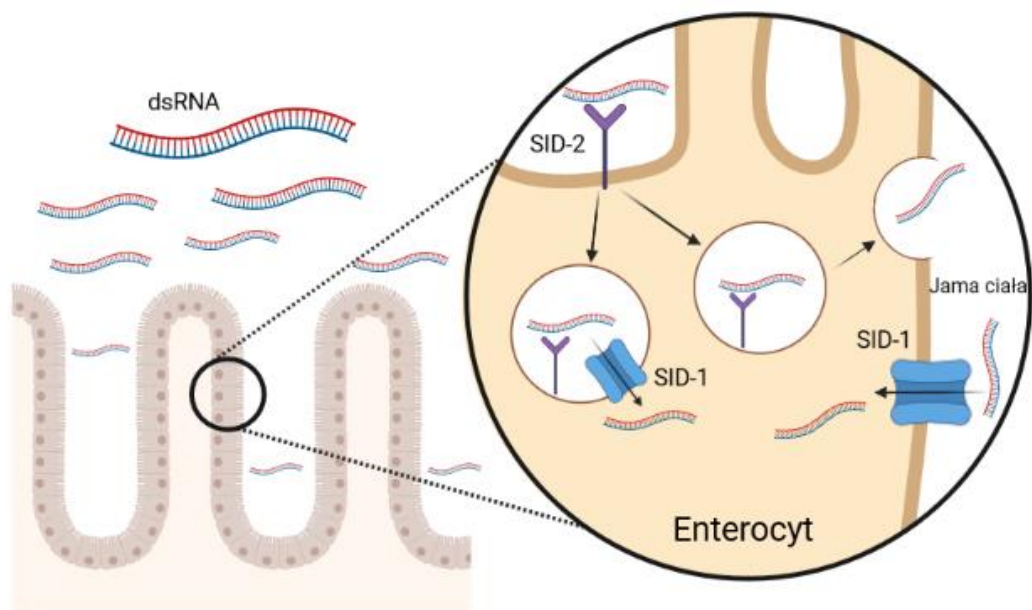
Gen *Ce-sid-2* koduje jednodomenowe białko transmembranowe (311 aminokwasów) identyfikowane w jelitach *C. elegans* [18]. Mutanty delecyjne *Ce-sid-2* wykazują wolniejsze tempo rozwoju i wzrostu [38]. W przeciwieństwie do SID-1, nie jest ono

związane z transportem dsRNA w obrębie organizmu, ale odpowiada za wychwytywanie dsRNA ze światła jelita. Uważa się, że SID-2 działa jako receptor dla dsRNA, umożliwiając jego pobór na zasadzie endocytozy do komórek [18,39].

Transport dsRNA zależny od SID-2 wymaga kwaśnego środowiska zewnątrzkomórkowego [39]. Szczegółowe analizy pozwoliły zidentyfikować kluczowe dla funkcjonowania białka histydyny zlokalizowane w części zewnątrzkomórkowej białka. Aminokwasy te w warunkach niskiego pH obdarzone są ładunkiem dodatnim, co ułatwia oddziaływania z ujemnie naładowanymi cząsteczkami RNA [39]. SID-2 wydajnie wiąże dsRNA o długości co najmniej 50 pz [39]. Do tej pory nie udało się zidentyfikować homologów *Ce-sid-2* u innych organizmów poza nicieniami.

Model funkcjonowania SID-1 i SID-2 u C. elegans

Zgromadzone dotychczas dane dotyczące struktury i funkcji SID-1 i SID-2 pozwalają zaproponować co najmniej dwa modele poboru dsRNA w jelicie *C.elegans* (Rysunek I-2) [39]. Oba zakładają, że dsRNA dostaje się do wnętrza enterocytów – komórek absorbcyjnych jelita na drodze endocytozy zależnej od SID-2 [40]. Według pierwszego scenariusza, dsRNA jest następnie uwalniane z endosomów do cytoplazmy za pośrednictwem SID-1, skąd może być dalej transportowany do sąsiednich komórek. Alternatywnie, dsRNA zamknięty w endosomach może być uwalniany na drodze egzocytozy do płynu wypełniającego pseudocelom, skąd jest pobierany przez dowolne komórki w ciele dzięki aktywności SID-1.



Rysunek I-2. Pobieranie egzogenego dsRNA w jelicie *C.elegans*

dsRNA pochodzenia egzogenego pobierany jest przez enterocyty na drodze endocytozy zależnej od białka SID-2. Następnie zamknięty w endosomach dsRNA jest uwalniany do cytoplazmy za pośrednictwem kanału SID-1 lub na drodze egzocytozy. dsRNA znajdujący się w jamie ciała może migrować i być importowany do komórek przez SID-1.

I-3. Organizm modelowy – *S. mediterranea*

Systematyka

S. mediterranea jest przedstawicielem wirków trójjelitowych (łac. *Tricladida*) zwanych inaczej wypławkami, należących do rzędu drapieźnych bezkręgowców z typu płazińców (łac. *Platyhelminthes*). Wypławki reprezentują jedne z najprostszych zwierząt trójwarstwowych (łac. *Triploblastica*), u których stwierdza się cefalizację oraz obecność złożonych układów narządów.

Środowisko życia

Wypławki są zwierzętami wolnożyjącymi, zamieszkującymi wody słodkie i słone w różnych szerokościach geograficznych oraz wilgotne gleby strefy tropikalnej [41]. *S. mediterranea* naturalnie występuje w źródłach i małych rzekach w strefie śródziemnomorskiej [41]. Zwykle bytuje przyczepiony do twardych powierzchni, np. pod kamieniami. W stanie dzikim *S. mediterranea* występują w wodzie o pH od 6,9 do 8,9

i jest zdolny do życia w temperaturach w zakresie od 0 do około 25°C. W warunkach laboratoryjnych, hodowany jest w roztworze lekko słonej wody (~0,5 g/L) o pH 6,9-8,1, w temperaturze pokojowej (~22°C).

Budowa

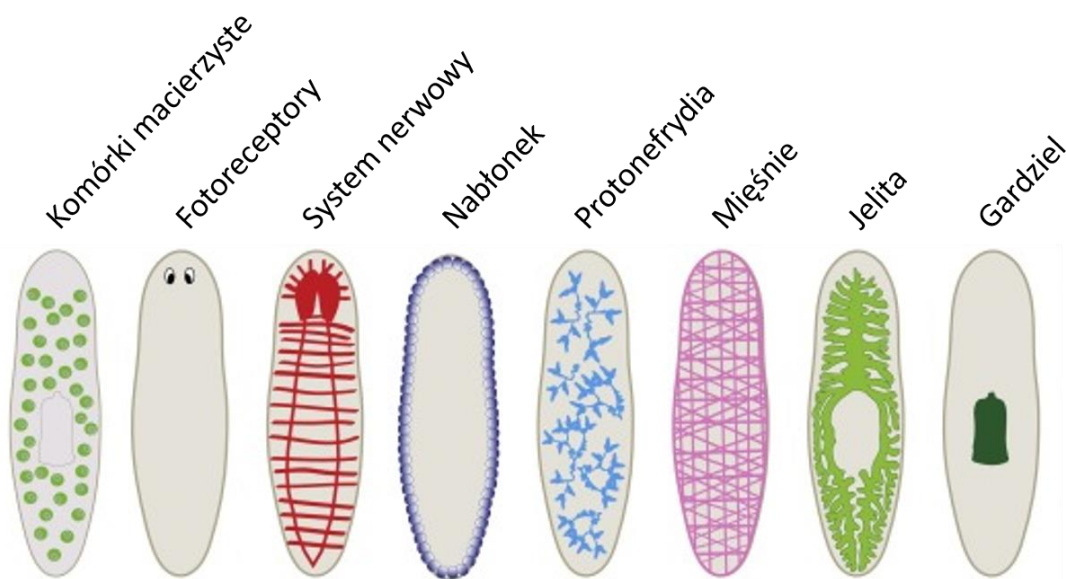
Ciało *S. mediterranea*, podobnie jak u innych wypławków, jest spłaszczone grzbieto-brzusznie, bez segmentów. Pokrywa je orzęsiony nabłonek i warstwa ochronnego śluzu. Jama ciała – przestrzeń ograniczona worem skórno-mięśniowym (pseudocel) jest wypełniona tkanką łączną (parenchymą). Układ pokarmowy ma postać otworu gębowego (pełniącego również rolę otworu odbytowego), gardzieli i rozgałęzionego, trójdzielnego jelita (Rysunek I-3) [41,42].

Układ mięśniowy wypławków tworzą trzy typy tkanki mięśniowej tj.: mięśnie okrężne, skośne oraz podłużne (Rysunek I-3). Ciało wypławków otacza gęsta i zwarta sieć podnaskórkowych włókien mięśniowych ułożonych w różnych kierunkach [41,43]. W przekroju poprzecznym wypławków można wyróżnić cztery następujące po sobie warstwy mięśni: (i) najbardziej zewnętrzną warstwę mięśni okrężnych (ii) cienką warstwę mięśni podłużnych zewnętrznych, (iii) warstwę mięśni skośnych oraz (iv) wewnętrzną warstwę mięśni podłużnych [41,44]. Mięśnie służą przede wszystkim do utrzymania kształtu i integralności ciała, wspierają również lokomocję. Skurcz mięśni tworzących gardziel umożliwia jej wysuwanie i pobieranie pokarmu. Oprócz mięśni ścian ciała, wypławki posiadają również włókna mięśniowe rozsiane wokół układu pokarmowego i narządów rozrodczych.

Układ nerwowy wypławków ma budowę drabinkową (Rysunek I-3) i składa się z prymitywnego mózgu (parzyste zwoje nerwowe) umieszczonego w przedniej części ciała, który współdziała z obwodowym układem nerwowym (podłużne pnie nerwowe) i narządami zmysłów, do których należą fotoreceptory, chemoreceptory oraz bruzdy małżowinowe [41,45,46]. Obecność plamek ocznych u wypławków nie jest obligatoryjna, u *S. mediterranea* występuje para prymitywnych oczu osadzona tuż pod warstwą epidermy w przedniej, grzbietowej części ciała. *S. mediterranea* wykazuje fotofobię [45].

Układ wydalniczy wypławków jest typu protonefrydialnego i składa się z orzęsionych komórek płomykowych oraz kanalików mających swoje ujście na powierzchni ciała zwierzęcia (Rysunek I-3) [47].

Wypławki nie mają układów: krążenia i oddechowego. Ze względu na małe rozmiary tych zwierząt, wymiana gazowa zachodzi całą powierzchnią ciała [48].



Rysunek I-3. Anatomia *S. mediterranea*

Schematy przedstawiające najważniejsze układy oraz typy tkanek w ciele *S. mediterranea*. Rysunek zaadaptowany z Adler i in. [49] za zgodą wydawcy (Załącznik 1).

Odżywianie

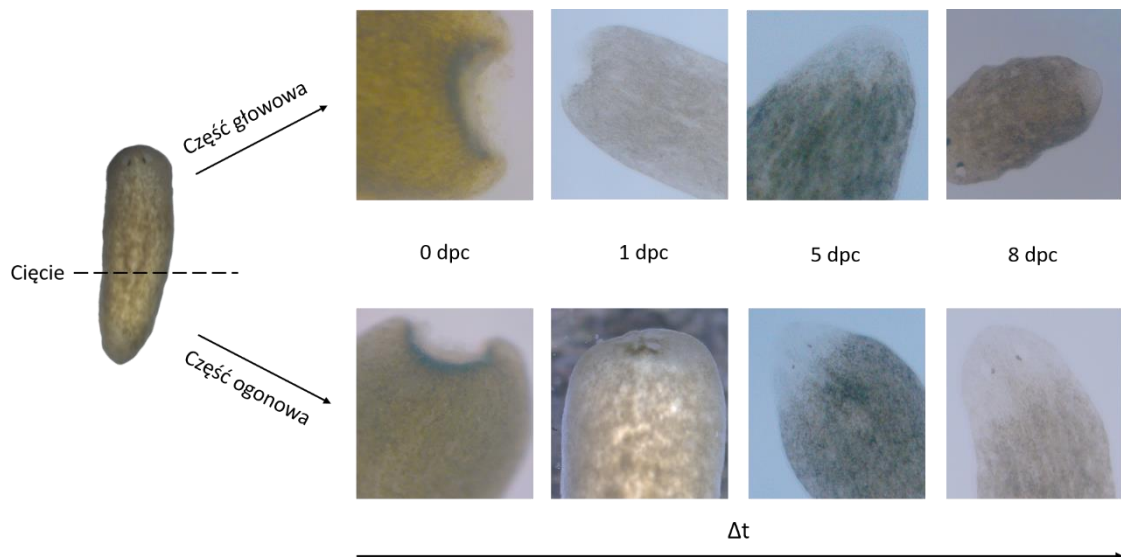
Większość wypławków to drapieżniki polujące na niewielkie bezkręgowce: skorupiaki, ślimaki, larwy owadów, niektóre zjadają też ikrę ryb [41]. W warunkach laboratoryjnych ich pokarm stanowi najczęściej wątroba (kurza lub wołowa) [50]. Wypławki pobierają pożywienie za pośrednictwem ruchomej gardzieli umieszczonej w kieszeni/woreczku gardłowym zlokalizowanym w brzusznej części ciała.

W kontekście odżywiania się wypławków należy zwrócić uwagę na zdolność tych zwierząt do przetrwania długiego czasu bez pożywienia. Na skutek głodzenia, następuje stopniowy zanik komórek i zmniejszanie się rozmiarów ciała [51]. W zależności od gatunku, wyjściowej wielkości i wieku zwierzęcia, tolerancja wydłużonego okresu postu może wynosić od kilku miesięcy do nawet roku.

Rozmnażanie

W obrębie gatunku *S. mediterranea* można wyodrębnić dwie zasadnicze linie: hermafrodytyczną rozmnażającą się płciowo przez zapłodnienie krzyżowe oraz aseksualną, niewykształcającą gonad, rozmnażającą się bezpłciowo, przez podział [52].

W warunkach naturalnych podział przebiega poprzez przyłączenie się końcówki ogona wypławka do podłoża i oderwanie przedniej części ciała w wyniku napięcia generowanego skurczami mięśni. W efekcie powstają dwa fragmenty ciała, z których po regeneracji powstają dwa niezależne organizmy. Do podziału dochodzi najczęściej po osiągnięciu przez zwierzę granicznej wielkości [53]. Rozmnażanie bezpłciowe stymulowane jest też przez niską gęstość populacji i podwyższoną temperaturę, stąd w dzikiej populacji *S. mediterranea* do rozszczepień dochodzi przede wszystkim w okresie wiosenno-letnim [41]. W warunkach laboratoryjnych rozmnażanie bezpłciowe jest prowadzone na zasadzie ekspansji klonalnej poprzez podział robaków za pomocą skalpela na mniejsze fragmenty, z których każdy utworzy nowy, kompletny organizm (Rysunek I-4) [50].



Rysunek I-4. Przebieg procesu regeneracji u *S. mediterranea*

Schemat przedstawiający kolejne etapy regeneracji *S. mediterranea* po cięciu. Dpc – dni po dekapitacji.

Zdolności regeneracyjne

S. mediterranea posiada prawie nieograniczone zdolności regeneracji warunkowane obecnością w ciele wypławka populacji komórek macierzystych, zwanych neoblastami (Rysunek I-3). Są one jedynymi aktywnymi mitotycznie komórkami wypławka i obejmują zarówno pluripotentne komórki macierzyste (cNeoblasty), jak i multipotentne wyspecjalizowane neoblasty [54]. Łącznie, oba typy neoblastów stanowią do 30% wszystkich komórek tworzących ciało robaka. Neoblasty są rozsiane w parenchymie w

obrębie całego ciała za wyjątkiem przedniej części głowy i gardzieli – jedynych fragmentów *S. mediterranea*, które po odcięciu nie są w stanie zregenerować utraconych struktur [55].

W warunkach fizjologicznych neoblasty odpowiadają za wymianę komórek i utrzymanie homeostazy tkanek, natomiast w sytuacji urazu – stanowią źródło nowych komórek. Proces regeneracji utraconych tkanek rozpoczyna się od migracji neoblastów do miejsca zranienia, gdzie następnie dochodzi do ich gwałtownych podziałów i różnicowania [56]. Wykazano, że przeszczepienie pojedynczego neoblastu jest w stanie uratować śmiertelnie napromieniowanego wyplawka (promieniowanie γ selektywnie eliminuje neoblasty) i przywrócić mu zdolności regeneracyjne [57].

Należy odnotować, iż nie wszystkie wyplawki posiadają tak dużą zdolność do regeneracji jak *S. mediterranea* [48], np. pospolity w Polsce wyplawek biały (*Dendrocoelum lacteum*) nie jest w stanie odtworzyć części głowowej, jeśli zostanie przecięty poniżej linii gardzieli [58].

Wykorzystanie S. mediterranea jako modelu badawczego

S. mediterranea stanowi doskonały model do badań procesów regeneracji, plastyczności tkanek oraz funkcjonowania komórek macierzystych. Jedną z najpowszechniej wykorzystywanych laboratoryjnie linii *S. mediterranea* jest klonalna, aseksualna linia CIW4 wyprowadzona z pojedynczego osobnika odłowionego w Barcelonie w latach 70 ubiegłego wieku [58]. Jako model badawczy, CIW4 cechuje relatywnie niewielki, diploidalny genom ($2n = 8$, ~ 782 Mbp), którego sekwencja została już w dużym stopniu poznana [60]. Jediną techniką stosowaną obecnie do charakterystyki funkcjonalnej genów wyplawków jest wyciszanie ich ekspresji na drodze RNAi indukowanej poprzez wprowadzanie do organizmu dsRNA o długości od kilkuset do kilku tysięcy par zasad. Najczęściej przeprowadza się mikroiniekcję syntetycznego dsRNA do światła jelita lub karmi się zwierzęta pokarmem zawierającym dsRNA lub modyfikowane bakterie, w których dochodzi do syntezy odpowiedniego dsRNA.

II. Cel

Jak wspomniano we Wstępie, RNAi jest podstawowym mechanizmem regulacji ekspresji genów u eukariota. Został on z powodzeniem zaadaptowany zarówno do badania funkcji genów, jak i rozwoju nowych terapii (np. antywirusowych) czy nowych generacji środków ochrony roślin (pestycydów, fungicydów i herbicydów). Powszechne wykorzystanie RNAi w biologii molekularnej i biotechnologii związane jest m.in. z możliwością indukowania ogólnoustrojowego efektu wyciszenia poprzez lokalne podanie dsRNA z pokarmem/medium hodowlanym lub poprzez jego wstrzyknięcie do światła jelita. Pomimo tego, iż technologia RNAi jest praktycznie wykorzystywana od ponad 20 lat, podstawy molekularne procesu pobierania dsRNA i transportu cząsteczek sygnałowych pomiędzy komórkami pozostają wciąż słabo poznane. Jak dotąd zjawisko to zostało najwszechstronniej zbadane u *C. elegans*, u którego zidentyfikowano białka o charakterze transporterów (SID-1) i receptorów (SID-2) dsRNA. Ponadto, wykazano zaangażowanie obu białek w proces indukowania RNAi. Na podstawie zebranych dotąd informacji sądzić można, że nie u wszystkich zwierząt mechanizmy poboru i transportu dsRNA są identyczne jak opisane dla nicienia.

Biorąc powyższe pod uwagę, przyjęto że podstawowym celem niniejszej pracy doktorskiej będzie identyfikacja oraz charakterystyka funkcjonalna białek, które u *S. mediterranea* (wyplawka reprezentującego podstawowy model wykorzystywany w badaniach regeneracji), zaangażowane są w pobieranie ze środowiska i międzykomórkowy transport kwasów nukleinowych. Osiągnięcie tak zarysowanego celu związane było z realizacją następujących zadań szczegółowych:

- (i) Identyfikacja potencjalnych homologów *sid-1* w genomie *S. mediterranea*;
- (ii) Analiza bioinformatyczna i molekularna poziomu oraz specyficzności tkankowej ekspresji domniemanych homologów – *sid-1* *S. mediterranea*;
- (iii) Analiza strukturalna *in silico* zidentyfikowanych białek *S. mediterranea*;
- (iv) Analiza funkcjonalna zidentyfikowanych białek *in vivo* w modelu *S. mediterranea* oraz *in vitro* w modelu heterologicznym *D. melanogaster*.

III. MATERIAŁY I METODY

III-1. Materiały

III-1-1. Podstawowe bufony i roztwory

Bufor 10×PBS, pH 7,4

- 1370 mM NaCl
- 27 mM KCl
- 43 mM Na₂HPO₄
- 14,7 mM KH₂PO₄

Bufor 10×TBE

- 890 mM Tris
- 890 mM H₃BO₃
- 20 mM EDTA

Bufor 10×TGS

- 0,25 M Tris-HCl, pH 8,3
- 1,92 M glicyna
- 1% SDS

III-1-2. Hybrydyzacja *in situ* typu WISH (ang. *whole mount in situ hybridization*)

Roztwór uśmiercający *S. mediterranea*

- 7,5% N-Acetylo-L-cysteina (NAC) rozpuszczona w 1x PBS

Bufor 1×PBSTx

- 1×PBS
- 0,3% Triton X-100

Roztwór utrwalający tkanki

- 12,5% formaldehyd
- 0,9×PBSTx (przygotowywany na świeżo)

Bufor 20×SSC

- 3 M NaCl
- 0,3 M cytrynian sodu, pH 7,0

Bufor 2×SSCx

- 2×SSC
- 0,1% Triton X-100

Roztwór wybielający

- 0,5×SSC
- 1,2% H₂O₂
- 5% formamid

Roztwór proteolityczny

- 1×PBSTx
- 0,1% (w/v) SDS
- Proteinaza K w stężeniu końcowym 10 ng/μl

Bufor prehybrydyzacyjny

- 50% dejonizowany formamid
- drożdżowy RNA w stężeniu końcowym 0,1 mg/ml
- 5×SSC
- 1% Tween 20

Bufor hybrydyzacyjny

- 50% dejonizowany formamid
- drożdżowy RNA w stężeniu końcowym 0,1 mg/ml
- 5×SSC
- 1% Tween 20
- 5% siarczan dekstranu

Bufor płuczący I

- 1×SSCx
- 25% dejonizowany formamid
- 2,5×SSC

- 0,5% Tween 20

Bufor płuczący II

- 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5
- 0,15 M NaCl
- 0,3% Triton X-100

Bufor blokujący

- 5% surowica końska w buforze płuczącym II

Medium do hodowli *S. mediterranea* (PAM, ang. *Planarian Artificial Medium*)

- 9,35 g NaCl
- 14,70 g CaCl₂ × 2 H₂O
- 12,04 g MgSO₄
- 2,03 g MgCl₂
- 0,75 g KCl
- 10,08 g NaHCO₃

Wszystkie składniki rozpuszczono w 1 l H₂O, uzyskując 10×PAM, który przed użyciem rozcieńczano wodą do stężenia 1×.

Medium do hodowli komórek S2 *D. melanogaster*

- Schneider's Drosophila Medium
- 10% płodowa surowica bydłęca (FBS, ang. *Fetal bovine serum*)

Inne:

- 10% wodny roztwór APS (10%)
- 0,5 M wodny roztwór EDTA, pH 8
- 10% wodny roztwór SDS
- wodny roztwór ampicyliny o stężeniu końcowym 100 mg/ml

III-1-3. Pożywki bakteryjne

Pożywka stała LB z ampicyliną

- 2 g peptonu
- 1,25 g wyciągu drożdżowego
- 1,25 g NaCl

- 3,75 g agaru

Dopełniano H₂O do 250 ml i sterylizowano w autoklawie. Po schłodzeniu do temperatury około 55°C do mieszanki dodawano 500 µl wodnego roztworu ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml (stężenie końcowe 200 µg/ml).

Pożywka płynna LB z ampicylina

- 10 g peptonu
- 5 g wyciągu drożdżowego
- 5 g NaCl

Dopełniano H₂O do 1 l i sterylizowano w autoklawie. Do 1 l schłodzonej pożywki LB dodawano 2 ml roztworu ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml (stężenie końcowe 200 µg/ml).

III-1-4. Żele

Żel agarozowy 1% do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych

- 0,5 g agarozy
- 50 ml 1×TBE
- 1 µl Midori Green Advanced DNA stain

Żele analityczne do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących

Żel rozdzielający 15% (2 żele o grubości 1 mm)

- 4,5 ml 40% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1
- 4,4 ml 1 M bufor Tris-HCL, pH=8,8
- 120 µl 10% APS
- 120 µl 10% SDS
- 6 µl TEMED
- 2,98 ml H₂O

Żel rozdzielający 5% (2 żele o grubości 1 mm)

- 625 µl 40% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1
- 630 µl 1 M bufor Tris-HCL, pH=6,8
- 50 µl 10% APS
- 500 µl 10% SDS

- 5 μ l TEMED
- 3,6 ml H₂O

III-1-5. Bufory obciążające

6× stężony bufor obciążający stosowany do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych (6×LD I, ang. *loading dye*)

- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
- 50 mM EDTA
- 10% Ficoll 400
- 0,25% błękit bromofenolowy
- 0,25% cyjanian ksylenu

4× stężony bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących (4×LD II, ang. *loading dye*)

- 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 20% v/v β -merkaptoetanol
- 8% SDS
- 0,15% błękit bromofenolowy
- 40% glicerol

III-1-6. Materiał biologiczny

- W badaniach *in vitro* wykorzystano linię komórek *Drosophila* S2 Cells (Gibco™); materiał do analiz stanowiły żywe komórki (bioobrazowanie, analizy funkcjonalne) lub izolowana z nich frakcja białkowa (western blot)
- W badaniach *in vivo* wykorzystano wyprawka *S. mediterranea* (linia klonalna CIW4, rozmnażająca się bezpłciowo). Gatunek ten występuje na obszarach przybrzeżnych w zachodniej części Morza Śródziemnego. Zwierzęta hodowane w ICHB PAN są klonami organizmów sprowadzonych z laboratorium Kerstin Bartscherer w Instytucie Biomedycyny Molekularnej im. Maxa Plancka w Monachium. Utrzymywana tam hodowla została wyprowadzona ze *S. mediterranea* odłowionych z fontanny Montjuic w Barcelonie. Materiałem badawczym w prezentowanej pracy były całe organizmy: żywe (badania

dotyczące regeneracji) lub utrwalone (WISH), jak również RNA izolowany z uśmierconych wypławków.

- Do propagacji plazmidów na potrzeby analiz funkcjonalnych wykorzystano bakterie *E. coli* DH5 α (Gibco™).

III-1-7. Oligonukleotydy

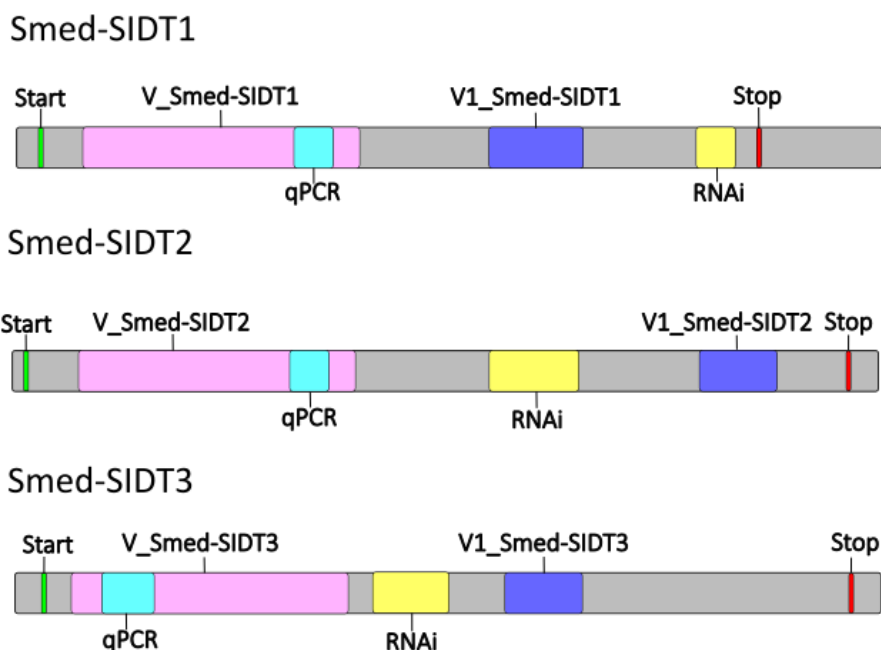
W badaniach wykorzystano jednoniciowe oligonukleotydy DNA zakupione w firmie Invitrogen oraz Genomed. Sekwencje wszystkich oligomerów przedstawiono w Tabeli III-1.

Tabela III-1. Zestawienie oligonukleotydów wykorzystywanych w pracy

Na pomarańczowo zaznaczono sekwencję promotora polimerazy T7

Nazwa	Sekwencja 5'-3'
Startery do reakcji RT-qPCR oraz ddPCR	
qPCR_6063_F	GGCCGGCGCATTGAACAAAC
qPCR_6063_R	GCTGTCCTGCGTTCGGATCT
qPCR_8231_F	CCATGGTGGGAGATCACTTT
qPCR_8231_R	GCATTGGATTTCGTCTTGGTT
qPCR_8407_F	CGAGATCCACATTAAGGGTGC
qPCR_8407_R	CAGGAAACGGACAAACCGTTC
EF-2_F	TGCTGGTGACACTTTGCTTC
EF-2_R	CATCACCAAGTGTCCGTTTG
Startery do syntezy matrycowego DNA do transkrypcji <i>in vitro</i> sond wykorzystywanych do hybrydyzacji typu WISH	
smed_gata456_V_Rev	TAATACGACTCACTATAGGGATGTGATTGAAGGGCTGGAC
smed_gata456_V_Fwd	GGCTTTATCACCGAATCGAA
smed_porcn_V_Fwd	TCAGCGCATTGGTAACGTA
smed_porcn_V_Rev	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGAGCCATCTTGTTGTGG
smed_acs11_V_Fwd	TTCAGCCGCTAATTATCAC
smed_acs11_V_Rev	TAATACGACTCACTATAGGGTCAATGTTGGAGTAAGGAGG
smedwi1_V_Fwd	TACAGCCTGATACAGTTAC
smedwi1_V_Rev	TAATACGACTCACTATAGGGTTGTAGTAGAATACCCTCCC
CTSL2_F_VIS	GCCTCATGGATAACGCATTT
CTSL2_R_VIS	TAATACGACTCACTATAGGTTGGTTTACTGGCGTCGAT
Fwd_V_Smed-SIDT1	TTGGCGTGATTGGAGTTGTC
Rev_V_Smed-SIDT1	TAATACGACTCACTATAGCGAACGACATGATCTGGACAC
Fwd_V1_Smed-SIDT1	TCATCGCAGTCTCAATCGGC

Rev_V1_Smed-SIDT1	TAATACGACTCACTATAGGCACCACTTCTTGTCACCGA
Fwd_V_Smed-SIDT2	AAGTACCGGTAAAGGCAGCA
Rev_V_Smed-SIDT2	TAATACGACTCACTATAGGGCATTGGATTCTGCTTGGTT
Fwd_V1_Smed-SIDT2	CCTTGGCCAGAAATGAAGCA
Rev_V1_Smed-SIDT2	TAATACGACTCACTATAGCTGCATGGGAATTGACCGAC
Fwd_V_Smed-SIDT3	AAATGTTGAAAATGGGACGA
Rev_V_Smed-SIDT3	TAATACGACTCACTATAGGGTGTGTTTTATCGTGTTGTGAAATT AGG
Fwd_V1_Smed-SIDT3	AGGGGATCAAGATACGTGCT
Rev_V1_Smed-SIDT3	TAATACGACTCACTATAGCAATGAAACTCCCATCGCGT
Startery służące do syntezy matrycowego DNA do transkrypcji <i>in vitro</i> dsRNA wykorzystywanego do indukcji RNAi	
RNAi_Smed-SIDT1_F	TAATACGACTCACTATAGGGATAGCAATGGTTTGTGGGG
RNAi_Smed-SIDT1_R	TAATACGACTCACTATAGGGTTTTGTCTGACCACATTCACA
RNAi_Smed-SIDT2_F	TAATACGACTCACTATAGGGTTTATAATTTCCGATGCGCC
RNAi_Smed-SIDT2_R	TAATACGACTCACTATAGGGCTGGTGGATAACGCCAATG
RNAi_Smed-SIDT3_F	TAATACGACTCACTATAGGGGGAGCAATCGGATTCTTTCT
RNAi_Smed-SIDT3_R	TAATACGACTCACTATAGGGACTGAACCACGGGTAATCCA
RNAi_T7_bcat_F	TAATACGACTCACTATAGGGATCCTTCAAATACCAACGCAA
RNAi_T7_bcat_R	TAATACGACTCACTATAGGGCTCACAGCTTCTGCATGCTC
Pozostałe oligonukleotydy	
8231_PCR_ver_1_F	TATAATTTCCGATGCGCCCGA
8231_PCR_ver_1_R	AACAAGCAGAAGCCAAACCAA
F_SIDT1_ampl	CTTACAATGAATTATTATATTTTC
R_SIDT1_ampl	TTAGAAAACGATAATTTTATC
F_SIDT2_ampl	GATAATGAAAGTCTTGTTGTTTATC
R_SIDT2_ampl	AAATATTTAATATTGTTCATTTCTTGG
F_SIDT3_ampl	TTGATAAATGAAAATTTTAGTTGC
R_SIDT3_ampl	CCTTATTAGAAAACAGCAATTTTGT



Rysunek III-1. Oligonukleotydy wykorzystywane do badania transkryptów *Smed-sidt1-3*

Schematyczne przedstawienie transkryptów *Smed-sidt1-3*, na których zostały zaznaczone miejsca hybrydyzacji starterów przedstawionych w Tabeli III-1. Oznaczono miejsca wiązania sond molekularnych wykorzystywanych do hybrydyzacji typu WISH V_Smed-SIDT (Sonda 1, kolor różowy) oraz V1_Smed-SIDT (Sonda 2, kolor niebieski) oraz miejsca komplementarne do dsRNA wykorzystywanego w procesie RNAi (kolor żółty). Ponadto zaznaczono miejsca podlegające amplifikacji w reakcji RT-qPCR oraz ddPCR (oznaczone jako qPCR, kolor seledynowy).

III-1-8. Przeciwciała

- Pierwszorzędowe przeciwciało kozie poliklonalne przeciwko V5 (ang. *Anti-V5 antibody produced in rabbit*) 2,5 µg/mL, stosowane rozcieńczenie 1:1000, producent: Sigma-Aldrich
- Drugorzędowe przeciwciało kozie poliklonalne przeciwko króliczym IgG sprzężone z fosfatazą alkaliczną (ang. *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, AP*) 1 mg/ml, stosowane rozcieńczenie 1:5000, producent: Invitrogen
- Drugorzędowe przeciwciało kozie poliklonalne przeciwko króliczym IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (ang. *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP*) 1 mg/ml, stosowane rozcieńczenie 1:5000, producent: Invitrogen

- Pierwszorzędowe przeciwciało mysie monoklonalne przeciwko alfa tubulinie, (ang. *Anti- α -Tubulin antibody, Mouse monoclonal (DM1A) IgG1*) 1 mg/ml, stosowane rozcieńczenie 1:10000, producent: Sigma-Aldrich

Przeciwciała stosowane do immunobarwienia

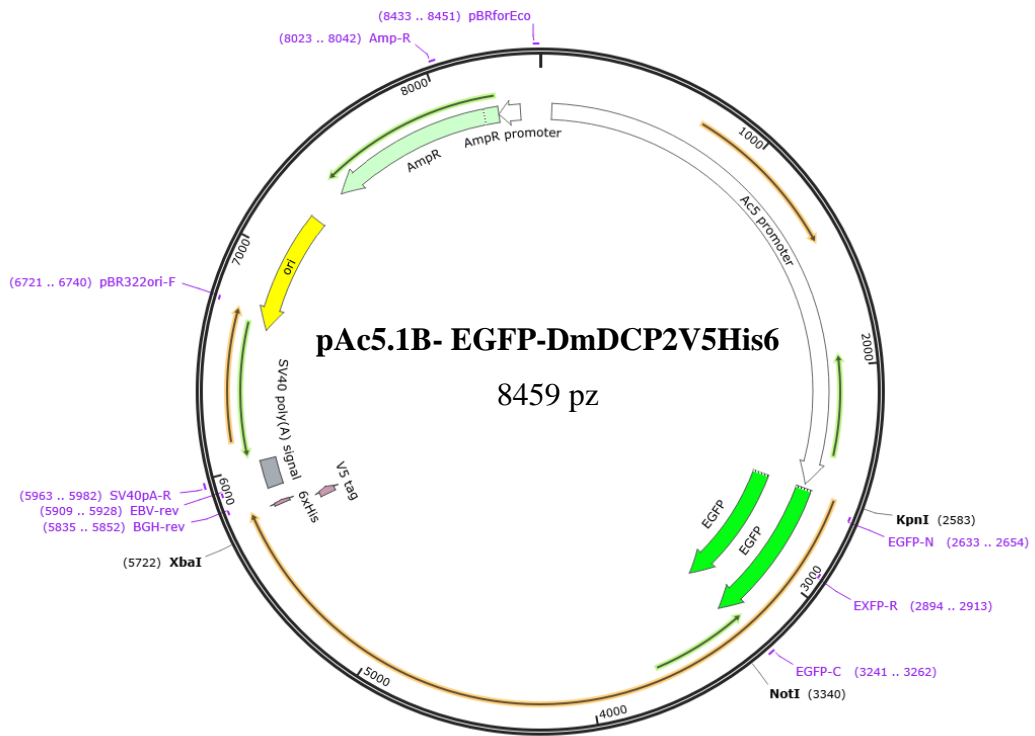
- Przeciwciało owcze poliklonalne przeciwko digoksygeninie sprzężone z alkaliczną fosfatazą (ang. *Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments*) stosowane rozcieńczenie 1:2000, producent: Roche
- Przeciwciało owcze poliklonalne przeciwko fluoresceinie sprzężone z alkaliczną fosfatazą (ang. *Anti-Fluorescein-AP, Fab fragments*) stosowane rozcieńczenie 1:2000, producent: Roche

III-1-9. Plazmidy

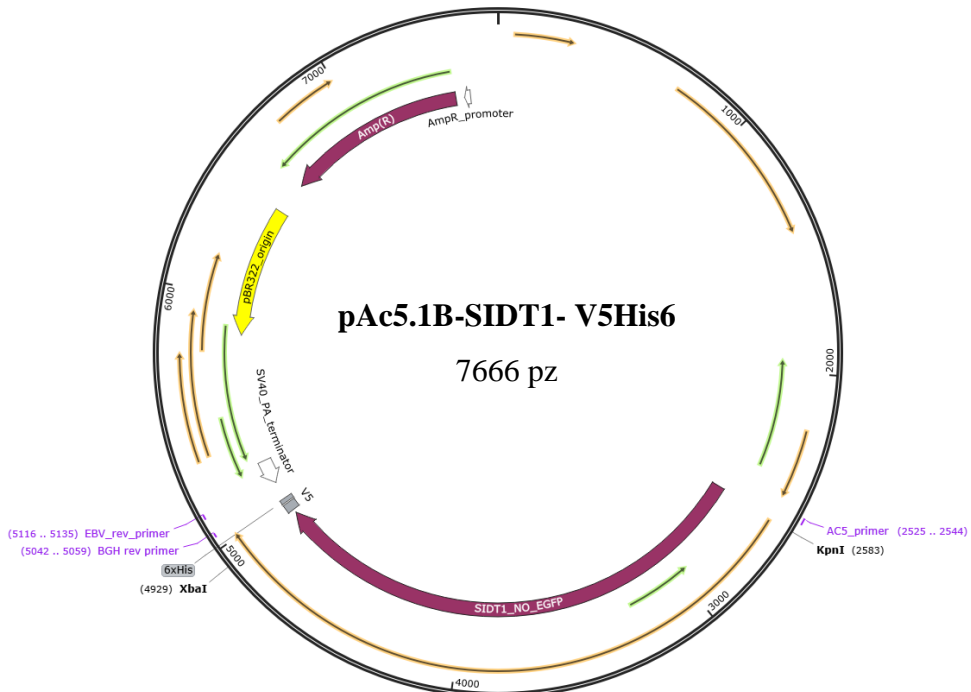
W doktoracie wykorzystano wektor pAc5.1B-EGFP-DmDCP2-V5His6 (Addgene), który posłużył do opracowania konstruktów genetycznych kodujących białka Smed-SIDT. Konstrukty te zostały zaprojektowane w taki sposób, aby umożliwiały ekspresję sekwencji kodujących Smed-SIDT-1/-2/-3 ze znacznikami: V5 i histydynowym na końcu karboksylowym białka. W Tabeli III-2. przedstawiono listę plazmidów wykorzystanych w badaniach. Procedurę klonowania molekularnego na podstawie sekwencji zaprojektowanych w ICHB PAN zlecono firmie Invitrogen. Poglądowe mapy plazmidów przedstawiono na Rysunek III-2 do 5.

Tabela III-2. Lista plazmidów wykorzystanych w badaniach

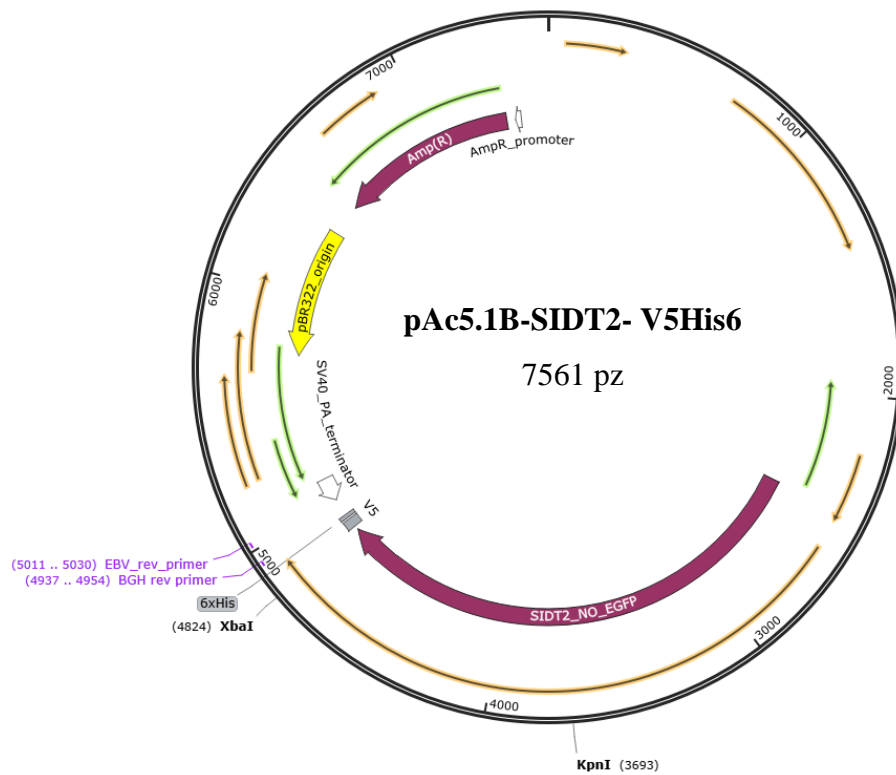
Nazwa plazmidu	Szkielet wektora	Nazwa genu	Rozmiar genu	Znacznik molekularny produktu białkowego
pAc5.1B-EGFP-DmDCP2-V5His6	pAc5.1B-V5His6	EGFP-DmDCP22	3228 bp	V5, znacznik histydynowy
pAc5.1B-SIDT1-V5His6	pAc5.1B-V5His6	SIDT1	2356 bp	V5, znacznik histydynowy
pAc5.1B-SIDT2-V5His6	pAc5.1B-V5His6	SIDT2	2379 bp	V5, znacznik histydynowy
pAc5.1B-SIDT3-V5His6	pAc5.1B-V5His6	SIDT3	2440 bp	V5, znacznik histydynowy



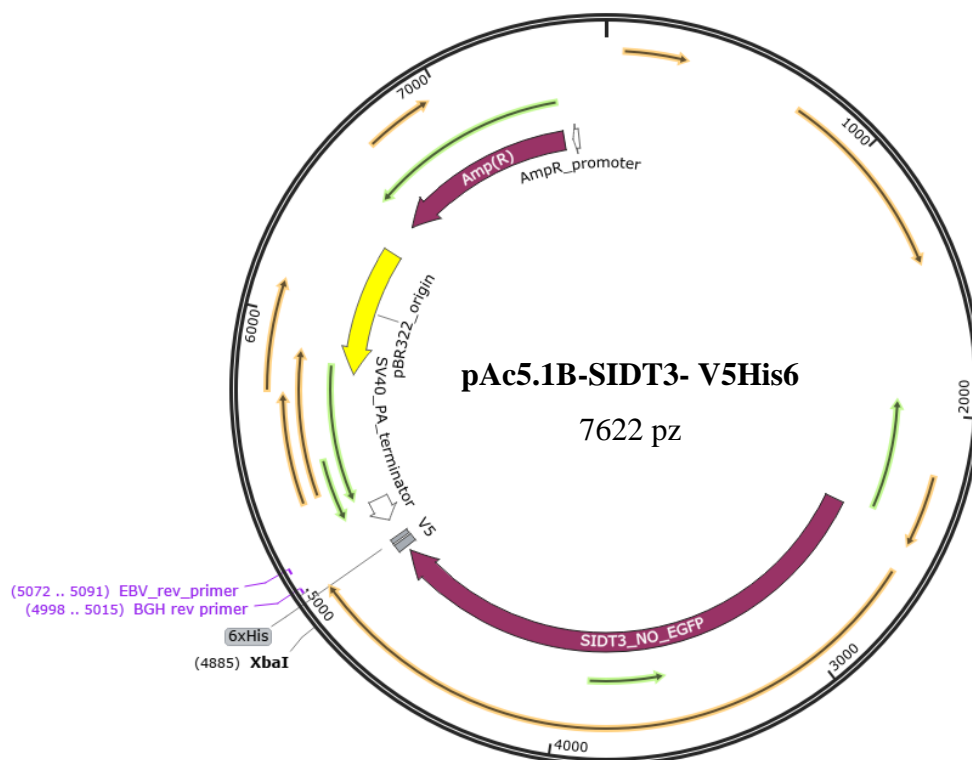
Rysunek III-2. Graficzne przedstawienie plazmidu pAc5.1B-EGFP-DmDCP2-V5His6



Rysunek III-3. Graficzne przedstawienie plazmidu pAc5.1B-SIDT1-V5His6



Rysunek III-4. Graficzne przedstawienie plazmidu pAc5.1B-SIDT2- V5His6



Rysunek III-5. Graficzne przedstawienie plazmidu pAc5.1B-SIDT3- V5His6

III-1-10. Zestawy odczynników

Tabela III-3. Podstawowe zestawy odczynników stosowane w pracy

Zestawy gotowych odczynników	Producent
NucAway™ Spin Columns	Ambion
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Invitrogen
Herculase II Fusion DNA Polymerases	Agilent
AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit	Lucigen
HighYield T7 Digoxigenin RNA Labeling Kit	Jena Bioscience
HighYield T7 Fluorescein RNA Labeling Kit	Jena Bioscience
SuperScript™ IV Reverse Transcriptase	Invitrogen
QIAprep Spin miniprep kit	Qiagen
Power Blotter Select Transfer Stacks PVDF, Mini SIZE	Invitrogen

III-1-11. Spis odczynników i producentów wykorzystanych w pracy

Tabela III-4. Podstawowe odczynniki stosowane w pracy

Nazwa producenta	Odczynnik
BioShop	agar, agaroz, akrylamid/N,N'-bisakrylamid w stosunku 29:1, C ₂ H ₃ NaO ₂ , EDTA, glicyna, HCl, H ₃ BO ₃ , KCl, KH ₂ PO ₄ , kwaśny fenol:chloroform, NaCl, Na ₂ HPO ₄ , pepton, TEMED, Tris, Tris-HCl, Tween-20,
Chempur	cytrynian sodu, etanol, formamid, metanol,
ThermoScientific	dNTP Set 100 mM Solutions, SuperBlock T20 (PBS) Blocking,
Sigma	dejonizowany formamid, formaldehyd, H ₂ O ₂ , N-Acetylo-L-cysteina, siarczan dekstranu, surowica końska, Triton X-100,
ThermoFisher	GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, RiboRuler High Range RNA Ladder, Yeast Total RNA,
Gibco	Schneider's Drosophila Medium, FBS
Nippon Genetics	Midori Green Advanced DNA stain,
Invitrogen	10X Turbo DNase Buffer , Block-iT, DTT, Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard, RNase Out (100 mM), S.O.C. Medium,

	SuperScript™ IV Reverse Transcriptase, TURBO™ DNase (2 U/μL),
Solis biodyne	HOT FirePol EvaGreen qPCR Supermix
EurX	Perfect Plus 1 kb DNA ladder Perfect Tricolor Protein Ladder, Random Hexamer Primers (500 ng/ μl)

III-2. Metody

III-2-1. Hodowla *S. mediterranea*

Hodowle wyplawków prowadzono w plastikowych pojemnikach, których rozmiar był dostosowany do liczby organizmów wykorzystywanych do eksperymentów. Wyplawki hodowano w ciemności, w stałej temperaturze 20°C, w medium 1×PAM. Zwierzęta karmiono 1-2 razy w tygodniu kurzą wątrobą.

III-2-2. Izolacja RNA z organizmu *Schmidtea mediterranea*

RNA izolowano z wykorzystaniem zestawu mirVana™ miRNA Isolation Kit. *Schmidtea mediterranea* w liczbie między 5-10 przenoszono do próbek o objętości 1,5 ml, a następnie mrożono poprzez zanurzenie próbek w ciekłym azocie na co najmniej 2 min. Do próbek dodawano 300 µl buforu lizującego (Lysis/Binding Buffer), a następnie próbki intensywnie worteksowano (1 min). Do lizatu dodawano 30 µl miRNA Homogenate Additive i inkubowano przez 10 min w temperaturze 4°C. W celu przeprowadzenia rozdziału kwasów nukleinowych i białek do zawiesiny dodawano 300 µl mieszaniny kwaśnego fenolu:chloroformu i intensywnie mieszano przez 1 min. Próbkę wirowano przez 5 min z prędkością 13000 rpm w temperaturze 4°C. Fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do świeżej próbki i mieszano z 375 µl 100% etanolu. Mieszaninę nanoszono na kolumnę (Filter Cartridge) i wirowano przez 15 s (1000 rpm). Kolumnę przepłukiwano buforem miRNA Wash Solution 1 (700 µl) oraz dwukrotnie buforem miRNA Wash Solution 2/3 (500 µl), każdorazowo wirując przez 10 s przy prędkości 12000 rpm i usuwając przesącz. Po ostatnim płukaniu kolumnę wirowano przez 1 min z prędkością 13000 rpm. Następnie, kolumnę przenoszono do nowych próbek i dodawano 50 µl H₂O wolnej od RNaz podgrzanej do 95°C. Po jednoczynowej inkubacji, próbki wirowano przez 30 s z prędkością 12000 rpm.

W celu usunięcia DNA, otrzymany przesącz traktowano DNazą. Skład mieszaniny reakcyjnej opisano w Tabeli III-5. Reakcje prowadzono przez 30 min w temperaturze 37°C w termocyklerze T100 (Bio-Rad). Następnie, mieszaninę oczyszczano stosując metodę precypitacji w etanolu. Stężenie RNA oznaczano spektrofotometrycznie (Multiscanning High Sky, ThermoScientific) a jakość analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym.

Tabela III-5. Skład mieszaniny reakcyjnej degradacji DNA

Składnik	Objętość
RNA	5 μ l
10X Turbo DNase Buffer	5 μ l
RNase Out (100 mM)	1 μ l
TURBO™ DNase (2 U/ μ L)	1 μ l
H ₂ O	do 50 μ l

III-2-3. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych prowadzono w 1% żelach agarozowych (Tabela III-6) w buforze 1×TBE w następujących warunkach: 120 V, 6,72 W, 56 mA, 45 min. Rozdzielone cząsteczki kwasów nukleinowych uwidoczniano w świetle UV, dzięki zastosowaniu barwnika kwasów nukleinowych Midori Green. Obraz zapisywano przy pomocy systemu do dokumentacji żeli ChemiDoc XRS+(Bio-Rad).

Tabela III-6. Skład 1% żelu agarozowego do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych

Składnik	Ilość
Bufor 1×TBE	50 ml
Agaroza	0,5 g
Midori Green Advanced DNA stain	1 μ l

III-2-4. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

PCR wykorzystywano do syntezy matryc do transkrypcji *in vitro*. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w Tabeli III-7. Z uwagi na różne długości oczekiwanych produktów reakcji wyszczególnić należy dwa podstawowe schematy prowadzenia reakcji przedstawione w Tabeli III-8 i Tabeli III-9. Wszystkie reakcje prowadzono w termocyklerze T100 (Bio-Rad).

Tabela III-7. Skład mieszaniny do PCR

Składnik (stężenie początkowe)	Ilość
matryca DNA	200-1000 ng
starter homologiczny do końca 5' powielanego fragmentu (10 μM)	1,25 μl
starter komplementarny do końca 3' powielanego fragmentu (10 μM)	1,25 μl
bufor reakcyjny 5x (Herculase buffer II, w zestawie)	10 μl
dNTPs (25 mM każdy)	0,5 μl
Herculase II Fusion DNA polymerase	0,5 μl
H ₂ O	do 50 μl

Tabela III-8. Warunki prowadzenia PCR dla produktów nie zawierających promotora T7

numer etapu	etap	czas trwania	temperatura	liczba cykli
1	Denaturacja	2 min	95°C	-
2	Denaturacja	20 s	95°C	30
	Hybrydyzacja	20 s	(TM)*	
	Elongacja	30 - 45 s	72°C	
3	Elongacja	10 min	72°C	-

* zależna od temperatury topnienia użytych starterów – TM obliczono wg wzoru $TM=2(A+T)+4(G+C)-5$ [°C]

Tabela III-9. Warunki prowadzenia PCR dla produktów zawierających promotor T7

numer etapu	etap	czas trwania	temperatura	liczba cykli
1	Denaturacja	2 min	95°C	-
2	Denaturacja	20 s	95°C	10
	Hybrydyzacja	20 s	(TM)*	
	Elongacja	30 s	72°C	
3	Denaturacja	20 s	95°C	25
	Hybrydyzacja	20 s	(TM)*+ 5°C	
	Elongacja	30 s	72°C	
3	Denaturacja	10 min	72°C	-

Wyniki PCR analizowano metodą elektroforezy DNA w żelach agarozowych.

III-2-5. Oczyszczanie kwasów nukleinowych

Produkty PCR oraz dsRNA oczyszczano metodą precypitacji w alkoholu etylowym. Do próbek dodawano 0,1 objętości octanu sodu (pH 5,5) oraz 3 objętości 96% etanolu

(-20°C). Próby wymrażano w -20°C przez noc. Po zakończeniu inkubacji preparat wirowano (16000×g, 4°C, 30 min), roztwór dekantowano, a osad zawieszano w 200 µl 70% etanolu (-20°C). Próby powtórnie wirowano (16000×g, 4°C, 30 min), po usunięciu etanolu osad suszono i rozpuszczano w wodzie wolnej od DNaz i RNaz. Stężenie oraz poziom czystości próbek mierzono spektrofotometrycznie na aparacie Multi Skan High (ThermoFisher Scientific). Do dalszych eksperymentów wykorzystywano jedynie próbki o absorbancji w zakresie $2,1 < A_{260/280} > 1,75$. Homogenność preparatów weryfikowano w 1% żelu agarozowym.

III-2-6. Transkrypcja *in vitro*

Transkrypcję prowadzono z wykorzystaniem zestawu AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit. Matrycę do transkrypcji stanowiły produkty PCR zawierające promotor dla polimerazy T7. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiony jest w Tabeli III-10. Reakcję prowadzono przez 3 h w temperaturze 42°C w termocyklerze T100 (Bio-Rad). Po zakończonej inkubacji, DNA usuwano poprzez dodanie 1 µl TURBO™ DNase (2 U/µL) oraz 2 µl dołączonego do enzymu buforu (10×Reaction Buffer). Reakcję prowadzono przez 30 min w temperaturze 37°C. Mieszaninę następnie oczyszczano metodą precypitacji. Stężenie RNA oznaczano spektrofotometrycznie (Multiscanning High Sky, ThermoScientific), a długość i homogenność analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym. Preparaty RNA weryfikowano w żelu z zastosowaniem RiboRuler High Range RNA Ladder.

Tabela III-10. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji

Składnik	Objętość
Oczyszczony produkt PCR	1 µg
AmpliScribe T7-Flash 10X Reaction Buffer	2 µl
100 mM ATP	1,8 µl
100 mM CTP	1,8 µl
100 mM GTP	1,8 µl
100 mM UTP	1,8 µl
100 mM DTT	2 µl
RiboGuard RNase Inhibitor	0,5 µl
AmpliScribe T7-Flash Enzyme Solution	2 µl
H ₂ O	do 20 µl

W przypadku sond RNA stosowanych do hybrydyzacji *in situ* typu WISH do transkrypcji *in vitro* wykorzystywano UTP znakowany digioksygeniną (HighYield T7 Digoxigenin RNA Labeling Kit) lub fluoresceiną (HighYield T7 Fluorescein RNA Labeling Kit). Skład mieszanin reakcyjnych opisano w Tabeli III-11 i Tabeli III-12. Reakcje prowadzono przez 3 h w temperaturze 37°C. Tak przygotowane sondy przechowywano w temperaturze -20°C z ograniczonym dostępem do światła.

Tabela III-11. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem UTP znakowanego digoksygeniną

Składnik	Objętość
HighYield T7 Reaction Buffer 10x	2 µl
100 mM DTT	2 µl
10 mM ATP/CTP/GTP	2 µl
10 mM UTP	1,3 µl
10 mM DIG-11-UTP	0,7 µl
Matryca DNA	X µl (0,5-1 µg)
HighYield T7 RNA Labeling Polymerase	2 µl
H ₂ O	do 20 µl

Tabela III-12. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem UTP znakowanego fluoresceiną

Składnik	Objętość
HighYield T7 Reaction Buffer 10x	2 µl
100 mM DTT	2 µl
10 mM ATP/CTP/GTP	2 µl
10 mM UTP	1,3 µl
5 mM Fluorescein-12-UTP	0,7 µl
Matryca DNA	X µl (0,5-1 µg)
HighYield T7 RNA Labeling Polymerase	2 µl
H ₂ O	do 20 µl

III-2-7. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z wykorzystaniem zestawu SuperScript™ IV Reverse Transcriptase. Matrycę do reakcji stanowił preparat oczyszczonego RNA

wyzolowanego ze *S. mediterranea*. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli III-13. W pierwszym etapie, RNA inkubowano z mieszaniną heksametrów stanowiących startery reakcji (mieszanina A) w 65°C przez 5 min, a następnie przenoszono na lód na kolejne 5 min. Do schłodzonej mieszaniny A dodawano mieszaninę B zawierającą polimerazę DNA zależną od RNA. Mieszaninę (A+B) inkubowano w termocyklerze T100 (Bio-Rad) zgodnie z warunkami przedstawionymi w

Tabela III-14. DNA oczyszczano metodą precypitacji w etanolu. Stężenie otrzymanego DNA oznaczano spektrofotometrycznie (Multiscanning High Sky, ThermoScientific), a jakość analizowano poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym.

Tabela III-13. Skład mieszaniny reakcyjnej A oraz B służącej odwrotnej transkrypcji

Mieszanina A	
Składnik	Objętość
RNA	1 µg
Mieszanina losowych heksametrów (500 ng/ µl)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
H ₂ O	do 13 µl
Mieszanina B	
Składnik	Objętość
5× SSIV Buffer	4 µl
DTT (100 mM)	1 µl
RNase Out (100 mM)	1 µl
SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl

Tabela III-14. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji

Etap	Temperatura	Czas
1	23°C	10 min
2	55°C	10 min
3	80°C	10 min

III-2-8. Przygotowywanie modyfikowanego pokarmu do indukcji RNAi

200 g świeżej wątroby z kurczaka homogenizowano z 200 ml wody. Mieszaninę przenoszono do probówek o objętości 50 ml i wirowano przez 3 min (6000 rpm).

Supernatant (po około 1 ml) przenoszono do oddzielnych próbek i przechowywano w -20°C.

Porcję zhomogenizowanej wątroby mieszano z 2% wodnym roztworem agarozy niskotopliwej i dsRNA. Skład mieszaniny podano w Tabela III-15. Mieszaninę podgrzewano do 50°C w celu jej upłynnienia, a następnie jej porcje (5 µl krople) nanoszono na parafilm i zamrażano w -20°C. Tak przygotowany pokarm przechowywano do dwóch tygodni.

Tabela III-15. Skład mieszanin modyfikowanego pokarmu do indukcji RNAi

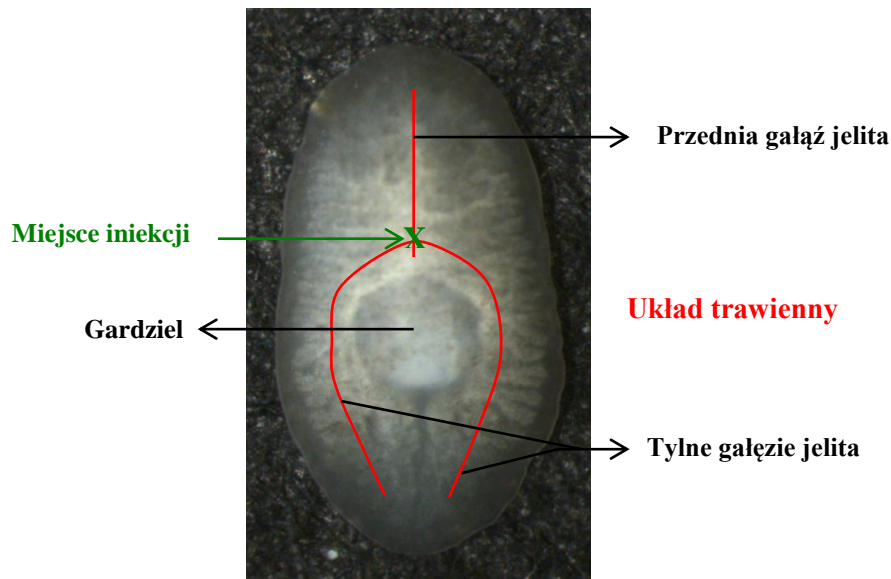
Składniki	Objętość
Mieszanina wątrobowa	25 µl
2% agarosa	5 µl
dsRNA (2 µg/µl)	10 µl

III-2-9. Indukcja RNAi poprzez karmienie zmodyfikowanym pokarmem

Wypławki głodzone 7 dni przenoszono do szalek Petriego zawierających świeże medium hodowlane (1×PAM). Na każde 10 wypławków dodawano 1 kroplę modyfikowanego pokarmu zawierającego dsRNA. Zwierzęta pozostawiano na 3 h. Po zakończeniu karmienia pokarm usuwano i wymieniano medium hodowlane na szalkach.

III-2-10. Indukcja RNAi u *S. mediterranea* poprzez mikroiniekcję dsRNA

Wypławki głodzone przez minimum 5 dni poddawano mikroiniekcji dojelitowej z wykorzystaniem systemu Nanoject III Programmable Nanoliter Injector (Drummond), mikroskopu C-PS160 (Nikon). Zwierzę wyjmowano z medium hodowlanego i umieszczano na płytce chłodzącej (8°C) w celu jego immobilizacji. Zaostrzoną kapilarą nakłuwano ciało wypławka na wysokości rozwidlenia gałęzi jelitowych (Rysunek III-6) i wprowadzano do wnętrza jelit ok. 150-180 nl wodnego roztworu dsRNA w stężeniu ~2000 ng/µl. Po skończonej mikroniekcji zwierzę przenoszono do naczynia hodowlanego.



Rysunek III-6. Obrazowanie miejsca iniekcji

Kolorem czerwonym zaznaczono przebieg gałęzi jelita *S. mediterranea*. Kapilarę wprowadzono w miejsce wskazane kolorem zielonym, tj. miejsce rozgałęzienia jelita *S. mediterranea*.

III-2-11. Badanie poziomu akumulacji mRNA

W celu określenia poziomu akumulacji poszczególnych mRNA w materiale biologicznym używano systemu QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad), wykorzystującego technikę PCR w kroplach (ddPCR, ang. *droplet digital PCR*). W badaniach wykorzystano gotową mieszaninę reakcyjną QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad) zawierającą bufor, nukleotydy, polimerazę DNA oraz barwnik fluorescencyjny EvaGreen służący do detekcji produktów. Jako matrycę stosowano dziesięciokrotnie rozcieńczone nieoczyszczone preparaty cDNA otrzymane na drodze odwrotnej transkrypcji. Mieszaniny reakcyjne (Tabela III-16) poddawano enkapsulacji w oleju QX200 (Bio-Rad) w aparacie QX200 Droplet Generator (Bio-Rad), a następnie przenoszono do termocyklera.

Tabela III-16. Skład mieszaniny i warunki reakcji ddPCR

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Dodana objętość
Preparat po reakcji odwrotnej transkrypcji	0,1 × (~100 ng/μl)	0,02 × (~20 ng/μl)	4 μl
Starter FWD	4 μM	0,2 μM	1 μl
Starter REV	4 μM	0,2 μM	1 μl
EvaGreen Supermix	2 ×	1 ×	10 μl
H ₂ O	-	-	4 μl
Aktywacja enzymu: 95°C – 5 min Synteza produktów, 40 cykli: 95°C – 30 s, 57°C – 30 s, 72°C – 45 s Stabilizacja sygnału: 4°C – 5 min, 90°C – 5 min			

Produkty reakcji poddawano pomiarowi fluorescencji dla każdej wygenerowanej w danej mieszaninie kropli. Do pomiaru wykorzystywano aparat QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Dane poddano analizie przy użyciu oprogramowania QuantaSoft (Bio-Rad), które bazując na pomiarze wartości fluorescencji, dokonało podziału kropli na tzw. pozytywne (w których nastąpiła amplifikacja docelowej sekwencji) oraz tzw. negatywne (niezawierające sekwencji docelowej). Uzyskane wyniki pozwoliły określić bezwzględną ilość badanej cząsteczki w próbce.

III-2-11. Oznaczenie poziomu ekspresji genów metodą RT-qPCR

Do określenia poziomu akumulacji poszczególnych transkryptów w izolatach z *S. mediterranea* lub komórek *D. melanogaster* S2 wykorzystywano ilościową reakcję PCR (RT-qPCR, ang. *real-time quantitative polymerase chain reaction*). Używano gotowej mieszaniny reakcyjnej 5x HOT FirePol EvaGreen qPCR Supermix, zawierającej bufor, polimerazę DNA, trifosforany nukleotydów oraz barwnik fluorescencyjny niezbędny do detekcji produktów. Matrycę do reakcji stanowił pięciokrotnie rozcieńczony, nieoczyszczony preparat cDNA otrzymywany w wyniku odwrotnej transkrypcji. Skład i warunki reakcji podano w Tabelach III-17 i III-18, odpowiednio. Reakcje prowadzono w aparacie CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Każdy eksperyment wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych, dodatkowo, dla każdej próbki wykonywano trzy powtórzenia techniczne.

Tabela III-17. Skład mieszaniny RT-qPCR

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Dodana objętość
H ₂ O	-	-	6 µl
Starter FWD	10 µM	500 nM	0,5 µl
Starter REV	10 µM	500 nM	0,5 µl
cDNA – preparat po reakcji odwrotnej transkrypcji	0,2x	0,02x	1 µl
Mieszanina Evagreen qPCR supermix	5x	1x	2 µl

Tabela III-18. Warunki RT-qPCR

Etap cyklu	Temperatura	Czas	Cykle
Wstępna denaturacja/aktywacja enzymu	95°C	15 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Hybrydyzacja/elongacja	60°C	1 min	
Stabilizacja końcowa	65 °C	+0,5°C co 5 s	1
	95°C		

W celu porównywania wyników i określenia istotności statystycznej stosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ang. *one-way ANOVA*) z testem post-hoc Bonferroni's. Do analiz statystycznych stosowano oprogramowanie Prism 5 (GraphPad).

III-2-12. Hybrydyzacja typu WISH

Etap 1 Przygotowanie preparatów

S. mediterranea w liczbie ustalonej dla poszczególnych eksperymentów przenoszono do probówek o objętości 15 ml. Do eksperymentów wybierano wyłącznie zwierzęta o wielkości 1-6 mm, głodzone przez 5-7 dni. Wyplawki umieszczone w probówce zalewano roztworem 7,5% NAC (10 ml, podane objętości dotyczą eksperymentów z udziałem 5-15 wyplawków) i kołysano na rotorze orbitalnym przez 8 min. Uśmiercone zwierzęta traktowano roztworem utrwalającym (9 ml) przez 20 min, kontynuując kołysanie. Następnie preparaty płukano dwukrotnie w roztworze 1×PBSTx, każdorazowo przez 5 min. W celu odwodnienia preparatów przenoszono je do roztworu 50% metanolu

(10 ml) na 5 min, a następnie do 100% metanolu (10 ml) na kolejne 5 min. W następnym etapie preparaty uwadniają, stosując 50% roztwór metanolu (10 ml, 5 min). Tak przygotowane próbki płukano buforem 1×PBSTx (10 ml, 5 min) oraz 1×SSC (10 ml, 5 min). W celu depigmentacji wypławków zawieszano je w roztworze wybielającym i naświetlano na foli aluminiowej w jasnym świetle przez 2-3 h aż do pełnego odbarwienia preparatów. Wybielone preparaty płukano kolejno w: 1×SSC (10 ml, 5 min) i dwukrotnie 1×PBSTx (10 ml, 5 min). Następnie preparaty poddawano trawieniu enzymatycznemu z wykorzystaniem roztworu Proteinyzy K (10 ml, 15 min) i ponownie inkubowano w buforze utrwalającym (10 ml, 10 min). Po tym etapie preparaty płukano dwukrotnie 1×PBSTx (10 ml, 5 min) i przenoszono do oddzielnych próbek w zależności od sondy stosowanej w dalszych etapach.

Etap 2 Hybrydyzacja sond

Utrwalone preparaty inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej w buforze płuczającym (300 µl), a następnie przez 2 h w 56°C ze stałym wytrząsaniem 400 rpm w buforze prehybrydyzacyjnym (400 µl). Po tym czasie do próbek dodawano sondy (400 ng RNA znakowanej digoksygeniną na 5 wypławków), przygotowane w następujący sposób: RNA denaturowano przez 5 min w 80°C w buforze hybrydującym, a następnie powoli schłodzono je do ok. 50°C.

Inkubację preparatów w buforze z sondami prowadzono w ciemności przez 16 h w 56°C. Wszystkie kolejne etapy, aż do obserwacji rezultatów pod mikroskopem były również prowadzone z ograniczonym dostępem światła. Po zakończonej hybrydyzacji preparaty poddawano płukaniu według następującego schematu:

- bufor płuczający (300 µl, 20 min, 56°C),
- trzykrotnie 2×SSCx (každorazowo: 300 µl, 20 min, 56°C),
- czterokrotnie 0,2×SSCx (každorazowo: 300 µl, 20 min, 56°C),
- dwukrotnie 1×TNTx (každorazowo: 300 µl, 10 min, temperatura pokojowa).

Po zakończeniu serii płukań, preparaty blokowano w buforze blokującym (300 µl, 2 h, temperatura pokojowa), a następnie inkubowano przez całą noc w roztworze przeciwciała I-rzędowego (300 µl, 4°C) rozcieńczonego w stosunku 1:1000. Po zakończonej inkubacji z przeciwciałem preparaty płukano w buforze 1×TNTx (300 µl), kolejno: jednokrotnie przez 5 min, jednokrotnie przez 10 min i sześciokrotnie przez 20 min.

Etap 3 Wizualizacja sygnału

Preparaty przenoszono na płytkę 12-dołkową i inkubowano w roztworze substratu dla fosfatazy alkalicznej (700 μ l). Czas inkubacji był uzależniony od zastosowanych sond, ich stężenia oraz roztworów barwiących i oscylował między 15 min a 2 h. Stopień intensywności sygnału monitorowano wizualnie. Po zakończonym barwieniu usuwano roztwór barwiący, a preparaty płukano dwukrotnie roztworem 1 \times PBSTx (1000 μ l, 10 min). W przypadku eksperymentów z zastosowaniem roztworu NBT/BCIP jako substratu fosfatazy alkalicznej, w celu redukcji tła preparaty dodatkowo płukano w 100% etanolu (ok. 15 min). Na zakończenie próbki płukano 1 \times PBSTx (5 min), наносono na szkiełka mikroskopowe i zatapiano w roztworze utrwalającym Fluoroshield (Sigma) lub w 80% glicerolu. Tak przygotowane preparaty fotografowano z wykorzystaniem systemu DFC450 C (Leica).

III-2-13. Hodowla komórek S2 *D. melanogaster*

Komórki hodowano w medium Schneider's Drosophila Medium suplementowanym 10% FBS bez antybiotyków, w temperaturze 27°C. Pasaży komórek dokonywano po osiągnięciu przez komórki około 80% poziomu konfluencji. Komórki odrywano od podłoża poprzez delikatne pipetowanie medium hodowlanego, zawiesinę komórek przenoszono do sterylnych próbek i delikatnie wirowano z prędkością 300 x g (5 min). Supernatant dekantowano, a osad komórkowy zawieszano w buforze 1 \times PBS i ponownie wirowano jak wyżej. Następnie komórki zawieszano w medium hodowlanym, komórki liczono (TC20 Automated Cell Counter, Bio-Rad) i dzielono pomiędzy nowe naczynia hodowlane.

III-2-14. Transformacja bakterii *E.coli*

Zawiesinę komórek *E.coli* DH5 α (Invitrogen) (50 μ l) inkubowano z 5-10 ng DNA plazmidowego na lodzie przez 30 min. Następnie komórki przenoszono do 42°C na 20 s, po czym natychmiast schładzano na lodzie (2 min). W kolejnym etapie dodawano 950 μ l SOC medium i mieszaninę inkubowano przez 1 h w 37 °C z wytrząsaniem (225 rpm). Zawiesinę komórkową przenoszono na wcześniej przygotowane szalki ze stałą pożywką LB zawierającą ampicylinę i inkubowano przez noc w 37 °C.

III-2-15. Izolacja plazmidów w małej skali

Wybrane kolonie zawieszano w 5 ml LB z dodatkiem ampicyliny i hodowano przez 8 godzin w 37°C w wytrząsarce (300 rpm). Po tym czasie 25-50 µl hodowli przenoszono do 25 ml LB z dodatkiem ampicyliny i hodowano przez 12-16 h w 37 °C w wytrząsarce (300 rpm).

Hodowlę bakteryjną wirowano przez 15 min (6000 xg) w 4°C i usuwano supernatant, a uzyskany osad mrożono w -20°C lub prowadzono oczyszczanie z zastosowaniem zestawu QIAprep Spin miniprep kit zgodnie z protokołem producenta. DNA eluowano z kolumny 50 µl H₂O. Stężenie DNA mierzono spektrofotometrycznie, wielkość izolowanego plazmidu weryfikowano poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym.

III-2-16. Transfekcja komórek *Drosophila melanogaster* S2

Transfekcji poddawano komórki linii embrionalnej S2 *D. melanogaster* po trzech pasażach od momentu rozpoczęcia hodowli. 24 h przed transfekcją komórki przenoszono na płytkę 24-dółkową w liczbie 0,5–2 × 10⁵ komórek na pojedynczy dołek. Po 24 h, przy stanie konfluencji nie mniejszym niż 70%, usuwano medium hodowlane i do każdego dołka zawierającego komórki dodawano mieszaninę transfekcyjną, której skład i sposób przygotowania przedstawiono w Tabeli III-19. Komórki hodowano bez wymiany medium przez kolejne 1-3 dni. Poziom ekspresji wprowadzanych transgenów weryfikowano metodą RT-qPCR. Wydajność transfekcji oceniano poprzez szacowanie liczby komórek EGFP+ z wykorzystaniem mikroskopu (Leica microsystem CMS GmbH DMI4000 B).

Tabela III-19. Skład mieszaniny używanej do transfekcji komórek *D. melanogaster* S2.

Mieszanina	Składnik	Objętość
Mieszanina A	Medium Schneidera + 10% FBS	25 µl
	Lipofectamine™ 3000 Reagent	1,5 µl
Mieszanina B	Medium Schneidera + 10% FBS	25 µl
	DNA (600 ng/µl)	1 µg
	P3000™ Reagent (2 µL/µg DNA)	2 µl
A+B	Mieszanina A	25 µl
	Mieszanina B	25 µl

Inkubację mieszaniny A+B prowadzono przez 15 min w temperaturze pokojowej.

III-2-17. Przygotowanie lizatów komórkowych

Póładherentne komórki *D. melanogaster* S2 hodowano w pożywce Schneider's Medium suplementowanej 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS). Przy stanie ~80% konfluencji, komórki odczepiano od podłoża poprzez przepipetowanie medium komórkowego. Następnie komórki poddawano sedymentacji poprzez krótkie wirowanie (500×g, 21°C, 5 min) i przemywano 1 ml 1x PBS po czym ponownie wirowano (500×g 21°C, 5 min). Po usunięciu PBS, osad komórkowy zawieszano w buforze do lizy (RIPA) (100 μl) i worteksowano (15 s). Zawiesinę inkubowano przez 40 min w temperaturze 4°C. Następnie preparat wirowano przez 10 min przy prędkości 1000×g w temperaturze 4°C. Supernatant zawierający frakcję cytoplazmatyczną przenoszono do nowej probówki. Osad, stanowiący frakcję błonową, zawieszano w 60 μl buforu do lizy. Stężenie całkowitego białka określano spektrofotometrycznie z wykorzystaniem zestawu DC Protein Assay (Bio-Rad) zgodnie z protokołem producenta.

III-2-18. Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących prowadzono z wykorzystaniem systemu Mini-Protean (Bio-Rad). Wykorzystywano gotowe żele poliakrylamidowe (Criterion Tris-HCl Gels) lub żele wykonywane samodzielnie (Tabela III-20). Stosowane żele poliakrylamidowe o grubości 1 mm składały się z dwóch warstw: a) zagęszczającej (5% poliakrylamidu) b) rozdzielającej (12% poliakrylamidu). Preparaty białkowe mieszało przed nałożeniem na żel z 0,25 objętości buforu obciążającego 4×SB, a następnie inkubowano w temperaturze 95°C przez 5 min. Zdenaturowany preparat przenoszono na lód i inkubowano przez 5 min. Wzorcem masy cząsteczkowej białek był Perfect Tricolor Protein Ladder lub Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard. Rozdział prowadzono w 1×TGS w następujących warunkach: 80 V przez 30 min, 130 V ok. 1 h (do momentu wyjścia z żelu barwnika obciążającego).

Tabela III-20. Skład żelu poliakryloamidowego do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących.

Składnik	Żel rozdzielający	Żel zagęszczający
Bufor Tris-HCl pH 8,8/6,8	300 mM (pH 8,8)	300 mM (pH 6,8)
Akrylamid/N,N'-metylenobisakrylamid (stosunek ilościowy 29:1)	5%	12%
SDS	1%	1%
APS	0,05%	0,05%
TEMED	0,1%	0,1%

III-2-19. Identyfikacja białek metodą western blot

Po skończonej elektroforezie, żel przycinano, usuwając część zagęszczającą. W celu transferu białek na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF) korzystano z gotowych zestawów Power Blotter Select Transfer Stacks PVDF, Mini SIZE (Invitrogen), postępując zgodnie z protokołem producenta. Transfer typu półsuchego prowadzono w aparacie Transfer-Blot Turbo Transer System (Bio-Rad), przez 20 min, przy napięciu nieprzekraczającym 15 V.

Membranę po transferze odpowiednio przycięte przenoszono do Falconów (50ml) a następnie płukano przez 15 min w buforze 1×TBST. Ten i wszystkie kolejne etapy przeprowadzano z wykorzystaniem kołyski rotacyjnej zapewniającej delikatnie obmywanie membrany odpowiednimi roztworami. Po wstępnym płukaniu membrany, blokowano ją przez 1 godzinę w roztworze SuperBlock T20 (PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific).

Tak przygotowaną membranę inkubowano przez noc w 4°C ze stałym mieszaniem z przeciwciałem I-rzędowym. Po całonocnej inkubacji membrany płukano trzykrotnie po 10 min buforem 1×TBST w temperaturze pokojowej. Następnie membranę inkubowano w roztworze przeciwciała II-rzędowego w temperaturze pokojowej przez 2h. Po zakończonej ekspozycji na przeciwciała, membrany były trzykrotnie płukane buforem 1×TBST (10 min każde). Po tym czasie membrany poddawano immunodetekcji stosując bufor 1 step - NBT/BCIP lub SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, przygotowany zgodnie z wytycznymi producenta. Inkubacja trwała w zależności od stosowanych przeciwciał między 5 a 15 min. Archiwizacji wyników dokonywano z wykorzystaniem aparatu ChemiDoc XRS+(Bio-Rad).

III-2-20. Oznaczenie retencji siRNA

Komórki *D. melanogaster* transfekowane plazmidami zawierającymi sekwencje Smed-SIDT1-3 inkubowano z siRNA znakowanym fluoresceiną (BLOCK-iT™ Fluorescent Control, Invitrogen). Do każdego dołka zawierającego $0,5-2 \times 10^5$ komórek dodawano 50 μl mieszaniny składającej się z 5 μl (50 pmol) znakowanego siRNA i 45 μl medium komórkowego i inkubowano w 27°C przez 5 min, 30 min, 60 min, 180 min. We wskazanym punkcie czasowym wymieniano medium na niezawierające siRNA, a następnie komórki przenoszono do próbówek 1,5 ml i wirowano (500×g, 5 min, 27°C). Supernatant usuwano, a osad płukano 1×PBS i ponownie wirowano (500×g, 5 min, 27°C). Czynność powtarzano dwukrotnie. Osad komórkowy zawieszano w 100 μl 1×PBS. Tak przygotowane komórki analizowano cytometrycznie za pomocą Guava® easyCyte™ Flow Cytometers w celu oceny liczby komórek, które pobrały znakowany siRNA.

III-2-21. Analiza filogenetyczna

Sekwencje transkryptów *Smed-sidt1-3* poddano translacji *in silico*. Uzyskane w ten sposób sekwencje białkowe wykorzystano do rekonstrukcji drzewa filogenetycznego. W tym celu dokonano analizy porównawczej sekwencji wybranych białek z rodziny SID-1 (Załącznik 2) z wykorzystaniem oprogramowania MEGA-X i funkcji MUSCLE. Regiony konserwatywne zidentyfikowano w programie Gblocks. Drzewo zostało zrekonstruowane przy użyciu metody maksymalnego podobieństwa (ang. *maximum likelihood*) w programie PhyML (v 3.0).

IV. Wyniki

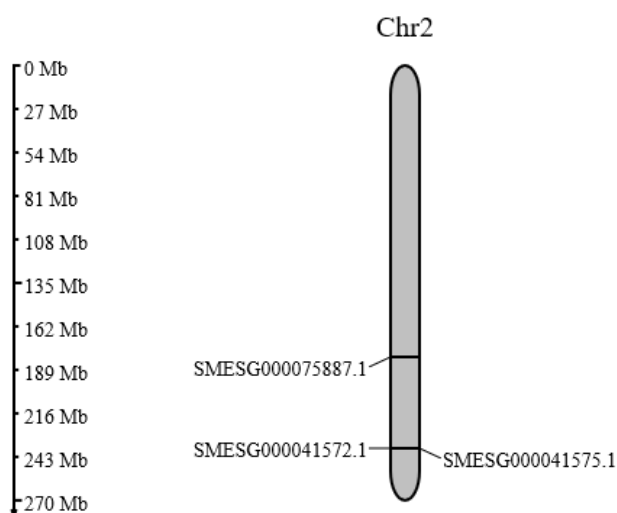
IV-1. Identyfikacja homologów SID-1 *C. elegans*

W celu zidentyfikowania genów *sid* w genomie *S. mediterranea* wykorzystano ogólnodostępną bazę danych genomicznych i transkryptomicznych płazińców PlanMine v3.0 stworzoną i administrowaną przez naukowców z Instytutu Molekularnej Biologii Komórki i Genetyki im. Maxa Plancka (MPIMCBG, ang. *Max Planck Institute for Molecular Cell Biology and Genetics*) [61]. Baza ta zawiera zagregowane dane pochodzące ze standardowego sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*) pełnych genomów i transkryptomów, jak również dane z sekwencjonowania pojedynczych komórek. Dodatkowo, w ramach PlanMine udostępniane są podstawowe narzędzia bioinformatyczne umożliwiające m.in. wizualizację struktury genów i transkryptów, tworzenie map różnicowej ekspresji genów w wybranych partiach ciała/tkankach/komórkach, analizy filogenetyczne, analizy ontologii genów.

Aby zidentyfikować homologii genów *sid* u wyplawków posłużono się algorytmem tBLASTn oraz najpełniejszą i najbardziej aktualną wersją transkryptomu *S. mediterranea* dd_Smed_v6. Wzorcem, który wykorzystano w przeszukiwaniach były sekwencje dwóch białek *C. elegans*: Ce-SID-1 (NP_504372.2) i Ce-SID-2 (NP_499823.2). Zastosowana metoda polega na translacji *in silico* zdeponowanych w bazie sekwencji nukleotydowych, a następnie porównywaniu uzyskanych sekwencji aminokwasowych z sekwencją białka wzorcowego [62]. W wyniku przeprowadzonej analizy, w transkryptomie *S. mediterranea* zidentyfikowano pięć transkryptów wykazujących podobieństwo do sekwencji kodującej Ce-SID-1 (Tabela IV-1), nie znaleziono żadnej sekwencji homologicznej do Ce-SID-2. Analiza genomu *S. mediterranea* (dd_Smes_g4), wykazała, że wszystkie zidentyfikowane transkrypty powstają z genów zlokalizowanych na chromosomie drugim (Rysunek IV-1).

Tabela IV-1. Potencjalne homologii *Ce-sid-1* zidentyfikowane u *S. mediterranea*

ID genu	ID transkryptu	Długość transkryptu [nt]	Lokalizacja chromosomowa
SMESG000041575.1	dd_Smed_v6_6063_0_1	3511	dd_Smes_g4_2: 13057109-13087108
SMESG000041575.1	dd_Smed_v6_6063_0_2	3495	dd_Smes_g4_2: 13057109-13087108
SMESG000041572.1	dd_Smed_v6_8231_0_1	4379	dd_Smes_g4_2: 13031069-13053120
SMESG000041572.1	dd_Smed_v6_8231_0_2	2341	dd_Smes_g4_2: 13031069-13053120
SMESG000075887.1	dd_Smed_v6_8407_0_1	2465	dd_Smes_g4_85: 1244482-1285479



Rysunek IV-1. Lokalizacja chromosomowa potencjalnych homologów *Ce-sid-1* zidentyfikowanych w genomie *S. mediterranea*

Gen SMESG000041575.1 lokalizowany jest w pozycji dd_Smes_g4_2: 13057109-13087108; SMESG000041572.1 lokalizowany jest w pozycji dd_Smes_g4_2: 13031069-13053120; SMESG000075887.1 lokalizowany jest w pozycji dd_Smes_g4_85: 1244482-1285479. Schemat przygotowano z wykorzystaniem oprogramowania MG2C [63].

Szczegółowe porównanie uzyskanych sekwencji wykazało, że w przypadku transkryptu oznaczonego dd_Smed_v6_6063 zidentyfikowano jego dwie izoformy: dd_Smed_v6_6063_0_1 (3511 nt) i dd_Smed_v6_6063_0_2 (3495 nt) identyczne w 99,17%. Występujące między nimi różnice ograniczają się do 12-nt delecji

i punktowych zmian (substytucje i delecje) zlokalizowanych w części niekodującej transkryptu, w obrębie 3'UTR (ang. *3' untranslated region*) (

Rysunek IV-2). Najdłuższa ramka odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) dla obu izoform koduje identyczne białko o długości 781 aminokwasów (aa).

```

dd_Smed_v6_6063_0_1 2982 tagagcgaattctggaaaaatgtagccaaaataccatcagaagcgaatgggtcaaaaatcaaaagggc 3024
dd_Smed_v6_6063_0_2 2982 tagagcgaattctggaaaaatgtagccaaaataccatcagaagcgaatgggtcaaaaatcaaaagggc 3024

dd_Smed_v6_6063_0_1 3025 cggcgcaattgaacaaaacttggctaaggccagaggaagtgtgtaaattgagggccgaaatcgaa 3087
dd_Smed_v6_6063_0_2 3025 cggcgcaattgaacaaaacttggctaaggccagaggaagtgtgtaaattgagggccgaaatcgaa 3087

dd_Smed_v6_6063_0_1 3088 actttaaatttgaacttggctcaaaggggaagaagtactgaagcaagcaaaaacaaaagatccga 3150
dd_Smed_v6_6063_0_2 3088 actttaaatttgaacttggctcaaaggggaagaagtactgaagcaagcaaaaacaaaagatccga 3150

dd_Smed_v6_6063_0_1 3151 acgcaggacagcgaaaaaatggagttaaaattgaagacgagatccagctggacttgtatagt 3213
dd_Smed_v6_6063_0_2 3151 acgcaggacagcgaaaaaatggagttaaaattgaagacgagatccagctggacttgtatagt 3213

dd_Smed_v6_6063_0_1 3214 acgtcagtcagctgtcggccaagcaggaggcaataatcataagaaattgtattggaaggatc 3276
dd_Smed_v6_6063_0_2 3214 acgtcagtcagctgtcggccaagcaggaggcaataatcataagaaattgtattggaaggatc 3276

dd_Smed_v6_6063_0_1 3277 atcatgccagcaacttcgagacctccagaagaaaagccgaaaagaaataggcaaaagaaataga 3339
dd_Smed_v6_6063_0_2 3277 atcatgccagcaacttcgagacctccagaagaaaagccgaaaagaaat.....agg 3327

dd_Smed_v6_6063_0_1 3340 cccggcaaaaaggagcgtgagaggcagaataaagttaaactgctcgcattggtgtggagcgg 3402
dd_Smed_v6_6063_0_2 3328 cccggcaaaaaggagctcgagaggcagaataaagttagaactgctattatggttggca.... 3386

dd_Smed_v6_6063_0_1 3403 atttctcaagttcaacgggatttggacacccacaaaaataactcaacattgtgatattcggtt 3465
dd_Smed_v6_6063_0_2 3387 catttctcaagttcaatgagatttggacactcacaaaaataactcaacattgtgatattcggtt 3449

dd_Smed_v6_6063_0_1 3466 ttgctgttttttaaatttaatcatttaataataatgttacttgtgtct 3511
dd_Smed_v6_6063_0_2 3450 ttgctgttttttaaatttaatcatttaataataatgttacttgtgtct 3495

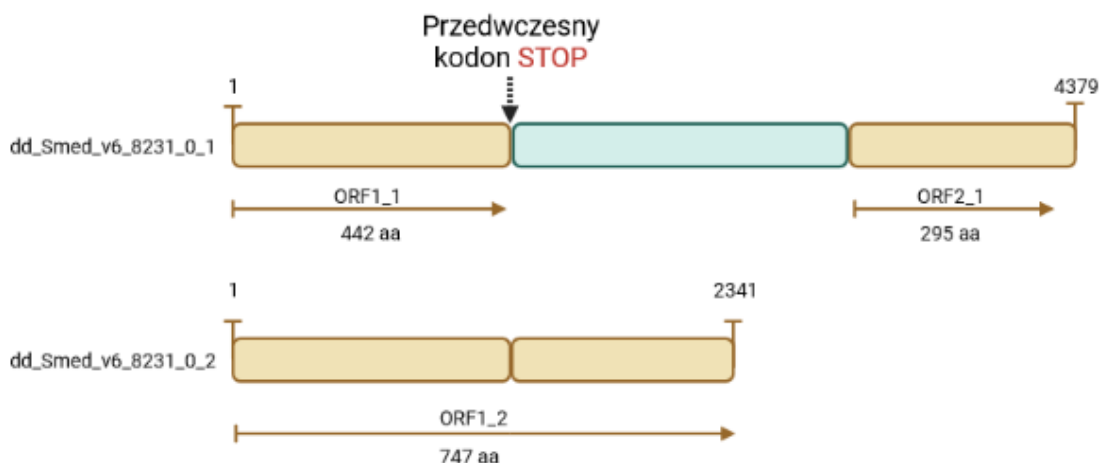
```

Rysunek IV-2. Porównanie sekwencji izoform dd_Smed_v6_6063

Fragment sekwencji dwóch izoform transkryptu dd_Smed_v6_6063: dd_Smed_v6_6063_0_1 oraz dd_Smed_v6_6063_0_2 zidentyfikowanych w bazie PlanMine v3.0. Analizy dokonano z wykorzystaniem narzędzia Clustal Omega [64–66]. Kolorem ciemnoniebieskim oznaczono identyczne fragmenty sekwencji, jasnoniebieskim – regiony różnicujące, czerwonym – kodon STOP.

Dla dd_Smed_v6_8231 także zidentyfikowano dwie izoformy: dd_Smed_v6_8231_0_1 (4379 nt) oraz dd_Smed_v6_8231_0_2 (2341 nt). Schematyczne porównanie obu transkryptów przedstawiono na Rysunek IV-3. Izoforma dd_Smed_v6_8231_0_1 zawiera fragment o długości 2038 nt, którego brak w izoformie dd_Smed_v6_8231_0_2. Porównanie najdłuższych ORF zidentyfikowanych w obu izoformach wykazało, iż dodatkowy fragment obecny w izoformie dd_Smed_v6_8231_0_1 zawiera kodon STOP. Z tego też powodu białko syntetyzowane na matrycy dd_Smed_v6_8231_0_1 byłoby krótsze o 295 aa (~39%) od białka

powstającego na matrycy dd_Smed_v6_8231_0_2 (Rysunek IV-3). W związku z powyższym, na dalszych etapach pracy do analiz wykorzystywano jedynie sekwencję izoformy dd_Smed_v6_8231_0_2, przyjmując, iż koduje ona pełne, funkcjonalne białko (Rysunek IV-3).



Rysunek IV-3. Porównanie sekwencji izoform dd_Smed_v6_8231

Schematyczna reprezentacja dwóch izoform transkryptu dd_Smed_v6_8231 zidentyfikowanych w bazie PlanMine v3.0: dd_Smed_v6_8231_0_1 oraz dd_Smed_v6_8231_0_2. Kolorem beżowym oznaczono fragmenty identyczne w obu izoformach. Kolorem niebieskim oznaczono fragment sekwencji różniący obie izoformy. ORF zidentyfikowano za pomocą narzędzia ORFfinder [67].

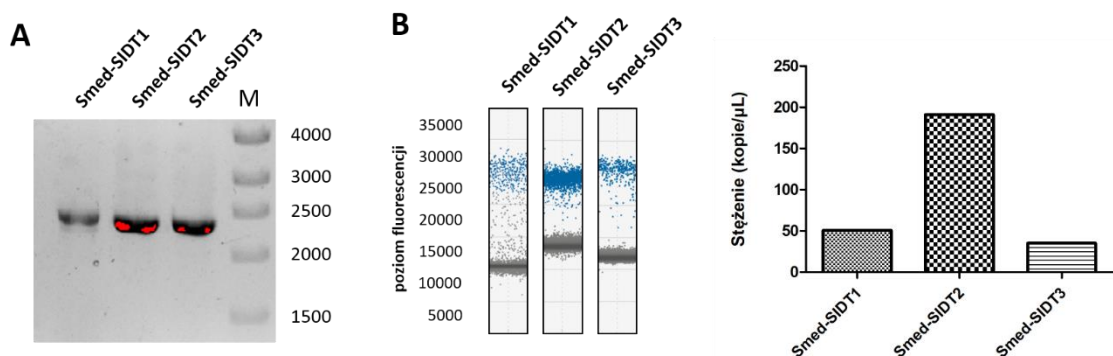
W dalszych częściach pracy, stosowano uproszczoną nomenklaturę, transkryptów/białek *S. mediterranea* (Tabela IV-2) zgodnie z konwencją przyjętą w badaniach dotyczących innych organizmów.

Tabela IV-2. Uproszczona nomenklatura homologów Ce-SID-1 zidentyfikowanych u *S. mediterranea*

ID PlanMine v3.0	Nazwa przyjęta w pracy (gen)	Nazwa przyjęta w pracy (białko)
dd_Smed_v6_6063_0_1/_0_2	<i>Smed-sidt1</i>	Smed-SIDT1
dd_Smed_v6_8231_0_2	<i>Smed-sidt2</i>	Smed-SIDT2
dd_Smed_v6_8407	<i>Smed-sidt3</i>	Smed-SIDT3

Obecność transkryptów *Smed-sidt1-3* w tkankach *S. mediterranea* potwierdzono, wykorzystując klasyczną reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) oraz emulsyjny PCR (ddPCR, ang. *digital droplet PCR*). W obu przypadkach matrycę do reakcji stanowiła próbka cDNA uzyskana metodą odwrotnej transkrypcji RNA izolowanego z wypławków typu dzikiego (WT, ang. *wild type*).

Startery do reakcji PCR zaprojektowano w taki sposób, aby amplifikacji ulegała sekwencja kodująca, pełnej długości białko, tj. sekwencja o długości 2436 pz dla Smed-SIDT1, 2394 pz dla Smed-SIDT2, 2328 pz dla Smed-SIDT3. Otrzymane wyniki były zgodne z oczekiwaniami, wskazywały bowiem na powstawanie w badanym materiale transkryptów kodujących pełnej długości białka Smed-SIDT1-3 (Rysunek IV-4A). Technikę ddPCR wykorzystano do ilościowej oceny poziomów akumulacji analizowanych transkryptów. W tym przypadku wykorzystano startery pozwalające na amplifikację ok. 200 nt fragmentu sekwencji. Otrzymane wyniki wykazały wyraźne różnice w poziomie ekspresji poszczególnych genów. Poziom akumulacji transkryptu kodującego Smed-SIDT2 był czterokrotnie wyższy niż poziom transkryptów kodujących Smed-SIDT1 oraz Smed-SIDT3 (Rysunek IV-4B).

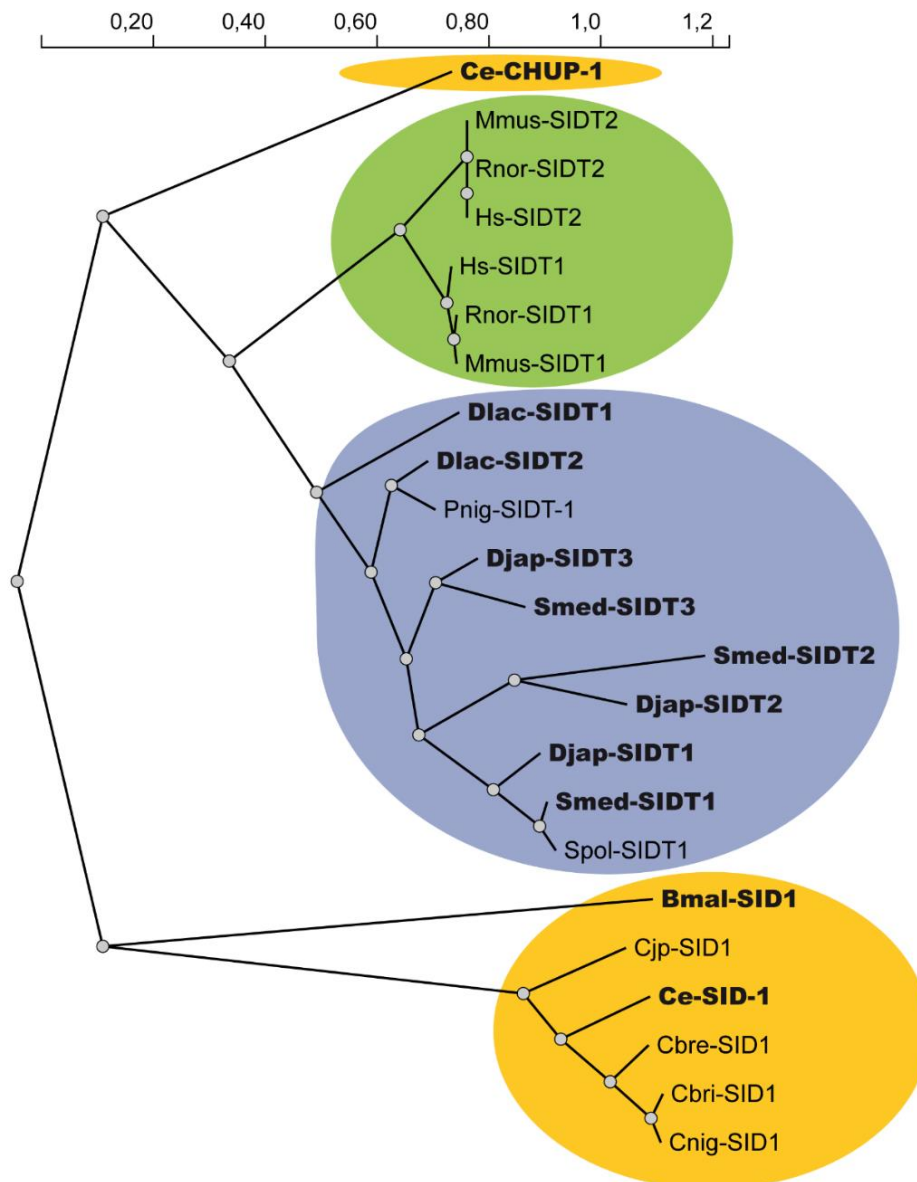


Rysunek IV-4. Analiza jakościowa i ilościowa transkryptów *Smed-sidt1-3*

A-B – Wyniki analizy jakościowej i ilościowej transkryptów kodujących Smed-SIDT1-3 w materiale izolowanym z wypławków ($n = 5$; n – liczba organizmów). A – Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji amplifikacji transkryptów kodujących Smed-SIDT1-3. Ścieżka M zawiera marker długości DNA (pz). B – Wyniki analizy ddPCR. Lewy panel – diagram przedstawiający poziom fluorescencji obserwowany dla poszczególnych transkryptów. Na niebiesko zaznaczono tzw. krople pozytywne (w których nastąpiła amplifikacja docelowego fragmentu), a na szaro tzw. krople negatywne (uznane za niezawierające fragmentu docelowego). Prawy panel – wykres słupkowy przedstawiający poziomy akumulacji mRNA białek Smed-SIDT1-3 wyznaczony metodą ddPCR.

Najnowsze analizy wskazują, iż ludzkie ortologi Ce-SID-1, tj. Hs-SIDT1 i Hs-SIDT2 są w rzeczywistości ewolucyjnie bliższe białku Ce-CHUP-1 [33]. W celu stwierdzenia, do której grupy białek należą produkty ekspresji *Smed-sidt1-3* zweryfikowano ich podobieństwo do znanych homologów Ce-SID-1 pochodzących od ssaków (człowiek, mysz, szczur) oraz nicieni (*C. elegans*, *Caenorhabditis briggsae*, *Caenorhabditis japonica*, *Brugia malayi*, *Caenorhabditis remanei*, *Caenorhabditis nigoni*). Oprócz *S. mediterranea* w porównaniu uwzględniono również cztery inne wypławki: *Dugesia japonica*, *Dendrocoelum lacteum*, *Polycelis nigra*, *Schmidtea*

polychroa. Analizy filogenetyczne objęły białka, których sekwencja aminokwasowa została ustalona na drodze translacji *in silico* najdłuższych ORFów zidentyfikowanych w analizowanych transkryptach wypławków. Pozostałe białka użyte w analizie pochodziły z bazy danych NCBI (Załącznik 2). Łącznie analiza objęła 23 białka z 14 gatunków zwierząt. Otrzymane drzewo filogenetyczne przedstawiono na Rysunku IV-5. Widać na nim, iż białka z rodziny SID-1 tworzą grupy filogenetyczne zgodnie z przynależnością do danej gromady. Co więcej, wyraźnie wyodrębnione są dwie główne gałęzie ewolucyjne: jedna obejmująca białka SID-1 nicieni oraz druga, do której należą: Ce-CHUP-1 oraz białka typu SID-1 ssaków oraz płazińców. Nie stwierdzono zależności między obecnością w genomie sekwencji kodujących SID-1 a występowaniem w danych gatunku mechanizmu eRNAi.



Rysunek IV-5. Drzewo filogenetyczne białek z rodziny SID-1

Drzewo filogenetyczne wygenerowane na podstawie publicznie dostępnych sekwencji białkowych SID-1 pochodzących od różnych organizmów. Analizę wykonano przy wykorzystaniu algorytmu MUSCLE (oprogramowanie Mega-X) [68], konserwatywne regiony zostały zidentyfikowane za pomocą Gblocks. Drzewo filogenetyczne utworzono, stosując metodę maksymalnego prawdopodobieństwa (PhyML v3.0) [69,70]. Pogrubienie nazwy wskazuje gatunki, w których występuje eRNAi. Kolorem żółtym oznaczono nicienie, niebieskim – płazińce, zielonym – ssaki. Bma – *Brugia malayi*, Cbre – *Caenorhabditis brenneri*, Cbri – *Caenorhabditis briggsae*, Ce – *Caenorhabditis elegans*, Cjp – *Caenorhabditis japonica*, Cnig – *Caenorhabditis nigoni*, Dlac – *Dendrocoelum lacteum*, Djap – *Dugesia japonica*, Hs – *Homo sapiens*, Mmus – *Mus musculus*, Pnig – *Polycelis nigra*, Rnor – *Rattus norvegicus*, Smed – *Schmidtea mediterranea*, Spol – *Schmidtea polychroa*.

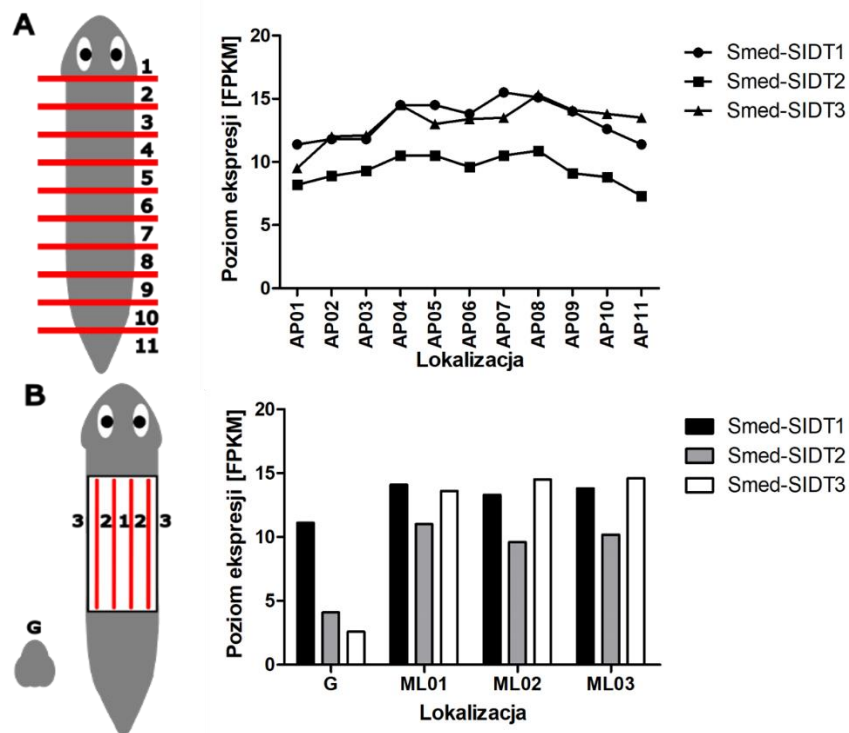
IV-2. Charakterystyka wzorów ekspresji genów kodujących Smed-SIDT1-3 na poziomie tkankowym, komórkowym i subkomórkowym

Kluczowe z perspektywy zrozumienia funkcji genów jest określenie tkankowo-specyficznych wzorów ich ekspresji. W przypadku *S. mediterranea* analizy poziomu akumulacji oraz lokalizacji białek są utrudnione z uwagi na brak specyficznych przeciwciał. Dostępne są jedynie dane NGS pochodzące z klasycznego sekwencjonowania oraz z sekwencjonowania pojedynczych komórek pozwalające analizować ekspresję genów na poziomie indywidualnych transkryptów.

Zdeponowane w PlanMine v3.0 dane wygenerowane przez Stückemann T i in. [71] oraz Rink i in. [61] pozwalają prześledzić rozkład poziomów poszczególnych transkryptów w wybranych fragmentach ciała wyplawka: wzdłuż osi podłużnej (Rysunek IV-6A, lewy panel) i poprzecznej (Rysunek IV-6B, lewy panel). W przypadku *Smed-sidt1* i *Smed-sidt2* najniższy poziom ekspresji *Smed*-występuje w części głowowej oraz ogonowej wyplawka (Rysunek IV-6A, prawy panel, fragment AP01, AP11). Wzdłuż długiej osi ciała poziom obu transkryptów przyrasta, osiągając maksimum w części środkowej – przed i zagardzielowej (Rysunek IV-6A, prawy panel, fragmenty AP04 i AP08). W przypadku *Smed-sidt3* obserwuje się podobny rozkład ekspresji, z tą różnicą, że w części ogonowej nie dochodzi do spadku poziomu transkryptu do wartości odnotowanych w przedniej części ciała (Rysunek IV-6A, prawy panel).

Analiza ekspresji *Smed-sidt1-3* wzdłuż osi poprzecznej ciała, z wyłączeniem gardzieli nie wykazała tworzenia się gradientu żadnego z badanych transkryptów w tej osi. Zaobserwowano natomiast dużą dysproporcję pomiędzy poziomem ekspresji w gardzieli względem pozostałych części ciała (Rysunek IV-6B, prawy panel).

Analizowane zestawy danych NGS pozwalają również na porównanie poziomów transkryptów względem siebie: najwyższy poziom akumulacji obserwuje się w przypadku, *Smed-sidt3*, a najniższy w przypadku *Smed-sidt2* (Rysunek IV-6), a więc inaczej niż w przypadku wartości uzyskanych w analizie ddPCR (Rysunek IV-4). Różnica ta może wynikać m.in. z faktu, iż w przypadku sekwencjonowania, RNA izolowany był z fragmentów ciała wyplawka, tj. z tkanek, w których zainicjowano proces regeneracji i towarzyszącą mu zmianę programu ekspresji genów. Tymczasem w analizach ddPCR wykorzystany został RNA izolowany z całych (nieciętych) zwierząt.



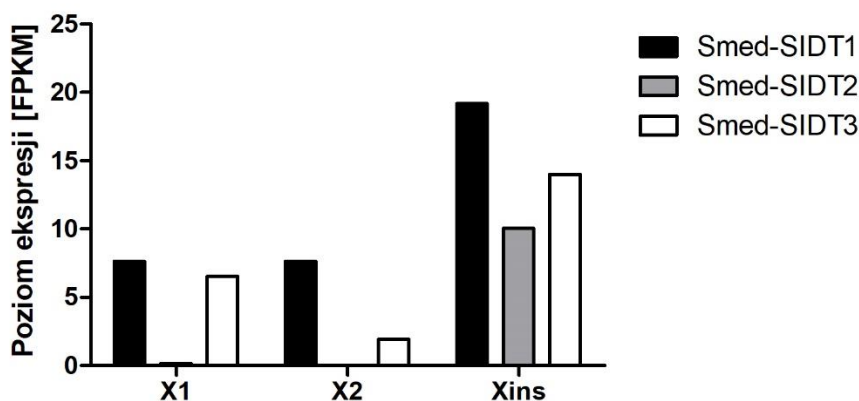
Rysunek IV-6. Zmiany poziomu ekspresji *Smed-sidt1-3* wzdłuż osi ciała *S. mediterranea*

A – Schemat podziału *S. mediterranea* na 11 sekcji wzdłuż osi długiej ciała oraz wykres obrazujący poziom ekspresji *Smed-Sidt1-3* w poszczególnych sekcjach obliczony na podstawie danych NGS uzyskanych przez Stückemann T i in. [71]. B – Schemat podziału *S. mediterranea* na 3 sekcje wzdłuż osi poprzecznej ciała i gardziel oraz wykres obrazujący poziom ekspresji *Smed-Sidt1-3* w poszczególnych sekcjach obliczony na podstawie danych NGS uzyskanych przez Rink i in. [61]. Poziomy ekspresji wyrażone w jednostkach FPKM (ang. Fragments Per Kilobase Million).

W kolejnym etapie dokonano analizy wzorów ekspresji *Smed-sidt1-3* w poszczególnych typach komórek i tkanek. W tym celu przeanalizowano publicznie dostępne dane pochodzące z: (i) sekwencjonowania RNA izolowanego z sortowanych populacji komórek [72], (ii) sekwencjonowania RNA z pojedynczych komórek [73,74].

W ciele wyplawka można wyróżnić trzy podstawowe populacje komórek w zależności od stopnia ich zróżnicowania: (i) komórki macierzyste (X1), (ii) komórki progenitorowe (komórki macierzyste swoiste tkankowo lub liniowo, ang. *lineage-specific*) (X2), (iii) komórki zróżnicowane (Xins) [72,75]. Grupa X1 składa się z komórek klonogennych (ang. *clonogenic neoblasts*) i pierwotnych (ang. *specialized neoblasts*) [76,77]. Wyróżnia je podwyższona ekspresja genów *Smedwi-1* i *Smedwi-2* [78] oraz większa zdolność do podziałów niż komórki X2 i Xins. Populację X2 tworzą progenitory określonych linii komórkowych oraz komórki macierzyste w fazie G0/G1 cyklu komórkowego [79]. Xins natomiast to populacja dojrzałych komórek zróżnicowanych.

Szczegółowa analiza zestawu danych transkryptomicznych wygenerowanego przez Roselyne M. Labbé i in. [72] dla trzech populacji komórek pozyskanych na drodze sortowania FACS (ang. *fluorescence activated cell sortin*) wykazała, że transkrypty kodujące *Smed-SIDT1* oraz *Smed-SIDT3* występują głównie w komórkach zróżnicowanych (Xins) i w znacznie mniejszym stopniu w pozostałych dwóch populacjach komórek (X1 i X2) (Rysunek IV-7). Transkrypty kodujące *Smed-SIDT2* występują prawie wyłącznie w komórkach zróżnicowanych (Xins), w niewielkim stopniu w komórkach macierzystych typu X1, natomiast nie są identyfikowane w komórkach macierzystych typu X2 (Rysunek IV-7).



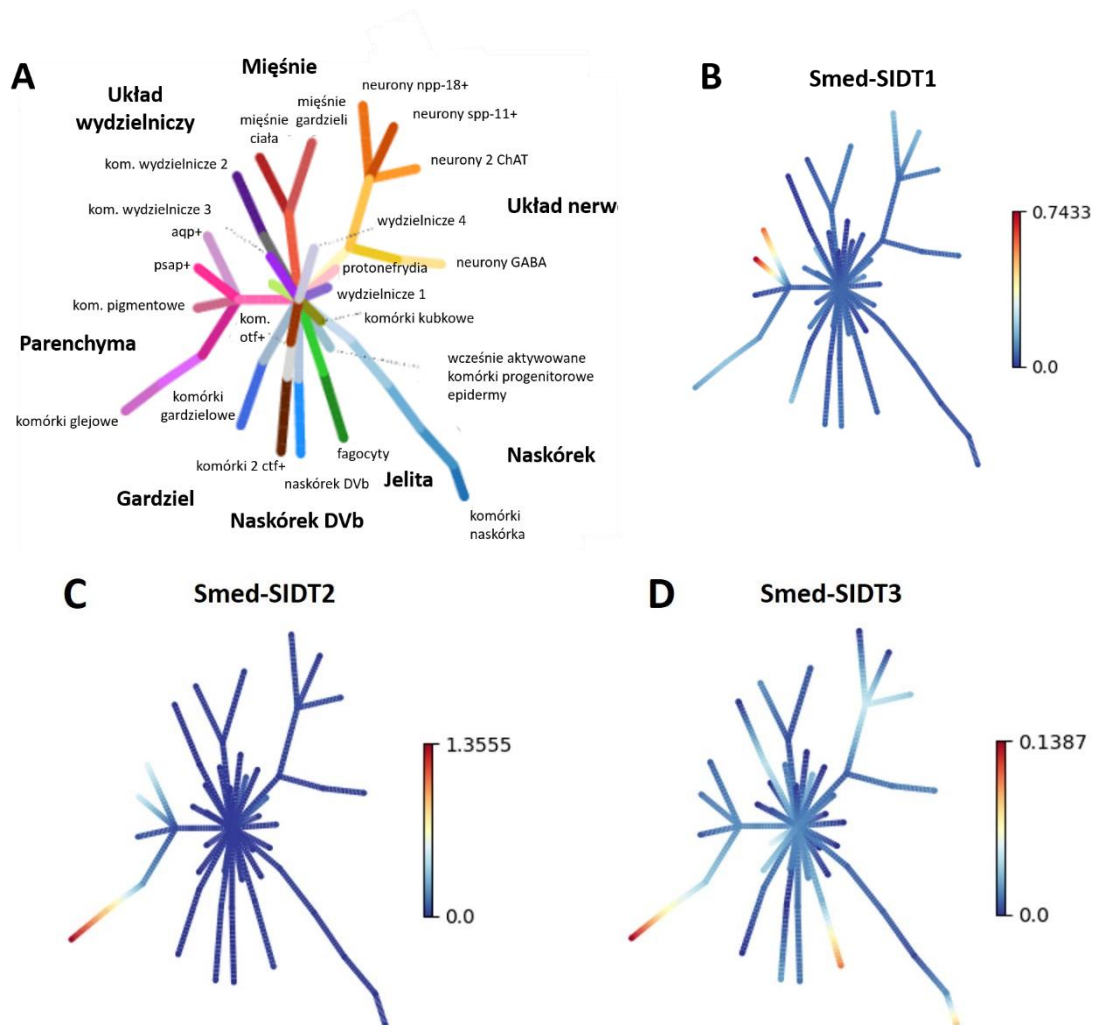
Rysunek IV-7. Poziom ekspresji Smed-sidt1-3 w trzech głównych typach komórek *S. mediterranea*

Wykres obrazujący poziom ekspresji Smed-sidt1-3 w neoblastach (X1 i X2) oraz w komórkach zróżnicowanych (Xins) przygotowany na podstawie danych NGS uzyskanych przez Roselyne M. Labbé i in. [72]. Poziomy ekspresji wyrażono w jednostkach FPKM (ang. *Fragments Per Kilobase Million*).

W kolejnym etapie, lokalizację tkankową badanych transkryptów zweryfikowano w dwóch atlasach transkryptomicznych dostępnych dla *S. mediterranea*: Planaria Single

Cell Atlas (PSCA) [74] oraz Digiworm [73]. Oba atlasy zostały opracowane na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomów pojedynczych komórek.

PSCA zawiera dane wygenerowane dla ponad 21 600 komórek pozyskanych z wypławków typu dzikiego w warunkach fizjologicznych oraz w trakcie regeneracji, a także z wypławków pozbawionych neoplastów [74]. Na ich podstawie dokonano podziału komórek *S. mediterranea* na 37 typów, w tym 23 typy komórek w pełni zróżnicowanych oraz szereg klastrow komórek macierzystych i progenitorowych oraz zrekonstruowano drzewa rozwojowe dla poszczególnych linii komórkowych (Rysunek IV-8A). Dane udostępnione w PSCA wskazują, że transkrypty *Smed-sidt1* identyfikowane są przede wszystkim w tkance łącznej (parenchymie) (Rysunek IV-8B). Komórki opisane jako parenchymalne stanowią heterogenną grupę, ich dokładna klasyfikacja jest prowadzona na podstawie ekspresji specyficznych genów markerowych [80]. Transkrypty *Smed-sidt1* występują głównie w komórkach aqp+ (ang. *aquaporin*), tj. komórkach odznaczających się ekspresją genu kodującego akwaporynę oraz w komórkach psap+ (ang. *prosaposin*) wykazujących ekspresję genu prosapozyny. *Smed-sidt2* podobnie jak *Smed-sidt1* ulega najwyższej ekspresji w parenchymie (Rysunek IV-8C): przede wszystkim w komórkach glejowych, które mimo iż występują w OUN, nie są zaliczane do komórek nerwowych, pełnią natomiast dla nich funkcje podporowe [81]. Transkrypty *Smed-sidt2* występują także, chociaż w mniejszym stężeniu, w pozostałych typach komórek parenchymalnych, tj. w komórkach aqp+, psap+, pgrn+ (ang. *progranulin*), a także ldlrr-1+ (ang. *low density lipoprotein receptor-related 1*). W przypadku *Smed-sidt3* najwyższą ekspresję odnotowano w obrębie jelit w fagocytach, a także w epidermie oraz parenchymie (komórki glejowe) (Rysunek IV-8D).



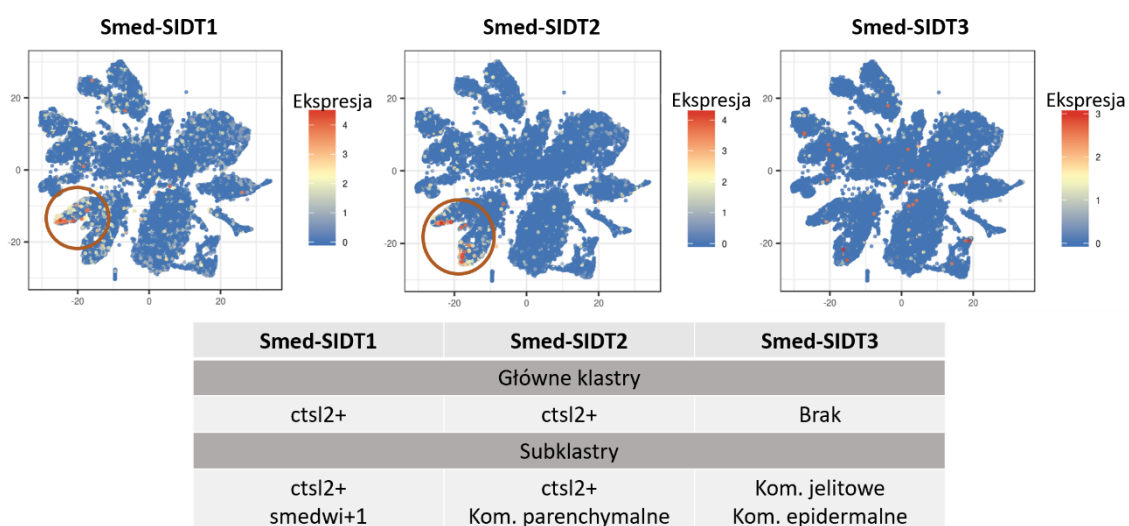
Rysunek IV-8. Lokalizacja tkankowa transkryptów *Smed-sidt1-3* wg atlasu PSCA

A – populacje komórek zidentyfikowane w PSCA [74]; B-D – wykresy poziomu ekspresji genów *Smed-sidt1-3* w poszczególnych populacjach komórek zidentyfikowanych w PSCA, poziom ekspresji oznaczano kolorem od niebieskiego (niska ekspresja) do czerwonego (wysoka ekspresja).

Drugi z atlasów transkryptomocnych wyplawków – baza danych Digiworm – została zbudowana na danych pochodzących z sekwencjonowania transkryptomów ponad 67 000 komórek pozyskanych z wyplawków typu dzikiego. Biorąc pod uwagę, że w przeciętnym ciele wyplawka znajduje się od 0,5 do 1 mln komórek [82] zestaw danych w Digiworm obejmuje transkryptomy bardzo rzadkich komórek występujących nawet w liczbie 10 w organizmie wyplawka. W atlasie Digiworm wszystkie komórki wyplawka podzielono na czterdzieści cztery główne klastry, które przypisano do jednej z ośmiu podstawowych klas tkankowo-narządowych wyróżnianych *S. mediterranea* (protonefrydia, jelita, gardziel, neoblasty, parenchyma, epiderma, tkanka nerwowa i mięśniowa) lub do wyodrębnionej niezależnie klasy komórek wykazujących ekspresję

genu katepsyny (ctsl2+, ang. *cathepsin* +). Wspomniane wyżej 44 klastry obejmują złożone, heterogenne pod względem ekspresji genów populacje komórek. Z tego względu w obrębie każdego z klastrów dokonano podziału na subklastry, łącznie wyróżniono ich ponad 150.

Analiza danych zgromadzonych w Digiworm wykazała, że podwyższone poziomy transkryptów *Smed-sidt1* oraz *Smed-sidt2* występują w populacji komórek ctsl2+ ze szczególnym uwzględnieniem: subklastrów ctsl2+ nr 2 i 4 oraz subklastra smedwi1+ nr 11 w przypadku transkryptu *Smed-sidt1* oraz subklastrów ctsl2+ nr 4, 5, 16 oraz subklastra parenchymalnego nr 5 dla transkryptu *Smed-sidt2* (Rysunek IV-9). Dla *Smed-Sidt3* nie stwierdzono podwyższonej ekspresji w żadnym z głównych klastrów komórkowych, natomiast wskazano dwa subklastry: epidermalny nr 5 oraz jelitowy nr 4.



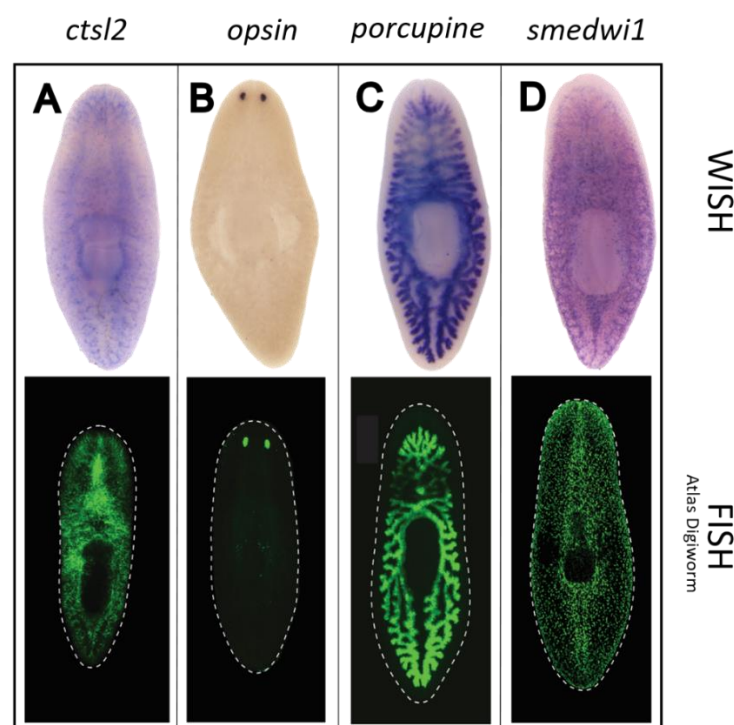
Rysunek IV-9. Lokalizacja tkankowa transkryptów *Smed-Sidt1-3* wg bazy danych Digiworm

Wykresy poziomu ekspresji *Smed-sidt1-3* w pojedynczych komórkach uzyskane na podstawie danych zdeponowanych w atlasie transkryptomicznym Digiworm [73]. Okręgami zaznaczono klastry komórek z podwyższoną ekspresją wskazanych genów. W tabeli podsumowano informacje dotyczące komórek/tkanek z najwyższą ekspresją wskazanych transkryptów z uwzględnieniem podziału na klastry główne i subklastry.

Z uwagi na różnice metodologiczne występujące pomiędzy oboma atlasami, a co za tym idzie, rozbieżności w przypisaniu transkryptów *Smed-sidt1-3* do poszczególnych populacji komórek, podjęto się weryfikacji lokalizacji tkankowej analizowanych transkryptów. W tym celu zastosowano metodę identyfikacji transkryptów z wykorzystaniem hybrydyzacji typu WISH (ang. *whole-mount in situ hybridization*). W metodzie tej wykorzystuje się sondy RNA komplementarne do wybranego regionu

analizowanego transkryptu. Sondy zawierają modyfikowane nukleotydy (np. nukleotydy znakowane digoksygeniną) rozpoznawane przez specyficzne przeciwdziała połączone kowalencyjnie z enzymem (np. alkaliczną fosfatazą). W miejscu związania sondy do transkryptu, po dodaniu odpowiedniego substratu enzym ten katalizuje reakcję, której barwny produkt jest widoczny pod mikroskopem.

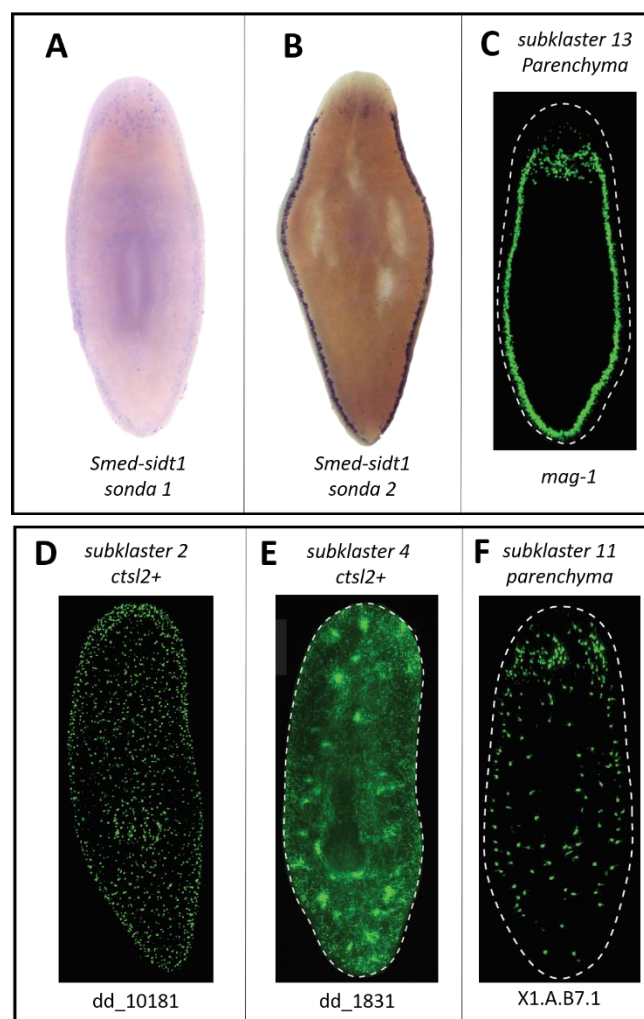
W pierwszym etapie przeprowadzono optymalizację protokołu, wykorzystując sekwencje sond rozpoznających wybrane mRNA należące do grupy dobrze scharakteryzowanych markerów tkankowo-narządowych *S. mediterranea*: *smedwi-1* dla neoblastów [75], *porcupine* dla jelit [83], *opsin* (opsyna) dla oczu [84], *ctsl2* (katepsyna L2) [73] (Rysunek IV-10). Wyniki uzyskane metodą WISH porównano do obrazów uzyskanych metodą FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) zdeponowanych w Digiworm [73] w celu potwierdzenia prawidłowości wzorów. Nie stwierdzono różnic w rozkładzie sygnału pomiędzy otrzymanymi wynikami a danymi pochodzącymi z bazy danych (Rysunek IV-10). Należy jednak przyznać, iż technika FISH w przypadku genów o bardzo niskiej ekspresji lub ekspresji punktowej może dawać lepsze rezultaty niż WISH.



Rysunek IV-10. Wizualizacja transkryptów metodą WISH oraz FISH

Zdjęcia prezentują wynik wizualizacji wskazanych transkryptów technikami WISH i FISH. A – *ctsl2*, B – *opsin*, C – *porcupine*, D – *smedwi1*. W przypadku techniki WISH preparaty zostały przygotowane samodzielnie, natomiast zdjęcia uzyskane techniką FISH zostały pobrane z bazy Digiworm [73].

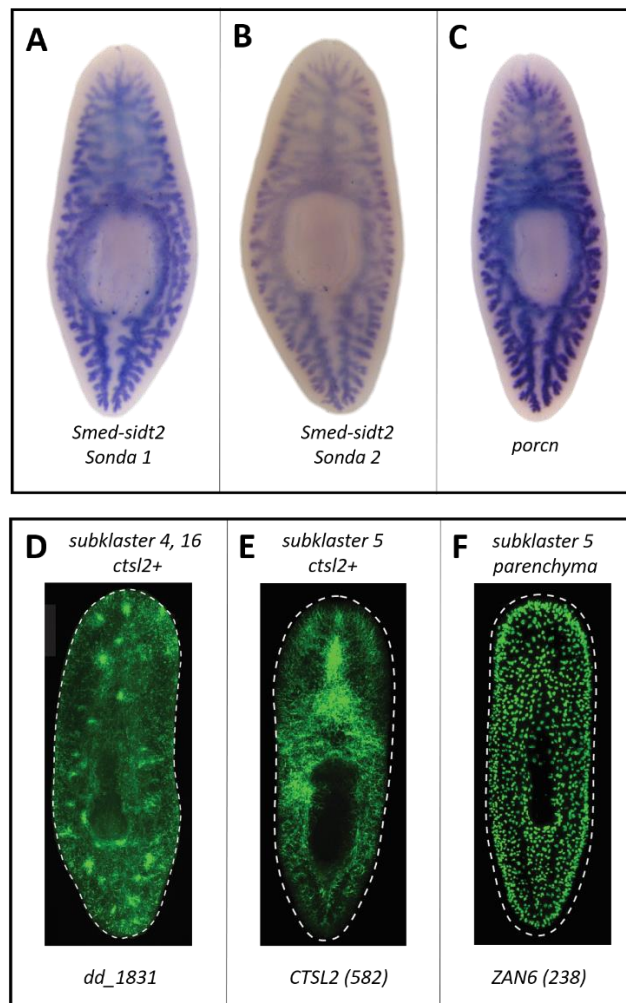
Obraz uzyskany dla *Smed-sidt1* wskazuje na lokalizację jego transkryptu na obwodzie ciała *S. mediterranea* oraz w środkowej części głowy (Rysunek IV-11A, B). Wzór ten nie odpowiada rozkładowi ekspresji wskazanemu w atlasie Digiworm, tj. typowemu dla komórek subklastrów *ctsl2+* nr 2 i 4 oraz subklastra *smedwi1+* nr 11 (Rysunek IV-11D-F). Przeszukiwanie bazy danych Digiworm wykazało, iż otrzymany wzór tkankowy jest zbliżony do wzoru charakterystycznego dla klastra parenchymalnego nr 13, dla którego markerem jest gen *mag-1* (ang. *marginal adhesive gland-1*) (Rysunek IV-10C). Ulega on ekspresji w subepidermalnych komórkach wydzielniczych zlokalizowanych na obwodzie ciała wyjątkowo z pominięciem części głowowej [85].



Rysunek IV-11. Tkankowy wzór ekspresji *Smed-sidt1*

A, B – Zdjęcia przedstawiające wynik wizualizacji transkryptów *Smed-sidt1* metodą WISH z wykorzystaniem dwóch różnych sond. Sonda 1 – V_Smed_sidt1, sonda 2 – V1_Smed_sidt1. C-F – Zdjęcia zdeponowane w bazie Digiworm przedstawiające wynik wizualizacji wskazanych transkryptów metodą FISH [73].

Analiza lokalizacji transkryptu *Smed-sidt2* metodą WISH wskazuje niezależnie od zastosowanej sondy charakterystyczny rozgałęziony wzór (Rysunek IV-12A, B), typowy dla jelit (Rysunek IV-12C), a nie dla komórek subklastrów *ctsl2+* nr 4, 5, 16 czy subklastra parenchymalnego nr 5, które wskazano w bazie Digiworm jako komórki o podwyższonej ekspresji *Smed-sidt2* (Rysunek IV-9, IV-12D-F).

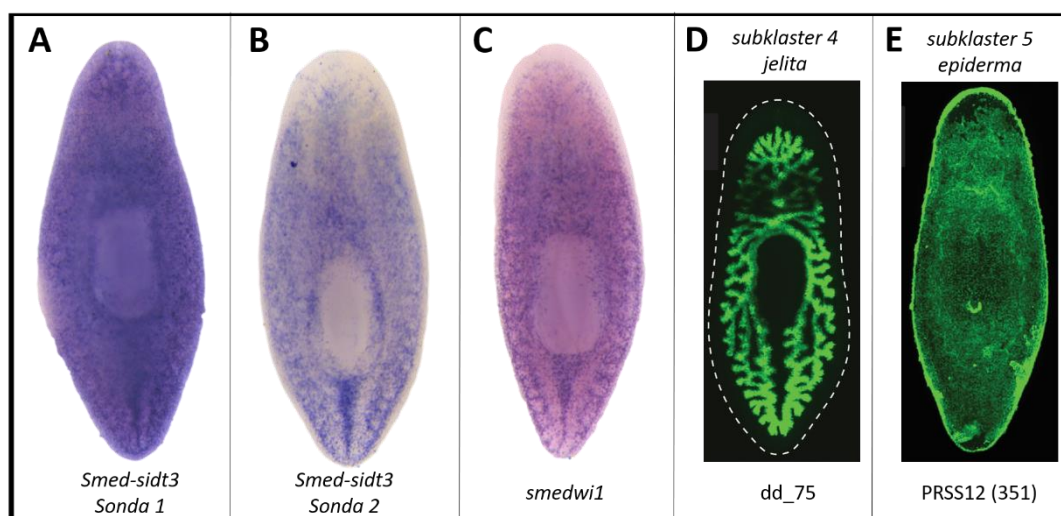


Rysunek IV-12. Tkankowy wzór ekspresji *Smed-sidt2*

A-C – Zdjęcia przedstawiające wynik wizualizacji transkryptów metodą WISH – *Smed-sidt2* z wykorzystaniem dwóch różnych sond Sonda 1 – V_Smed_sidt2, Sonda 2 – V1_Smed_sidt2 i *porcn*. D-F – Zdjęcia zdeponowane w bazie Digiworm przedstawiające wynik wizualizacji wskazanych transkryptów metodą FISH [73].

Wyniki WISH dla *Smed-sidt3* wskazują na rozproszony, częściowo punktowy wzór ekspresji w całym ciele za wyjątkiem gardzieli (Rysunek IV-13A, B). Taki obraz jest podobny do tego charakterystycznego dla neoplastów (*smedwil*) (Rysunek IV-13C) lub komórek *ctsl2+* (Rysunek IV-10A), nie zaś komórek jelitowych (Rysunek IV-13D)

lub epidermalnych (Rysunek IV-13E), które wskazano w bazie Digiworm jako komórki o podwyższonej ekspresji *Smed-sidt3* (Rysunek IV-9).



Rysunek IV-13. Tkankowy wzór ekspresji *Smed-sidt3*

A-C – Zdjęcia przedstawiające wynik wizualizacji transkryptów metodą WISH – *Smed-sidt3* z wykorzystaniem dwóch różnych sond. Sonda 1 – V_Smed_sidt3, Sonda 2 – V1_Smed_sidt3 oraz *smedwi1*. D-E – Zdjęcia zdeponowane w bazie Digiworm przedstawiające wynik wizualizacji wskazanych transkryptów metodą FISH [73].

Lokalizacja transkryptów *Smed-sidt2* i *Smed-sidt3* określona techniką WISH była inna niż wskazują analizowane atlasy transkryptomiczne. Wyłącznie *Smed-sidt1* prezentował wzór tkankowy tożsamy z tym wynikającym z baz danych. W Tabeli IV-3 przedstawiono podsumowanie lokalizacji tkankowych określonych na podstawie danych NGS zgromadzonych w bazach PSCA i Digiworm oraz na podstawie obrazowania metodą WISH.

Tabela IV-3. Podsumowanie informacji związanych z lokalizacją tkankową transkryptów dla białek Smed-SID1-3

	Smed-SIDT1	Smed-SIDT2	Smed-SIDT3
Planaria Single Cell Atlas	parenchyma (aqp+, psap+)	parenchyma (komórki glejowe, aqp+, psap+, pgrn+, ldrr-1+)	parenchyma (komórki glejowe), epiderma, jelita (fagocyty)
Digiworm	neoblasty, ctsl+	parenchyma, ctsl+	jelita, epiderma
WISH	parenchyma	jelita	neoblasty/ctsl+ (?)

IV-3. Analiza *in silico* lokalizacji i struktury białek Smed-SIDT1-3

W sekwencji każdego z transkryptów *Smed-sidt1-3* zidentyfikowano najdłuższą ramkę odczytu, na podstawie której wyznaczono przewidywane sekwencje białek Smed-SIDT1-3 (Załącznik 3). Ich wielkość oraz teoretyczny punkt izoelektryczny obliczony na podstawie sekwencji przedstawiono w Tabeli IV-4 i zestawiono z danymi dla Ce-SID-1 (Q9GZC8), jego paraloga Ce-CHUP-1 (Q9GYF0) oraz ludzkiego homologa Hs-SIDT-1 (Q9NXL6).

Wielkość analizowanych białek *S. mediterranea* waha się w granicach od 88,51 kDa (Smed-SID-2) do 90,9 kDa (Smed-SIDT1) i jest zbliżona do białek *C. elegans* (ok. 88 kDa) oraz *H. sapiens* (ok. 94 kDa) (Tabela IV-4). Natomiast teoretyczny punkt izoelektryczny obliczony na podstawie sekwencji białkowej jest w przypadku Smed-SIDT2 i 3 wyższy ($pI > 8$) niż dla Smed-SIDT1 oraz pozostałych analizowanych białek ($pI \leq 7$) (Tabela IV-4).

Tabela IV-4. Porównanie wielkości i ładunku homologów Ce-SID-1

Nazwa białka	Długość białka	Masa cząsteczkowa	Teoretyczny punkt izoelektryczny
Smed-SIDT1	780 aa	90,9 kDa	6,94
Smed-SIDT2	747 aa	88,51 kDa	8,85
Smed-SIDT3	766 aa	89,5 kDa	8,45
Ce-SID-1	776 aa	87,9 kDa	7,32
Ce-CHUP-1	756 aa	87,1 kDa	6,76
Hs-SIDT1	827 aa	93,8 kDa	6,55

Lokalizacja subkomórkowa białek SID-1

Lokalizację subkomórkową analizowanych białek przewidziano za pomocą programu DeepLoc 1.0 [86]. Wykorzystuje on model predykcyjny zbudowany na rekurencyjnych sieciach neuronowych, które przetwarzają pełną sekwencję danego białka i na jej podstawie przewidują prawdopodobieństwo występowania białka w obrębie dziesięciu lokalizacji: błony komórkowej, lizosomu/wodniczki, siateczki śródplazmatycznej, aparatu Golgiego, mitochondrium, peroksysomu, jądra, plastydu, cytoplazmy, przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Model wykorzystywany w DeepLoc 1.0 został wytrenowany na 13 858 sekwencji białkowych zdeponowanych w bazie UniProt.

Analiza sekwencji Smed-SIDT1-3 wskazuje, że wszystkie trzy białka z najwyższym prawdopodobieństwem lokalizują się w błonie komórkowej oraz w błonie lizosomów (Tabela IV-5). Model DeepLoc podobną lokalizację przewidział też dla białek *C. elegans* oraz *H. sapiens* (Tabela IV-5). Jest ona zgodna z wynikami wcześniejszych analiz *in vitro* i *in vivo* tych białek [26,31].

Tabela IV-5. Przewidywana lokalizacja subkomórkowa homologów Ce-SID-1

Prawdopodobieństwo (%) wystąpienia białka w danym kompartmentcie określone przez model sieci neuronowej programu DeepLock 1.0 [86].

	Smed-SIDT1	Smed-SIDT2	Smed-SIDT3	Ce-SID-1	Hs-SIDT1	Ce-CHUP-1
Błona komórkowa	51	47,8	49,5	54,8	58,4	48,7
Lizosom	33,5	26,2	32,8	25,2	34,7	29,6
Siateczka śródplazmatyczna	7,9	15,7	9,9	10,9	3,1	10,7
Aparat Golgiego	6,6	9,1	7,5	8,3	3,5	9,4
Jądro komórkowe	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,4
Cytoplazma	0,1	0,1	0	0	0	0,1
Plastydy	0	0	0	0	0	0
Peroksysomy	0,2	0,3	0	0,1	0,1	0,4
Mitochondium	0,4	0,5	0,1	0,5	0,2	0,7
Przestrzeń zewnątrzkomórkowa	0	0	0	0	0	0

Analiza struktury pierwszorzędowej białek

Porównanie sekwencji aminokwasowej wszystkich 7 analizowanych białek wykazało, że białka *S. mediterranea* są bardziej podobne do białek Hs-SIDT1 i Ce-CHUP-1 niż do Ce-SID-1 (Tabela IV-6). W przypadku Smed-SIDT1 i Smed-SIDT2 podobieństwo sekwencji do białka ludzkiego sięga 35-37%, podczas gdy ich podobieństwo do Ce-SID-1 nie przekracza 28%. Co ciekawe, podobna zależność występuje pomiędzy oboma białkami *C. elegans* a białkiem ludzkim – podobieństwo pomiędzy Ce-CHUP-1 i Hs-SIDT1 wynosi ok. 33%, a pomiędzy Ce-SID-1 i Hs-SIDT1 – 24%. Jedynie Smed-SIDT2 wykazuje zbliżone podobieństwo sekwencji do obu białek *C. elegans* (ok. 27%) i białka ludzkiego (ok. 29%). W obrębie białek *S. mediterranea*, najbardziej podobne do siebie są białka Smed-SIDT1 oraz Smed-SIDT3 (47,16% identyczności) (Tabela IV-6).

Tabela IV-6. Porównanie sekwencji aminokwasowych homologów *Ce-SID-1*

Identyczność sekwencji białek (%) wyznaczona na podstawie ich przyrównania z wykorzystaniem algorytmu BLASTp.

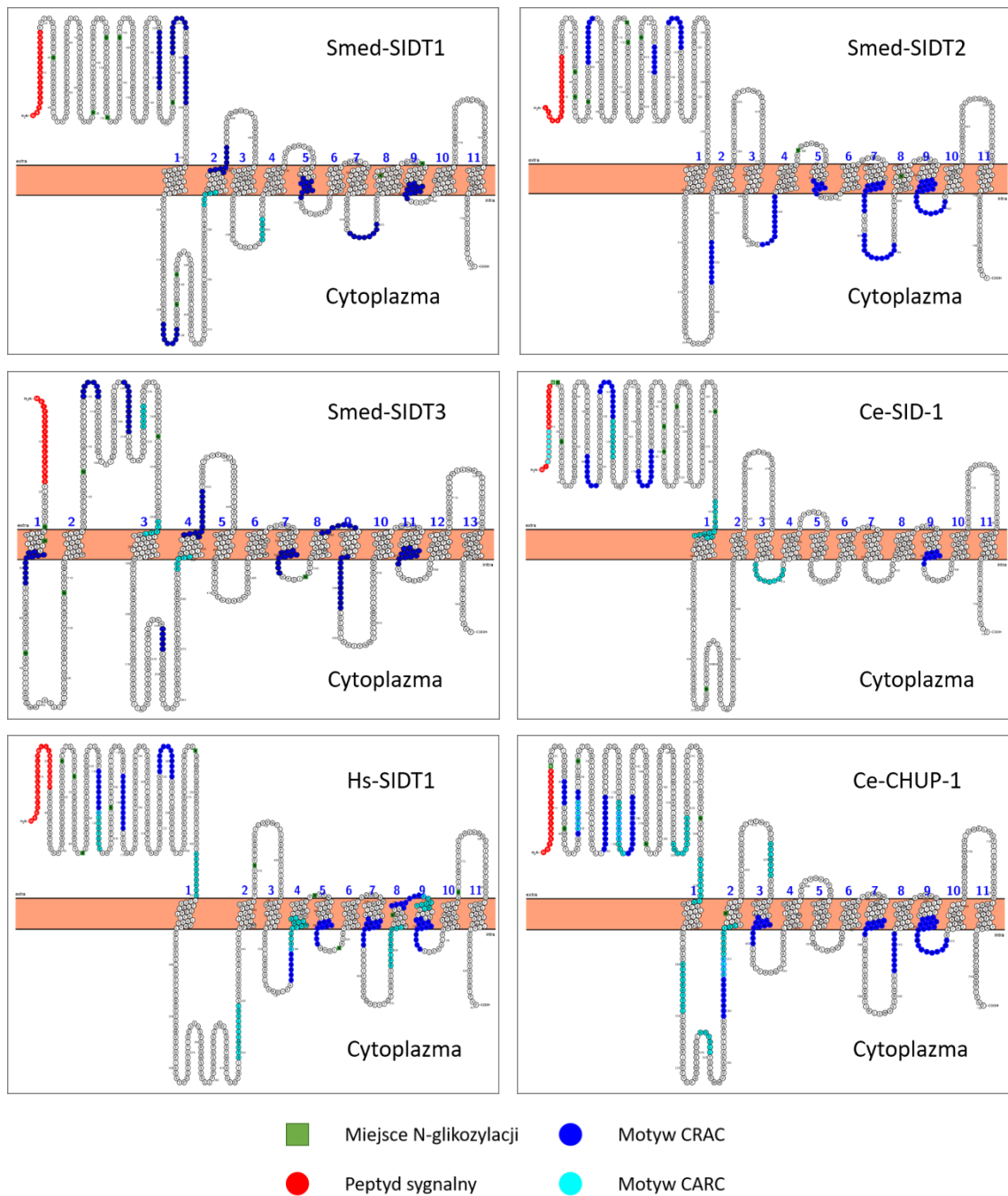
	Smed-SIDT1	Smed-SIDT2	Smed-SIDT3	Ce-SID-1	Ce-CHUP-1	Hs-SIDT1
Smed-SIDT1		38,54	47,16	25,15	30,65	36,56
Smed-SIDT2	38,54		36,74	27,4	27,72	28,91
Smed-SIDT3	47,16	36,74		31,01	30,33	35,78
Ce-SID-1	25,15	27,4	31,01		29,66	24,13
Ce-CHUP-1	30,65	27,72	30,33	29,66		32,97
Hs-SIDT1	36,56	28,91	35,78	24,13	32,97	

W kolejnym etapie zweryfikowano, czy w sekwencjach Smed-SIDT1-3 występują motywy sekwencyjne zidentyfikowane w Ce-SID-1, Ce-CHUP-1 lub Hs-SIDT1, w szczególności: peptydu sygnałowego oraz motywów wiązania cholesterolu. W przypadku wszystkich trzech białek *S. mediterranea* zidentyfikowano na ich końcu N, Sec-zależną sekwencję sygnałową kierującą białka eukariotyczne do szlaku sekrecyjnego dla białek błonowych (Rysunek IV-14). Dodatkowo, zidentyfikowano kilka powtórzeń motywów wiążących cholesterol, należących do dwóch głównych typów: CRAC (ang. *Cholesterol Recognition/interaction Amino acid Consensus sequence*) i CARC (Rysunek IV-14). CRAC jest najlepiej opisaną w literaturze domeną odpowiedzialną za wiązanie

cholesterolu [87]. Jest to liniowy motyw o sekwencji (L/V)-X₁₋₅-(Y)-X₁₋₅-(K/R) zidentyfikowany m.in. w białkach Ce-CHUP-1 i Hs-SIDT1. Motyw CRAC wykazuje szczególnie silne powinowactwo do cholesterolu znajdującego się w błonach komórkowych [88]. Domena CARC posiada podobne właściwości jak CRAC, wykazuje jednak odwrotną orientację wzdłuż łańcucha polipeptydowego tj. (K/R)-X₁₋₅-(Y/F)-X₁₋₅-(L/V), stąd jej nazwa [89].

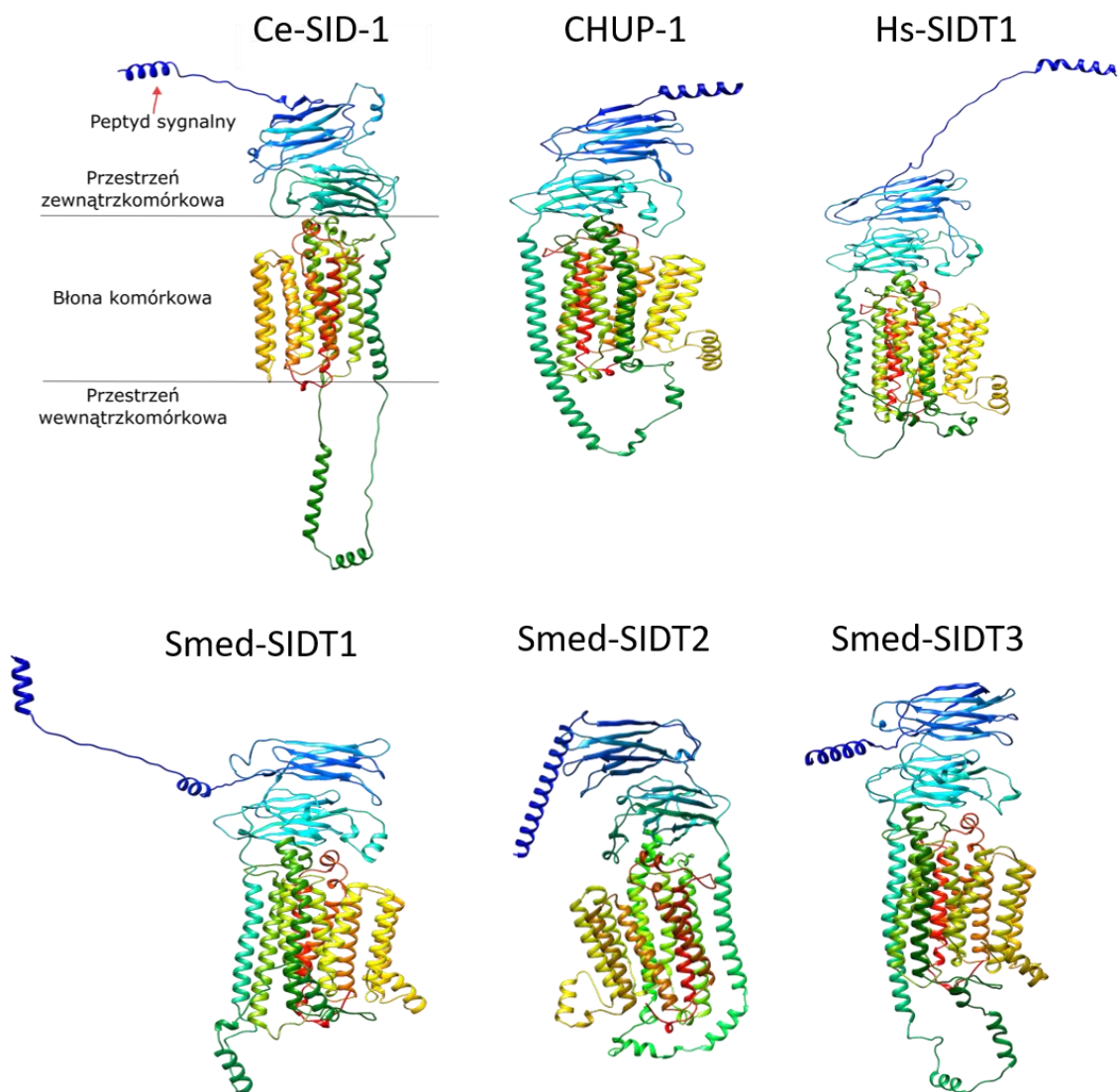
Analiza topologii białek

Topologię analizowanych białek przewidziano z wykorzystaniem narzędzia Protter [90], które wykorzystuje: zarówno informacje o topologii białek pochodzące z zewnętrznych baz danych (głównie UniProt), jak również dane eksperymentalne np. z bazy PeptideAtlas [91]. Smed-SIDT1-3 wykazują budowę wielodomenową, transbłonową (Rysunek IV-14). Topologia białek Smed-SIDT1 oraz Smed-SIDT2 jest bardzo podobna do topologii Ce-SIDT-1, Ce-CHUP-1 oraz Hs-SIDT1. Wszystkie ww. białka posiadają 11 domen transbłonowych, dużą N-końcową domenę zewnątrzkomórkową oraz niewielką domenę cytoplazmatyczną. W porównaniu do nich, Smed-SIDT3 posiada 13 domen transbłonowych. Dwie dodatkowe domeny, których brak w pozostałych porównywanych białkach, powstały z udziałem aminokwasów z N-końcowego fragmentu Smed-SIDT3 kosztem skrócenia domeny zewnątrzkomórkowej.



Rysunek IV-14. Przewidywana topologia białek z rodziny SID-1

Topologia białek Smed-SIDT1-3, Ce-SID-1, CHUP-1, Hs-SIDT1 została określona za pomocą programu Protter [90]. Manualnie wprowadzono koordynaty peptydów sygnałnych zidentyfikowanych w programie SignalP3.0 [92] oraz motywów wiążących cholesterol zidentyfikowanych przy użyciu programu fuzzpro [93]. Kolorem czerwonym oznaczono peptyd sygnałny, zielonym - miejsca N-glikozylacji, seledynowym – motyw CARC, a granatowym motyw CRAC.



Rysunek IV-15. Modele struktury trzeciorzędowej białek z rodziny SID-1

Modele trójwymiarowe białek Ce-SID-1, Ce-CHUP-1, Hs-SIDT1, Smed-SIDT1-3 zostały wygenerowane z wykorzystaniem narzędzia trRosetta. Zastosowano gradient kolorystyczny rozpoczęty kolorem granatowym (koniec N białka) a zakończony kolorem czerwonym (koniec C białka) z uwzględnieniem zmiany koloru dla poszczególnych domen.

Na podstawie wygenerowanych modeli 3D wszystkich białek możemy postulować znaczne podobieństwo w ich budowie (Rysunek IV-15). Białka można podzielić na trzy fragmenty, zewnątrzkomórkowy zakończony alfa helisą na N-końcu, transmembranowy składający się z kilkunastu domen transmembranowych oraz wewnątrzkomórkowy z C-końcem. Struktura 3D białek dodatkowo pozwoliła uwidocznić charakterystyczny motyw beta kartki pojawiający się po fragmencie peptydu sygnałnego.

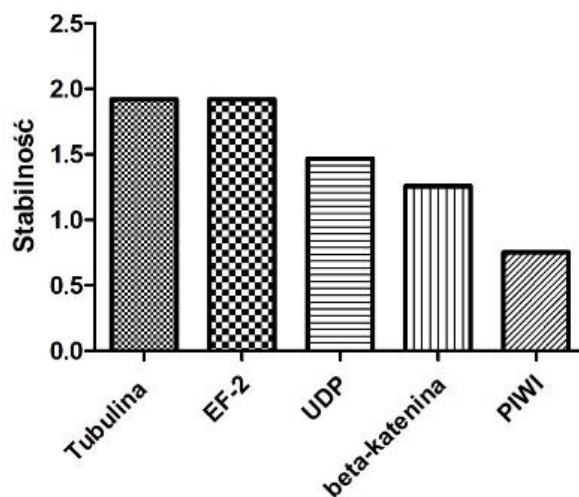
IV-4. Charakterystyka funkcjonalna genów *Smed-sidt1-3*

Zgromadzone wyniki dotyczące (i) wzorów akumulacji transkryptów, (ii) przewidywanej struktury białek oraz (iii) ontologii genów pod kątem funkcji pełnionych w komórce, wydają się wskazywać na zaangażowanie genów *Smed-sidt1-3* w proces transportu dsRNA i ich udział w RNAi. W celu weryfikacji tej hipotezy i sprawdzenia, czy białka Smed-SIDT1-3 pełnią rolę kanałów importujących dsRNA do komórek zastosowano dwa modele badawcze: (i) *S. mediterranea* (ii) komórki embrionalne *D. melanogaster* S2, które pozbawione są homologów SID-1 i posiadają ograniczoną zdolność do pobierania RNA z medium komórkowego [20].

Charakterystyka funkcjonalna Smed-sidt1-3 in vivo w modelu S. mediterranea

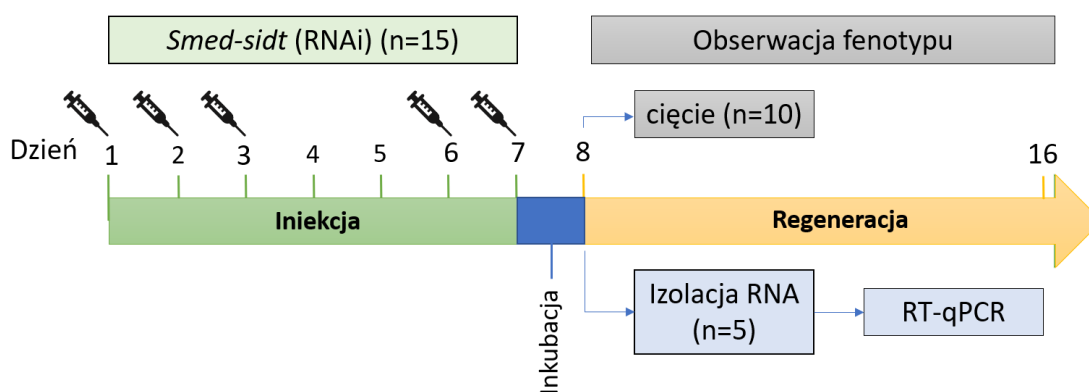
RT-qPCR jest jedną z podstawowych metod szybkiego i niezawodnego oznaczania ilościowego ekspresji genów. Aby przeprowadzić dokładną analizę względnej ekspresji genów w różnych próbkach, tkankach lub warunkach eksperymentalnych, należy użyć genów referencyjnych w celu znormalizowania zmienności pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami. Biorąc pod uwagę, iż RT-qPCR nie był do tej pory powszechnie wykorzystywany w badaniach *S. mediterranea* oraz fakt, iż w niniejszej pracy metoda ta została wybrana jako podstawowa technika pomiaru poziomu transkryptów na potrzeby analiz funkcjonalnych, przed przystąpieniem do zasadniczej części badań konieczne było przeprowadzenie wstępnych analiz mających na celu wybranie genu referencyjnego. W tym celu sprawdzono, jak stabilna w wybranych warunkach jest ekspresja genów kodujących następujące białka: PIWI (ang. *piwi-like protein 1*), czynnik elongacyjny 2 (EF-2, ang. *elongation factor 2*), β -kateninę, fosforylazę urydyny (UDP, ang. *uridine phosphorylase*), tubulinę (ang. *tubulin*). Poziomą akumulację transkryptów ww. genów mierzono metodą RT-qPCR w materiale izolowanym z wypławków typu dzikiego, wypławków będących w fazie aktywnej regeneracji (od 1 do 3 dni po amputacji głowy), wypławków, którym podano kontrolny dsRNA GFP.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż wymagania stawiane genom referencyjnym – względną stabilność poziomu mRNA niezależnie od warunków – spełniają geny dla tubuliny i EF-2 (Rysunek IV-17). Arbitralnie, do dalszych eksperymentów wybrano EF-2.



Rysunek IV-16. Analiza stabilności ekspresji genów referencyjnych

Analiza stabilności ekspresji genów w wybranych warunkach fizjologicznych. Dla każdego genu obliczono stabilność ekspresji definiowaną jako $\ln(1/M)$, gdzie wartość M jest średnią arytmetyczną wszystkich wariacji pomiędzy parami analizowanych transkryptów. Im niższa wartość M , tym bardziej stabilny jest gen odniesienia. Analiz dokonano za pomocą narzędzia CFX Maestro (Bio-Rad).

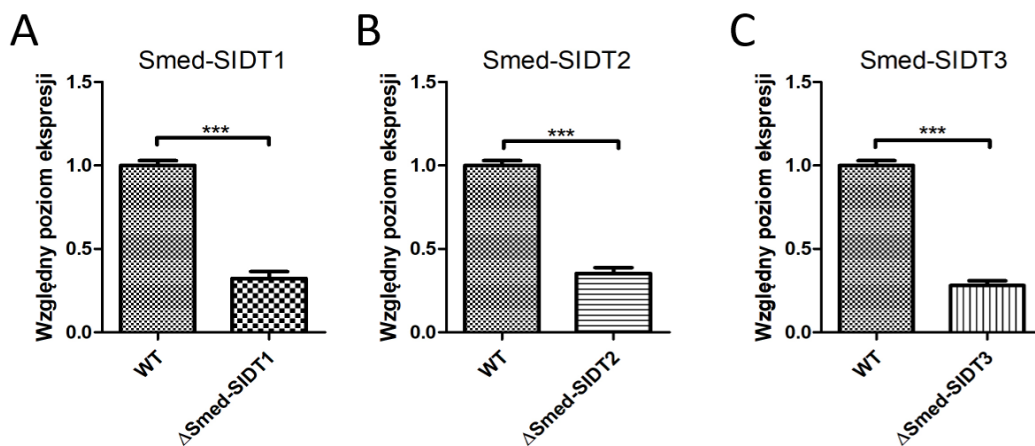


Rysunek IV-17. Ocena wydajności wyciszania ekspresji genów *Smed-sidt1-3* z wykorzystaniem metody dojelitowej iniekcji dsRNA

Schemat eksperymentu zakładał wprowadzenie na drodze iniekcji do ciała wypławka ($n = 15$) dsRNA o sekwencji komplementarnej do fragmentu badanego genu. Iniekcje wykonywano pięciokrotnie w dniu 1, 2, 3, 6 i 7. Po tym czasie wypławki cięto ($n = 10$) lub uśmiercano i izolowano z nich RNA ($n = 5$). Cięte wypławki monitorowano przez kolejne 8 dni. Wyizolowany całkowity RNA wykorzystywano do analizy poziomu ekspresji *Smed-sidt1-3* metodą RT-qPCR.

Analiza funkcjonalna genów *Smed-sidt1-3* w modelu *S. mediterranea* zakładała wyciszenie ich ekspresji poprzez indukcję RNAi za pomocą dsRNA wstrzykiwanego do światła jelita. W celu opracowania optymalnego schematu eksperymentu oraz określenia, czy wyciszenie *Smed-sidt1-3* nie wpływa negatywnie na regenerację wypławków przeprowadzono wstępne testy zgodnie z planem zaprezentowanym na Rysunku IV-17.

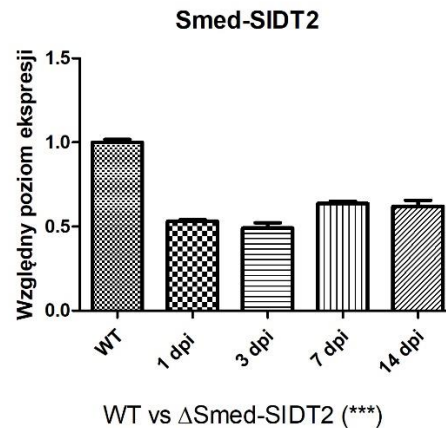
Każdorazowo do eksperymentu wykorzystywano 15 wypławków, którym podawano raz dziennie przez trzy następujące po sobie dni (dni 1-3) dsRNA o sekwencji komplementarnej do fragmentu transkryptów *Smed-sidt1-3*. Następnie po dwudniowej przerwie (dni 4-5) stosowano tzw. dawki przypominające (dni 6-7). Dzień po podaniu ostatniej dawki (dzień 8) z pięciu wypławków izolowano RNA w celu określenia względnego poziomu ekspresji wybranych genów metodą RT-qPCR. Pozostałe 10 wypławków cięto wzdłuż osi poprzecznej ciała i obserwowano przebieg ich regeneracji przez kolejne 8 dni. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zastosowany schemat iniekcji (Rysunek IV-17) pozwolił wyciszyć ekspresję badanych genów w 67% dla *Smed-sidt1*, 65% dla *Smed-sidt2* i 72% dla *Smed-sidt3*, w porównaniu do kontrolnych wypławków typu dzikiego, którym nie podawano dsRNA (Rysunek IV-18). Na przykładzie *Smed-sidt2* wykazano, że efekt inhibicji utrzymywał się aż do 14 dni po ostatnim podaniu indukującego wyciszanie dsRNA (Rysunek IV-19).



Rysunek IV-18. Wydajność wyciszania ekspresji genów *Smed-sidt1-3*

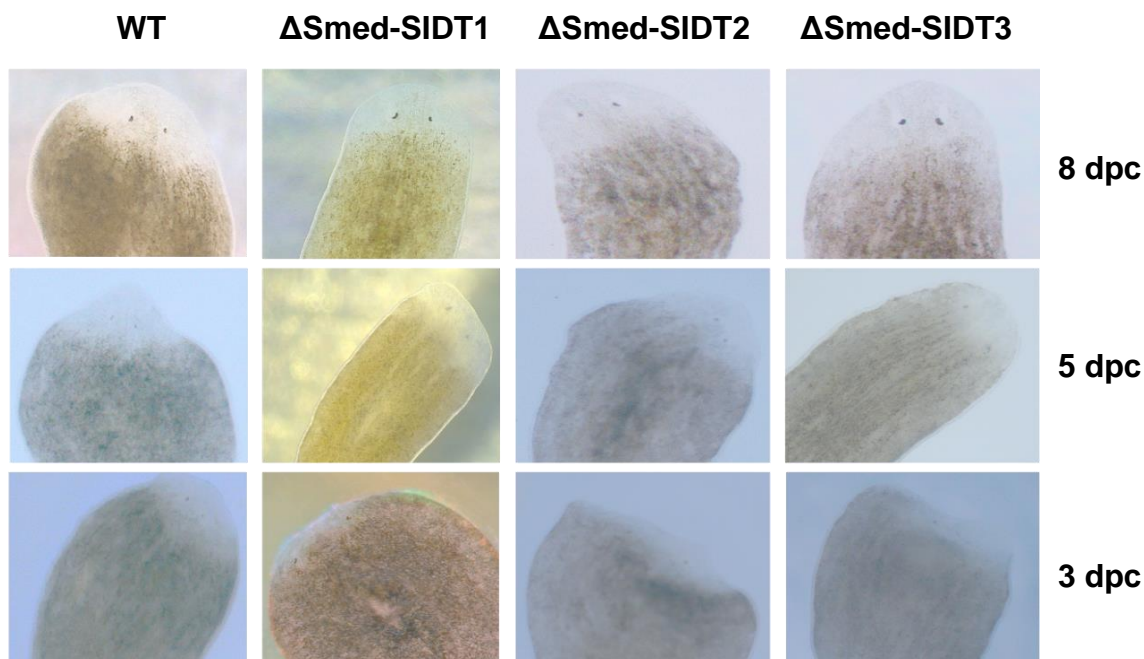
Analiza poziomów ekspresji A – *Smed-sidt1*, B – *Smed-sidt2*, C – *Smed-sidt3* metodą RT-qPCR na materiale izolowanym z wypławków, którym pięciokrotnie podano dsRNA komplementarny do wskazanego transkryptu (Δ *Smed-sidt1-3*). Wyniki normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wypławków. Istotność statystyczną określano względem próbki WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, ***($p \leq 0,001$).

Obserwacja wyplawków przeciętych na pół w dniu 8 (Rysunek IV-17) nie wykazała żadnych zauważalnych zmian fenotypowych w zakresie procesu regeneracji. Organizmy, u których wyciszano geny *Smed-sidt1-3*, po 8 dniach odtworzyły utracone części ciała podobnie jak wyplawki typu dzikiego (Rysunek IV-20). Nie stwierdzono również, żeby inhibicja *Smed-sidt1-3* wywoływała zmiany behawioru *S. mediterranea* tzn. nie zaobserwowano znamion zaburzonej fotofobii, spadku zainteresowania pokarmem czy zdolności do jego pobierania.



Rysunek IV-19. Trwałość efektu wyciszenia ekspresji *Smed-sidt2* u wyplawków, którym na drodze iniekcji podano dsRNA

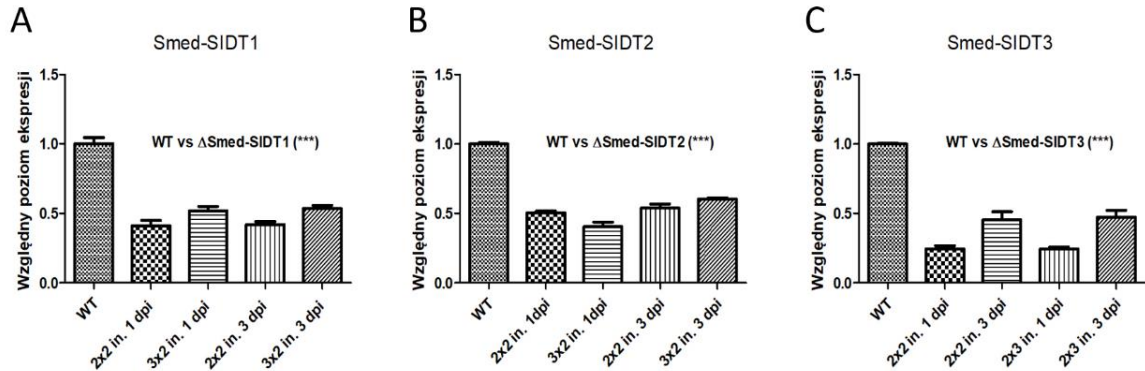
Analiza poziomu ekspresji *Smed-sidt2* w materiale izolowanym w różnych punktach czasowych z wyplawków, którym podano dsRNA komplementarny do wycisanego transkryptu (Δ *Smed-sidt2*). Poziom ekspresji określono metodą RT-qPCR. Wyniki normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wyplawków. Istotność statystyczną określano względem próbki WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, w przypadku wszystkich próbek wyniosła ona $p \leq 0,001$ (***) . Dpi – dzień od ostatniej iniekcji.



Rysunek IV-20. Weryfikacja wpływu wyciszenie ekspresji *Smed-sidt1-3* na proces regeneracji

Zdjęcia dokumentujące proces regeneracji części głowowej *S. mediterranea*. WT – wyplawki typu dzikiego, Δ Smed-SIDT1-3 – wyplawki, w których wyciszono ekspresję odpowiednio *Smed-sidt1-3*. Dpc – dni po dekapitacji (ang. *day post-cutting*).

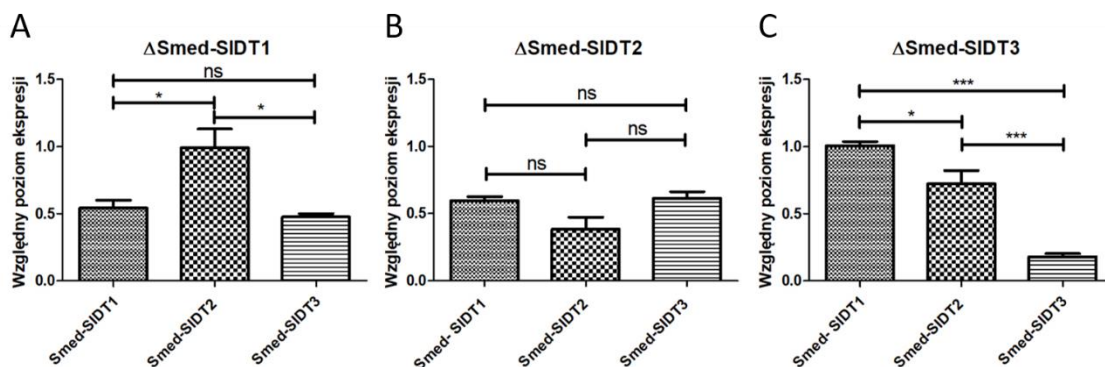
Przetestowany schemat wyciszania (Rysunek IV-17), choć wydajny, wymagał pięciokrotnego podania dsRNA przez siedem dni. Aby skrócić procedurę, zdecydowano się zintensyfikować podawanie dsRNA do dwóch razy w ciągu doby, zachowując minimum siedmiogodzinny odstęp czasu pomiędzy poszczególnymi iniekcjami. Porównanie wydajności dwóch schematów podawania dsRNA: 2 dni po 2 iniekcje dziennie (2x2) oraz 3 dni po 2 iniekcje dziennie (3x2) wykazało, że oba modele pozwoliły na wydajne obniżenie poziomów wszystkich trzech badanych transkryptów o ponad 50% (Rysunek IV-21). Okazały się więc skuteczniejsze niż pierwotnie testowany schemat siedmiodniowy (Rysunek IV-18). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy schematem dwudniowym i trzydniowym, stąd na dalszych etapach zdecydowano się stosować ten pierwszy.



Rysunek IV-21. Poziom ekspresji genów *Smed-sidt* u *S. mediterranea* poddanych czynnikom stresowemu – przerwanie ciągłości warstw ciała

Analiza poziomów ekspresji genów: A – *Smed-sidt1*, B – *Smed-sidt2*, C – *Smed-sidt3*. Materiał do analiz prowadzonych metodą RT-qPCR izolowano z wypławków, którym podano dsRNA komplementarny do wskazanego transkryptu (Δ *Smed-sidt1-3*) w schemacie 2x2 lub 3x2. Wyniki normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wypławków. Istotność statystyczną określano względem próbki WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, w przypadku wszystkich próbek wyniosła ona $p \leq 0,001$ (***) . Dpi – dzień od ostatniej iniekcji.

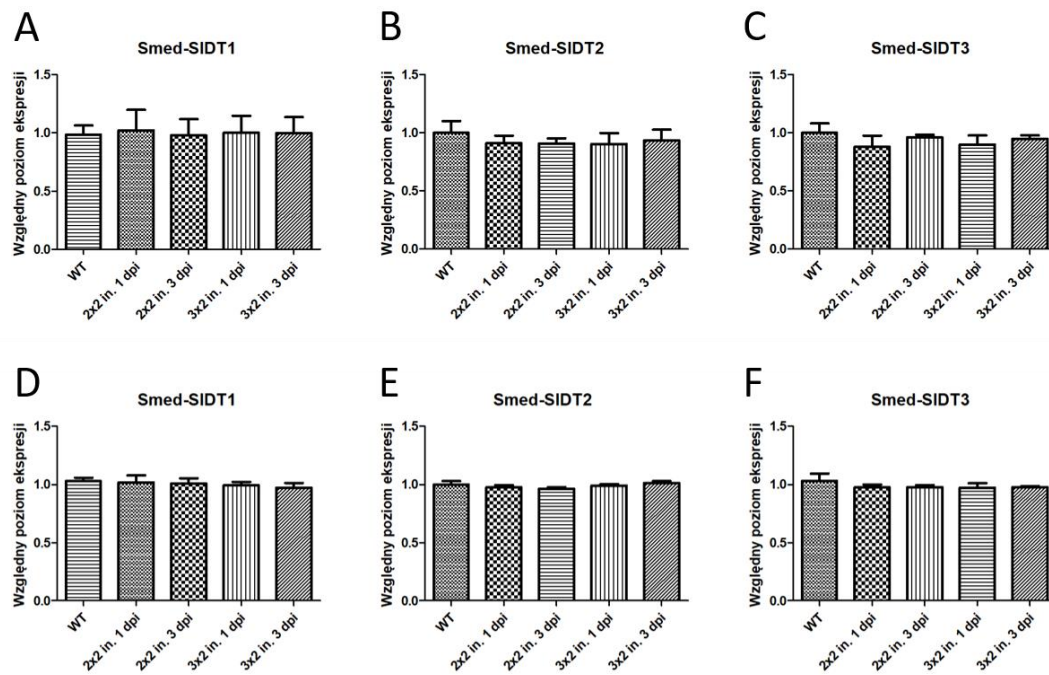
Dodatkowo, dla prób pochodzących ze schematu 2x2 sprawdzono, czy wycieszenie ekspresji jednego z analizowanych genów *Smed-sidt1-3* wpływa na poziom ekspresji dwóch pozostałych homologów. Analiza wyników RT-qPCR wykazała, że w wypławkach, w których dochodzi do wycieszenia ekspresji *Smed-sidt1* obniżeniu o ok. 50% ulega również poziom transkryptu *Smed-sidt3* (Rysunek IV-22A). W przypadku inhibicji ekspresji *Smed-sidt2* spada również poziom transkryptów *Smed-sidt1* i *Smed-sidt3* (Rysunek IV-22B). Wycieszenie ekspresji *Smed-sidt3* nie wpływa na poziom ekspresji *Smed-sidt1* i ma niewielki wpływ na poziom ekspresji *Smed-sidt2* (spadek o 20%) (Rysunek IV-22C).



Rysunek IV-22. Analiza poziomów ekspresji *Smed-sidt1-3* w układach z wyciszonym wybranym genem

A-C – Analiza poziomów ekspresji wskazanych genów metodą RT-qPCR. A – wyplawki z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1*, B – wyplawki z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt2*, C – wyplawki z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt3*. Materiał do analiz izolowano z wyplawek nastrzykiwanych dsRNA w schemacie 2x2. Wyniki uzyskane dla poszczególnych transkryptów normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wyplawek. Istotność statystyczną określano względem próbki WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego. p w przypadku żadnej ze zmian nie stwierdzono istotności statystycznej, $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**), ns – brak istotności.

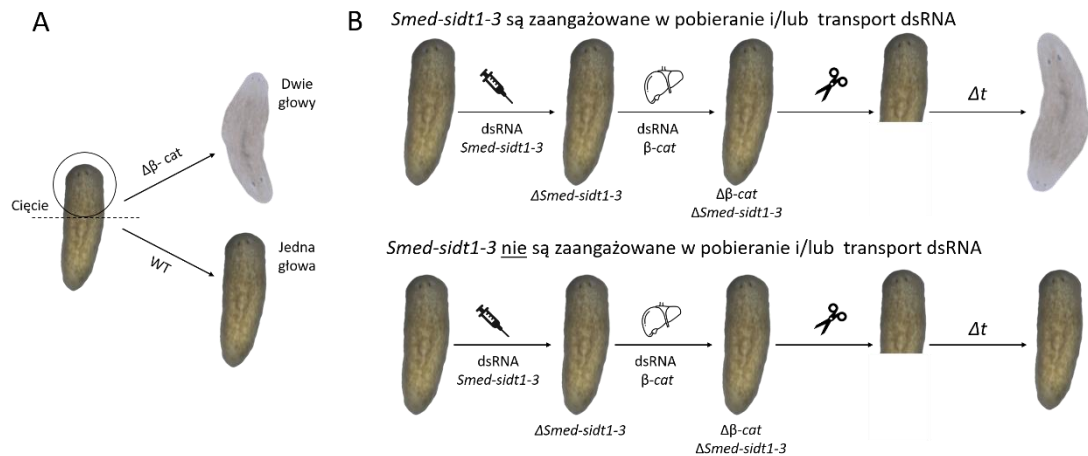
Iniekcja dsRNA powoduje przerwanie ciągłości powierzchni ciała wyplawka na skutek czego dochodzi do uruchomienia programów transkrypcyjnych związanych z regeneracją [94]. Podwyższeniu ekspresji ulegają m.in. niektóre czynniki transkrypcyjne. Analiza poziomów ekspresji *Smed-sidt1-3* w wyplawkach poddanych jedynie nakłuciu w schemacie 2x2 lub 3x2 nie wykazała istotnych statystycznie zmian (Rysunek IV-23A-C). Nie stwierdzono też, aby wprowadzenie do badanego organizmu dsRNA (dsRNA *EGFP*) niewykazującego komplementarności do analizowanych transkryptów, zmieniało poziomy ich akumulacji (Rysunek IV-23D-F).



Rysunek IV-23. Profile ekspresji genów *Smed-sidt1-3* w odpowiedzi na ranę punktową lub nastrzyknięcie obcym dsRNA

A-C – Analiza poziomów ekspresji genów: A – *Smed-sidt1*, B – *Smed-sidt2*, C – *Smed-sidt3* w materiale izolowanym z wypławków nakłuwanych w schemacie 2x2 lub 3x2. Poziom akumulacji transkryptów określono metodą RT-qPCR. D-F – Analiza poziomów ekspresji genów: D – *Smed-sidt1*, E – *Smed-sidt2*, F – *Smed-sidt3* w materiale izolowanym z wypławków nastrzykiwanych dsRNA EGFP w schemacie 2x2 lub 3x2. Poziom akumulacji transkryptów określono metodą RT-qPCR. Wyniki uzyskane dla poszczególnych transkryptów normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wypławków. Istotność statystyczną określano względem próbki WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, w przypadku żadnej ze zmian nie stwierdzono istotności statystycznej.

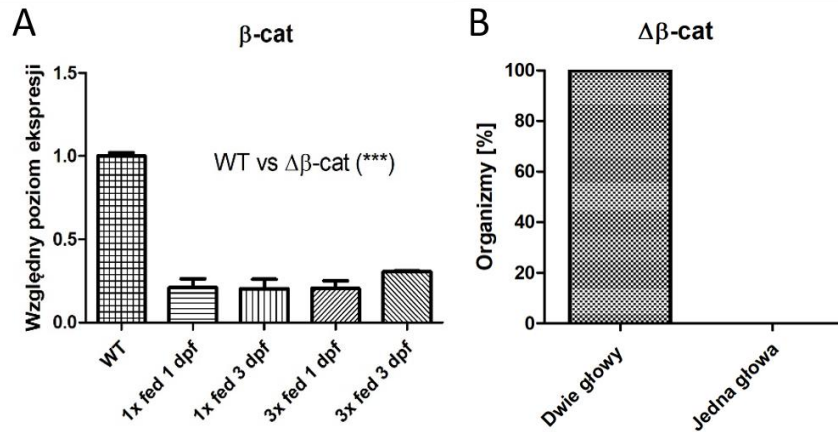
Po optymalizacji schematu wyciszania ekspresji *Smed-sidt1-3*, przystąpiono do analizy funkcjonalnej tych genów i sprawdzenia, czy są zaangażowane w transport dsRNA ze światła jelita. W tym celu wykorzystano dobrze poznany układ, w którym wyciszenie ekspresji β -kateniny (β -cat) zaburza proces definiowania polarności ciała wypławka, w efekcie czego fragmenty posiadające głowę, zamiast brakującego ogona, wykształcają drugą głowę (Rysunek IV-24A). Schemat eksperymentu zakłada wyciszenie ekspresji *Smed-sid1-3* poprzez nastrzykiwanie odpowiednim dsRNA, a następnie karmienie wypławków dsRNA β -cat, cięcie na pół i obserwację regeneracji (Rysunek IV-24B). W przypadku, gdy obniżenie ekspresji *Smed-sid1*, *Smed-sid2* lub *Smed-sid3* skutkowałoby zaburzeniem zdolności *S. mediterranea* do wchłaniania dsRNA z jelita, karmienie wypławków dsRNA β -cat nie powinno prowadzić do wykształcenia typowych dla zwierząt $\Delta\beta$ -cat dwugłowych fenotypów (Rysunek IV-24B).



Rysunek IV-24. Model $\Delta\beta\text{-cat}$ *S. mediterranea*

A – schemat obrazujący prawidłowy przebieg regeneracji *S. mediterranea* (WT) oraz zaburzoną regenerację u zwierząt z wyciszoną ekspresją $\beta\text{-cat}$ ($\Delta\beta\text{-cat}$). B – schemat przedstawiający koncepcję badań funkcjonalnych *Smed-sidt1-3* z wykorzystaniem modelu $\Delta\beta\text{-cat}$.

W pierwszym etapie zweryfikowano wydajność wyciszenia ekspresji $\beta\text{-cat}$ poprzez jednokrotne lub trzykrotne karmienie dsRNA. Wykazano, iż jedna dawka pokarmu zawierającego dsRNA $\beta\text{-cat}$ jest wystarczająca, aby obniżyć poziom transkryptu $\beta\text{-cat}$ o ponad 70% (Rysunek IV-25A), co skutkowało wystąpieniem dwugłowego fenotypu u 100% badanych wypławków (Rysunek IV-25B). Obniżony poziom ekspresji obserwowany był już 1 dzień po karmieniu i utrzymywał się co najmniej 3 dni po karmieniu (Rysunek IV-25A). Nie stwierdzono istotnych różnic w wydajności RNAi w przypadku zwierząt karmionych jeden raz i trzykrotnie, stąd do dalszych eksperymentów zdecydowano się stosować pierwszy schemat.

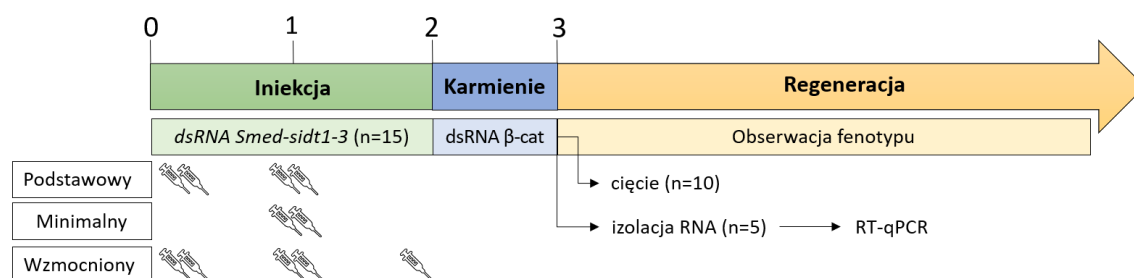


Rysunek IV-25. Wyciszenie ekspresji genu β -cat poprzez karmienie *S. mediterranea* modyfikowanym pokarmem zawierającym dsRNA

A – Wyniki analizy poziomu ekspresji β -cat metodą RT-qPCR. Materiał do analiz był izolowany w dwóch punktach czasowych, z wypławków karmionych jednokrotnie lub trzykrotnie pokarmem zawierającym dsRNA komplementarny do transkryptu β -cat. Wyniki normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wypławków ($n = 5$). Istotność statystyczną określano względem próbki WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, ***($p \leq 0,001$). Dpf – dni po karmieniu. B – wynik analizy fenotypów wypławków traktowanych j.w. Wykresy przedstawiają wyniki pochodzące z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano łącznie 30 wypławków.

W kolejnym etapie przystąpiono do eksperymentu właściwego, polegającego na sprawdzeniu, czy wyciszenie ekspresji *Smed-sidt1-3* wpłynie na zdolność komórek wypławka do pobierania dsRNA β -cat ze światła jelita i/lub ogólnoustrojowy transport sygnałów wyciszających. Każdorazowo grupę badaną stanowiło 15 wypławków. Podawano im na drodze iniekcji dsRNA indukujący wyciszenie *Smed-sidt1-3*. Oprócz zoptymalizowanego wcześniej schematu 2 iniekcje x 2 dni (Rysunek IV-21), zwanego dalej „podstawowym” zdecydowano się stosować równoległe zmodyfikowane schematy: „minimalny” – 2x1 i „wzmocniony” – 2x2+1 (Rysunek IV-26). Dzień po ostatnim nastrzyknięciu w schemacie podstawowym lub minimalnym, lub 6 h po ostatnim nastrzyknięciu w przypadku schematu wzmocnionego, wypławkom podawano pokarm zawierający dsRNA β -cat. Po całonocnej inkubacji, 5 wypławków uśmiercano i izolowano z nich RNA na potrzeby analiz RT-qPCR poziomu wybranego transkryptu *Smed-sidt1-3* i β -cat, natomiast 10 wypławków cięto wzdłuż krótszej osi ciała i poddawano obserwacji przez kolejne 8 dni (Rysunek IV-26).

Grupa badana obejmowała również trzy grupy kontrolnych wypławków. Pierwszą z nich stanowiły wypławki, którym na drodze iniekcji podano wodę według schematu podstawowego oraz karmionno je niemodyfikowanym pokarmem (WT), drugą – wypławki którym podano dsRNA *Smed-sidt1-3* według schematu podstawowego (Δ *Smed-sidt1-3*) po czym ich nie karmiono, trzecią – wypławki, którym podano wodę wg schematu podstawowego, a następnie karmiono je dsRNA β -cat (Δ β -cat) (Rysunek IV-26).



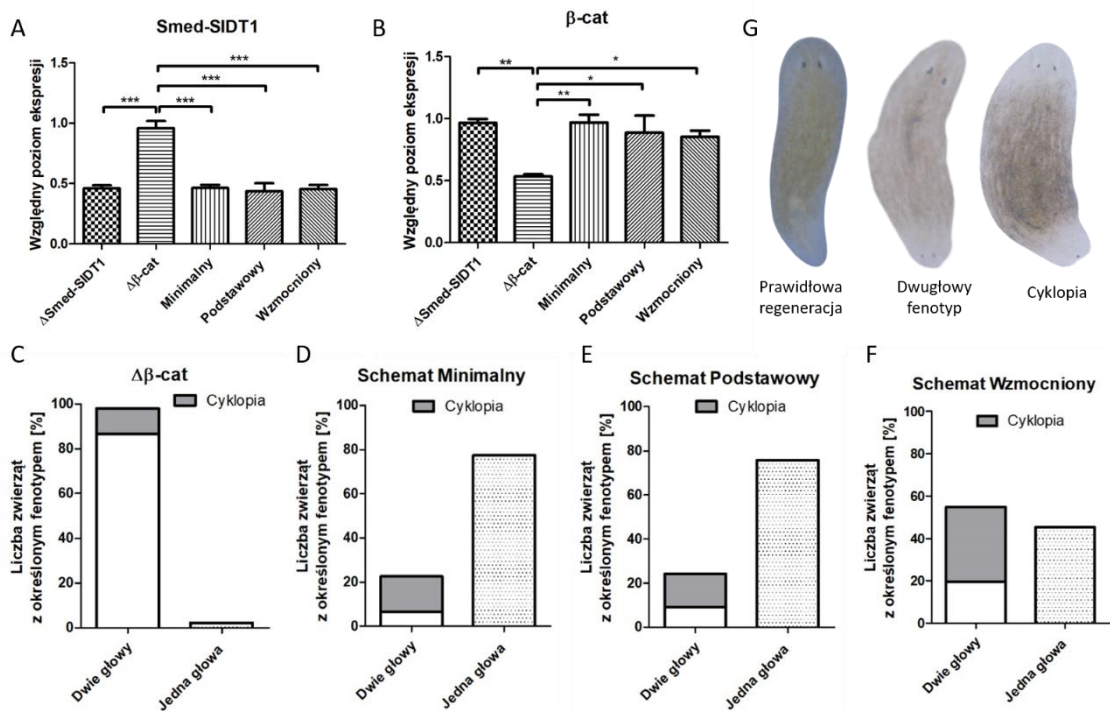
Rysunek IV-26. Szczegółowy schemat eksperymentu weryfikującego zaangażowanie *Smed-sidt1-3* w proces transportu dsRNA

Stosowano trzy schematy nastrzykiwania wypławków dsRNA *Smed-sidt1-3* w celu wywołania RNAi: podstawowy, minimalny, wzmocniony. Następnie zwierzętom podawano modyfikowany pokarm zawierający dsRNA β -cat. 10 osobników z każdej grupy badanej było ciętych i poddawanych obserwacji w trakcie regeneracji, a 5 było uśmierczanych w celu określenia poziomu *Smed-sidt1-3* oraz β -cat techniką RT-qPCR.

W przypadku zwierząt z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1* (Rysunek IV-27A), po podaniu zmodyfikowanego pokarmu zawierającego dsRNA β -cat nie obserwowano inhibicji ekspresji β -cat, jak to miało miejsce w przypadku zwierząt kontrolnych Δ β -cat (iniekcja wodą i karmienie dsRNA β -cat) (Rysunek IV-27B). Obniżenie wydajności RNAi β -cat nie było zależne od przyjętego schematu wyciszania *Smed-sidt1*. W przypadku każdego z nich, poziom mRNA β -cat kształtował się na poziomie ok. 90-100% w porównaniu do wypławków kontrolnych typu WT i był o ok. 50% wyższy niż u kontroli typu Δ β -cat (Rysunek IV-27B). Nie stwierdzono, aby samo wyciszenie *Smed-sidt1* jakkolwiek wpływało na poziom ekspresji β -cat (Rysunek IV-27B).

Wyniki analizy poziomu transkryptu β -cat korespondowały z badaniami fenotypu – w grupie kontrolnej, karmionej wyłącznie dsRNA β -cat obserwowano dwugłowy fenotyp charakterystyczny dla mutantów Δ β -cat u niemal 100% zwierząt (Rysunek IV-27C). W przypadku zwierząt z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1*, karmionych dsRNA β -cat, dwugłowy fenotyp występował u mniejszej liczby zwierząt – od ok. 25%

wypławków w przypadku zastosowania schematów: minimalnego (Rysunek IV-27D) lub podstawowego (Rysunek IV-27E), do 55% – w przypadku schematu wzmacnianego (Rysunek IV-27F). Co ciekawe wśród dwugłowych wypławków obserwowano występowanie cyklopi w obrębie zregenerowanej głowy (Rysunek IV-27G). Cyklopy stanowiły ok. 10% dwugłowych wypławków z grupy kontrolnej typu $\Delta\beta\text{-cat}$ (Rysunek IV-27C) i ok. 65% dwugłowych wypławków z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1* (Rysunek IV-27D-E). W grupie kontrolnej typu $\Delta\text{Smed-sidt1}$ (wypławki niekarmione dsRNA $\beta\text{-cat}$) nie stwierdzono żadnych zaburzeń w regeneracji zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami (Rysunek IV-20).

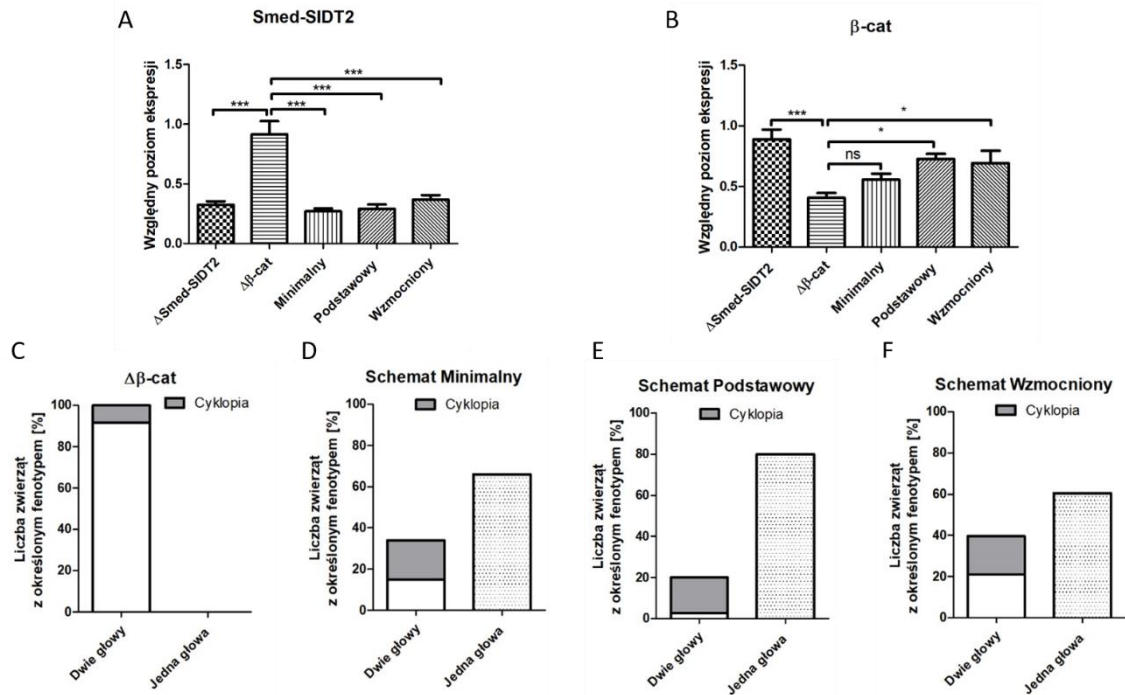


Rysunek IV-27. Wpływ inhibicji *Smed-sidt1* na zdolność *S. mediterranea* do pobierania ze środowiska i ogólnoustrojowego transportu dsRNA

Analiza poziomu ekspresji A – *Smed-sidt1* oraz B – $\beta\text{-cat}$ metodą RT-qPCR. Materiał do badań izolowano z wypławków, którym podawano dsRNA *Smed-sidt1* wg jednego z trzech schematów (Minimalnego, Podstawowego, Wzmocnionego) oraz karmiono dsRNA $\beta\text{-cat}$. $\Delta\text{Smed-sidt1}$ – grupa kontrolna z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1*; $\Delta\beta\text{-cat}$ – grupa kontrolna z wyciszoną ekspresją $\beta\text{-cat}$. Wyniki uzyskane dla poszczególnych transkryptów normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wypławków. Istotność statystyczną określano względem grupy kontrolnej WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**), $p \leq 0,001$ (***) C-F – Analiza fenotypu *S. mediterranea* po regeneracji. C – wypławki z wyciszoną ekspresją $\beta\text{-cat}$ D-E – wypławki z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1* wg wskazanego schematu i karmione dsRNA $\beta\text{-cat}$. Wykresy przedstawiają sumaryczną liczbę wypławków wykazujących dany fenotyp w trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano łącznie 30 wypławków.

W grupie zwierząt z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt2* (Rysunek IV-28A) i karmionych dsRNA β -cat stwierdzono obniżenie wydajności RNAi β -cat o ok. 20-35% w porównaniu do grupy kontrolnej typu $\Delta\beta$ -cat (wypławki z iniekcją wody i karmione dsRNA β -cat) (Rysunek IV-28B). Najmniejszą różnicę między grupą badaną a ww. kontrolą stwierdzono w przypadku wyciszania *Smed-sidt2* wg schematu minimalnego (Rysunek IV-28B), mimo iż to podejście zapewniało obniżenie poziomu ekspresji *Smed-sidt2* aż o ok. 70% w porównaniu z kontrolą typu WT (Rysunek IV-28A), czyli na podobnym lub nawet nieco niższym poziomie jak w przypadku pozostałych dwóch schematów badawczych (schemat podstawowy, schemat wzmocniony) (Rysunek IV-28A). Podobnie jak w przypadku *Smed-sidt1*, samo wyciszenie *Smed-sidt2* bez etapu karmienia wypławków dsRNA β -cat nie powodowało obniżenia poziomu ekspresji β -cat (Rysunek IV-28B).

Obserwacja regenerujących wypławków wykazała, że dwugłowy fenotyp typowy dla mutantów $\Delta\beta$ -cat pojawiał się u zwierząt z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt2* i karmionych dsRNA β -cat od 2,5 do 4 razy rzadziej niż w grupie kontrolnej, wyłącznie karmionej dsRNA β -cat (Rysunek IV-28C-F). Dwugłowe osobniki stanowiły 36% zwierząt poddanych wyciszaniu *Smed-sidt2* wg schematu minimalnego (z czego ok. 56% stanowiły cyklopy) (Rysunek IV-28D), 20% zwierząt poddanych wyciszaniu według schematu podstawowego (z czego 90% stanowiły cyklopy) (Rysunek IV-28E), 40% zwierząt poddanych wyciszaniu wg schematu wzmocnionego (z czego ok. 50% stanowiły cyklopy) (Rysunek IV-28F). W grupie kontrolnej typu $\Delta\beta$ -cat (wypławki wyłącznie karmione dsRNA β -cat) 100% zwierząt wykazywało dwugłowy fenotyp (z czego 8% stanowiły cyklopy) (Rysunek IV-28C), natomiast w grupie kontrolnej typu Δ *Smed-sidt2* (wypławki niekarmione dsRNA β -cat) nie obserwowano żadnych zaburzeń w regeneracji zgodnie z wynikami wcześniejszych analiz (Rysunek IV-20).



Rysunek IV-28. Wpływ inhibicji *Smed-sidt2* na zdolność *S. mediterranea* do pobierania ze środowiska i ogólnoustrojowego transportu dsRNA

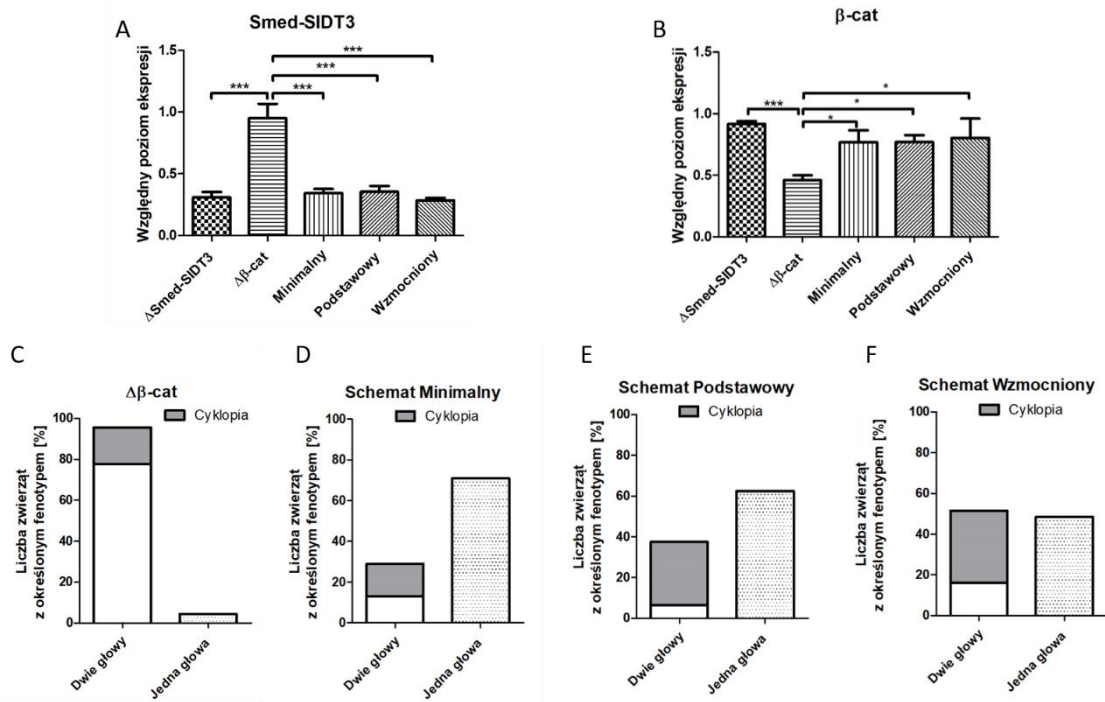
Analiza poziomu ekspresji A – *Smed-sidt2* oraz B – β -cat metodą RT-qPCR. Materiał do badań izolowano z wypławków, którym podawano dsRNA *Smed-sidt2* wg jednego z trzech schematów (Minimalnego, Podstawowego, Wzmocnionego) oraz karmiono dsRNA β -cat. Δ *Smed-sidt2* – grupa kontrolna z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1*; $\Delta\beta$ -cat – grupa kontrolna z wyciszoną ekspresją β -cat. Wyniki uzyskane dla poszczególnych transkryptów normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wypławków. Istotność statystyczną określano względem grupy kontrolnej WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**), $p \leq 0,001$ (***)). C-F – Analiza fenotypu *S. mediterranea* po regeneracji. C – wypławków z wyciszoną ekspresją β -cat D-E – wypławków z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1* wg wskazanego schematu i karmione dsRNA β -cat. Wykresy przedstawiają sumaryczną liczbę wypławków wykazujących dany fenotyp w trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano łącznie 30 wypławków.

W przypadku zwierząt z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt3* (Rysunek IV-29A) podobne jak dla wariantów *Smed-sidt1* obserwowano skuteczne obniżenie wydajności wyciszania β -cat po karmieniu wypławków dsRNA β -cat w porównaniu do zwierząt kontrolnych typu $\Delta\beta$ -cat (prawidłowy poziom *Smed-sidt1*) i odtworzenie niemal fizjologicznego poziomu mRNA β -cat (Rysunek IV-29B). Nie stwierdzono również, aby samo wyciszenie *Smed-sidt3* wpływało na poziom ekspresji β -cat (Rysunek IV-29B).

W przypadku regeneracji zwierząt z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt3* karmionych dsRNA β -cat, dwugłowy fenotyp występował od 30% do 50% w zależności od schematu wyciszania *Smed-sidt3* (Rysunek IV-29D-F). Również w tym przypadku obserwowano

pojawianie się cyklopów, które stanowiły od ok. 50% do 70% zwierząt dwugłowych w przypadku badanych grup i ok. 15% w grupie kontrolnej typu $\Delta\beta\text{-cat}$ (Rysunek IV-29).

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazały, iż obniżenie o ok. 25-40% poziomu ekspresji *Smed-sidt1*, *Smed-sidt2* lub *Smed-sidt3* było wystarczające, aby zaburzyć proces pobierania z jelit dsRNA o długości ~200 pz i/lub jego transportu w organizmie wypławka o czym świadczyło obniżenie wydajności indukcji RNAi $\beta\text{-cat}$ za pomocą dsRNA podawanego z pożywieniem, obserwowane zarówno na poziomie transkryptów jak i zmian fenotypu regenerujących zwierząt.



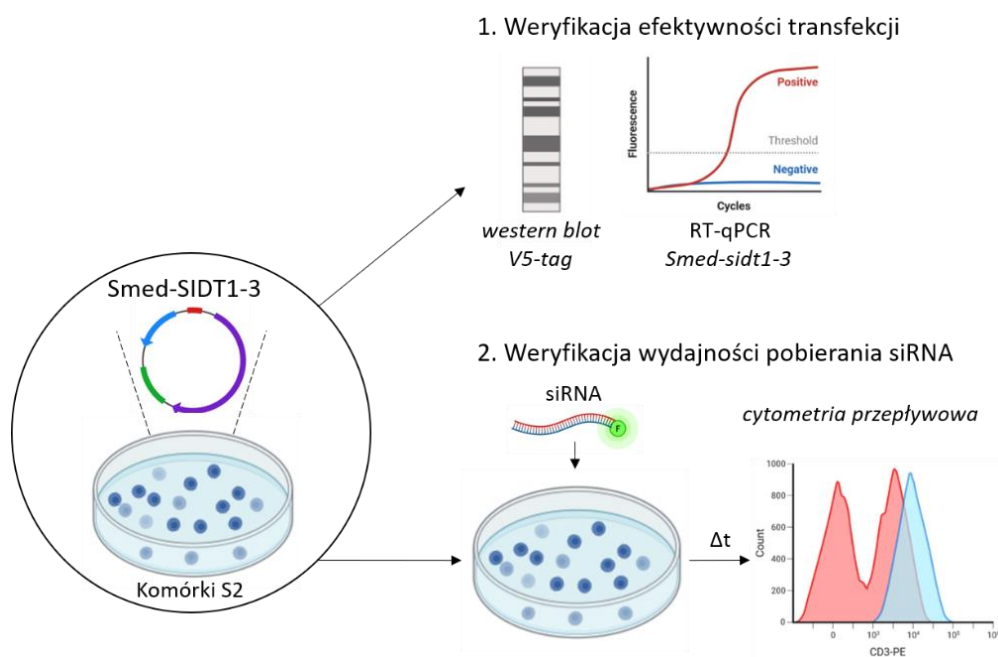
Rysunek IV-29. Wpływ inhibicji *Smed-sidt3* na zdolność *S. mediterranea* do pobierania ze środowiska i ogólnoustrojowego transportu dsRNA

Analiza poziomu ekspresji A – *Smed-sidt3* oraz B – $\beta\text{-cat}$ metodą RT-qPCR. Materiał do badań izolowano z wypławków, którym podano dsRNA *Smed-sidt2* wg jednego z trzech schematów (Minimalnego, Podstawowego, Wzmocnionego) oraz karmiono dsRNA $\beta\text{-cat}$. $\Delta\text{Smed-sidt3}$ – grupa kontrolna z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt1*; $\Delta\beta\text{-cat}$ – grupa kontrolna z wyciszoną ekspresją $\beta\text{-cat}$. Wyniki uzyskane dla poszczególnych transkryptów normalizowano względem poziomu transkryptu *ef-2*. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano zawsze 5 wypławków. Istotność statystyczną określano względem grupy kontrolnej WT, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (test one-way ANOVA) i korektę Bonferroniego, $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,001$ (**), $p \leq 0,001$ (***) C-F – Analiza fenotypu *S. mediterranea* po regeneracji. C – wypławki z wyciszoną ekspresją $\beta\text{-cat}$ D-E – wypławki z wyciszoną ekspresją *Smed-sidt2* wg wskazanego schematu i karmione dsRNA $\beta\text{-cat}$. Wykresy przedstawiają sumaryczną liczbę wypławków wykazujących dany fenotyp w trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, w których analizowano łącznie 30 wypławków.

Charakterystyka funkcjonalna *Smed-sidt1-3* in vitro w modelu komórek S2 *D. melanogaster*

Szczegółowa charakterystyki działania Ce-SID-1 możliwa była dzięki wykorzystaniu modelu embrionalnych komórek S2 *D. melanogaster*. Komórki S2 pobierają dsRNA z pożywki hodowlanej w ograniczonym stopniu, proces ten najprawdopodobniej jest zależny od endocytozy [95]. Dodatkowo, w genomie *D. melanogaster* nie zidentyfikowano homologów *sid-1* [96]. Heterologiczna ekspresja *Ce-sid1* w komórkach S2 znacząco zwiększa ich zdolność do wchłaniania dsRNA [20]. Biorąc powyższe pod uwagę, zdecydowano się wykorzystać ten model do dalszych analiz funkcjonalnych białek Smed-SIDT1-3.

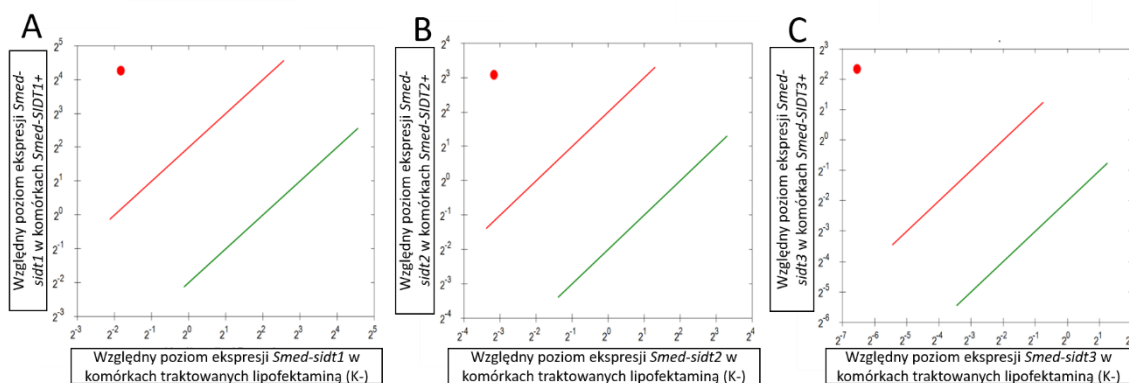
Schemat eksperymentu przedstawiono na Rysunku IV-30. Komórki S2 poddawano lipofekcji z plazmidem ekspresyjnym kodującym wybrane białko *S. mediterranea* z dodatkowym znacznikiem na końcu C (V5-tag) ułatwiającym analizy na dalszych etapach. Efektywność transfekcji zweryfikowano z wykorzystaniem metody RT-qPCR (pomiar poziomu transkryptu *Smed-sidt1-3*) i western blot (analiza poziomu białka).



Rysunek IV-30. Schemat eksperymentu w komórkach S2 *D. melanogaster*

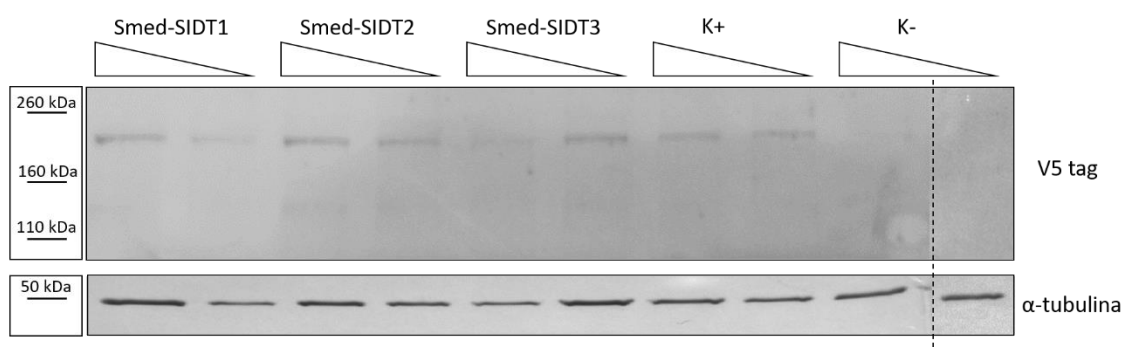
Wyniki analizy poziomu transkryptów *Smed-sidt1-3* w materiale izolowanym po 48 h od transfekcji komórek S2 wykazały wysoką wydajność ekspresji wprowadzonych transgenów (Rysunek IV-30). Dodatkowo, stwierdzono, że po 72h od transfekcji poziom

białek Smed-SIDT1-3-V5-tag był wyższy niż po 48 h (Rysunek IV-32), stąd zdecydowano się wybrać ten punkt czasowy jako początek dalszych eksperymentów funkcjonalnych.



Rysunek IV-31. Ocena wydajności transfekcji komórek S2

A-C Porównanie względnego poziomu ekspresji A – *Smed-sidt1*, B – *Smed-sidt2*, C – *Smed-sidt3* w komórkach transfekowanych wektorem ekspresyjnym niosącym sekwencję kodującą wskazane białko i w komórkach nietrafekowanych, traktowanych lipofektaminą (K+).



Rysunek IV-32. Potwierdzenie efektywności transfekcji komórek S2 plazmidami zawierającymi sekwencje kodujące Smed-SIDT1-3

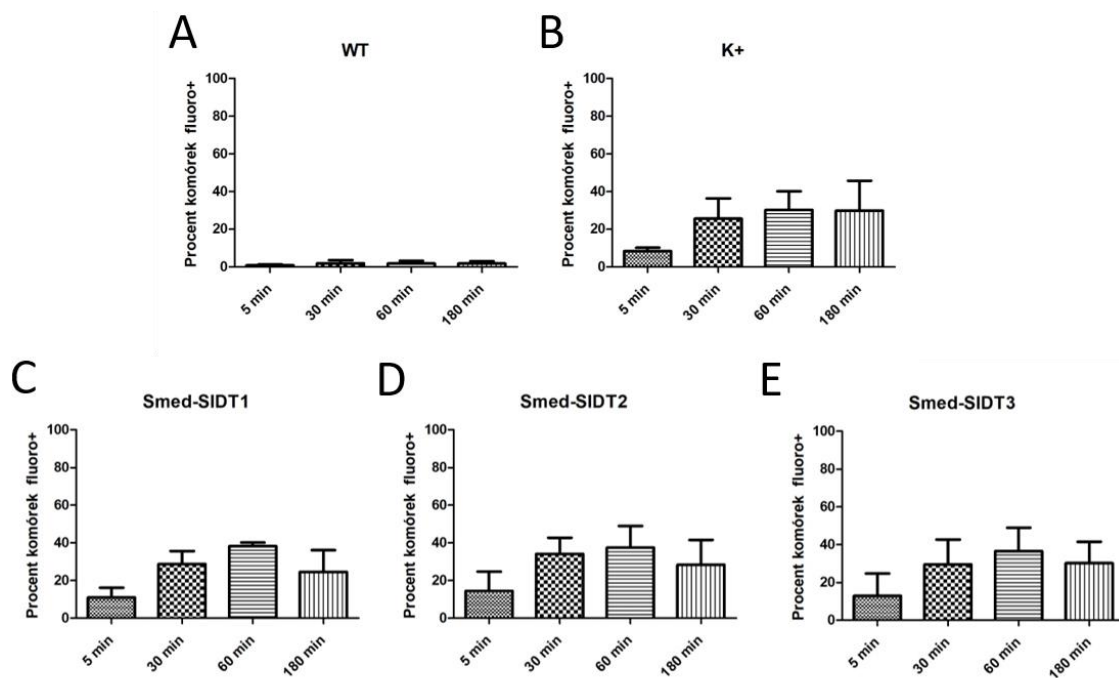
Wynik analizy western blot białek izolowanych z komórek transfekowanych plazmidem niosącym sekwencję kodującą Smed-SIDT1-3-V5 lub sekwencję kodującą EGFP-V5 (K+) Kontrolę negatywną (K-) stanowiły komórki traktowane lipofektaminą (czynnik transfekcyjny) bez DNA. Oczekiwane długości poszczególnych białek wynosiły kolejno: Smed-SIDT1 – 200,25 kDa, Smed-SIDT2 – 202,24 kDa, Smed-SIDT3 – 206,56 kDa, K+ 211,58 kDa. Trójkątem oznaczono zmianę czasu (materiał do badań pobierano w dwóch punktach czasowych 72 h po transfekcji i 48 h). Marker masy molekularnej po lewej stronie od żelu.

Po 72 h od transfekcji wektorem niosącym sekwencję kodującą wybrany Smed-SIDT1-3 lub wektorem pustym (kontrola WT), do komórek dodawano Block-IT – komercyjny preparat siRNA o długości 25 pz znakowany fluoresceiną. Inkubację prowadzono przez 5 min, 30 min, 60 min oraz 180 min Dodatkową grupę kontrolną

stanowiły nietransfekowane komórki typu dzikiego, które inkubowano z mieszaniną siRNA i lipofektaminy – odczynnika ułatwiającego wnikanie kwasów nukleinowych do komórek. W wybranych punktach czasowych komórki ze wszystkich grup wirowano i przepłukiwano dwukrotnie 1×PBS, żeby pozbyć się nadmiarowego siRNA, które pozostało w medium lub mogło niespecyficznie wiązać się na powierzchni komórek. Pelet komórkowy zawieszano w 1×PBS i analizowano cytometrycznie.

Ilościowe oznaczenie komórek, które pobrały znakowany siRNA było wykonywane za pomocą cytometrii przepływowej (Guava® easyCyte™ Flow Cytometers). Każdorazowo analizowano ok. 5 000 komórek z pojedynczej próbki. Pomiar obejmował: (i) rozpraszanie światła w zakresie małych kątów czołowych (ang. *forward scatter*), (ii) rozpraszanie światła pod kątem 90° (ang. *side scatter*), (iii) natężenie fluorescencji poszczególnych komórek przy użyciu lasera o długości 488 nm i filtra 695/50. Analiza danych (InCyte 4.5) obejmowała wyznaczenie zależności pomiędzy (i) forward scatter i side scatter, na podstawie której określano populację komórek pojedynczych, a odrzucano agregaty i fragmenty komórek oraz (ii) forward scatter i natężenia fluorescencji, na podstawie której wyznaczano frakcję komórek, które wykazywały pozytywny sygnał od fluoresceiny.

Uzyskane wyniki wykazały, że ekspresja *Smed-sidt1-3* w komórkach *S2 D. melanogaster* zwiększa ich zdolność do pobierania siRNA z pożywki hodowlanej (Rysunek IV-33). W grupie kontrolnej typu WT poziom świecących komórek nie przekraczał 5% w żadnym punkcie czasowym (Rysunek IV-33A), co potwierdziło znikomą naturalną zdolność komórek S2 do wchłaniania ze środowiska RNA o długości 25 pz. Dla wszystkich komórek *Smed-SIDT1+*, *Smed-SIDT2+*, *Smed-SIDT3+* obserwowano liniowy wzrost liczby komórek, które pobrały znakowany siRNA, w czasie – po 60 min. ok. 40% komórek w każdej z ww. prób wykazywało pozytywny sygnał pochodzący od fluoresceiny (Rysunek IV-33C-E). Efekt ten był porównywalny do obserwowanego w przypadku, komórek, w których pobieranie siRNA było ułatwione przez zastosowanie lipofektaminy (Rysunek IV-33B) Dodatkowo, w przypadku komórek z ekspresją białek *S. mediterranea* obserwowano ok. 10% spadek liczby świecących komórek po 180 min, co może wskazywać na uruchomienie mechanizmu usuwania siRNA z komórek w przypadku wydłużonej inkubacji Rysunek IV-33C-E). Podobnej zmiany nie obserwowano dla komórek traktowanych lipofektaminą; w tym przypadku liczba komórek świecących po 60 min i 180 min pozostawała niemal identyczna (Rysunek IV-33B).



Rysunek IV-33. Analiza funkcjonalna Smed-SID1-3 w komórkach S2 *D. melanogaster*

Wpływ obecności białek Smed-SIDT1-3 na zdolność komórek S2 *D. melanogaster* do absorpcji siRNA znakowanego fluoresceiną badano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wykresy przedstawiają procent komórek świecących (fluoro+) mierzony w czterech punktach czasowych (5 min, 30 min, 60 min, 180 min). A – komórki typu dzikiego (WT), B – komórki traktowane lipofektaminą i siRNA (K+), C-E – komórki z ekspresją genów *Smed-sidt1-3*, odpowiednio. Wykresy przedstawiają średnią \pm odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników pochodzących z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

V. Dyskusja

Wydaje się, że prawie wszystkie komórki roślinne i zwierzęce posiadają maszynę białkową umożliwiającą biogenezę krótkich regulatorowych cząsteczek RNA i ich udział w procesie specyficznego i efektywnego wyciszenia ekspresji genów na drodze RNAi [97–101]. Zjawisko RNAi zostało zaadaptowane na potrzeby genomiki funkcjonalnej, stając się szybką i relatywnie taną metodą obniżania poziomu ekspresji wybranych genów. Technologia RNAi posiada również ogromny potencjał w aspekcie jej wdrożenia w medycynie czy agrobiotechnologii. Jednym z trendów ostatnich lat, jest np. rozwój nowej generacji środków ochrony roślin w postaci oprysków z RNA (ang. *sprayed RNA*), które zastąpiłyby tradycyjne herbicydy/pestycydy [102]. W ciągu ostatnich dwóch dekad, zrozumienie mechanizmu efektorowego RNAi umożliwiło rozkwit osobnego nurtu badań, jakim jest projektowanie, synteza i zastosowanie wszelkiego rodzaju oligonukleotydów włączających się w endogenne szlaki RNAi lub zaburzających je (np. syntetyczne siRNA, oligonukleotydy antysensowe, gąbki molekularne) [103,104].

Mimo dużego potencjału aplikacyjnego RNAi, powszechne wykorzystanie tej technologii związane jest z wieloma wyzwaniem natury naukowo-technicznej (stabilność oligonukleotydów, wydajność dostarczania ich do komórek, selektywność działania) i społeczno-legislacyjnej (sceptycyzm wobec produktów GMO, brak konsensusu w sprawie niezbędnych regulacji prawnych). Aby sprostać tym wyzwaniom, opracowano między innymi szereg modyfikacji RNA zwiększających stabilność i selektywność oligonukleotydów oraz szereg nanonośników ułatwiających transport RNA do komórek. Nadal brak jednak pełnej wiedzy na temat molekularnych podstaw pobierania RNA ze środowiska i ogólnoustrojowej dystrybucji sygnałów wyciszających. Jedynie pełne wyjaśnienie, w jaki sposób procesy te zachodzą i dlaczego niektóre organizmy są zdolne do pobierania kwasów nukleinowych ze środowiska i rozwoju systemowej odpowiedzi w postaci zmiany profilu ekspresji genów, a inne zdają się niewrażliwe na podobne sygnały środowiskowe, umożliwi szerokie i bezpieczne wykorzystanie RNAi nie tylko w warunkach laboratoryjnych.

Jednym z modeli badawczych, w których istnieje możliwość wywołania zjawiska RNAi na poziomie całego organizmu poprzez podanie dsRNA metodą iniekcji lub karmienia jest wyplawek *S. mediterranea*. Organizm ten stanowi równocześnie doskonały model do badania plastyczności tkanek, regeneracji i trajektorii rozwojowych

komórek macierzystych *in vivo* w dorosłym organizmie zwierzęcym i w tym też celu wykorzystywany jest w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN.

Jak dotąd w literaturze światowej brak było jakichkolwiek informacji dotyczących transportu międzykomórkowego kwasów nukleinowych pobieranych ze środowiska przez *S. mediterranea*. Mając na uwadze prawie nieograniczone zdolności tego organizmu do regeneracji utraconych części ciała uznaliśmy, iż pełne zrozumienie procesów warunkujących szereg unikatowych cech wyplawków wymaga szczegółowego poznania białek *S. mediterranea* uczestniczących w procesie eRNAi.

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek uczestniczących w międzykomórkowym transporcie dsRNA pobieranego ze środowiska jest SID-1, zidentyfikowany po raz pierwszy u *C. elegans*. Wykazano, że u nicienia białko to tworzy kanał transmembranowy umożliwiający pasywny transport dsRNA między komórkami. Jak dotąd nie zidentyfikowano ortologów SID-1 u roślin, ale występują one powszechnie u zwierząt m.in. ssaków, ryb, owadów (za wyjątkiem muchówek (łac. *Diptera*), np. *D. melanogaster*) [100,101]. Liczba genów *sid-1* w ramach jednej gromady jest zmienna w zależności od rodzaju lub gatunku. U stawonogów, wśród pszczoł i mszyc występuje jeden ortolog *sid-1*, podczas gdy u jedwabnika morwowego i chrząszczy trojszyków – trzy [29]. U ssaków powszechne jest występowanie dwóch homologów, na przykład u człowieka są to *Hs-SIDT1* oraz *Hs-SIDT2* [105,106]. Jak dotąd brak doniesień literaturowych na temat występowania homologów *sid-1* u płazińców.

W ramach niniejszej pracy w genomie *S. mediterranea* zidentyfikowano trzy homologi *sid-1*: SMESG000041575.1, SMESG000041572.1, SMESG000075887.1 będące najprawdopodobniej wynikiem duplikacji. Geny te są źródłem co najmniej pięciu transkryptów. Analiza sekwencji wykazała, że dwa z nich, tj. izoformy dd_Smed_v6_6063 kodują identyczne białko, nazwane Smed-SIDT1. Dwa kolejne transkrypty, izoformy dd_Smed_v6_8231, to warianty splicingowe, z których jeden koduje pełnej długości białko nazwane Smed-SIDT2, a drugi - białko skrócone w wyniku przedwczesnej terminacji translacji. Ostatni ze zidentyfikowanych transkryptów, dd_Smed_v6_8407 koduje białko nazwane Smed-SIDT3. Jak wspomniano wyżej, występowanie kilku homologów *sid-1* w ramach genomu pojedynczego organizmu jest powszechne. Podobnie jak występowanie wariantów splicingowych czy izoform białka. W przypadku ludzkich homologów *sid-1* zidentyfikowano dwa warianty transkryptu *Hs-SIDT1* kodujące białka różniące się pięcioma aminokwasami oraz aż 10 wariantów splicingowych *Hs-SIDT2* kodujących białka o długości od 97 do 832 aminokwasów.

Analiza filogenetyczna wykazała, że *Smed-SIDT1-3* są bliższe białkom *Hs-SIDT1* i *Hs-SIDT2* niż *Ce-SID-1*. Co więcej, podobnie jak wymienione białka ludzkie, wykazują one wyższe podobieństwo sekwencji do *Ce-CHUP-1* – paraloga *Ce-SID-1* zaangażowanego w transport cholesterolu [89].

Szczegółowe analizy bioinformatyczne struktury pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowej białek *Smed-SIDT1-3* wykazały, iż posiadają one cechy charakterystyczne dla białek tworzących kanały błonowe, w szczególności kanały w błonie komórkowej oraz lizosomalnej. W ich strukturze można wyróżnić układ domen typowy dla białek z rodziny *SID-1*, w tym występowanie dużej domeny zewnątrzkomórkowej z licznymi miejscami N-glikozylacji (Ser/Thr) i przewagą aminokwasów zasadowych, ułatwiających wiązanie dodatnio naładowanych cząsteczek RNA. Dodatkowo, w sekwencji aminokwasowej *Smed-SIDT1-3* zidentyfikowano motywy typu CRAC i CARC [108] wiążące cholesterol, które zostały wcześniej opisane i funkcjonalnie scharakteryzowane dla białek *Ce-CHUP-1*, *Hs-SIDT1* i *Hs-SIDT2*. Co ciekawe u nicieni występuje jasny podział funkcjonalny - *Ce-SID-1* jest kanałem dla dsRNA, a *Ce-CHUP-1* - kanałem dla cholesterolu, natomiast u ssaków obie funkcje są łączone w ramach jednego białka. Analizy struktury *Smed-SIDT1-3* wskazują, iż białka te mogą również być dwufunkcyjne [106]. W ramach niniejszej pracy skupiono się jedynie na aspektach związanych z udziałem *Smed-SIDT1-3* w międzykomórkowym transporcie RNA.

Badania funkcjonalne w układzie *in vivo* wykazały, że wyciszenie *Smed-sid1-3* ogranicza wydajność indukowania eRNAi poprzez karmienie wypławków dsRNA o długości ~200 pz. Niecałkowite zahamowanie wyciszenia ekspresji wybranego genu (*β -cat*) widoczne zarówno na poziomie transkrypty jak i charakterystycznego fenotypu, może wynikać z (i) niepełnego wyciszenia ekspresji *Smed-sid1-3*, (ii) obecności w komórkach białek *Smed-SIDT1-3*, które powstały przed przystąpieniem do procedury wyciszenia ekspresji *Smed-sid1-3*, (iii) istnienia innych, niezależnych od *Smed-SIDT1-3* mechanizmów transportu sygnałów wyciszających indukujących eRNAi. Niemniej, uzyskane wyniki wskazują, że białka *Smed-SID1-3* są zaangażowane w pobieranie dsRNA ze światła jelita i/lub ogólnoustrojowy transport dsRNA. Zastosowany układ badawczy nie pozwala jednoznacznie stwierdzić, w którym z dwóch wyżej wymienionych procesów biorą udział poszczególne białka *Smed-SIDT1-3*, niemniej, tkankowo-specyficzne wzory ekspresji poszczególnych genów sugerują możliwe scenariusze. *Smed-sidt1* i *Smed-sidt3* ulegają podwyższonej ekspresji odpowiednio:

w parenchymie i w komórkach zlokalizowanych na obwodzie działła, mogłyby więc być zaangażowane w systemowy transport dsRNA. Wyniki analizy WISH z zastosowaniem dwóch różnych sond wskazują lokalizację jelitową transkryptu *Smed-sidt2*, co sugerowałoby jego możliwy udział w pobieraniu dsRNA z jelita. Dane z atlasów transkryptomicznych (PSCA, Digiworm) wskazują natomiast na jego lokalizację parenchymalną [73,74]. Rozbieżności pomiędzy uzyskanymi wynikami mogą być skutkiem zbyt małej liczby komórek jelitowych w populacji komórek, których transkryptom podlegał sekwencjonowaniu. W tej sytuacji, możliwe jest, że brak danych (w atlasach transkryptomicznych) uniemożliwił poprawne przypisanie *Smed-sidt2* do klastra jelitowego.

Interesującym wynikiem uzyskanym na tym etapie prac była obserwacja nietypowego fenotypu - zaburzonej regeneracji głowy z wyłącznie jednym okiem. Jednooki fenotyp był obserwowany zarówno w przypadku wszystkich grup badanych z obniżoną ekspresją jednego z genów *Smed-sidt1-3* i karmionych dsRNA β -cat, jak również, grupy kontrolnej z wyciszoną ekspresją β -cat, choć w tym ostatnim przypadku w zdecydowanie mniejszym stopniu. Pojawienie się cyklopów może być konsekwencją częściowego wyciszenia ekspresji β -cat i niepełnego zaburzenia ścieżki sygnałowej β -cat/wnt [108].

Badania przeprowadzone *in vivo* potwierdziły powiązanie badanych genów *Smed-sidt1-3* z procesem RNAi u *S. mediterranea*, jednak nie pozwoliły określić, czy są one zaangażowane w proces pobierania RNA przez komórki wypławka. W związku z tym zdecydowano się przeprowadzić analizy w prostszym układzie *in vitro* – w komórkach S2 *D. melanogaster*, które naturalnie mają ograniczoną zdolność do pobierania RNA z medium hodowlanego. W zastosowanych warunkach eksperymentalnych, ekspresja *Smed-sidt1-3*, zwiększała o ponad 40% zdolność komórek S2 do importu znakowanego fluorescencyjnie siRNA z pożywki. Wartości te były porównywalne do wydajności osiągniętej przez komórki typu dzikiego traktowane liposomami zawierającymi identyczny RNA. Najwyższy poziom fluorescencji obserwowano godzinę od ekspozycji komórek na siRNA, po tym czasie dochodziło do obniżenia intensywności sygnału w komórkach, co sugerować może dwukierunkowość działania *Smed-SIDT1-3*. W badaniach z udziałem komórek S2, w przeciwieństwie do eksperymentów prowadzonych *in vivo* w modelu *S. mediterranea* nie stosowano długich cząsteczek dsRNA (~200 pz), ale krótkie siRNA (25 pz). Wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazują na preferencję transportera nicienia Ce-SID-1 do dłuższych

cząsteczek dsRNA (50-500 pz) [27,31]. Ce-SID-1 nie wiąże wydajnie dsRNA o długości 20-25 pz, podobnie jak krótkich ssRNA o zbliżonej wielkości. Natomiast co ciekawe, ludzkie białka Hs-SIDT-1 i Hs-SIDT-2 wydajnie wiążą i transportują siRNA i miRNA [34,109]. W przypadku Smed-SIDT1-3 trudno jednoznacznie określić preferencję do RNA o określonej długości lub strukturze. Użyte w badaniach siRNA było znakowane fluoresceiną, barwnikiem obdarzonym ładunkiem ujemnym, mogącym ułatwiać wiązanie do dodatnio naładowanej domeny zewnątrzkomórkowej Smed-SIDT1-3. Z drugiej strony, podobieństwo sekwencyjne Smed-SIDT1-3 do białek ludzkich (większe niż do białka *C.elegans*) może sugerować, że będą one wykazywały zbliżoną preferencję i selektywność substratową. Niewątpliwie, wyjaśnienie tej kwestii wymaga dodatkowych badań, w których wykorzystane zostaną cząsteczki RNA/DNA różnej długości. Otwartą kwestią pozostaje również sposób funkcjonowania Smed-SIDT1-3, w tym np. mechanizm formowania się kanału czy jego otwierania. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują na to, iż pomiędzy genami *Smed-sidt1-3* istnieje pewien rodzaj hierarchii: wyciszenie *Smed-sidt2* negatywnie wpłynęło na poziom ekspresji *Smed-sidt1* oraz *Smedn-sidt3*, wyciszenie *Smed-sidt1* obniżyło poziom transkryptu *Smed-sidt3* i jedynie wyciszenie *Smed-sidt3* nie wpływało na ekspresję pozostałych dwóch genów. Co ciekawe, w żadnym przypadku nie odnotowano indukcji ekspresji w odpowiedzi na wyciszenie któregośkolwiek z genów, co świadczy, iż nie działają one redundantnie. Opisana powyżej wzajemna zależność poziomów transkryptów *Smed-sidt1-3* wskazuje natomiast na możliwe szeregowe ułożenie transporterów Smed-SIDT1-3: od jelitowych Smed-SIDT2 w komórkach pobierających RNA ze środowiska do Smed-SIDT-1 i Smed-SIDT3 ułożonych w komórkach dystalnych, przyjmujących RNA. Innym wyjaśnieniem takiego stanu rzeczy jest scenariusz, w którym pojedynczy kanał błonowy jest tworzony przez więcej niż jeden typ białka, np. Smed-SIDT2 i Smed-SIDT1. W takim przypadku, *Smed-sidt2*, który wydaje się mieć najwyższy poziom w tkankach wypławka, miałby też największy wpływ na funkcjonowanie i ekspresję pozostałych genów. Dowodów na poparcie tej hipotezy dostarczają wyniki badań w *C. elegans* wskazujące, na to, iż białka SID-1 funkcjonują jako multimery [20]. Dodatkowo, bioobrazowanie białek Hs-SIDT1 i Hs-SIDT2 niezwykle czułą techniką FRET-FLIM (ang. *Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging*) wykazało, że oddziałują one ze sobą w komórkach [32].

Powszechność sekwencji kodujących SID-1 w genomach zwierząt świadczy o tym, iż biorą one udział w procesach o podstawowym znaczeniu dla funkcjonowania

organizmu, skłaniając tym samym do postawienia kilku pytań. Jakie znaczenie biologiczne ma zdolność zwierząt do pobierania kwasów nukleinowych ze środowiska? Jakie jest znaczenie ekologiczne eRNAi? Czy kanały typu SID-1 od zawsze pełniły rolę transporterów RNA? Czy udział białek SID-1 w transporcie RNA jest ich podstawową funkcją? Dokonana w niniejszej pracy identyfikacja i wstępna charakterystyka białek Smed-SIDT1-3 stanowi podwaliny umożliwiające wykorzystanie *S. mediterranea* do dalszych badań mogących przybliżyć nas do uzyskania odpowiedzi na powyższe pytania.

VI. Wnioski

Badania składające się na niniejszą pracę doktorską pozwoliły sformułować następujące wnioski:

1. Genom *S. mediterranea* zawiera trzy homologii *Ce-sid-1* nazwane *Smed-sidt1*, *Smed-sidt2*, *Smed-sidt3*.
2. Geny *Smed-sidt1-3* są bliższe ewolucyjnie ludzkim genom *Hs-SIDT1* i *Hs-SIDT2* oraz *Ce-chup-1* niż *Ce-sid-1*.
3. W uzyskanych modelach struktury przestrzennej białek Smed-SIDT1-3 występuje układ transbłonowych domen charakterystycznych dla kanałów typu SID-1 z silnie glikozylowaną domeną zewnątrzkomórkową odpowiadającą za wiązanie dsRNA. Białka Smed-SIDT1-3 posiadają także motywy wiążące cholesterol.
4. W odróżnieniu od *C. elegans*, u którego występują niezależne białka odpowiedzialne za transport dsRNA i cholesterolu, tj. (Ce-SID-1 i Ce-CHUP-1), u *S. mediterranea* podobnie jak u ludzi występują białka łączące obie te funkcje (Smed-SIDT1-3, Hs-SIDT1-2).
5. *Smed-sidt2* ulega ekspresji w jelitach, gdzie może uczestniczyć w pobieraniu znajdującego się w pokarmie dsRNA. *Smed-sidt1* oraz *Smed-sidt3* wykazują parenchymalny wzór ekspresji, co może sprzyjać ich zaangażowaniu w systemowe rozprzestrzenianie się sygnału RNAi.
6. Białka Smed-SIDT1-3 są zaangażowane w transport dsRNA (~200 pz) z jelita i/lub między komórkami, umożliwiając systemowy efekt RNAi.
7. Białka Smed-SIDT1-3 w układzie heterologicznym S2 *D. melanogaster* zwiększają zdolność komórek do pobierania siRNA o długości 25 pz.

VII. Streszczenie/Abstract

Rozwój oraz funkcjonowanie organizmów uwarunkowane jest ich zdolnością do krótko- i długodystansowego transportu cząsteczek modulujących procesy biologiczne zarówno na poziomie pojedynczych komórek, tkanek, jak i całych organów. Biomolekuły o znaczeniu regulatorowym mogą mieć charakter endogenny, jak również egzogenny, np. dsRNA pobierany z pokarmem może indukować ogólnoustrojowe wyciszenie ekspresji genów w procesie znanym jako środowiskowa interferencja RNA (eRNAi, ang. *environmental RNA interference*).

Podstawy molekularne etapu efektorowego eRNAi zostały dobrze poznane, dzięki czemu możliwy był rozwój technologii RNAi i jej powszechne zastosowanie do badania funkcji genów. Pomimo tego, iż technologia RNAi jest praktycznie wykorzystywana od ponad 20 lat, proces pobierania dsRNA i transportu cząsteczek sygnałowych pomiędzy komórkami pozostaje wciąż słabo poznany. Jak dotąd najwszechstronniej został on zbadany u *Caenorhabditis elegans*, u którego zidentyfikowano białka o charakterze transporterów (SID-1) i receptorów (SID-2) dsRNA. Zebrane dotychczas dane pozwalają jednak sądzić, iż nie u wszystkich zwierząt mechanizmy poboru i transportu dsRNA są identyczne jak opisane dla nicienia.

Celem niniejszej pracy była identyfikacja i charakterystyka białek odpowiedzialnych za pobieranie ze środowiska oraz międzykomórkowy transport kwasów nukleinowych u wyplawka *Schmidtea mediterranea*. Stanowi on jeden z podstawowych modeli stosowanych w badaniach zjawiska regeneracji oraz rozwoju i funkcjonowania komórek macierzystych. W ramach prac wykonanych w związku z realizacją niniejszej rozprawy doktorskiej zidentyfikowano w genomie *S. mediterranea* trzy sekwencje kodujące homologii SID-1 (białka Smed-SIDT1-3), nie stwierdzono natomiast obecności sekwencji kodujących homologii SID-2. Przeprowadzono analizy strukturalne *in silico* oraz funkcjonalnej *in vitro* i *in vivo* wszystkich trzech białek Smed-SIDT1-3. Uzyskane modele struktury przestrzennej Smed-SIDT1-3 wskazują, iż posiadają one cechy wielodomenowych białek transmembranowych zdolnych do wiązania zarówno kwasów nukleinowych jak i cholesterolu. Badania *in vitro* w komórkach S2 *Drosophila melanogaster* potwierdziły zdolność Smed-SIDT1-3 do transportu siRNA przez błonę komórkową. Wykazano również zaangażowanie białek Smed-SIDT1-3 w transport dsRNA w procesie eRNAi u *S. mediterranea*.

Zawarte w rozprawie wyniki stanowią zatem doskonały fundament, na którym budować można dalsze szczegółowe badania dotyczące roli zjawiska eRNAi w interakcji zwierząt ze środowiskiem.

The development and functioning of organisms are determined by their ability for the short- and long-range transport of molecules that modulate biological processes at the level of single cells, tissues, and whole organs. Regulatory biomolecules can be of endogenous or exogenous origin, for example, dietary dsRNA can induce systemic silencing of gene expression in a process known as environmental RNA interference (eRNAi).

The molecular basis of the effector step of eRNAi has been well understood, which made it possible to develop RNAi technology and widely apply it to study gene functions. Although RNAi technology has been practically used for more than 20 years, the process of dsRNA uptake and transport of signalling molecules between cells is still poorly understood. So far, it has been most extensively studied in *Caenorhabditis elegans*, in which dsRNA transporter (SID-1) and receptor (SID-2) proteins have been identified. However, the data gathered so far suggests that not all animals have the same dsRNA uptake and transport mechanisms as described for nematodes.

The presented PhD thesis aimed to identify and characterise the proteins responsible for the import from the environment and intercellular transport of nucleic acids in the planarian *Schmidtea mediterranea*. It is known as a basic model to study the phenomenon of regeneration and stem cell development and function. This study identified sequences encoding three SID-1 homologues (Smed-SIDT1-3) in the *S. mediterranea* genome. However, no sequences encoding SID-2 were found. *In silico* structural and functional *in vitro* and *in vivo* analyses were performed for all three Smed-SIDT1-3 proteins. The obtained models indicate that Smed-SIDT1-3 possess features characteristic of multi-domain transmembrane proteins capable of binding both nucleic acids and cholesterol. *In vitro* studies in *Drosophila melanogaster* S2 cells confirmed the ability of Smed-SIDT1-3 to transport siRNA across the cell membrane. Further, their involvement of Smed-SIDT1-3 proteins in dsRNA transport during the eRNAi process was demonstrated *in vivo* in *S. mediterranea*.

The results presented in this thesis provide an excellent foundation for further research on the role of the eRNAi phenomenon in animal-environment interactions.

VIII. Literatura

- 1 Hammond, S.M., Caudy, A.A. and Hannon, G.J. (2001) Post-Transcriptional Gene Silencing by Double-Stranded RNA. *Nature Reviews Genetics*, **2**, 110–119. <https://doi.org/10.1038/35052556>.
- 2 Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling: Transient Inactivation of Gene Expression in *Neurospora Crassa* by Transformation with Homologous Sequences. *Molecular Microbiology*, **6**, 3343–3353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x>.
- 3 Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature*, **391**, 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>.
- 4 Ghildiyal, M. and Zamore, P.D. (2009) Small Silencing RNAs: An Expanding Universe. *Nature Reviews Genetics*, **10**, 94–108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>.
- 5 Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of Gene Silencing by Double-Stranded RNA. *Nature*, **431**, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature02873>.
- 6 Ketting, R.F., Fischer, S.E.J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. and Plasterk, R.H.A. (2001) Dicer Functions in RNA Interference and in Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in *C. Elegans*. *Genes & Development*, **15**, 2654–2659. <https://doi.org/10.1101/gad.927801>.
- 7 Tang, G. (2005) SiRNA and MiRNA: An Insight into RISCs. *Trends in Biochemical Sciences*, **30**, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.12.007>.
- 8 Maori, E., Garbian, Y., Kunik, V., Mozes-Koch, R., Malka, O., Kalev, H., Sabath, N., Sela, I. and Shafir, S. (2019) A Transmissible RNA Pathway in Honey Bees. *Cell Reports*, **27**, 1949-1959.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.073>.
- 9 Sanchez Alvarado, A. and Newmark, P.A. (1999) Double-Stranded RNA Specifically Disrupts Gene Expression during Planarian Regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 5049–5054. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5049>.
- 10 Galvani, A. and Sperling, L. (2002) RNA Interference by Feeding in Paramecium. *Trends in Genetics*, **18**, 11–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02548-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02548-3).
- 11 Kolev, N.G., Tschudi, C. and Ullu, E. (2011) RNA Interference in Protozoan Parasites: Achievements and Challenges. *Eukaryotic Cell*, **10**, 1156–1163. <https://doi.org/10.1128/EC.05114-11>.
- 12 Food Safety Commission of Japan. (2016) MON 87411 Line, a Maize Tolerant to Glyphosate and Resistant to Coleoptera: Summary. *Food Safety*, **4**, 91–92. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2016016s>.
- 13 Fishilevich, E., Vélez, A.M., Storer, N.P., Li, H., Bowling, A.J., Rangasamy, M., Worden, S.E., Narva, K.E. and Siegfried, B.D. (2016) RNAi as a Management Tool for the Western Corn Rootworm, *Diabrotica Virgifera Virgifera*: RNAi as a Pest Management Tool for Western Corn Rootworm. *Pest Management Science*, **72**, 1652–1663. <https://doi.org/10.1002/ps.4324>.
- 14 Palli, S.R. (2014) RNA Interference in Colorado Potato Beetle: Steps toward Development of DsRNA as a Commercial Insecticide. *Current Opinion in Insect Science*, **6**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.09.011>.
- 15 Ramaseshadri, P., Segers, G., Flannagan, R., Wiggins, E., Clinton, W., Ilagan, O., McNulty, B., Clark, T. and Bolognesi, R. (2013) Physiological and Cellular Responses Caused by RNAi- Mediated Suppression of Snf7 Orthologue in Western Corn Rootworm (*Diabrotica Virgifera Virgifera*) Larvae. Cotterill, S., Ed., *PLoS ONE*, **8**, e54270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054270>.

- 16 Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J., Wiggins, E., Heck, G. and Segers, G. (2012) Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica Virgifera Virgifera* LeConte). Palli, S.R., Ed., *PLoS ONE*, **7**, e47534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047534>.
- 17 Alcazar, R.M., Lin, R. and Fire, A.Z. (2008) Transmission Dynamics of Heritable Silencing Induced by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics*, **180**, 1275–1288. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.089433>.
- 18 Winston, W.M., Sutherlin, M., Wright, A.J., Feinberg, E.H. and Hunter, C.P. (2007) *Caenorhabditis Elegans* SID-2 Is Required for Environmental RNA Interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 10565–10570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611282104>.
- 19 Winston, W.M., Molodowitch, C. and Hunter, C.P. (2002) Systemic RNAi in *C. Elegans* Requires the Putative Transmembrane Protein SID-1. *Science*, **295**, 2456–2459. <https://doi.org/10.1126/science.1068836>.
- 20 Shih, J.D., Fitzgerald, M.C., Sutherlin, M. and Hunter, C.P. (2009) The SID-1 Double-Stranded RNA Transporter Is Not Selective for DsRNA Length. *RNA*, **15**, 384–390. <https://doi.org/10.1261/rna.1286409>.
- 21 Shih, J.D. and Hunter, C.P. (2011) SID-1 Is a DsRNA-Selective DsRNA-Gated Channel. *RNA*, **17**, 1057–1065. <https://doi.org/10.1261/rna.2596511>.
- 22 Boutla, A. (2002) Induction of RNA Interference in *Caenorhabditis Elegans* by RNAs Derived from Plants Exhibiting Post-Transcriptional Gene Silencing. *Nucleic Acids Research*, **30**, 1688–1694. <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1688>.
- 23 Gabel, H.W. and Ruvkun, G. (2008) The Exonuclease ERI-1 Has a Conserved Dual Role in 5.8S RRNA Processing and RNAi. *Nature Structural & Molecular Biology*, **15**, 531–533. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1411>.
- 24 Calixto, A., Chelur, D., Topalidou, I., Chen, X. and Chalfie, M. (2010) Enhanced Neuronal RNAi in *C. Elegans* Using SID-1. *Nature Methods*, **7**, 554–559. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1463>.
- 25 Hammell, C.M. and Hannon, G.J. (2012) Inducing RNAi in *C. Elegans* by Feeding with DsRNA-Expressing *E. Coli*. *Cold Spring Harbor Protocols*, **2012**, pdb.prot072348. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot072348>.
- 26 Elhassan, M.O., Christie, J. and Duxbury, M.S. (2012) Homo Sapiens Systemic RNA Interference-Defective-1 Transmembrane Family Member 1 (SIDT1) Protein Mediates Contact-Dependent Small RNA Transfer and MicroRNA-21-Driven Chemoresistance. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 5267–5277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318865>.
- 27 Li, W., Koutmou, K.S., Leahy, D.J. and Li, M. (2015) Systemic RNA Interference Deficiency-1 (SID-1) Extracellular Domain Selectively Binds Long Double-Stranded RNA and Is Required for RNA Transport by SID-1. *Journal of Biological Chemistry*, **290**, 18904–18913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658864>.
- 28 Duxbury, M.S., Ashley, S.W. and Whang, E.E. (2005) RNA Interference: A Mammalian SID-1 Homologue Enhances SiRNA Uptake and Gene Silencing Efficacy in Human Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**, 459–463. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.199>.
- 29 Tomoyasu, Y., Miller, S.C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D. and Bucher, G. (2008) Exploring Systemic RNA Interference in Insects: A Genome-Wide Survey for RNAi Genes in *Tribolium*. *Genome Biology*, **9**, R10. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r10>.

- 30 Valdes, V.J., Athie, A., Salinas, L.S., Navarro, R.E. and Vaca, L. (2012) CUP-1 Is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in *Caenorhabditis Elegans*. Uversky, V.N., Ed., *PLoS ONE*, **7**, e33962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033962>.
- 31 Feinberg, E.H. and Hunter, C.P. (2003) Transport of DsRNA into Cells by the Transmembrane Protein SID-1. *Science*, **301**, 1545–1547. <https://doi.org/10.1126/science.1087117>.
- 32 Nguyen, T.A., Smith, B.R.C., Elgass, K.D., Creed, S.J., Cheung, S., Tate, M.D., Belz, G.T., Wicks, I.P., Masters, S.L. and Pang, K.C. (2019) SIDT1 Localizes to Endolysosomes and Mediates Double-Stranded RNA Transport into the Cytoplasm. *The Journal of Immunology*, **202**, 3483–3492. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801369>.
- 33 Méndez-Acevedo, K.M., Valdes, V.J., Asanov, A. and Vaca, L. (2017) A Novel Family of Mammalian Transmembrane Proteins Involved in Cholesterol Transport. *Scientific Reports*, **7**, 7450. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07077-z>.
- 34 Chen, Q., Zhang, F., Dong, L., Wu, H., Xu, J., Li, H., Wang, J., Zhou, Z., Liu, C., Wang, Y., Liu, Y., Lu, L., Wang, C., Liu, M., Chen, X., Wang, C., Zhang, C., Li, D., Zen, K., Wang, F., Zhang, Q. and Zhang, C.-Y. (2021) SIDT1-Dependent Absorption in the Stomach Mediates Host Uptake of Dietary and Orally Administered MicroRNAs. *Cell Research*, **31**, 247–258. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0389-3>.
- 35 Aizawa, S., Fujiwara, Y., Contu, V.R., Hase, K., Takahashi, M., Kikuchi, H., Kabuta, C., Wada, K. and Kabuta, T. (2016) Lysosomal Putative RNA Transporter SIDT2 Mediates Direct Uptake of RNA by Lysosomes. *Autophagy*, **12**, 565–578. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1145325>.
- 36 Nguyen, T.A., Smith, B.R.C., Tate, M.D., Belz, G.T., Barrios, M.H., Elgass, K.D., Weisman, A.S., Baker, P.J., Preston, S.P., Whitehead, L., Garnham, A., Lundie, R.J., Smyth, G.K., Pellegrini, M., O’Keeffe, M., Wicks, I.P., Masters, S.L., Hunter, C.P. and Pang, K.C. (2017) SIDT2 Transports Extracellular DsRNA into the Cytoplasm for Innate Immune Recognition. *Immunity*, **47**, 498–509.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.007>.
- 37 Suthar, M.S., Brassil, M.M., Blahnik, G., McMillan, A., Ramos, H.J., Proll, S.C., Belisle, S.E., Katze, M.G. and Gale, M. (2013) A Systems Biology Approach Reveals That Tissue Tropism to West Nile Virus Is Regulated by Antiviral Genes and Innate Immune Cellular Processes. Gack, M.U., Ed., *PLoS Pathogens*, **9**, e1003168. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003168>.
- 38 Braukmann, F., Jordan, D., Jenkins, B., Koulman, A. and Miska, E.A. (2020) SID-2 Negatively Regulates Development Likely Independent of Nutritional DsRNA Uptake. *RNA Biology*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1827619>.
- 39 McEwan, D.L., Weisman, A.S. and Hunter, C.P. (2012) Uptake of Extracellular Double-Stranded RNA by SID-2. *Molecular Cell*, **47**, 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.014>.
- 40 Whangbo, J.S., Weisman, A.S., Chae, J. and Hunter, C.P. (2017) SID-1 Domains Important for DsRNA Import in *Caenorhabditis Elegans*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, **7**, 3887–3899. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300308>.
- 41 Rink, J.C., Ed. (2018) Planarian Regeneration: Methods and Protocols. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7802-1>.
- 42 Flores, N.M., Oviedo, N.J. and Sage, J. (2016) Essential Role for the Planarian Intestinal GATA Transcription Factor in Stem Cells and Regeneration. *Developmental Biology*, **418**, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.08.015>.

- 43 Cutie, S., Hoang, A.T., Payumo, A.Y. and Huang, G.N. (2017) Unconventional Functions of Muscles in Planarian Regeneration. *Developmental Cell*, **43**, 657–658. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.006>.
- 44 Witchley, J.N., Mayer, M., Wagner, D.E., Owen, J.H. and Reddien, P.W. (2013) Muscle Cells Provide Instructions for Planarian Regeneration. *Cell Reports*, **4**, 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.022>.
- 45 Paskin, T.R., Jellies, J., Bacher, J. and Beane, W.S. (2014) Planarian Phototactic Assay Reveals Differential Behavioral Responses Based on Wavelength. Dickens, J.C., Ed., *PLoS ONE*, **9**, e114708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114708>.
- 46 Sandmann, T., Vogg, M.C., Owlarn, S., Boutros, M. and Bartscherer, K. (2011) The Head-Regeneration Transcriptome of the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *Genome Biology*, **12**, R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-8-r76>.
- 47 Rink, J.C., Vu, H.T.-K. and Alvarado, A.S. (2011) The Maintenance and Regeneration of the Planarian Excretory System Are Regulated by EGFR Signaling. *Development*, **138**, 3769–3780. <https://doi.org/10.1242/dev.066852>.
- 48 Mummery, C.L., Stolpe, A. van de, Roelen, B.A.J. and Clevers, H., Eds. (2014) Stem Cells: Scientific Facts and Fiction. Second edition., Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, London.
- 49 Adler, C.E. and Sánchez Alvarado, A. (2015) Types or States? Cellular Dynamics and Regenerative Potential. *Trends in Cell Biology*, **25**, 687–696. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.008>.
- 50 Sousa, N. and Adell, T. (2018) Maintenance of *Schmidtea mediterranea* in the Laboratory. *BIO-PROTOCOL*, **8**. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3040>.
- 51 Reynoldson, T.B. (1968) Shrinkage Thresholds in Freshwater Triclad. *Ecology*, **49**, 584–586. <https://doi.org/10.2307/1934135>.
- 52 Newmark, P.A. and Alvarado, A.S. (2002) Not Your Father's Planarian: A Classic Model Enters the Era of Functional Genomics. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 210–219. <https://doi.org/10.1038/nrg759>.
- 53 Brøndsted, H.V. (1955) PLANARIAN REGENERATION. *Biological Reviews*, **30**, 65–126. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1955.tb00649.x>.
- 54 Sánchez Alvarado, A. and Kang, H. (2005) Multicellularity, Stem Cells, and the Neoblasts of the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *Experimental Cell Research*, **306**, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.020>.
- 55 Sánchez Alvarado, A. (2006) Planarian Regeneration: Its End Is Its Beginning. *Cell*, **124**, 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.012>.
- 56 Scimone, M.L., Kravarik, K.M., Lapan, S.W. and Reddien, P.W. (2014) Neoblast Specialization in Regeneration of the Planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem Cell Reports*, **3**, 339–352. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.06.001>.
- 57 Charytoniuk, T., Iłowska, N., Berk, K., Drygalski, K., Chabowski, A. and Konstantynowicz-Nowicka, K. (2019) The Effect of Enterolactone on Sphingolipid Pathway and Hepatic Insulin Resistance Development in HepG2 Cells. *Life Sciences*, **217**, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.044>.
- 58 Liu, S.-Y., Selck, C., Friedrich, B., Lutz, R., Vila-Farré, M., Dahl, A., Brandl, H., Lakshmanaperumal, N., Henry, I. and Rink, J.C. (2013) Reactivating Head Regrowth in a Regeneration-Deficient Planarian Species. *Nature*, **500**, 81–84. <https://doi.org/10.1038/nature12414>.
- 59 Benazzi, M., Ballester, R., Bagaña, J. and Puccinelli, I. (1972) The Fissiparous Race of the Planarian *Dugesia lugubris* S.L. Found in Barcelona (Spain) Belongs to the Biotype G: Comparative Analysis of the Karyotypes. *Caryologia*, **25**, 59–68. <https://doi.org/10.1080/00087114.1972.10796465>.

- 60 Grohme, M.A., Schloissnig, S., Rozanski, A., Pippel, M., Young, G.R., Winkler, S., Brandl, H., Henry, I., Dahl, A., Powell, S., Hiller, M., Myers, E. and Rink, J.C. (2018) The Genome of *Schmidtea mediterranea* and the Evolution of Core Cellular Mechanisms. *Nature*, **554**, 56–61. <https://doi.org/10.1038/nature25473>.
- 61 Rozanski, A., Moon, H., Brandl, H., Martín-Durán, J.M., Grohme, M.A., Hüttner, K., Bartscherer, K., Henry, I. and Rink, J.C. (2019) PlanMine 3.0—Improvements to a Mineable Resource of Flatworm Biology and Biodiversity. *Nucleic Acids Research*, **47**, D812–D820. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1070>.
- 62 Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merzhuk, Y., McGinnis, S. and Madden, T.L. (2008) NCBI BLAST: A Better Web Interface. *Nucleic Acids Research*, **36**, W5–W9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>.
- 63 Chao, J., Li, Z., Sun, Y., Aluko, O.O., Wu, X., Wang, Q. and Liu, G. (2021) MG2C: A User-Friendly Online Tool for Drawing Genetic Maps. *Molecular Horticulture*, **1**, 16. <https://doi.org/10.1186/s43897-021-00020-x>.
- 64 Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D. and Higgins, D.G. (2011) Fast, Scalable Generation of High-quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, **7**, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- 65 Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. and Lopez, R. (2010) A New Bioinformatics Analysis Tools Framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, **38**, W695–W699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq313>.
- 66 McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Cowley, A.P. and Lopez, R. (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, **41**, W597–W600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>.
- 67 Wheeler, D.L. (2003) Database Resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Research*, **31**, 28–33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg033>.
- 68 Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Battistuzzi, F.U., Ed., *Molecular Biology and Evolution*, **38**, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- 69 Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S. and Gascuel, O. (2019) NGPhylogeny.Fr: New Generation Phylogenetic Services for Non-Specialists. *Nucleic Acids Research*, **47**, W260–W265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>.
- 70 Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, **59**, 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- 71 Stückemann, T., Cleland, J.P., Werner, S., Thi-Kim Vu, H., Bayersdorf, R., Liu, S.-Y., Friedrich, B., Jülicher, F. and Rink, J.C. (2017) Antagonistic Self-Organizing Patterning Systems Control Maintenance and Regeneration of the Anteroposterior Axis in Planarians. *Developmental Cell*, **40**, 248–263.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.024>.
- 72 Labbé, R.M., Irimia, M., Currie, K.W., Lin, A., Zhu, S.J., Brown, D.D.R., Ross, E.J., Voisin, V., Bader, G.D., Blencowe, B.J. and Pearson, B.J. (2012) A Comparative Transcriptomic Analysis Reveals Conserved Features of Stem Cell Pluripotency in Planarians and Mammals. *STEM CELLS*, **30**, 1734–1745. <https://doi.org/10.1002/stem.1144>.

- 73 Fincher, C.T., Wurtzel, O., de Hoog, T., Kravarik, K.M. and Reddien, P.W. (2018) Cell Type Transcriptome Atlas for the Planarian *Schmidtea Mediterranea*. *Science*, **360**, eaaq1736. <https://doi.org/10.1126/science.aaq1736>.
- 74 Plass, M., Solana, J., Wolf, F.A., Ayoub, S., Misios, A., Glažar, P., Obermayer, B., Theis, F.J., Kocks, C. and Rajewsky, N. (2018) Cell Type Atlas and Lineage Tree of a Whole Complex Animal by Single-Cell Transcriptomics. *Science*, **360**, eaaq1723. <https://doi.org/10.1126/science.aaq1723>.
- 75 Reddien, P.W., Oviedo, N.J., Jennings, J.R., Jenkin, J.C. and Alvarado, A.S. (2005) SMEDWI-2 Is a PIWI-Like Protein That Regulates Planarian Stem Cells. *Science*, **310**, 1327–1330. <https://doi.org/10.1126/science.1116110>.
- 76 Mohamed Haroon, M., Lakshmanan, V., Sarkar, S.R., Lei, K., Vemula, P.K. and Palakodeti, D. (2020) Mitochondrial State Determines Functionally Divergent Stem Cell Population in Planaria. preprint, *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.29.226365>.
- 77 Wagner, D.E., Ho, J.J. and Reddien, P.W. (2012) Genetic Regulators of a Pluripotent Adult Stem Cell System in Planarians Identified by RNAi and Clonal Analysis. *Cell Stem Cell*, **10**, 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.016>.
- 78 Resch, A.M., Palakodeti, D., Lu, Y.-C., Horowitz, M. and Graveley, B.R. (2012) Transcriptome Analysis Reveals Strain-Specific and Conserved Stemness Genes in *Schmidtea Mediterranea*. Boutros, M., Ed., *PLoS ONE*, **7**, e34447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034447>.
- 79 Molinaro, A.M. and Pearson, B.J. (2016) In Silico Lineage Tracing through Single Cell Transcriptomics Identifies a Neural Stem Cell Population in Planarians. *Genome Biology*, **17**, 87. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0937-9>.
- 80 García-Castro, H. and Solana, J. (2022) Single-Cell Transcriptomics in Planaria: New Tools Allow New Insights into Cellular and Evolutionary Features. *Biochemical Society Transactions*, **50**, 1237–1246. <https://doi.org/10.1042/BST20210825>.
- 81 Wang, I.E., Lapan, S.W., Scimone, M.L., Clandinin, T.R. and Reddien, P.W. (2016) Hedgehog Signaling Regulates Gene Expression in Planarian Glia. *eLife*, **5**, e16996. <https://doi.org/10.7554/eLife.16996>.
- 82 Baguna, J. and Romero, R. (1981) Quantitative Analysis of Cell Types during Growth, Degrowth and Regeneration in the Planarians *Dugesia Mediterranea* and *Dugesia Tigrina*. *Hydrobiologia*, **84**, 181–194. <https://doi.org/10.1007/BF00026179>.
- 83 Guerrero-Hernández, C., Doddihal, V., Mann, F.G. and Alvarado, A.S. (2021) A Powerful and Versatile New Fixation Protocol for Immunohistology and *in Situ* Hybridization That Preserves Delicate Tissues in Planaria. preprint, *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.01.466817>.
- 84 Umesono, Y., Watanabe, K. and Agata, K. (1997) A Planarian Orthopedia Homolog Is Specifically Expressed in the Branch Region of Both the Mature and Regenerating Brain. *Development, Growth and Differentiation*, **39**, 723–727. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1997.t01-5-00008.x>.
- 85 Zayas, R.M., Cebrià, F., Guo, T., Feng, J. and Newmark, P.A. (2010) The Use of Lectins as Markers for Differentiated Secretory Cells in Planarians. *Developmental Dynamics*, **239**, 2888–2897. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22427>.
- 86 Almagro Armenteros, J.J., Sønderby, C.K., Sønderby, S.K., Nielsen, H. and Winther, O. (2017) DeepLoc: Prediction of Protein Subcellular Localization Using Deep Learning. Hancock, J., Ed., *Bioinformatics*, **33**, 3387–3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>.
- 87 Li, H. and Papadopoulos, V. (1998) Peripheral-Type Benzodiazepine Receptor Function in Cholesterol Transport. Identification of a Putative Cholesterol

- Recognition/Interaction Amino Acid Sequence and Consensus Pattern ¹. *Endocrinology*, **139**, 4991–4997. <https://doi.org/10.1210/endo.139.12.6390>.
- 88 Fantini, J. and Barrantes, F.J. (2013) How Cholesterol Interacts with Membrane Proteins: An Exploration of Cholesterol-Binding Sites Including CRAC, CARC, and Tilted Domains. *Frontiers in Physiology*, **4**. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00031>.
- 89 Baier, C.J., Fantini, J. and Barrantes, F.J. (2011) Disclosure of Cholesterol Recognition Motifs in Transmembrane Domains of the Human Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Scientific Reports*, **1**, 69. <https://doi.org/10.1038/srep00069>.
- 90 Omasits, U., Ahrens, C.H., Müller, S. and Wollscheid, B. (2014) Protter: Interactive Protein Feature Visualization and Integration with Experimental Proteomic Data. *Bioinformatics*, **30**, 884–886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>.
- 91 Deutsch, E.W. (2010) The PeptideAtlas Project. In: Hubbard, S.J. and Jones, A.R., Eds., *Proteome Bioinformatics*, Humana Press, Totowa, NJ, 285–296. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-444-9_19.
- 92 Teufel, F., Almagro Armenteros, J.J., Johansen, A.R., Gíslason, M.H., Pihl, S.I., Tsirigos, K.D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2022) SignalP 6.0 Predicts All Five Types of Signal Peptides Using Protein Language Models. *Nature Biotechnology*, **40**, 1023–1025. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3>.
- 93 Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, **16**, 276–277. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02024-2).
- 94 Wenemoser, D., Lapan, S.W., Wilkinson, A.W., Bell, G.W. and Reddien, P.W. (2012) A Molecular Wound Response Program Associated with Regeneration Initiation in Planarians. *Genes & Development*, **26**, 988–1002. <https://doi.org/10.1101/gad.187377.112>.
- 95 Saleh, M.-C., van Rij, R.P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O’Farrell, P.H. and Andino, R. (2006) The Endocytic Pathway Mediates Cell Entry of DsRNA to Induce RNAi Silencing. *Nature Cell Biology*, **8**, 793–802. <https://doi.org/10.1038/ncb1439>.
- 96 Roignant, J.-Y., Carré, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J.-A. and Antoniewski, C. (2003) Absence of Transitive and Systemic Pathways Allows Cell-Specific and Isoform-Specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, **9**, 299–308. <https://doi.org/10.1261/rna.2154103>.
- 97 Murphy, D., Dancis, B. and Brown, J.R. (2008) The Evolution of Core Proteins Involved in MicroRNA Biogenesis. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, 92. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-92>.
- 98 Dowling, D., Pauli, T., Donath, A., Meusemann, K., Podsiadlowski, L., Petersen, M., Peters, R.S., Mayer, C., Liu, S., Zhou, X., Misof, B. and Niehuis, O. (2017) Phylogenetic Origin and Diversification of RNAi Pathway Genes in Insects. *Genome Biology and Evolution*, evw281. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw281>.
- 99 Torri, A., Jaeger, J., Pradeu, T. and Saleh, M.-C. (2022) The Origin of RNA Interference: Adaptive or Neutral Evolution? *PLOS Biology*, **20**, e3001715. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001715>.
- 100 Obbard, D.J., Gordon, K.H.J., Buck, A.H. and Jiggins, F.M. (2009) The Evolution of RNAi as a Defence against Viruses and Transposable Elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 99–115. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0168>.

- 101 The Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006) Insights into Social Insects from the Genome of the Honeybee *Apis Mellifera*. *Nature*, **443**, 931–949. <https://doi.org/10.1038/nature05260>.
- 102 Rank, A.P. and Koch, A. (2021) Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We? *Frontiers in Plant Science*, **12**, 755203. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.755203>.
- 103 Quemener, A.M., Bachelot, L., Forestier, A., Donnou-Fournet, E., Gilot, D. and Galibert, M. (2020) The Powerful World of Antisense Oligonucleotides: From Bench to Bedside. *WIREs RNA*, **11**. <https://doi.org/10.1002/wrna.1594>.
- 104 Shen, X. and Corey, D.R. (2018) Chemistry, Mechanism and Clinical Status of Antisense Oligonucleotides and Duplex RNAs. *Nucleic Acids Research*, **46**, 1584–1600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1239>.
- 105 Pratt, A.J., Rambo, R.P., Lau, P.-W. and MacRae, I.J. (2012) Preparation and Characterization of the Extracellular Domain of Human Sid-1. Butko, P., Ed., *PLoS ONE*, **7**, e33607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033607>.
- 106 Song, Y., Gu, J., You, J., Tao, Y., Zhang, Y., Wang, L. and Gao, J. (2022) The Functions of SID1 Transmembrane Family, Member 2 (*Sidt2*). *The FEBS Journal*, febs.16641. <https://doi.org/10.1111/febs.16641>.
- 107 Di Scala, C., Baier, C.J., Evans, L.S., Williamson, P.T.F., Fantini, J. and Barrantes, F.J. (2017) Relevance of CARC and CRAC Cholesterol-Recognition Motifs in the Nicotinic Acetylcholine Receptor and Other Membrane-Bound Receptors. *Current Topics in Membranes*, Elsevier, 3–23. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2017.05.001>.
- 108 Gurley, K.A., Rink, J.C. and Alvarado, A.S. (2008) β -Catenin Defines Head Versus Tail Identity During Planarian Regeneration and Homeostasis. *Science*, **319**, 323–327. <https://doi.org/10.1126/science.1150029>.
- 109 Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R.K., Rajeev, K.G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E.M., Zimmermann, T., Koteliansky, V., Manoharan, M. and Stoffel, M. (2007) Mechanisms and Optimization of in Vivo Delivery of Lipophilic SiRNAs. *Nature Biotechnology*, **25**, 1149–1157. <https://doi.org/10.1038/nbt1339>.

IX. Załączniki

Załącznik 1. Plik tekstowy zawierający zgodę na wykorzystanie obrazu (dostępny w wersji elektronicznej pracy).

Załącznik 2. Lista białek użytych do skonstruowania drzewa filogenetycznego homologów SID-1.

Lp.	Organizm	Nazwa białka	ID sekwencji w źródłowej bazie danych
Nicień (Wormbase)			
1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ce-SID-1	CE30331
2	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Cbr-SID-1	CBP22114
3	<i>Caenorhabditis japonica</i>	Cjp-SID-1	JA60059
4	<i>Brugia malayi</i>	Bma-SID-1	BM45574
5	<i>Caenorhabditis remanei</i>	Cre-SID-1	RP37195
6	<i>Caenorhabditis nigoni</i>	Cni-SID-1	Cni-sid-1.2
7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ce-CHUP-1	CE26397
Ssaki (UniProt)			
8	<i>Mus musculus</i>	Mmus-SIDT1	Q6AXF6
9	<i>Mus musculus</i>	Mmus-SIDT2	Q8CIF6
10	<i>Rattus norvegicus</i>	Rnor-SIDT1	Q6Q3F5
11	<i>Rattus norvegicus</i>	Rnor-SIDT2	D3ZEH5
12	<i>Homo sapiens</i>	Hs-SIDT1	Q9NXL6
13	<i>Homo sapiens</i>	Hs-SIDT2	Q8NBJ9
Płazińce (PlanMine)*			
14	<i>Dugesia japonica</i>	Dj-SIDT1	dd_Djap_v4_16500_2_1
15	<i>Dugesia japonica</i>	Dj-SIDT2	dd_Djap_v4_28772_1_1
16	<i>Dugesia japonica</i>	Dj-SIDT3	dd_Djap_v4_73344_2_1
17	<i>Dendrocoelum lacteum</i>	Dlac-SIDT1	dd_Dlac_v9_184150_0_1
18	<i>Dendrocoelum lacteum</i>	Dlac-SIDT2	dd_Dlac_v9_190304_0_1
19	<i>Polycelis nigra</i>	Pnig-SIDT1	dd_Pnig_v3_5654_1_1
20	<i>Schmidtea polychroa</i>	Spol-SIDT1	dd_Dlac_v9_190304_0_1
21	<i>Schmidtea mediterranea</i>	Smed-SIDT1	dd_Smed_v6_6063_0_1
22	<i>Schmidtea mediterranea</i>	Smed-SIDT2	dd_Smed_v6_8231_0_2
23	<i>Schmidtea mediterranea</i>	Smed-SIDT3	dd_Smed_v6_8407_0_1

* sekwencje białek uzyskano na drodze translacji *in silico* najdłuższych ramek odczytu zidentyfikowanych we wskazanych transkryptach

Załącznik 3. Sekwencje białek Smed-SIDT1, Smed-SIDT2, Smed-SIDT3, Ce-CHUP-1, Ce-SID-1, Hs-SIDT1, Hs-SIDT2.

>Smed-SIDT1

MNYYIFILNIFIFTGHSFPTFNIVNFDINETKVVKASHLITTVAVYNYPEEYFLRVFVESKIDILQSLVIIIKDDK
SVVTSFELVRDSNQSVIRAARTICPFLQDSTVGLIRNRTLSIEFSSQSQSAINVSVTVRTINFLISVNDPRNLITR
NTPYYFLFKFQPTMKEVIVYVDSTDECMILSIQESVCPHIDISGNVKFKGSYQSVTRSGAMVVQKKHYNSS
NFVIVFTLNSNNEYECFNKMLMQKLQKYPPIRKKYITFHVTEIIEDYLLPILGAIGFYLLFFYLIFPIISFIYRFYCIKS
SVSENVENSPIAHSDERPVSYETIEERADMKNMSYNDNQSYNIEVSSSVSGNQLAEDNEIIDSFGFVGVFVHSRL
GNIFVSDLKKNALVDRKYFLYLWYVIISVFYSLPVVQLVINYQRTLEVTGNQDICFYNFRCTRPLYVFIAF
NNVMSNCGYVLLGILFTLITWRRHSLYNECKLRLCKKDYNLGPQYYGLFYAMGVSLTMEGIMSACYHVCV
SHDNFQFDAYMYILASLCLIKIYQIRHPDIDATAHSFYMTMALFIFIGVIGVFNRLILWIIFTMLYLFGMLFL
SCEIYFLGQWNIDVKVPIQIYNRFKQDKWLILCPDHVVRMIILIFNIVNISFALFGAIIKPSNFSSYFLAIFMINL
LLYFFIYVILKIIYCESIYYLSILYVLIAMVCWGFALYCFIKHPTDWEQSPASSRAFNQNCLLNFYDIHDIWHF
LSSLSMFFSFMALLNIDDGLFAIERDKIIVF

>Smed-SIDT2

LIMKVLLFILIIICELFTVENHFYNIYNGIINEVNEMNISVRNTSIIIFYEYNNLSTKEAALRVYIECDLKPHEISIII
KQDNSYLLSMELFQINNEVPVKAARTIHLFNEATNHNYSSNHSTSIEVSSKSLRKAIVKIQIKWIDNFLIKLNQ
NQSVSITITYTPVYYLKFQDSKKQTIVIHVQSKDEICMNLGIQNHVEPVQDDYRHIKPYIYHQTMSKETTLVIKK
GKFISNSILIFMLNKAIEKCANFFSLSKKPWPEMKHFNFHITELKTDYMLPIFLAIGFYLSFYVIACLAMVG
DHFIKSVSSENRFRILSDFSSVNSHAGTTKKRCLTQNNPECEKLIYLSDLTKTNPMHLEQEYFFMYIWLIVISI
FNLPSAIQMIWNFYRNFITNGNQCICFYNFRCARPFFVFPANMISNIGYILLGILFLLITWKKHQRYNSWLN
ELNMSIFYYGLPKYFGLYYAMGFSLMMEGIMSALYHVCNPNQSHMIFDQSYKYILVCIMMVQIYQFRHFDITA
SAHLFYISLAIFIFIGVIHQFFQEIIFFWSLFTVLYMFWTAILMCDIYFDQFKINIMLPKQVYLVKSKKWKAFIP
TYKYRMVIVVFALIINGTISIYGILIKPEEFPLFFLTFLSLNLLIYFGYYIVMKAFYKETFNKTAIFYSIITISCWA
VAVYCFIQPTSNWRKTPAVSREQNKKCIFLDFYDIHDISHFLFSIAIFFTFLTLQNMDCLENQEMNNIKIF

>Smed-SIDT3

MKIFSCILCLLFFNVLSFLPKINVENGTINVPLNVSIISTSLSFVYYEYSPRSTLRVQVKVDSNLNASLLIIKDKQ
NRIVSSIDIPKINHILAERTVCPFDLRENKTRMSLEVSTSSSVLTVVTILVLVDNFQLEVNIKRNFTITQYSP
SFFLFELKNKYIYKLYVESSDNTCMIFSIEAKCPINIDHKKIHELNSVAYQTVTRIGSITAYETKLEKAYVVF
VVDVTGACGTALTKNITVVEKYFTLLISQHDKTYLPLVFGAIGFFLIFYLFSPIISFIYMRFCYKNLNSKDEE
MLIESSMESPVSYGSIIDHADIATINRILLPQSESNNLYRRENSDNSYDSLSDVYTDNSVFRNLKNVRLSDF
SRKNHAVLDRKYFLYFWYLIVISVFYGLPVVQLVIKYQENFDKTGDQDTCYNYNFRVCVPPYIFSAFNNVISN
IGYVLLGILFTLLTWREIYYKEGSKSHGVPQYFGLFYAMGVSLTMEGIMSACYHICPSNNNFQFDAYMYI
LACLMIKIYQTRHPDINATAHSFFMTMALFIFVSVIGVVTMYNRIIFWIFFLILYLCCIGFLTSEVYYMGCWK
LDCQILKRIYNMILLDKWKIFIPTYKRRMAILSFFNAVNFASLYGIIAKPKNFPSYFLAVFMVNLILYFGFYIL
MKVIHSERFHRISLFYVIVSILCWATALYCFINHPTDQWKPPSLSRIENKDCLEFFDYDIHDTWHFLSAMSMMFF
SFMGLQNIDDCLIHTERNKIAVF

>Ce-SID1

MIRVYLIILMHLVIGLTQNNSTPSPITSSNSSVLFVEISSKMKMIEKKLEANTVHVLRLELDQSFILDITKVA
AEIVDSSKYSKEDGVILEVTVSNGRDSFLLKLPVYPNLKLYTDGKLLNPLVEQDFGAHRKRHRIGDPHFHQ

NLIVTVQSRLNADIDYRLHVTHLDRAQYDFLKFKTGQTTKLSNQKLTfVVKPIGFFLNCSEQNISQFHVTLYS
EDDICANLITVPANESIYDRSVISDKTHNRRVLSFTKRADIFFTETEISMFKSFRI FVFIAPDDSGCSTNTSRKSF
NEKKKISFEFKLENQSYAVPTALMMIFLTPCLLFLPIVINIINKNSRKLAPSQSNLISFSPVPSEQRDMDLSDH
EQQNTSSELENGEIPA AENQIVVEITAENQETSVEEGNREIQVKIPLKQDSLHLHGQMLQYPVAAILPVL MHT
AIEFHKWTTSTMANRDEMCFHNHACARPLGELRAWNNITNIGYTLYGAIFIVLSICRRGRHEYSHVFGTYEC
TLLDVTIGVFMVLQSIASATYHICPSDVAFQFDTPCIQVICGLLMVRQWFVRHESPSPAYTNILLVGVVSLNFL
ISAFSKTSYVRFIIAVIHVIVVGSICLAKERSLGSEKLRFFIMAFSMGNFAAIVMYLTL SAFHLNQIATYCFII
NCIMYLMYYGCMKVLHSERITSKAKLCGALSLLAWAVAGFFFFQDDTDWTRSA AASRALNKPCLLGFFG
SHDLWHIFGALAGLFTFIFVSFVDDDLINTRKTSINIF

>Ce-CHUP-1

MRTSQAIFILIFLDSVRNQSPQVIPAKWDVVYEKETGHNMSLTVFRFQVKEQYSVARIIMSCNESTEHNPLLA
VFREKLAILSLQVPLIVDNYEYSQVARTLCPFTEYKEGEAFTVEVTSSRPVHYNFRAELVQNFYLYNNSQRL
VTASASEPVYLRYDIPGDVDSVAVHLDSNSTICMTVSVQKIGCPVFDLPDNNVSMGLHQMTTTSATIPVEKS
RMSSFYVVFVNTNDLDCSEILSIKPNKPTKFLRMRKSFNVTISSMKIFDYTIPIVFWACILLVTVVVFVYHY
FDGIWERRFVSRAYTHLEDNAQEQRIRDFYDFQRMSEDDDLKDYDLLTDCQDMMVVRKASLTVADLSM
TPYEERELKYDVYKIALAIIGIFYNITVLQLIISKAGSLRQSGDLDECTFNFQCARPLWYFVAFNNVVSNGGY
VYFGTLIIVMNYCRERSFRRLFAVQPTLAERYGLPQHSGLMTAIGLAVIMEGISSATYHVCNNINYPQFDAL
MYVIGMLGKLIWLSLRHPDMVVSAYHAFGLGVFLMAAIAGVYVHNMIFWALFSIYIASMLLVSLEFYFK
GIWTLNLRRLNSIRLSWVSSRHLSCVVPAYKARFFVILLNLIANTAVVVYGLEAHPKDFLSFLLIPFIGNLFIY
IYYILMKMIYREKIPKRAIALFAAVISWTCAGILFNQRVSDWSKMPAISRELNKPCIFLNFYDNHDLWHLSS
AFAIFFSFTAINVIDDDLMFVMRNTIRVF

>Hs-SIDT1

MRGCLRLALLCALPWLLAASPGHPAKSPRQPPAPRRDPFDAARGADFDHVYSGVNLSTENIYSFNYTSQP
DQVTA VRVYVNSSSENLYPVLVVVRQKQEVLSWQVPLLFQGLYQRSYNYQEVSR TLCPSEATNETGPLQ
QLIFVDVASMPLGAQYKLLVTKLKHFLR TNVAFHFTASPSQPQYFLYKFKPDVDSVIKVVSEMA YPCSV
VSVQNMCPVYDLDNHVEFNGVYQSMTKKAAITLQKKDFPGEQFFVVFVIKPEDYACGGSFFIQEKENQ TW
NLQRKKNLEVTIVPSIKESVYVKSSLFSVFIFLSFYLGCLLVGFVHYLRFQRKSIDGSFGSNDGSGNMVASHPI
AAS TPEGSNYGTIDESSSPGRQMSSSDGGPPGQSDTDSSVEESDFDTMPDIESDKNIIRTKMFLYLSDL SRKD
RRIVSKKYKIYFWNIITIAVFYALPVIQLVITYQTVVNVNVTGNQDICYNFLCAHPLGVLSAFNNILSNLGHVLL
GFLFLLIVLRRLDILHRRALEAKDIFAVEYGIPKHFGLFYAMGIALMMEGVLSACYHVCNYSNFQFDTSFMY
MIAGLCMLKLYQTRHPDINASAYSAYASFVIMVTVLGVVFGKNDVWFVWVIFSAIHVLASLALSTQIYYM
GRFKIDL GIFRAAMVYFTDCIQQCSRPLYMDRMVLLVVGNLVNWSFALFGLIYRPRDFASYMLGIFICNLL
LYLAFYIIMKLRSSSEKVLVPLFCIVATAVMWAAALYFFFQNLSSWEGTPAESREKNRECILLDFDDHDIWH
FLSATALFFSFLVLLTLDDDLVVRDQIPVF

>Hs-SIDT2

MFALGLPFLVLLVASVESHGLVLPKNVSKDAEFERTYVDEVNSELVNIYTFNHTVTRNRTEGVRVSVNV
LNKQKQAPLLFVVRQKEAVVSFQVPLILRGMFQRKYLQKVERTLCPPTKNESEIQFFYVDVSTLSPVNTT
YQLRVSRRMDDFVLRTEGEQSFNTTAAQPQYFKYEFPEGVDSVIVKVTSNKAFPCSVISIQDVLCPVYDLN N
VAFIGMYQTMTKKAAITVQRKDFPSNSFYVVVVVKTEDQACGGS LPFYPFAEDEPVDQGHRQKTL SVLVSQ
AVTSEAYVSGMLFCLGIFLSFYLLTVLLACWENWRQKKKTLLVAIDRACPESGHPRVLADSFPGSSPYEGYN
YGSFENVSGSTDGLVDSAGTGDLSYGYQGRSFEPVGT RPRVDSMSSVEEDDYDTLTDIDSDKNVIRTKQYL
YVADLARKDKRVLRRKKYQIYFWNIATIAVFYALPVVQLVITYQTVVNVNVTGNQDICYNFLCAHPLGNLSAF

NNILSNLGYILLGLLFLLIILQREINHNRRALLRNDLCALECGIPKHFGLFYAMGTALMMEGLLSACYHVCPNY
TNFQFDTSFMYMIAGLCMLKLYQKRHPDINASAYSAYACLAIVIFFSVLGVVFGKGNTAFWIVFSIIHIIATLL
LSTQLYYMGRWKLDSGIFRRILHVLYTDCIRQCSGPLYVDRMVLLVMGNVINWSLAAYGLIMRPNDFASYL
LAIGICNLLYFAFYIIMKLRSGERIKLIPLLCIVCTS VVWGFALFFFQGLSTWQKTPAESREHNRDCILLDF
DDHDIWHFLSSIAMFGSFLVLLTLDDDLDTVQRDKIYVF