

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Stasė
GASIULĖ

Kanoninių ir mirtroninių miRNR
funkcinis tyrimas krūtinės kylančiosios
aortos aneurizmos audiniuose
ir virškinimo sistemos navikuose

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija N 004

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2012 – 2014; 2015 - 2018 metais Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Giedrius Vilkaitis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Daumantas Matulis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija N 004).

Nariai:

Prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biochemija N 004).

Dr. Gintautas Tamulaitis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija N 004).

Prof. dr. Rasa Ugenskienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija N 010).

Prof. dr. Aurelija Žvirblienė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija T 005).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. balandžio mėn. 16 d. 13 val. Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centro R-101 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +37067205704; el. paštas stase.gasiule@bti.vu.lt.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Stasė
GASIULĖ

Functional analysis of canonical and
mirtronic miRNAs in thoracic ascending
aortic aneurysm tissues and digestive
system tumors

DOCTORAL DISSERTATION

Nature sciences,
Biochemistry N 004

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2012 - 2014 and 2015 – 2018, at Vilnius University, Life Science Centre, Institute of Biotechnology.

The research was supported by Research Council of Lithuania.

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant – prof. dr. Giedrius Vilkaitis (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry N 004).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – prof. dr. Daumantas Matulis (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry N 004);

Members:

Prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lithuanian University of Health Science, Nature sciences, Biochemistry N 004);

Dr. Gintautas Tamulaitis (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry N 004);

Prof. dr. Rasa Ugenskienė (Lithuanian University of Health Science, Nature sciences, Biology N 010);

Prof. dr. Aurelija Žvirblienė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 1 a.m. on 16th April 2020 in auditorium R-101 of the Life Sciences Centre of Vilnius University. Address: Saulėtekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania. Tel. +370 67205704; e-mail: stase.gasiule@bti.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University and on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	9
ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1 miRNR reikšmė, brendimas ir funkcijos	14
1.1.1 Kanoninis miRNR brendimo kelias gyvūnuose	14
1.1.2 miRNR veikimo mechanizmas	15
1.2 miRNR raiškos reguliacija	19
1.2.1 miRNR transkripcijos reguliacija	19
1.2.2 miRNR sekų redagavimas	20
1.2.3 Reguliacija „surišant“ miRNR	21
1.3 Cirkuliuojančios miRNR	21
1.4 Nekanoniniai miRNR brendimo keliai	23
1.4.1 Nuo Dicer nepriklausomas brendimas	23
1.4.2 Nuo uridilo grupės prijungimo priklausomas brendimas	23
1.4.3 Nuo Drosha ir DGCR8 nepriklausoma miRNR biogeneze	24
1.4.3.1 miRNR kilusios iš mažųjų branduolėlio arba transportinių RNR ...	24
1.4.3.2 miRNR, kilusių iš intronų, brendimas	25
1.5 Molekulinis RNR splaisingo mechanizmas	28
1.5.1 Splaisingo mechanizmas	28
1.5.2 Splaisingo veiksniai	29
1.5.3 Splaisingo veiksniai ir miRNR	31
1.6 miRNR reikšmė krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos vystymuisi ..	32
1.6.1 Krūtinės kylančiosios aortos aneurizma ir jos priežastys	32
1.6.2 Tarpląstelinio užpildo pakitimai, išsivysčius krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai	34
1.6.3 Kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių pokyčiai, išsivysčius krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai	35
1.6.4 miRNR įtaka krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos susiformavimui	35
1.7 miRNR kaip biožymenys virškinimo sistemos vėžinių susirgimų detekcijai	37

1.8 Mirtroninių miRNR reikšmė vėžinėse ląstelėse ir jų panaudojimas genų terapijoje.....	38
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	41
2.1 Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su kylančiosios aortos aneurizmos audiniais ir kraujo plazmos mėginiais	41
2.1.1 Pacientų, kuriems susiformavo kylančiosios aortos aneurizma, audinių ir kraujo plazmos mėginiai	41
2.1.2 RNR gryninimas iš KAA audinių ir RNR kokybės įvertinimas.....	43
2.1.2.1 DEPC-H ₂ O ruošimas	43
2.1.2.2 RNR gryninimas.....	43
2.1.2.3 RNR vientisumo tikrinimas Agilent nanogardelėje.....	44
2.1.3 miRNR sekoskaitos bibliotekų ruošimas.....	44
2.1.3.1 RNR koncentracijos matavimas	44
2.1.3.2 miRNR sekoskaitos bibliotekų paruošimas.....	45
2.1.3.3 miRNR sekoskaitos bibliotekų įvertinimas Agilent nanogardelėje.	46
2.1.3.4 miRNR sekoskaitos bibliotekų koncentracijos nustatymas.....	46
2.1.3.5 Sekoskaitos bibliotekų paruošimas Illumina sekoskaitai	46
2.1.4 Tikro laiko RT-PGR.....	47
2.1.4.1 Komplementarios DNR (kDNR) sintezė.....	47
2.1.4.2 Tikro laiko PGR	48
2.2 Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su virškinimo sistemos vėžiniais bei sveikais audiniais.....	48
2.2.1 Virškinimo sistemos vėžiniai bei sveiki audiniai	48
2.2.2 RNR gryninimas iš vėžinių ir sveikų virškinimo sistemos audinių....	49
2.2.3 kDNR sintezė ir tikro laiko PGR, tiriant mirtronines miRNR	49
2.3 Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su virškinimo ir šalinimo sistemos vėžinėmis ląstelėmis.....	50
2.3.1 Eukariotinių ląstelių linijos	50
2.3.2 Medžiagos eukariotinių ląstelių kultivavimui	50
2.3.3 Ląstelių linijų kultivavimas	50
2.3.4 Ląstelių atšildymas/ užšaldymas	51

2.3.5	Ląstelių skaičiavimas	51
2.3.6	Mikoplazmos užkrato nustatymas	51
2.3.7	Transfekcija.....	51
2.3.8	RNR gryninimas iš ląstelių linijų	52
2.4	Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su <i>E.coli</i> bakterijomis.....	53
2.4.1	<i>E.coli</i> bakterijų kamienas	53
2.4.2	Medžiagos <i>E.coli</i> bakterijų kultyvavimui.....	53
2.4.3	Elektroforezės buferiai	53
2.4.4	Genų inžinerijos metodai, naudoti klonuojant genų dalis, kuriose lokalizuoti tiriami mirtronai	53
2.4.4.1	Genų fragmentų padauginimas.....	53
2.4.4.2	DNR išsodinimas.....	54
2.4.4.3	DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis.....	54
2.4.4.4	DNR gryninimas iš agarozinio gelio	55
2.4.4.5	DNR fragmentų susiuvimas	55
2.4.4.6	Imliųjų ląstelių paruošimas ilgalaikiam saugojimui.....	55
2.4.4.7	<i>E. coli</i> imliųjų ląstelių transformacija	56
2.4.4.8	Diagnostinė PGR.....	56
2.4.4.9	Plazmidinės DNR išskyrimas	56
2.4.4.10	Tikslinių mutacijų konservatyvose srityse įvedimas	56
2.4.4.11	Splaisingo efektyvumo nustatymas	57
2.5	Statistinė analizė.....	57
3.	REZULTATAI	58
3.1	Visuminių miRNR raiškos pokyčių audinyje ir kraujo plazmoje, susiformavus krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai, identifikavimas.....	58
3.2	Sekoskaitos būdu nustatytų miRNR raiškos pokyčių patvirtinimas didesnėje pacientų imtyje tikro laiko PGR metodu.....	64
3.3	TGF- β signalinio kelio reikšmė krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos vystymesi.....	69
3.4	Mirtroninių miRNR brendimo mechanizmo ir jų raiškos tyrimas žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose	74

3.4.1 Mirtroninių miRNR identifikavimas ir jų brendimo priklausomybės nuo splaisingo tyrimas.....	75
3.4.2 SRSF1 bei SRSF2 splaisingo veiksmių įtaka mirtroninių miRNR brendimui	79
3.4.3 Mirtroninių miRNR raiška žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose.....	81
4. REZULTATŲ APTARIMAS	85
4.1 miRNR raiškos pokyčių audiniuose bei kraujo plazmoje, susiformavus krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai, reikšmė	86
4.2 Mirtroninių miRNR brendimo mechanizmo ir jų raiškos žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose, analizė.....	89
IŠVADOS.....	93
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	94
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION.....	126
SANTRAUKA	159
DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .	161
KITOS PUBLIKACIJOS	161
DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS....	162
KITI PRANEŠIMAI.....	162
PEDAGOGINĖ IR MOKSLO POPULIARINIMO VEIKLA	164
DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE.....	165
CURRICULUM VITAE	166
PUBLIKACIJŲ KOPIJOS	167
PADĖKA.....	196

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AUC - specifiskumą žyminčios kreivės plotas
AVAJ - aortos ir vainikinių arterijų jungtis
Ct – slenkstinis ciklas
ceRNR - konkuruojanti ilgoji RNR
dCt – Ct vertė normalizuota su endogeninės RNR Ct verte
DEPC - dietilo pirokarbonatas
endo-shRNR - iRNR transkripto struktūra, susiformavusi dėl per anksti įvykusios terminacijos
IHC – imunohistocheminė analizė
iRNR – informacinė RNR
KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma
kDNR – komplementari DNR
KLF4 – transkripcijos veiksnys (angl. Kruppel-like factor 4)
miRNR – mikroRNR
MYOC - miokardinas
MUT – plazmidės su mutacijomis 5’- ir 3’- splaisingo sekose
Op – po operacijos
PAA - pilvo aortos aneurizma
pre-miRNR – miRNR pirmtakas
pri-miRNR - miRNR pirminis transkriptas
RC – normalizuotas sekų skaičius
RIN - RNR integralumo rodiklis
ROC – specifiskumą žyminti kreivė
RT – atvirkštinė transkripcija
snoRNR - mažosios branduolėlio RNR
SV – sveikų pacientų mėginiai
tRNR - transportinės RNR
VSMC – kraujagyslių lygųjų raumenų ląstelės
WT – laukinio tipo

ĮVADAS

mikroRNR (miRNR) – tai 18-25 nukleotidų ilgio trumposios baltymų nekoduojančios RNR, dalyvaujančios genų raiškos reguliacijoje. Nors žmogaus miRNR identifikuotos dar 2000 metais, iki šiol miRNR funkcijos ir reikšmė intensyviai tiriama. Remiantis Mirbase v22 duomenų bazės duomenimis, šiuo metu žmogaus ląstelėse identifikuota net 2654 subrendusių miRNR (1), kurios dalyvauja daugelio ląstelėje vykstančių procesų reguliacijoje (2). Nustatyta, kad miRNR raiška kinta esant vėžiniams susirgimams, širdies sutrikimams, virškinimo sistemos ir neurologinėms ligoms. Esant pakitimams ląstelėse, vienų miRNR kiekis ląstelėse didėja, o kitų mažėja, todėl susiformuoja skirtingi miRNR profiliai, kuriuos nustačius galima identifikuoti ligos mechanizmą. Be to, miRNR pokyčiai gali būti panaudoti kaip biožymenys ligų diagnostikai, prognozei ir gydymo parinkimui (3,4). Tokie biožymenys turi didžiulį potencialą pritaikymui klinikoje, nes miRNR yra identifikuojamos ir išlieka stabilios visuose kūno skysčiuose - kraujo plazmoje ir serume, šlapime, seilėse ir motinos piene. Taip pat miRNR lengvai nustatomos ne tik įprastai užšaldytuose, bet ir formaline bei parafine užfiksuotuose audiniuose (3).

Nustatyta, kad miRNR raiška keičiasi krūtinės kylančiosios aortos audiniuose ir kraujo plazmoje, išsivysčius aneurizmai (5). Aortos aneurizma susiformuoja, kai aorta išsiplečia 1,5 karto, lyginant su sveika aorta (6). Nors krūtinės kylančiosios aortos aneurizma (KAA) nėra dažnas susirgimas, tokio tipo aneurizma vystosi be simptomų ir jei liga nenustatoma laiku, KAA gali staigiai plyšti bei būti mirtina (7). KAA yra skirstoma į gana daug formų - sindromines (Marfano, Loeys–Dietz, Shprintzen–Goldberg, Ehlers–Danlos sindromai), šeimyninę nesindrominę ir atsitiktinę. Sindromines KAA formas sukelia skirtingos mutacijos, todėl tarpusavyje jos yra labai heterogeniškos. Iki šiol daugiausia tirtas Marfano sindromas (8). Tuo tarpu, mes tyrimams pasirinkome tik atsitiktinę KAA formą, kuri retai yra siejama su genų mutacijomis.

Atsitiktinės KAA susiformavimo priežastys nagrinėtos mažai. Vystymosi mechanizmo eksperimentai buvo atlikti naudojant kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių linijas arba pelės modelius, o tai tik dalinai atspindi tikruosius pokyčius susiformuojančius žmogaus audiniuose (9). Taigi, iki šiol turime mažai žinių, kodėl ir kaip atsitiktinė KAA išsivysto (10). miRNR raiška audiniuose ir kraujo plazmoje, susiformavus atsitiktinei KAA, buvo tirta tik tikro laiko PGR metodu ir miRNR gardelėmis (11-13). miRNR sekoskaitos tyrimai iki šiol nebuvo daryti, nors tik visumine sekoskaita gali būti

identifikuojamos naujos su kylančiosios aortos aneurizmos atsiradimu susietos miRNR. Nustatytos naujos cirkuliuojančios miRNR galėtų būti naudojamos kaip biožymenys šios ligos nustatymui, o identifikuoti miRNR pokyčiai KAA audiniuose leistų geriau suprasti šios ligos vystymosi mechanizmą.

Žinoma, kad miRNR gali bręsti net tik kanoniniu brendimo keliu, kuriame svarbų vaidmenį atlieka Drosha ir Dicer III tipo egz nukleazės, tačiau ir alternatyviais keliais, kai miRNR brendime nedalyvauja vienas iš šių baltymų. Nustatyta, kad dalis miRNR gali būti lokalizuotos segtuką formuojančiuose intronuose, vadinamuose mirtronuose. Mirtronus vietoj Drosha/DGRC8 komplekso kerpa splaisosoma. Tokios subrendusios miRNR vadinamos mirtroninėmis miRNR. Mirtronai gali būti skirstomi į keturius tipus - standartinius mirtronus, 5' tipo mirtronus, 3' tipo mirtronus ir 5' - 3' tipo mirtronus. Standartiniai mirtronai intronuose sudaro trumpus segtukus, 5' tipo mirtronai 5' gale turi nesuporuotas ilgą seką, 3' tipo mirtronai turi tokias sekas 3' gale. O 5' - 3' tipo mirtronuose segtukų nesudarančios sekos yra 5' ir 3' introno galuose. Nors bioinformatiškai žinduoliuose identifikuota beveik 1000 potencialių mirtroninių sekų (14), tačiau eksperimentiškai parodyta, kad tik dviejų žmogaus hsa-miR-877, hsa-miR-1226 ir vieno pelės mmu-miR-1224 mirtroninės miRNR, lokalizuotos standartiniuose mirtronuose, tikrai kerpa splaisosoma (15,16). Taip pat iki šiol tik nustatytas tik vienas atvejis kai drozofilos 3' tipo mirtroną dme-miR-1017 brendimo metu vietoj Drosha/DGRC8 kerpa splaisosoma (17). Taigi, iki šiol nėra aišku ar bioinformatiškai nustatytų tiek lokalizuotų standartiniuose, tiek lokalizuotų 5' ar 3' galuose intronuose, turinčiuose ilgą seką, mirtronų brendimas iš tikrųjų priklauso nuo splaisingo. Todėl norint įsitikinti, ar šias sekas tikrai kerpa splaisosoma, būtina tai patvirtinti eksperimentiškai. Taip pat nebuvo žinoma, kaip mirtroninių miRNR brendimą įtakoja splaisingą reguliuojantys veiksniai.

Nors mirtroninių miRNR brendimo kelias skiriasi nuo kanoninio, tačiau veikimo mechanizmas išlieka toks pats (18). Mirtroninių miRNR reikšmė biologiniuose procesuose buvo tirta mažai. Identifikuota keletas atvejų, kai tokios miRNR dalyvauja vėžinių procesų reguliacijoje (19,20), tačiau apie alternatyviu būdu splaisosomos iškerpamų mirtroninių miRNR raišką vėžinėse ląstelėse buvo žinoma nedaug.

Taigi, šio **darbo tikslas** buvo ištirti visuminius miRNR raiškos pokyčius krūtinės kylančiosios aortos audiniuose ir kraujo plazmoje, susiformavus aneurizmai, bei, patvirtinus mirtroninių miRNR brendimo priklausomybę nuo

splaisingo, nustatyti mirtroninių miRNR raiškos pokyčius virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose.

UŽDAVINIAI

1. Visumine sekoskaita identifikuoti miRNR raiškos pokyčius žmogaus aortos audiniuose ir kraujo plazmoje, susiformavus krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai, ir tikro laiko PGR metodu patvirtinti pasirinktų miRNR kiekio pokyčius didesnėje mėginių imtyje.
2. Bioinformatiškai nustatyti signalinį kelią, kurį įtakoja miRNR, kurių raiška pasikeitė žmogaus kylančiosios aortos aneurizmos audiniuose, lyginant su sveikais audiniais, iširti šio signalinio kelio pasirinktų genų ir baltymų raišką.
3. Eksperimentiškai patvirtinti žmogaus potencialių mirtroninių miRNR: penkių lokalizuotų standartiniuose mirtronuose miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, miR-1238-3p; dviejų lokalizuotų 5' tipo mirtronuose - miR-3064-3p, miR-6515-5p; dviejų lokalizuotų 3' tipo mirtronuose - miR-3940-5p, miR-6850-3p; priklausomybę nuo splaisingo proceso.
4. Nustatyti splaisingo veiksnių SRSF1 ir SRSF2 įtaką mirtroninių miRNR brendimui storosios žarnos HCT116 vėžinėse ląstelėse.
5. Identifikuoti mirtroninių miRNR raiškos pokyčius žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse bei navikuose.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šiame darbe pirmą kartą:

1. Visumine sekoskaita nustatyti ir tarpusavyje palyginti miRNR profilio pokyčiai žmogaus kylančiosios aortos audiniuose bei kraujo plazmoje, susiformavus krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai (KAA). Identifikuota, kad kraujo plazmos miRNR profilio pokyčiai, susiformavus KAA, nepriklauso nuo pasikeitusios miRNR raiškos KAA audiniuose.
2. Žmogaus KAA audiniuose nustatyta išaugusi TGF- β signalinio kelio receptoriaus *ALK1* geno raiška. Pirmą kartą nustatyta, kad tik dalyje - 27% kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių branduolių padidėja transkripcijos veiksnio KLF4 kiekis, kai sveikuose aortos audiniuose aukštas KLF4 raiškos lygis nustatomas tik 10% branduolių. Transkripcijos veiksnio KLF4 kiekio padidėjimas sukelia

kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių fenotipo pasikeitimą į sintetinį, ir tai gali būti viena iš priežasčių lemianti tokio tipo aneurizmos vystymąsi.

3. Nustatyta, kad lokalizuotų standartiniuose mirtronuose miR-1227-3p, miR-1229-3p ir miR-1236-3p brendimas priklauso nuo splaisingo ir šios naujai įrodytos miRNR priskirtos mirtroninių miRNR tipui.
4. Nustatyta, kad splaisingo veiksnys SRSF1 skatina mirtroninės miRNR miR-1229-3p, o SRSF2 - miR-1227-3p ir miR-1229-3p brendimą storosios žarnos HCT116 vėžinėse ląstelėse.
5. Identifikuota skirtinga mirtroninių miRNR raiška virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse, lyginant su su nevėžine HEK293A ląstelių linija, bei virškinimo sistemos navikuose, lyginant su sveikais audiniais. Taigi, vieni pirmųjų nustatėme, kad mirtroninės miRNR gali būti susijusios su vėžiniais procesais bei turi potencialą būti naudojamos kaip biožymenys vėžio diagnostikai.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. miRNR dalyvauja žmogaus krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos vystymesi. miRNR, kurių raiška pakinta, esant kylančiosios aortos aneurizmai, į kraujo plazmą patenka ne iš kylančiosios aortos aneurizmos audinio.
2. miRNR raiškos pokyčiai krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos audiniuose gali įtakoti TGF- β signalinio kelio pakitimus bei pasikeitusią dalies kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių diferenciacijos stadiją – dėl dalyje ląstelių išaugusio transkripcijos veiksnio KLF4 kiekio padaugėja ląstelių, pasižyminčių sintetiniu fenotipu.
3. Tik dalies bioinformatiškai nustatytų mirtronų brendimas priklauso nuo splaisingo.
4. Splaisingo veiksniai SRSF1 ir SRSF2 storosios žarnos HCT116 vėžinėse ląstelėse įtakoja mirtroninių miRNR brendimą.
5. Mirtroninės miRNR yra susijusios su vėžiniais procesais žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose.

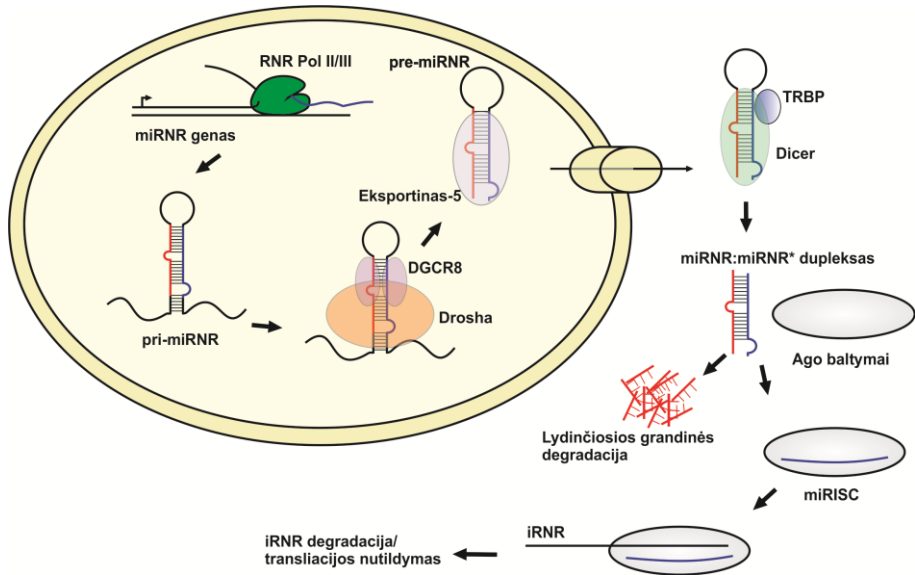
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 miRNR reikšmė, brendimas ir funkcijos

miRNR dalyvauja beveik visuose ląstelėje vykstančiuose procesuose tokiuose kaip vystymasis, ląstelių diferenciacija, ląstelių homeostazės palaikymas ir kiti (2). Šios trumposios RNR yra sutinkamos augaluose ir gyvūnuose (21). miRNR raiškos pokyčiai yra susiję su daugeliu neurologinių, širdies ir kitų organų ligų, taip pat vėžio vystymusi (22). Delecijos miRNR brendime dalyvaujančių RNR kerpančių baltymų - III tipo RNazių, atpažįstančių ir kerpančių dvigrandes RNR, *Dicer* arba *Drosha* genuose lemia pelės embrionių žūtį (23,24). Mirbase v22 duomenų bazėje yra paskelbta, kad žmogaus ląstelėse yra identifikuotos 1917 pre-miRNR ir 2654 iš jų subrendusių miRNR (1). Nustatyta, kad miRNR gali reguliuoti daugiau nei 60% ląstelėje esančių genų raišką (25). Taip pat identifikuota, kad miRNR yra specifiskai sintetinama audiniuose (26).

1.1.1 Kanoninis miRNR brendimo kelias gyvūnuose

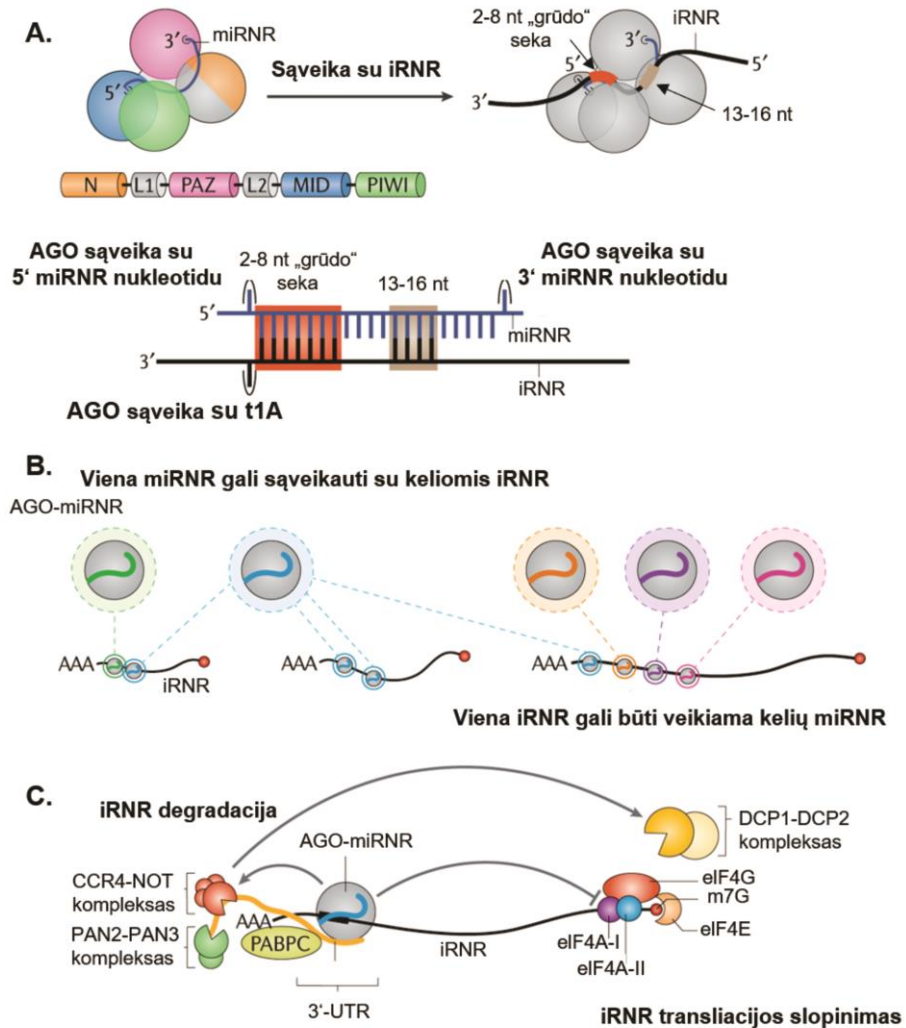
miRNR brendimas gyvūnuose ir augaluose yra skirtingas (21). Gyvūnuose pri-miRNR (angl. *primary miRNA*) nuo DNR yra nurašoma RNR polimerazės II (27). pri-miRNR gali kilti iš egzonų, intronų bei tarpgeninių sričių bei ilgų nekoduojančių RNR (1.1 pav.) ir gali būti sudaryta tik iš vienos miRNR arba iš klasterį sudarančių kelių miRNR (28). pri-miRNR branduolyje yra kerpama heterotrimerinio mikroprocesoriaus komplekso, sudaryto iš RNazės Drosha bei dviejų RNR surišančių DGCR8 baltymų. Drosha atpažįsta apatinę segtuko dalį, kur dvigrandė RNR pereina į viengrandę. DGCR8 jungiasi prie viršutinės segtuko dalies (29). Po kirpimo susiformavęs apie 70 nt ilgio pre-miRNR (angl. *precursor-miRNA*) segtukas jungiasi su eksportinu-5 ir yra transportuojamas per branduolio poras į citoplazmą. Kadangi užslopinus eksportiną-5, miRNR vis tiek patenka į citoplazmą, manoma, kad galimi kiti miRNR pamašos keliai (30). Citoplazmoje pre-miRNR sąveikauja su Dicer ir RNR surišančiais baltymais TRBP ir PACT. Dicer veikia kaip molekulinė liniuotė ir kerpa pre-miRNR, TRBP ir PACT baltymai šią saveiką stabilizuoja. Abi RNazės Drosha ir Dicer nepasizymi itin tiksliai kirpimu. Todėl subrendusios miRNR sekos tarpusavyje varijuoja ilgiu ir susiformuoja skirtingi izomirai (detalesiau aprašyta 1.1.3.2 skyriuje) (31,32). Nukreipiančioji miRNR grandinė jungiasi su Argonauto baltymais (AGO), suformuojamas genų raiškos slopinime dalyvaujantis miRISC kompleksas. Kita lydinčioji grandinė degraduojama (33). Iš 5' segtuko galo kylanti subrendusi miRNR žymima 5p, iš 3' segtuko galo - žymima 3p. Dažniausiai ląstelėje viena forma (5p arba 3p) yra paplitusi labiau nei kita (34).



1.1 pav. Kanoninis miRNR brendimo kelias. miRNR nuo DNR yra nurašoma RNR polimerazės II. pri-miRNR branduolyje yra kerpama mikroprocesoriaus komplekso, sudaryto iš RNazės Drosha ir RNR surišančio DGCR8 baltymo. Susiformavusi pre-miRNR kartu su eksportinu-5 ir yra pernešama į citoplazmą. Citoplazmoje RNazė Dicer sąveikauja su TRBP ir kerpa pre-miRNR. Nukreipiančioji miRNR grandinė jungiasi su Argonauto baltymais, suformuojamas miRISC kompleksas, kita lydinčioji grandinė dažnai yra degraduojama. miRISC kompleksas dalyvauja genų raiškos slopinime. Modifikuota pagal (34).

1.1.2 miRNR veikimo mechanizmas

Subrendusi miRNR veikia kartu su AGO baltymais. AGO baltymai sudaryti iš keturių pagrindinių domenų – N-galinio, PAZ, MID ir PIWI (1.2 pav. A). L1 linkerinė seka jungia N-galinį domeną su PAZ, L2 linkerinė seka - PAZ su MID. MID ir PIWI domenai suriša miRNR 5' galą, su 3' galu jungiasi PAZ (35). Žinduoliuose sutinkami keturi AGO baltymai – AGO1, AGO2, AGO3, AGO4. AGO2 baltymo kiekis ląstelėse yra didžiausias ir tik šis baltymas, esant pilnam taikinio komplementarumui, gali kirpti iRNR. Kiti AGO baltymai iRNR nekerpa (36). Dauguma miRNR gali jungtis su visais keturiais AGO baltymais, vis dėlto yra atvejų, kad jungiasi tik specifiskai su vienu AGO baltymu (37,38).



1.2 pav. miRNR veikimas. A) AGO baltymai sudaryti iš keturių domėnų – N-galinio, PAZ, MID, PIWI, ir dviejų linkerinių sekų L1 ir L2. miRNR taikiniai yra 3' iRNR gale, miRNR-iRNR sąveikai svarbi „grūdo“ seka, t1A nukleotidas bei papildoma sąveika tarp 13-16 nt; B) Viena miRNR gali veikti šimtus genų, taip pat vieną geną gali veikti kelios miRNR; C) AGO pritraukia GW182 baltymą, kuris sąveikauja su PABPC ir pritraukia adenilo grupę nukerpančią kompleksą PAN2-PAN3 bei CCR4-NOT kompleksą. DCP1-DCP2 kompleksas pašalina 5' „kepurę“ ir iRNR yra sukarpoma 5'-3' egzozukleazės XRN1. Jei miRNR-AGO slopina eIF4A-I arba eIF4A-II prisijungimą prie iRNR, yra slopinama transliacija. Modifikuota pagal (39).

miRNR taikiniai dažniausiai yra iRNR 3' baltymo nekoduojančiame rajone (3'UTR). Su iRNR sąveikauja pirmaisiais 2-8 nukleotidais, ši seka vadinama „grūdo“ seka (40) (1.2 pav. A). miRNR, turinčios panašias „grūdo“ sekas, sudaro šeimas (41). Stipriausia sąveika tarp miRNR ir iRNR vyksta tada, kai „grūdo“ sekos 2-8 nukleotidai komplementariai jungiasi su iRNR, bei iRNR pirmas nukleotidas (dar vadinamas t1A) prieš „grūdo“ seką yra adeninas. t1A nukleotidą atpažįsta Ago baltymai (42-44). Kai sąveika vyksta tarp 2-7 arba 3-8 nukleotidų, grandinės susiriša žymiai silpniau (43). Papildoma sąveika tarp 13-16 nukleotidų gali įtakoti iRNR atpažinimą ir miRNR, su tomis pačiomis „grūdo“ sekomis, nukreipti prie skirtingų iRNR (45). Viena miRNR gali veikti šimtus genų, tačiau tokiu atveju poveikis genų raiškai yra silpnas (46), taip pat vieną geną gali veikti kelios miRNR (1.2 pav. B) (47).

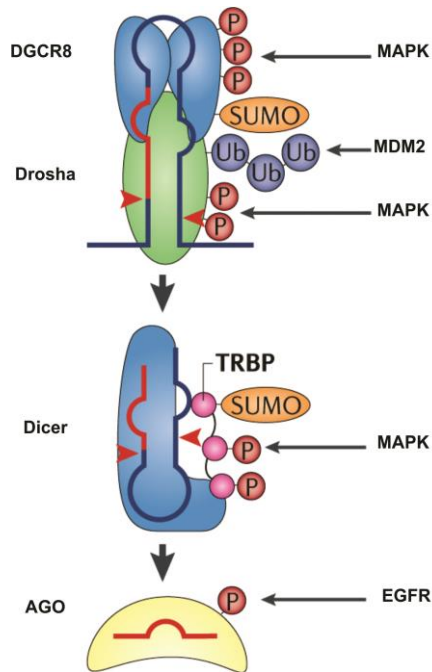
Kai miRNR-AGO kompleksas susiriša su iRNR, yra arba slopinama transliacija, arba skatinama iRNR degradacija. iRNR sukarpymas vyksta 66-90% atvejų (1.2 pav. C) (48). AGO pritraukia GW182 baltymą, kuris sąveikauja su adenilo grupę prijungiančiu baltymu PABPC, ko pasekoje prisijungia adenilo grupę karpantis PAN2-PAN3 bei transkripciją skatinantis CCR4-NOT kompleksai. Po adenilo grupės pašalinimo, prie iRNR jungiasi DCP1-DCP2, kuris nukerpa iRNR 5' „kepurę“. Toliau iRNR sukarto 5'-3' egzonukleazė XRN1 (49-52). Kai miRNR-AGO kompleksas sukelia transkripcijos iniciacijos faktorių eIF4A-I arba eIF4A-II disociaciją nuo iRNR - transliacija yra slopinama (53).

miRNR biogenezės kelio baltymų Drosha, DGCR8, Dicer ir AGO aktyvumas gali būti keičiamas prie jų prijungiant fosfato grupę, bei ubikvitino arba SUMO baltymus (1.3 pav).

Su miRNR brendimu yra glaudžiai susijęs MAPK signalinis kelias. MAPK signalo pasekoje yra stipriai fosforilinamas DGCR8, kas lemia sustiprėjusį mikroprocesoriaus, sudaryto iš Drosha bei DGCR8 baltymų, aktyvumą ir išaugusią miRNR raišką. Jei fosfato grupė yra prijungiama prie TRBP, sustiprėja Dicer-TRBP komplekso stabilumas ir taip pat yra aktyvinama miRNR raiška (54). Galima ir priešinga reguliacija - streso atveju MAPK aktyvina p38, kuris prijungia fosfato grupę prie DGCR8, todėl susilpnėja jo sąveika su Drosha ir tai lemia šio baltymo degradaciją bei ląstelių žūtį (55).

Taip pat fosfato grupė gali būti prijungiama ir prie AGO baltymų. Šiuo atveju dažniausiai yra modifikuojamos trys baltymo pozicijos: L2 linkerinė seka (Ser 387 ir Tyr 393), MID domeno (Tyr 529) ir PIWI (Ser 824, Ser 828, Thr 830, Ser 831 ir Ser 834). Jei fosfato grupė yra prijungiama L2

linkerinėje sekoje prie Tyr 393 - miRNR raiška gali būti slopinama. Nustatyta, kad esant hipoksijai ir sustiprėjus EGFR signaliniui keliui bei RAS aktyvumui yra fosforilinama Tyr 393 padėtis, kas lemia, kad AGO suriša žymiai mažiau miRNR (56). Priešingai, prijungiant fosfato grupę L2 linkerinėje sekoje prie Ser 387 padėties yra skatinamas miRISC komplekso susiformavimas (39).



1.3 pav. miRNR brendimo veiksnių modifikacijos. Prie Drosha, DGCR8, Dicer ir AGO baltymų gali būti prijungamos fosfato grupės, bei ubiquitino arba SUMO baltymai, taip aktyvinant arba slopinant miRNR brendimą. Su šių modifikacijų reguliacija yra susijęs MAPK ir EGFR signaliniai keliai. Taip pat svarbi ir ubiquitino ligazė MDM2, slopinanti p53 baltymą. Modifikuota pagal (57).

E3 ubiquitino ligazė MDM2 (slopinanti p53 baltymą) gali prie Drosha prijungti ubiquitiną ir lemti šio baltymo degradaciją (58). Jei ubiquitino baltymas yra prijungiamas prie AGO2 tai sukelia visų ląstelėje esančių miRNR raiškos sumažėjimą (59).

Taip pat prie DGRC8 gali būti prijungiamas SUMO baltymas. Tokiu atveju yra blokuojamas ubiquitino prijungimas ir kompleksas stabilizuojamas (60). Tačiau taip modifikuojamas AGO2 baltymas gali būti ir destabilizuojamas (61), ko pasekoje sustiprinamas iRNR tildymo efektyvumas (62).

1.2 miRNR raiškos reguliacija

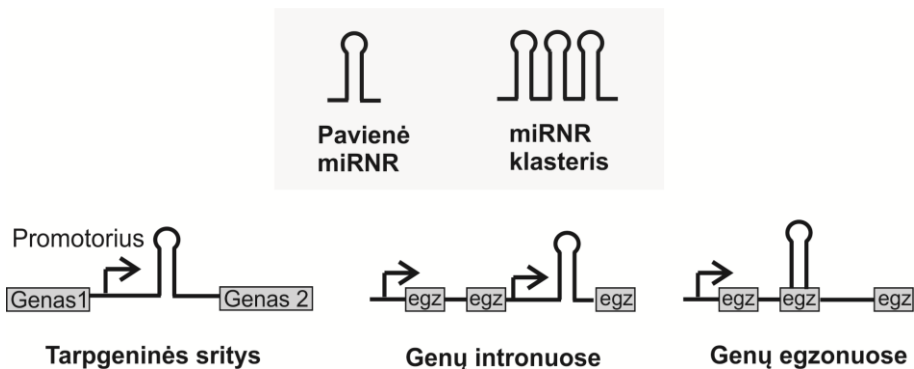
miRNR raiška pirmiausia yra reguliuojama transkripcijos lygmenyje. Taip pat gali būti redaguojamos miRNR sekos. Be to, miRNR gali būti laikinai „surišama“ konkuruojančių ilgųjų RNR (ceRNR), taip sumažinant laisvos miRNR, galinčios sąveikauti su komplemetaria iRNR, kiekį.

1.2.1 miRNR transkripcijos reguliacija

miRNR gali būti lokalizuota genų egzonuose, intronuose bei tarpgeninėse srityse (1.4 pav.). Jei miRNR yra randama geno egzone ar introne, dažniausiai miRNR transkripcija vyksta nuo geno, kuriame jos sutinkamos, promotoriaus. Visgi, miRNR, lokalizuotos geno intronuose, gali turėti ir savo atskirą promotorių ir jų raiška gali būti nepriklausoma nuo geno. Jei miRNR sutinkama tarpgeninėje sekoje, miRNR yra nurašoma nuo savo nepriklausomo promotoriaus (63). Ne visų miRNR genų promotorių vietos yra žinomos (34).

Nustatyta, kad skirtingų miRNR genai gali būti išsidėstę šalia vienas kito. Tokios miRNR sankaupos vadinamos miRNR klasteriais. Šiems klasteriams būdinga tai, kad jie yra kartu nurašomi nuo vieno promotoriaus, visgi vėliau kiekviena miRNR gali būti reguliuojama skirtingai ir veikti kartu arba atskirai (64,65).

Taip pat miRNR raiška gali būti reguliuojama epigenetiškai - keičiant DNR metilinimą (66) ar histonų modifikacijas (67).



1.4 pav. miRNR lokalizacija. miRNR gali būti lokalizuota tarpgeninėse srityse, genų egzonuose bei intronuose. Jei miRNR genai išsidėsto šalia vienas kito suformuojami miRNR klasteriai.

1.2.2 miRNR sekų redagavimas

miRNR seka 5' ar 3' gale gali būti redaguojama dėl netikslaus Drosha arba Dicer kirpimo, egzonukleazių, nukleotidų transferazių veikimo. Taip pat miRNR seka gali keistis veikiant adenozino deaminazei (angl., *double-stranded RNA-specific adenosine*, ADAR) (32).

Subrendusi miRNR gali skirtis ilgiu arba/ir seka, ir tokios miRNR vadinamos izomirais. Izomirai yra skirstomi į 5' izomirus, 3' izomirus arba vidinius izomirus. Kai papildomi nukleotidai identifikuojami 5' miRNR gale, sutinkami 5' izomirai, kai 3' gale - 3' izomirai. Jei miRNR nukleotidai yra pakeičiami sekos viduryje - susiformuoja vidiniai izomirai (32). Dažniausiai ląstelėse yra sutinkami 3' izomirai. Su iRNR miRNR sąveikauja 5' gale esančiais nukleotidais, todėl tikėtina, kad 3' izomirai negali veikti skirtingų iRNR, tačiau tarpusavyje skiriasi savo stabilumu ir aktyvumu. Parodyta, kad 21 nt ilgio miR-122-5p 3' izomiras silpniau rišasi su hepatito C viruso RNR nei ilgesni 3' izomirai (68).

Iš viso žmoguje yra nustatyta 12 nukleotidų transferazių, iš jų septynios yra susijusios su miRNR 3' galo modifikacijomis. Dažniausiai prie miRNR yra jungiamos uridilo ir adenilo grupės. Šios modifikacijos vyksta specifiskai ir priklauso nuo audinio, ląstelių tipo, vystymosi stadijos ir ligų (69). Nustatyta, kad kepenų ląstelėse GLD2 prie 3' galo prijungdamas adenilo grupę stabilizuoja miR-122-5p (70). Uridilo grupę prie miRNR prijungia uridililtransferazės, TUT7, TUT4 ir TUT1. Įvykus šiai modifikacijai, priešingai, nei prijungus adenilo grupę, miRNR gali būti degraduojama. Nustatyta, kad TUT4 prijungus uridilą prie miR-26b-5p adenokarcinomos ląstelėse, IL-6 iRNR, su kuria ši miRNR sąveikauja, kiekis išauga. Nukleazė, kuri šiuo atveju karpą miRNR nėra žinoma (71). Drozofiloje yra nustatyta Nibbler 3'-5' egzonukleazė, kuri sąveikaudama su AGO, kerpa nukleotidus 3' miRNR gale (72). *Neurospora crassa* grybuose rastos dvi šio tipo nukleazės – RNR egzosoma bei QIP (73). Žinduoliuose iki šiol nėra rasta šių egzonukleazių homologų (39).

Kai papildomi nukleotidai pridedami 5' gale, įvyksta „grūdo“ sekos pasikeitimas, ir tai gali turėti dramatišką reikšmę genų reguliacijoje. Nustatyta, kad miR-133a-3p ir miR-133a-3p 5' gale turintis uracilą izomiras veikia skirtingas iRNR kardiomiocituose (74). Priešingai 3' izomirams, kurie nėra specifiski ląstelių tipui, 5' izomirai yra specifiskai sintetinami ląstelėse (75,76).

Taip pat pri-miRNR dažnai sąveikauja su ADAR, kuri adenoziną verčia inozinu. Inozinas splaisingo ar iRNR transliacijos metu yra

atpažįstamas kaip guanozinas ir taip suformuojami vidiniai izomirai. ADAR redaguoja net 16% miRNR žmogaus smegenų ląstelėse (77). miR-376 yra redaguojama visada, nes dėl to keičiasi „grūdo“ seka (78).

1.2.3 Reguliacija „surišant“ miRNR

Konkuruojančios RNR (ceRNR, angl. *competing endogenous RNAs*) – tai tokios RNR, kurios gali laikinai „surišti“ miRNR ir sumažinti laisvos miRNR, galinčios sąveikauti su komplementaria iRNR, kiekį. ceRNR gali būti ilgos nekoduojančios RNR, žiedinės RNR, pseudogenai bei iRNR. Vis dėlto ši konkuruojančių RNR hipotezė iki šiol išlieka ginčytina ir daugėja ją paneigiančių tyrimų. Dažnai pakėlus ceRNR kiekį ląstelėse, iRNR kiekis, su kuria sąveikauja miRNR, sumažėja silpnai (79,80). Taip pat identifikuota, kad tam, kad ceRNR veiktų, reikia žymiai didesnės ceRNR koncentracijos nei sutinkama ląstelėse (79,81).

Buvo identifikuota, kad žiedinė RNR CDR1 kaip kempinė gali surišti miR-7-5p. HEK293 ląstelėse identifikuota, kad išveiklinus *CDR1* geną, geno *FOS* iRNR kiekis, su kuria sąveikauja miR-7-5p, raiška sumažėja. Taip pat pelės smegenų audiniuose nustatyta tarpusavyje persidengianti CDR1 ir miR-7-5p raiška (82,83). Tačiau, išveiklinus CDR1 geną pelėse, priešingai nei ląstelių linijoje, sumažėjo miR-7-5p raiška, o geno *FOS* iRNR – išaugo. Taip pat buvo pažeistos pelės smegenų funkcijos. Manoma, kad CDR1 stabilizuoja miR-7-5p, ir tokiu būdu yra būtina normaliai smegenų veiklai (84).

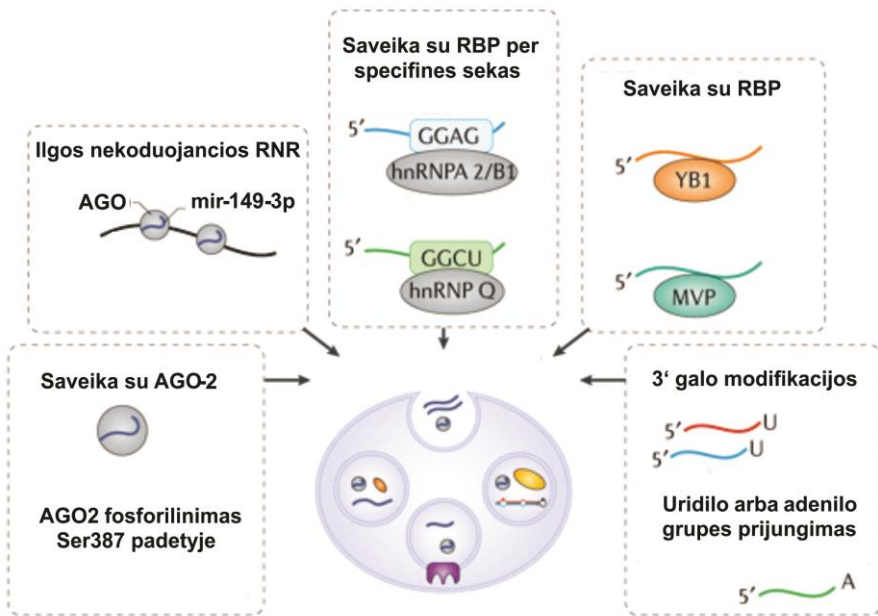
1.3 Cirkuliuojančios miRNR

miRNR patenka į visus kūno skysčius ir juose išlieka stabilios. Cirkuliuojančios miRNR buvo identifikuotos kraujo plazmoje (85), serume (86), seilėse (87), šlapime (88), motinos piene (89). Tokios miRNR kūno skysčiuose sutinkamos apgaubtos mikropūslelėmis (90), apoptotiniuose kūneliuose (91), egzosomose (92) arba susirišusios su AGO bei su RNR sąveikaujančiais RNP baltymais ir nėra susijusios su membraninėmis struktūromis. AGO baltymai pasižymi dideliu atsparumu nukleazėms, todėl apsaugo užląstelinę miRNR (93). Manoma, kad daug cirkuliuojančių miRNR gali būti nesusirišusios nei su baltymais, nei su pūslelėmis, tačiau tokios miRNR yra labai nestabilios ir greitai degraduojamos nukleazių. Taip pat maža dalis tokių laisvų miRNR gali susirišti su didelio tankio lipoproteinais (94).

Nustatyta, kad cirkuliuojančių miRNR profiliai plazmoje ir serume skiriasi (95,96). Nėra aišku, ar tie skirtumai kyla dėl skirtingų serumo ir

plazmos savybių, ar RNR gryninimo būdų. Visgi, gali būti, kad dalis miRNR į serumą patenka trombocitų krešėjimo metu, ir tai lemia plazmos bei serumo cirkuliuojančių miRNR skirtumus (97,98).

Šiuo metu vyrauja dvi hipotezės, kodėl miRNR patenka į kūno skysčius. Manoma, kad miRNR gali veikti kaip ląstelių tarpusavio signalas, arba kad tokia miRNR tiesiog yra “šalutinis“ ląstelių produktas ir į užląstelinę erdvę patenka tiesiog suyrant ląstelėms. Abi teorijos yra pagrindžiamos eksperimentais ir tikėtina, kad abu atvejai yra teisingi. Yra nustatyta, kad cirkuliuojanti miRNR gali turėti itin svarbią reikšmę signalo perdavime (99). Identifikuota, kad miR-105-5p yra sekretuojama vėžinių ląstelių ir patekusi į kraujagyslių endotelio ląsteles, slopina glaudžiųjų jungčių formavimąsi ir taip palengvina vėžinių ląstelių migraciją (100). MiR-126-3p apoptotiniuose kūneliuose patekusi į kraujagyslių ląsteles slopina chemokino CXCL12 raišką, taip stabdydama aterosklerozės progresavimą (91). Yra daugybė kitų panašių pavyzdžių (101,102).



1.5 pav. miRNR patekimo į egzomas mechanizmai. Į egzomas miRNR gali nukreipti ilgos nekoduojančios RNR bei specifiskai ir nespecifiskai su miRNR sąveikaujantys su ribosomomis susirišantys baltymai RBP. Taip pat patekimui į pūsles turi įtakos 3' galo modifikacijos bei AGO2 fosforilinimas. Modifikuota pagal (39).

miRNR esančios pūslelėse gali skirtis nuo esančių ląstelių citoplazmoje (92,103). Kaip miRNR yra specifiskai ir tikslingai atrenkama bei patenka į užląstelinę ertmę nėra žinoma. Identifikuota, kad vėžinėse prostatos ląstelėse ilgosios nekoduojančios RNR gali surišti miRNR ir taip nukreipti miRNR į egzosomas (104) (1.5 pav.). Nustatyta, kad pūslelėse esantys su ribosomomis susirišantys baltymai RBP gali specifiskai sąveikauti su miRNR 3' gale esančiomis sekomis (105,106). Taip pat, nors specifinių sąveikos sekų ir nėra nustatoma, RBP baltymai YB1 arba MVP gali nukreipti miRNR į egzosomas (107,108). Parodyta, kad miRNR 3' gale esančios modifikacijos gali lemti šį paskirstymą. Prijungta uridilo grupė skatina miRNR patekimą į pūsleles, adenilo grupė – slopina (109). Taip pat, identifikuota, kad dėl MAPK signalinio kelio sukkelto AGO2 fosforilinimo Ser 387 padėtyje yra slopinamas miRNR patekimas į egzosomas (110).

1.4 Nekanoniniai miRNR brendimo keliai

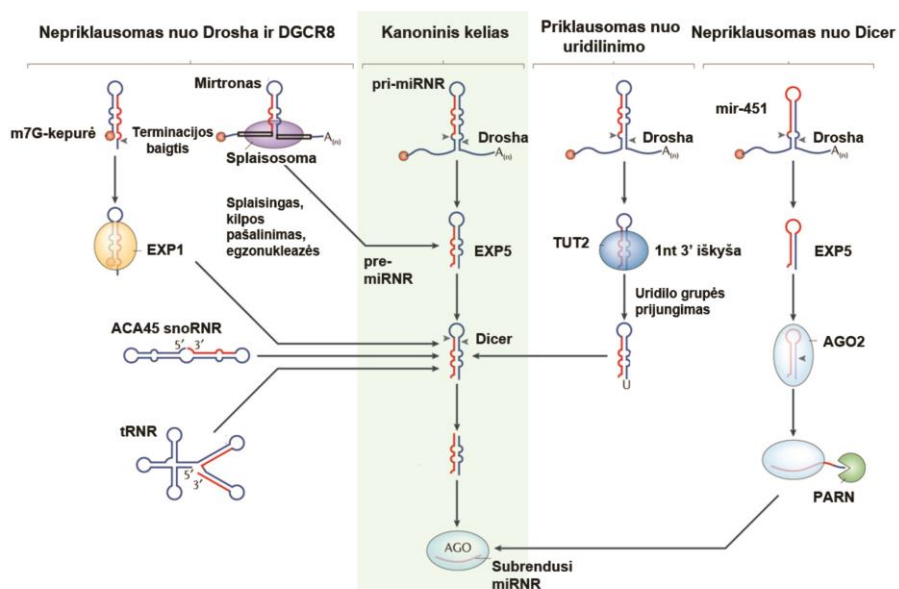
Kanoniniame miRNR brendimo kelyje svarbų vaidmenį atlieka Drosha ir Dicer baltymai, tačiau yra ir alternatyvių miRNR biogenezės kelių, kuriuose gali nedalyvauti bent viena iš šių RNazių (1.6 pav).

1.4.1 Nuo Dicer nepriklausomas brendimas

Nuo Dicer nepriklausomas miRNR brendimo kelias yra labai retas. Identifikuota, kad eritrocitams specifinės pre-miR-451 segtukas yra trumpesnis nei įprastai (17 bp vietoj 22 bp), dėl to jos negali kirpti Dicer. Pre-miR-451 sąveikauja su AGO2 baltymu, kuris kerpa segtuką ir 3p grandinę. Ribonuklezė PARN nukerpa likusios 5p grandinės 3' galinius nukleotidus ir suformuojama subrendusi 23 nt ilgio miR-451. Taip pat, nustatyta, kad ir nedalyvaujant PARN, susidariusi 30 nt ilgio miR-451 yra aktyvi (111,112). Kita eritrocitų miRNR miR-486 yra kerpama Dicer ir AGO2. AGO2 pašalina lydinčiąją miRNR grandinę (113).

1.4.2 Nuo uridilo grupės prijungimo priklausomas brendimas

Jei pre-miRNR 3' gale turi tik 1 nt iškyšą (II tipo pre-miRNR, let-7, miR-105 ir kt.), vietoj standartinės 2 nt iškyšos (I tipo pre-miRNR), prie trumpesnės pre-miRNR TUT2, TUT4 ar TUT7 fermentai prijungia uridilo grupę. Ši modifikacija yra reikalinga Dicer kirpimui (114,115).



1.6 pav. Nekanoniniai miRNR brendimo keliai. miRNR gali bręsti nuo Dicer (miR-451) arba Drosha/DGCR8 nepriklausomu keliu (mirtroninės miRNR bei miRNR kilusios iš snoRNR ir tRNR). Taip pat, jei miRNR turi tik 1 nt iškyšą, vietoj standartinės 2 nt, sutinkamas nuo uridilino priklausomas brendimo kelias. Modifikuota pagal (34).

1.4.3 Nuo Drosha ir DGCR8 nepriklausoma miRNR biogenezė

1.4.3.1 miRNR kilusios iš mažųjų branduolėlio arba transportinių RNR

miRNR nepriklausomai nuo Drosha ir DGCR8 gali kilti iš mažųjų branduolėlio RNR (angl., *small nucleolar RNA*, snoRNR), transportinių RNR (tRNR) bei per anksti įvykus transkripcijos terminacijai iš iRNR (angl., *endogenous-shorthairpin RNA*, endo-shRNR) (1.6 pav).

snoRNR antrinę struktūrą sudaro du tarpusavyje sujungti į pre-miRNR panašūs sektukai (Ender et al., 2008). Pirmoji miRNR susiformuojanti iš snoRNR buvo nustatyta gana seniai ir pavadinta ACA45. Manoma, kad maža dalis ACA45 iš branduolio pernešama į citoplazmą, kur ją iškart kerpa Dicer, kad susidarytų subrendusios miRNR dupleksas (116). Vėliau buvo atrasta daugiau iš snoRNR kylančių miRNR, tarp kurių yra anksčiau kanoninėmis miRNR laikytos miR-664 (kyla iš ACA36b), miR-1248 (kyla iš HBI-61), miR-1291 (kyla iš ACA34) (117). Toliau tęsiant tyrimus identifikuota, kad iš snoRNR 3' galo gali susiformuoti 20-24 nt ilgio trumposios RNR, o iš 5' galo - kilti 17-19 nt ir ilgesnės nei 27 nt RNR. Nėra aišku, kaip veikia šios

trumposios RNR, nes dauguma tokių RNR nesąveikauja su AGO baltymais (118). Visgi, nustatyta, kad trumpoji RNR kilusi iš snoRNR-93 veikia kaip miRNR ir slopina geno *PIPOX* raišką, taip skatindama krūties vėžinių ląstelių invazyvumą (119).

Į miRNR panašios sekos taip pat gali kilti iš transportinių RNR. Nors tRNR skaidymas į trumpesnius fragmentus yra konservatyvus tarp rūšių (120), visgi, tikslus mechanizmas, kaip tRNR pakeičia savo struktūrą ir ją kerpa Dicer nėra žinomas. Tam, kad susiformuotų teisinga dobilo lapo struktūra tRNR sąveikauja su La šaperonu. Jei šio šaperono nėra, susidaro struktūra, kurią gali kirpti Dicer ir susiformuoja į miRNR panašios sekos (angl., *tRNA-derived fragments*, tRFs). Taigi šaperonas La reguliuoja pusiausvyrą tarp dviejų tRNR erdvinių formų (121,122). Identifikuota, kad tRFs gali sąveikauti su Ago baltymais (38,123,124). Kokius taikinius šios sekos reguliuoja ir ar tikrai reguliuoja, informacijos nėra daug ir ji yra prieštaringa. Visgi, nustatyta, kad seka CU1276, kilusi iš gliciną pernašančios tRNR, B ląstelių limfomoje gali slopinti *RPA1* geno raišką bei reguliuoti atsaką į DNR pažeidimus (125).

Taip pat miRNR gali subręsti ir kai transkripcijos metu dėl per anksti įvykusios terminacijos suformuojama segtuko struktūra (endo-shRNR). 5' gale prie iRNR yra prijungiamas m7G „kepurė“, kuri padeda susirišti su eksportinu-1 ir patekti į citoplazmą. Segtuko struktūras atpažįsta Dicer, o m7G „kepurė“ neleidžia 5p grandinei patekti į RISC kompleksą, todėl nukreipiančiąja miRNR šiuo atveju visada tampa 3p grandinė (126).

1.4.3.2 miRNR, kilusių iš intronų, brendimas

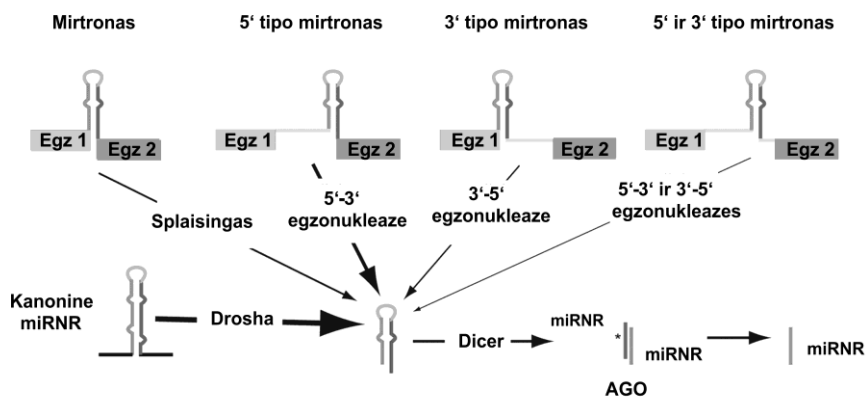
miRNR gali būti lokalizuotos segtuką formuojančiuose genų intronuose iš kurių gali kilti mirtroninės miRNR, simtroninės miRNR, agotronai, taip pat miRNR, kurių brendime gali dalyvauti kanoninio ir nekanoninio kelio baltymai ir jos nėra priskirtos vienai grupei.

Mirtronus brendimo metu vietoj Drosha/DGRC8 kerpa splaisosoma (1.7 pav.). Tokios subrendusios miRNR pavadintos mirtroninėmis miRNR. Splaisosomos komponentai prisijungia intronų ir egzonų sandūros vietose, iškerpa intronus ir sujungia egzonus, kad susiformuotų subrendusi iRNR. Iškirpti mirtronai, sudaro kilpas, kurios yra pašalinamos kilpos genėjimo (Ldbr) fermento vykstant 2'-5' fosfodiesterinio jungties hidrolizei (18).

Mirtronai yra randami *A. thaliana*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, pelėse ir žmoguje (18,127-129). Taip pat gali būti aptinkami ne tik trumpuose, bet ir ilgesniuose intronuose. Mirtronai pagal lokalizaciją yra skirstomi į keturius tipus: standartinius mirtronus, 5' tipo mirtronus, 3' tipo mirtronus ir

5' – 3' tipo mirtronus. Standartiniai mirtronai formuoja trumpus segtukus, 5' tipo mirtronai 5' gale turi ilgas segtukų neformuojančias sekas intronuose, 3' tipo mirtronai turi tokias sekas 3' gale, 5' – 3' tipo mirtronuose ilgos segtukų neformuojančios sekos yra abiejuose 5' ir 3' introno galuose (1.6 pav.). 3' gale esančias sekas brendimo metu nukerpa egzozomos kompleksas. Kaip yra pašalinamos sekos 5' gale nėra žinoma (17). Mirtronų turinčių sekas 5' gale yra žymiai daugiau nei turinčių 3' gale (130).

Šiuo metu identifikuota šimtai mirtronų, iš kurių manoma gali kilti miRNR (14). Žmoguje identifikuota 585 mirtronai, iš kurių kyla 1136 potencialios mirtroninės miRNR (131). Nors kelios miRNR kilusios iš mirtronų sekų yra konservatyvios (128), tačiau dauguma neturi konservatyvumo tarp rūšių. Tarp nustatytų 500 mirtronų pelėse ir žmoguje, tik keli procentai buvo sutinkami abiejuose žinduoliuose (14).



1.7 pav. Mirtronų tipai. Mirtronai gali būti aptinkami ne tik trumpuose, bet ir ilgesniuose intronuose, kai 5' ar/ir 3' gale yra segtukų neformuojančios sekos. 3' gale esančias sekas brendimo metu nukerpa egzozomos kompleksas. Kaip yra pašalinamos sekos 5' gale nėra žinoma. Rodyklių storis nurodo kiekvienu keliu subręstančių pre-miRNR kiekį. Modifikuota pagal (14).

Lyginant su kanoniniu keliu bręstančiomis pre-miRNR, iš mirtronų susiformavę pre-miRNR segtukai dažniausiai yra ilgesni, formuoja daugiau kilpų ir „pūpsnių“ (132), sekos pasižymi didesniu GC nukleotidų kiekiu miRNR dupleksų vietose. Taip pat tokios miRNR nuo kanoniniu keliu subrędusių miRNR skiriasi 5' ir 3' iškyšomis. Dėl Drosha kirpimo susiformuoja 2 nt AG iškyša 3' segtuko gale, ši iškyša yra optimali tam, kad miRNR jungtųsi su eksportinu-5 ir būtų pernešama į citoplazmą. Mirtroninių miRNR atveju po splaisingo dažnai sutinkamos 1 nt ir/arba 2 nt iškyšos 5' ir 3' galuose (133). Taip pat randamos ir 2 ir 3 nt, bei 0 ir 3 nt iškyšų variacijos

(134). Dažnai prie 3p grandinės yra prijungiama uridilo grupė, o 5p grandinės sekos dėl egz nukleazijų veiklos yra heterogeniškos (132). Drozofiloje mirtroninės miRNR dažniausiai kyla iš 3' segtuko galo (18), žinduoliuose tokia miRNR gali kilti iš abiejų 5' ir 3' segtuko galų (16). Visgi, iki šiol dar tikslinamos mirtronų sekų savybės ir bendro susitarimo dėl reikalavimų struktūrai nėra (14,133,135).

Dauguma mirtronų yra identifikuoti tik bioinformatiškai analizuojant miRNR sekoskaitos duomenis. Tik trijų hsa-miR-877, hsa-miR-1226 ir mmu-miR-1224 žinduolių mirtroninių miRNR priklausomybė nuo splaisingo įrodyta eksperimentiškai (15,16). Drozofiloje identifikuota, kad 3' tipo mirtronas dme-miR-1017 priklauso nuo splaisingo (17).

Nustatyta, kad laikytos mirtroninės miRNR hsa-miR-1225, hsa-miR-1228 ir hsa-miR-1233 brendimas gali nepriklausyti nuo splaisingo proceso (16,136). Jei splaisingas yra užblokuojamas hsa-miR-1225 ir hsa-miR-1228 brendime gali dalyvauti ir Drosha, tačiau biogeneze yra nepriklausoma nuo Dicer, AGO2 ir eksportino-5. Visgi, šios miRNR sąveikauja su AGO1-4 baltymais ir pasižymi iRNR tildymu. Šios miRNR pavadintos simtroninėmis miRNR ir tikėtina tokių miRNR brendimas gali vykti ir nuo splaisingo priklausomu ir nepriklausomu keliu (136).

Taip pat identifikuoti agotronai, intronai, kurie yra iškerpami splaisosomos, tačiau brendimas nėra priklausomas nuo Dicer, kaip mirtronų, ir citoplazmoje su AGO baltymais rišasi pilno ilgio intronas (apie 100 nt), o ne trumpa miRNR. Kaip tiksliai agotronai veikia nėra žinoma, tačiau sekos yra labai konservatyvios tarp žinduolių. Nustatyta, kad agotronai gali veikti kaip miRNR ir slopinti iRNR (137), visgi, nėra tikėtina, kad slopinimas vyksta fiziologinėmis sąlygomis. Didžiausia tikimybė, kad agotronai stabilizuoja ir apsaugo AGO baltymus nuo degradacijos. Agotronams sąveikaujant su AGO baltymais, AGO nebesuriša atsitiktinių RNR. Kadangi šie baltymai be miRNR yra labai nestabilūs, gali būti, kad sąveika su agotronais apsaugo nuo degradacijos ir taip ląstelėje yra palaikomas reikalingas kiekis AGO baltymų (137,138). Manoma, simtrone miRNR laikoma miR-1225 iš tikrųjų gali veikti kaip konservatyvus agotronas PDK1. Taip pat pasiūlyta, kad mirtroninė miR-1236 irgi gali veikti kaip agotronas RDBP. Agotronų atradimas pabrėžė tai, kad tiriant miRNR būtina detektuoti ir įvertinti ne tik subrendusių miRNR formą, bet ir jos pirmtakus.

Taip pat nustatytos miRNR, kylančios iš 50-200 nt ilgio segtuko formos struktūrą formuojančių trumpų intronų, kurie yra iškerpami alternatyvaus splaisingo metu (139). Alternatyvaus splaisingo metu tokio introno išlaikymas/iškirpimas skirtingose ląstelės diferenciacijos stadijose gali lemti

tai ar miRNR kiekis ląstelėje padidės ar sumažės. Tiriant tokių miRNR priklausomybę nuo Drosha, DGCR8, Dicer, AGO2, genėjimo fermento DBR1 bei splaisinge dalyvaujančių snRNP70, PRP8, U2AF65 baltymų, nustatyta, kad iš tokių intronų miRNR gali kilti kanoniniu bei alternatyviu mirtronų ar simtronų brendimo keliu. Tačiau taip pat identifikuota, kad dalis tokių miRNR kyla ir nuo Drosha/DGCR8, ir nuo splaisingo baltymų bei DBR1 priklausomu keliu. Taip pat nustatyta keletas miRNR kurių brendimas priklauso nuo Dicer ir AGO2, tačiau nepriklauso nuo likusių biogenezėje dalyvaujančių baltymų. Šie duomenys rodo, kad kanoninis ir alternatyvūs brendimo keliai tarpusavyje yra stipriai susiję nei buvo manoma, ir tikėtina ta pati miRNR gali bręsti skirtingais būdais (139).

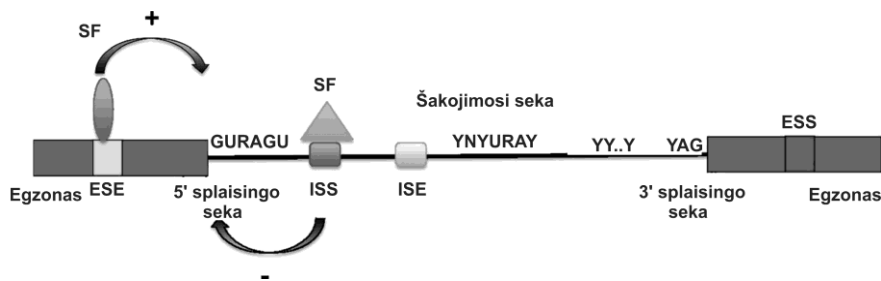
1.5 Molekulinis RNR splaisingo mechanizmas

1.5.1 Splaisingo mechanizmas

Splaisingo procesas gali įtakoti miRNR brendimą (140). Splaisingas – tai dviejų pakopų transesterifikacijos reakcija, kurios metu iš pre-iRNR yra iškerpami intronai. Šis procesas vyksta susiformavus splaisosomai – 3 MDa dydžio makromolekulių kompleksui, sudarytam iš penkių snRNP kompleksų (mažosios branduolio RNR U1, U2, U4/U6 bei U5 ir prie jų prisijungę snRNP baltymai) ir daugiau nei 100 su jais sąveikaujančių specifinių baltymų (141). Splaisosomos kompleksas formuojasi egzono-introno ribose – 5'- splaisingo vietoje, šakojimo taške, bei 3'- splaisingo vietoje (1.8 pav.). 5'- splaisingo seka yra vadinama donorine seka, GU(G/A)AGU, ją atpažįsta U1 snRNP. 3'- splaisingo seka vadinama akceptorine ir pasižymi pirimidiniais gausia seka (Y)_n(C/U)AG introno 3'-gale. Taip pat svarbi šakojimosi vieta, esanti 15-50 nt nutolusi nuo 3' introno galo ir turinti pirmai transesterifikacijos reakcijai reikalingą adenziną. U2 snRNP atpažįsta šakojimosi seką, U2AF35 bei U2AF65 splaisingo veiksniai - 3'- splaisingo seką (142,143). Donorinės sekos 5' introno pradžioje sutinkami GU nukleotidai, bei akceptorinės sekos 3' gale esantys AG nukleotidai yra stipriai konservatyvūs ir mutacijos juose slopina splaisingą. Visgi stiprios sekų homologijos egzono-introno ribose nėra, gausu nukleotidų variacijų. Mažiau nei 5% 5'-gale esančių sekų identiškai persidengia su donorine seka, o 25% - kai sekoje yra su 2-3 nukleotidų neatitikimais (144).

Splaisingui vykti, be 5' ir 3'- splaisingo ir šakojimo sekų, taip pat svarbios ir kitos alternatyvios specifinės sekos egzonuose ir intronuose, su kuriomis sąveikauja pagalbiniai splaisingo regulatoriai/veiksniai. Šios specifinės sekos gali būti skirstomos - ESE (egzoninis splaisingo enhanseris),

ISE (introninis splaisingo enhanceris), ESS (egzoninis splaisingo slopiklis) ir ISS (introninis splaisingo slopiklis) (1.8 pav.).



1.8 pav. Specifinės splaisingo sekos ir reguliacija. Splaisosomos kompleksas formuojasi egzono-introno ribose – sąveika vyksta su donorine 5'- splaisingo, šakojimosi, bei akceptorine 3' – splaisingo seka. Splaisingui taip pat svarbios ir kitos specifinės sekos egzonuose ir intronuose, su kuriomis sąveikauja pagalbiniai splaisingo veiksniai (SF). Priklausomai nuo sekos ir jos lokalizacijos splaisingas gali būti aktyvinamas (+) arba slopinamas (-). ESE - egzoninis splaisingo enhanseris; ISE - introninis splaisingo enhanceris; ESS - egzoninis splaisingo slopiklis; ISS - introninis splaisingo slopiklis; R – purinai A arba G, Y - pyrimidiniai C ir U. Modifikuota pagal (143).

Splaisingo veiksnių sąveika su šiomis sekomis yra silpnesnė nei sąveika su pagrindinėmis splaisingo sekomis ir jei sąveika įvyksta - gali vykti alternatyvus splaisingas. Jei alternatyvios sekos sutinkamos egzone, dalis egzono gali būti priskirta intronui. Jei 3'-splaisingo vieta nėra atpažįstama, splaisosoma sąveikauja su kita artimiausia 3'-splaisingo vieta, ir tai lemia, kad egzonas yra iškerpamas kaip intronas. Taip pat, jei 5'-splaisingo vieta nėra atpažįstama - intronas gali būti neiškerpamas (141). Identifikuota, kad alternatyvus splaisingas gali vykti beveik 95% atvejų. Iš iRNR subręsta skirtingos iRNR izoformos, besiskiriančios stabilumu bei lemiančios skirtingą baltymo funkcionalumą (145). Taigi, iš maždaug 24000 genų, koduojančių baltymus, subręsta apie 100000 skirtingų baltymų (146).

1.5.2 Splaisingo veiksniai

Dažniausiai sutinkamos dvi splaisingą reguliuojančių veiksnių klasės – serinu ir argininu turtingi SR ir heterogeniški branduolio hnRNP baltymai.

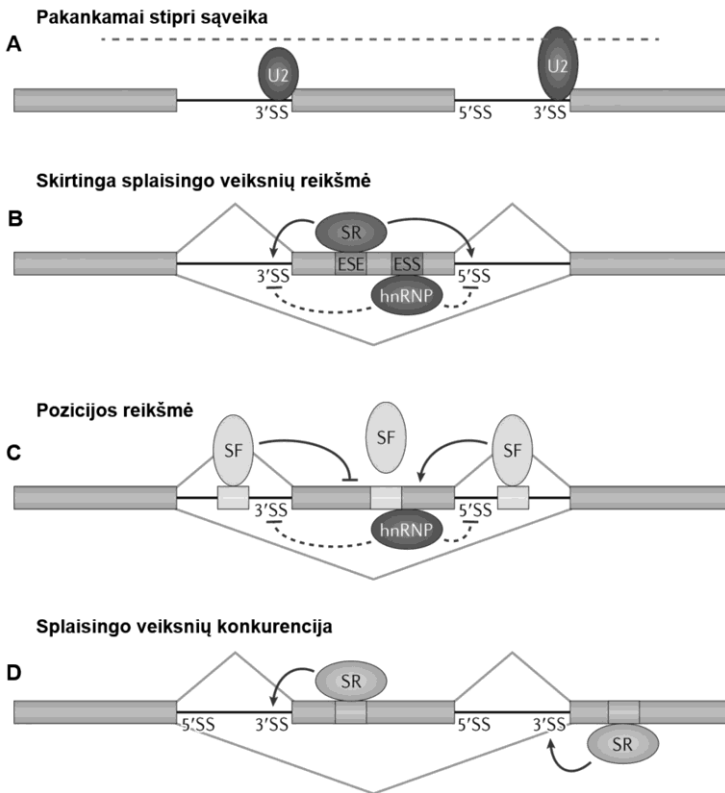
SR baltymai yra svarbiausi splaisingo proceso reguliatoriai. Iš viso yra 12 SR baltymų tipų žinduoliuose (žymimi SRSF 1-12). SR baltymai tarpusavyje yra panašūs savo struktūra. N-gale esančiu RNR atpažinimo domenu SR baltymai sąveikauja su RNR, C-gale esančiu argininu ir serinu turtingu domenu - su įvairiais baltymais ar RNR (147). Splaisingo metu SR baltymai yra fosforilinami ir lemia U1 snRNP sąveiką su 5' donorine seka.

Taip suformuojama splaisosoma ir iškerpami intronai. Dauguma SR baltymų yra branduolyje, bei kai kurie (SRSF1, SRSF3 ir SRSF7) sutinkami ir branduolyje, ir citoplazmoje (148).

hnRNP splaisingo veiksniai skirstomi į pagrindinius ir nepagrindinius hnRNP baltymus. Pagrindiniai hnRNP baltymai identifikuojami abecelės tvarka nuo A1 iki U. Nepagrindinių hnRNP baltymų kiekis ląstelėje nedidelis, šie baltymai patys nesuriša RNR, tačiau dalyvauja pagrindinių hnRNP reguliacijoje (149). Pagal RNR surišantį domeną hnRNP baltymai skirstomi į turinčius RRM (4 β -lakštai ir dvi α -spiralės ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$)) domeną); turinčius RGG (Arg-Gly-Gly) domeną; turinčius KH domeną (trys β -lakštai išsidėstę antiparaleliai trimis α -spiralėms ($\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$)) (150). Taip pat dažnai šie reguliatoriai pasižymi glicinu ar prolinu turtingais papildomais domenais, kurie yra svarbūs jų lokalizacijai ląstelėse (151).

SR ir hnRNP dalyvauja ne tik splaisingo reguliacijoje, bet ir sąveikauja su transkripcijoje bei translucijoje dalyvaujančiais baltymais (150,152).

Kaip jau minėta, su alternatyviomis splaisingo sekomis splaisingo veiksniai sąveikauja žymiai silpniau. Jei sąveika nepakankama - splaisingas nevyksta (1.9 pav. A) (145). SR šeimos baltymai dažniausiai rišasi su ESE ir aktyvina splaisingą pritraukdami splaisosomą. Priešingai, hnRNP baltymai sąveikauja su ESS arba ISS ir slopina iRNR kirpimą (152) (1.9 pav. B). Taip pat SR baltymai gali veikti ir slopinančiai – tai priklauso nuo splaisingą reguliuojančių sekų pozicijos. Nustatyta, jei SR sąveikauja su egzzone esančia seka, gali skatinti splaisingą, jei introne – slopinti (1.9 pav. C) (153). Kiti splaisingo faktoriai pvz. NOVA, taip pat gali veikti dvejopai, priklausomai nuo prisijungimo padėties. Jei NOVA sąveikauja su sekomis esančiomis introne ir einančiomis už egzono, dažniausiai slopina to egzono splaisingą. Tačiau jei šis splaisingo veiksnys prisijungia prie introno einančio prieš egzoną, šio egzono kirpimas yra skatinamas (1.9 pav. C). Be to, du SR splaisingo veiksniai gali tarpusavyje konkuruoti, kas gali lemti skirtingų intronų splaisingą (1.9 pav. D) (145). Dėl itin didelio kiekio splaisingą reguliuojančių veiksnių ir nehomologinių sekų, su kuriomis šie veiksniai sąveikauja, dažnai bioinformatiškai yra sunku nuspėti alternatyvaus splaisingo eigą. Vis dėlto manoma, kad gali egzistuoti splaisingo kodas, pagal kurį atsižvelgiant į ląstelių tipą, splaisingo veiksnių koncentraciją bei specifines sekas, būtų galima nuspėti iRNR lemtį (154).



1.9 pav. Splaisingo veiksmų veikimas. A) Svarbus pakankamas sąveikos tarp iRNR ir splaisosomos/splaisingo veiksmų stiprumas; B) SR baltymai dažniausiai aktyvina, hnRNP – slopina splaisingo procesą; C) Priklausomai nuo prisijungimo padėties tas pats splaisingo reguliatorius gali veikti skirtingai; D) Splaisingo veiksmiai gali tarpusavyje konkuruoti, lemia skirtingą efektą. ESE - egzoniškas splaisingo enhanseris; ESS - egzoniškas splaisingo slopiklis; 5'SS - donorinė 5'- splaisingo seka, 3'SS akceptorinė 3' – splaisingo seka. Modifikuota pagal (145).

1.5.3 Splaisingo veiksmiai ir miRNR

SR, hnRNP ir kiti splaisingo veiksmiai gali tiesiogiai ir netiesiogiai reguliuoti miRNR brendimą (63).

SRSF1 nepriklausomai nuo splaisingo gali sąveikauti su CGCACAC seka, esančia pri-miR-7-1, ir taip aktyvinti Drosha kirpimą. Visgi, kaip yra skatinamas Drosha kirpimas nėra žinoma. Gali būti, kad SRSF1 tik palengvina pre-miR-7-1 pernašą pro branduolio membraną (155).

Taip pat buvo nustatyta, kad SRSF3 ir SRSF7 jungiasi prie pri-miR-16-1, pri-miR-30a ir pri-miR-223 sąveikaudami su CNNC seka esančia 17-18 nt nuo Drosha kirpimo vietos ir taip pritraukia Drosha, skatindama šių pri-miRNR brendimą (156,157).

hnRNP A1 gali tiesiogiai sąveikauti su pri-miR-18a (158). miR-18a yra viena iš šešių miR-17-92 klasterį sudarančių miRNR. Nustatyta, kad sumažinus hnRNP A1 sumažėja tik pre-miR-18a kiekis, o kitų miRNR raiška nekinta. miR-18a segtukas pasižymi specifine seka, prie kurios ir jungiasi hnRNP A1. Todėl pasikeičia pri-miR-18a antrinė struktūra, kurią stipriau atpažįsta Drosha. hnRNP A1, hnRNP L ir hnRNP I taip pat jungiasi su pri-let-7a-1 ir pri-miR-101-1 (159).

SR baltymai gali ir netiesiogiai reguliuoti miRNR brendimą, keisdami transkripcijos veiksmų ar kitų baltymų dalyvaujančių brendime reguliaciją. Identifikuota, kad SRSF3 skatina transkripcijos veiksmo NF-kB raišką, o NF-kB aktyvina miR-1908-5p brendimą (160). Panašiai, SRSF3 keičia REST transkripcijos veiksmo kiekį ląstelėje, ko pasekoje pakinta miR-132-3p ir miR-212-3p raiška (161).

1.6 miRNR reikšmė krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos vystymuisi

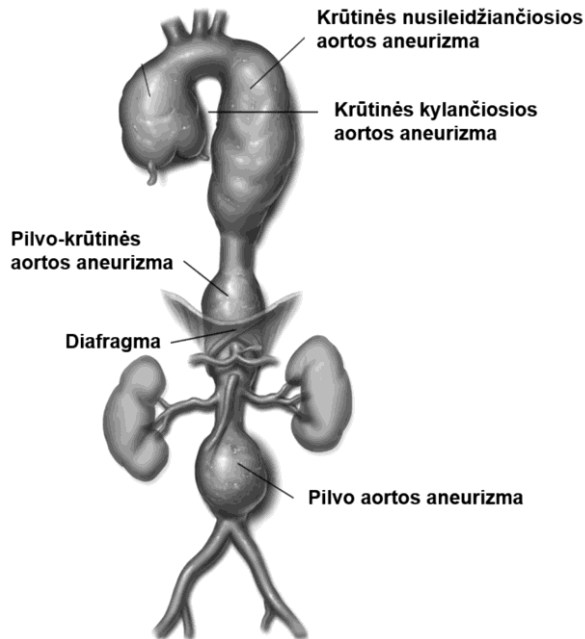
1.6.1 Krūtinės kylančiosios aortos aneurizma ir jos priežastys

Aortos aneurizma - tai viena dažniausių aortos ligų, kuri išsivysto, kai aorta išsiplečia daugiau nei 1,5 karto lyginant su sveiko žmogaus aorta (6). Formuojantis aneurizmai pacientai dažniausiai nejaučia jokių simptomų ir ši liga yra diagnozuojama atsitiktinai, tikrinant dėl kitų sutrikimų. Jei liga nenustatoma laiku, aneurizma gali staigiai plyšti ir būti mirtina (7). Aneurizmos yra skirstomos į pilvo, pilvo-krūtinės ir krūtinės kylančiosios bei nusileidžiančiosios aortų aneurizmas (1.10 pav.) (162). Krūtinės kylančiosios aortos aneurizma (KAA) ir pilvo bei krūtinės nusileidžiančiosios aneurizmos kyla iš skirtingų ląstelių embriono vystymosi metu. Nors fiziologiškai šios aneurizmos panašios, tačiau priežastys sukeliančios šias aneurizmas yra skirtingos. Aortos sieną sudaro keturi ląstelių tipai – kraujagyslių lygiųjų raumenų (angl. *vascular smooth muscle cells*, VSMC), endotelio, fibroblastai ir imuninės ląstelės. Visos ląstelės gali būti paveikiamos vystantis aneurizmai (163).

Pilvo aortos aneurizmą dažniausiai lemia VSMC ląstelių apoptozė, tarpląstelinio užpildo suirimas, stiprūs uždegiminiai procesai ir padidėjęs reaktyvių deguonies formų kiekis. KAA labiausiai yra siejama su tarpląstelinio užpildo pakitimais (elastino, kolageno, glikozaminų-glikanų kiekio sumažėjimu/padidėjimu) bei su lygiųjų raumenų ląstelių diferenciacijos pokyčiais. KAA išsivysto rečiau nei pilvo aortos aneurizma, apie 6-10 atvejų iš 100000 žmonių (7) ir dažniausiai pasireiškia vyrams, tačiau

jei išsivysto moterims, plečiasi 3 kartus greičiau (164). Yra nustatyta, kad KAA atveju moterų aortų audiniuose yra didesnės tarpląstelinio užpildo metalo proteinazių (angl., *matrix metalloproteinase-2*) MMP2 ir MMP9, bei mažesnė jų slopiklių TIMP1 ir TIMP2 angl., *tissue inhibitor of metalloproteinases*) koncentracija. Taip pat, vyrų aortos audiniuose yra daugiau kolageno ir elastino, kas lemia skirtingą audinio struktūrą (165). Visgi, kodėl KAA skirtingai vystosi tarp vyrų ir moterų nėra žinoma (166).

KAA yra skirstoma į sindromines formas (Marfano, Loeys–Dietz, Shprintzen–Goldberg, Ehlers–Danlos sindromai), šeimyninę nesindrominę ir atsitiktinę. Sindromines KAA formas lemia mutacijos, kurios dažniausiai identifikuojamos tarpląstelinio užpildo, lygiųjų raumens ląstelių reguliacijoje bei TGF- β signaliniame kelyje dalyvaujančiuose genuose. Būtent dėl skirtingų ligą sukeliančių genų mutacijų sindrominės formos tarpusavyje yra labai heterogeniškos. Marfano sindromo atvejis siejamas su mutacijomis fibrilino-1, lizino oksidazės *LOX* ir biglikano *BGN* genuose. Loeis-Dietzo sindromas gali būti kelių tipų, kuriuos lemia skirtingos mutacijos – *SMAD3*, *TGFB2*, *TGFB3*, *TGFBR1* ir *TGFBR2* genuose (8).



1.10 pav. Aortos aneurizmų lokalizacija. Aortos aneurizmos yra skirstomos į pilvo, pilvo-krūtinės ir krūtinės kylančiosios bei nusileidžiančiosios aortų aneurizmas. Modifikuota pagal (167).

Atsitiktinės KAA formoje mutacijos sutinkamos retai: 4,2% atvejų - fibrilino-1, 1,4% - *TGFBR1*, 1,1% - *COL3A1*, 0,8% - *SMAD3*, 0,8% - *ACTA2*, 0,3% - *TGFB2*, 0,3% - *TGFBR2* genuose (10). Šio tipo KAA atveju buvo identifikuotas vieno nukleotido polimorfizmas, susijęs su fibrilino-1 raiška, rodantis sąsają su liga. Manoma, kad tai gali rodyti, kad atsitiktinė KAA sukeliama panašiai, kaip ir sindrominė Marfano forma (168). Taip pat nustatytos 9 genų (tarp kurių yra ir miozino sunkiosios grandinės *MYH11* genas) duplikacijos chromosomos 16p13.1 regione (169). Identifikuota, kad atsitiktinė KAA dažnai kyla esant dviburio aortos vožtuvo patologijai (163).

1.6.2 Tarpląstelinio užpildo pakitimai, išsivysčiusi krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai

Vystantis KAA nustatyti TGF- β signalinio kelio pakitimai, kurie lemia tarpląstelinio užpildo baltymų (elastino, kolageno, glikozaminų-glikanų) kiekio pokyčius. Tarpląsteliniam užpilde TGF- β yra susirišęs su LTBP baltymu, kas lemia TGF- β neaktyvumą. Atsivalaidavęs nuo LRBP baltymo, TGF- β dimerizuojasi ir jungiasi su II tipo receptoriu TGF β -RII, pritraukia I tipo receptorių TGF β -RI, ir suformuoja stabilų receptorių kompleksą. TGF- β signalinis kelias yra labai platus ir įvairiapusis. Iš viso identifikuoti 30 skirtingų TGF- β signalinio kelio ligandų, 5 skirtingi II tipo receptoriai, 7 skirtingi I tipo receptoriai. Signalas į ląstelę gali būti perduodamas klasikiniu keliu, keičiant SMAD baltymų aktyvumus, arba nekanoniniu, kai signale dalyvauja ERK1/2 kinazės (162,170).

Atsitiktinėje KAA formoje kanoninio TGF- β signalinio kelio tyrimų atlikta mažai. Dėl daugelio šiame signaliniame kelyje identifikuotų mutacijų daug tyrimų atlikta tiriant Marfano sindromą (171). Buvo nustatyta, kad Marfano sindromo atveju mutaciją turintis fibrilinas-1 lemia padidėjusį TGF- β aktyvumą, kas sukelia TGF- β ir SMAD2 baltymo raiškos padidėjimą (172,173). Tačiau neseniai nustatyta, kad šį sindromą turinčioje pelėje visgi nėra nustatomi šio signalinio kelio pakitimai (174). Taip pat parodyta, kad SMAD4 and TGFBR2 receptoriaus inaktyvacija, vadinasi TGF- β signalinio kelio slopinimas, gali sukelti KAA, ne tik Marfano bet atsitiktinėje KAA formoje (174-176). Be to, sindrominėje ir atsitiktinėje KAA identifikuota, kad išaugęs SMAD2 aktyvumas yra nepriklausomas nuo TGF- β signalinio kelio (177). Taigi, vystantis KAA, TGF- β signalo reikšmė lieka neaiški.

Tarpląstelinio užpildo struktūrą keičia ir tarpląstelinio užpildo metalo proteinazės, kurios taip pat pasižymi aktyvumu dualumu - gali degraduoti tarpląstelinį užpildą bei taip pat reguliuoti jį tam, kad stabilizuotų, kai plečiasi aorta. Daug tyrimų atlikta su metalo proteinaze MMP2, tačiau gauti duomenys

taip pat neaiškūs. Nustatyta, kad *MMP2* delecija pelėje, susiformavus angiotenzino sukeltam aortos išplatėjimui, skatina KAA, tačiau, kai pelėje susiformuoja CaCl_2 sukeltas išplatėjimas, priešingai - apsaugo. Taip pat identifikuota, kad pelėje turinčioje Marfano sindromą *MMP2* inaktyvacija slopina KAA plyšimą, $\text{TGF-}\beta$ aktyvaciją ir ERK1/2 bei SMAD2 fosforilinimą, taip prailgindama pelės išgyvenamumą. Skirtingi duomenys gauti ir tiriant metalo proteinazės *MMP9* reikšmę. Nustatyta, kad šios proteinazės kiekis išauga pelėje, esant angiotenzino sukeltam išplatėjimui, tačiau esant dviburio vožtuvo patologijai *MMP9* raiška nekinta (178,179).

1.6.3 Kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių pokyčiai, išsivysčius krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai

KAA vystymuisi taip pat yra svarbūs VSMC diferenciacijos pokyčiai. VSMC gali būti dviejose skirtingose diferenciacijos stadijose – kontraktinio ir sintetinio fenotipo (1.11 pav). Esant natūraliai ramybės fazei, VSMC pasižymi kontraktiliniui fenotipui būdingomis savybėmis – pailga, verpstės formos ląstelių morfologija, lėtai dalinasi ir migruoja. Tokiam fenotipui būdinga lygiųjų raumenų α -aktino (α -SMA), miozino sunkiosios grandinės (SM-MHC) ir kalponino raiška. α -SMA bei miozinas formuoja skaidulas, besijungiančias prie glaudžiųjų jungčių, kurios sąveikauja su elastinu. Tvarkinga šių komponentų raiška užtikrina efektyvų VSMC susitraukimą (180). Kai audinyje įvyksta pažeidimas, VSMC keičia savo fenotipą į sintetinį – VSMC plokštėja, pradeda migruoti ir proliferuoti greičiau, keičiasi tarpląstelinio užpildo baltymų kiekis, padidėja metaloproteinazių raiška, fragmentuojasi elastinas bei silpnėja kontraktiliniui fenotipui būdingų baltymų raiška (181). Panašu, kad KAA vystymosi metu keičiasi VSMC diferenciacijos stadija, mažėja kontraktiliniui fenotipui būdingų baltymų (182,183), tačiau diferenciacijos pokyčių mechanizmai žmogaus KAA audiniuose iki šiol nėra aiškūs (7).

Taip pat nustatyta, kad KAA vystymosi metu silpnai, bet gali vykti ir VSMC apoptozė. Parodyta, kad KAA audinyje yra sutinkami T-limfocitai bei makrofagai (184). T-limfocitai ekspresuoja FAS ligandus, kurie skatina VSMC žūtį (185).

1.6.4 miRNR įtaka krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos susiformavimui

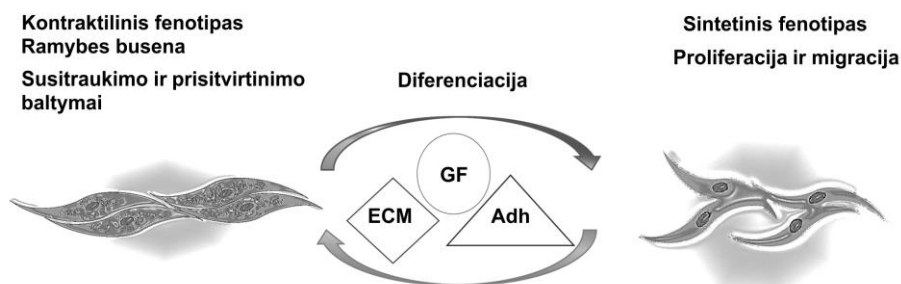
Nors miRNR, dalyvaujančios pilvo aortos aneurizmos vystymesi, yra gerai ištirtos (186), nustatyta nedaug miRNR raiškos pokyčių KAA. miRNR

kiekis KAA audiniuose tirtas tik tikro laiko PGR metodu ir miRNR gardelėmis (11-13). Šioje disertacijoje pirmą kartą atlikta audinių ir kraujo plazmos mėginių, susiformavus KAA, sekoskaita.

Identifikuota, kad su KAA vystymusi yra susijusi miR-143/-145 šeima. Nors, miR-143-3p ir miR-145-5p raiškos tyrimai aneurizmoje yra priešaringi ir nustatomas arba sumažėjęs (187), arba padidėjęs kiekis, lyginant su sveikomis aortomis (188), nustatyta, kad miR-143-3p ir miR-145-5p gali reguliuoti kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių homeostazę. Nustatyta, kad išveiklinus šias miRNR, VSMC keičia savo fenotipą į sintetinį, ko pasekoje pakinta aortos struktūra (189). Taip pat identifikuota, kad miR-145-5p gali tiesiogiai veikti transkripcijos veiksnių KLF4, kuris skatina VSMC diferenciaciją į sintetinį fenotipą (190). Be to, miR-143-3p ir miR-145-5p gali būti perduodama egzozomose iš endotelio ląstelių į VSMC (191).

Nustatyta, kad miR-29a/-29b/-29c šeimos miRNR taip pat yra susijusios su KAA. Identifikuota, kad miR-29b-3p kiekis padidėja KAA audiniuose, o nuslopinus šią miRNR pelėse, turinčiose angiotenzino sukeltą aortos išplatėjimą, sustiprėja tarpląstelinio užpildo sintezė (192). Priešingai, žmogaus KAA audiniuose mažėja miR-29a-3p raiška, ko pasekoje išauga MMP2 kiekis (193).

Taip pat daug duomenų sutinkama apie miRNR klasterį sudarančias miR-1 ir miR-133a. Nustatyta, kad šių abiejų miRNR raiška mažėja susiformavus KAA, tačiau tik miR-133a-3p dalyvauja VSMC diferenciacijos reguliavime. miR-133a-3p tiesiogiai sąveikauja su transkripcijos veiksniu Sp1, kurio išaugęs kiekis lemia sintetinį VSMC fenotipą (193,194).



1.11 pav. Kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių fenotipinis plastiškumas. Įvykus pažaidai audinyje VSMC diferencijuoja ir keičia savo fenotipą iš kontraktilinio į sintetinį. Taip pat kinta tarpląstelinio užpildo (ECM) baltymų kiekis, su prisitvirtinimu prie paviršiaus susiję baltymai (Adh), augimo veiksniai (GF). Mofikuota pagal (195).

Taip pat identifikuota, kad iš kylančiosios aortos fibroblastų, esant mechaniniui aortos spaudimui, miR-133a-3p egzozomose patenka į kraujo plazmą (196).

Nedaug duomenų identifikuota apie miRNR pokyčius kraujo plazmoje ar serume, išsivysčius KAA. Pakitusi miR-133a-3p, miR-21-5p, miR-29a-3p, miR-143-3p raiška nustatyta kraujo plazmoje (5,197). Taip pat identifikuota, kad kraujo serume, esant KAA, padidėja miR-574-5p kiekis (198).

1.7 miRNR kaip biožymenys virškinimo sistemos vėžinių susirgimų detekcijai

Vėžiniai susirgimai yra vieni pagrindinių ligų lemiančių sveikatos problemas ir sukeliančių mirtį. Vieni dažniausi iš visų vėžinių susirgimų yra virškinimo sistemos vėžiniai pakitimai. Tokio tipo navikai gali susiformuoti virškinimo sistemos organuose bei liaukose. Prie virškinimo sistemos vėžinių audinių priskiriami stemplės, skrandžio, storosios ir tiesiosios žarnos, kepenų, tulžies pūslės ir kasos navikai. Pagal dažnumą pasaulyje trečioje vietoje identifikuojami storosios ir tiesiosios žarnos navikai (10,2% susirgusių vėžiu). Daugiausia mirštama nuo storosios ir tiesiosios žarnos (9,2% skaičiuojant nuo visų vėžio sukeltų mirčių), skrandžio (8,2%) ir kepenų vėžio (8,2%) (199). Išsivysčius virškinimo sistemos tipo navikams, pirmose vėžio stadijose pacientai dažnai nejaučia simptomų, todėl dažnai tokio tipo vėžiniai pakitimai yra detektuojami tik navikui stipriai pažengus. Bendras tokio tipo vėžiu sergančių pacientų 5 metų išgyvenamumas yra tik 15% (200,201). Kasos vėžys dažniausiai nustatomas tik labai pažengusioje stadijoje, kartu identifikuojamos ir metastazės limfmazgiuose, daugiausia pacientai miršta per pirmus šešis mėnesius ir 5 metų išgyvenamumas yra žemesnis nei 5% (202). Jei virškinimo sistemos navikai būtų identifikuojami pradinėse stadijose, po tinkamo chemoterapinio ir radioterapinio gydymo, bei vėžinio audinio pašalinimo, tikėtina, pacientų 5 metų išgyvenamumas siektų apie 90% (201).

Identifikuota, kad miRNR dalyvauja visuose vėžio vystymosi procesuose – skatina ląstelių dalijimąsi, slopina augimo slopiklius, dalyvauja atsparumo vaistams mechanizmo vystymesi, skatina metastazes ir naujų kraujagyslių formavimąsi, taip pat dalyvauja ir naviko mikroaplinkos bei imuninio atsako reguliacijoje (203,204). miRNR raiškos pokyčiai gali įvykti dėl miRNR genų delecijų arba amplifikacijos, transkripcijos reguliacijos pasikeitimų, DNR metilinimo pasikeitimo bei miRNR biogenezėje dalyvaujančių (Drosha, Dicer, eksportinas-5, AGO1-2) baltymų mutacijų (203). Nustatyta, kad miRNR kiekio pokyčiai yra susieti su virškinimo sistemos navikų metastazių formavimusi, naviko tūrio augimu ir vėžinių

ląstelių piktybiškumu. miRNR raiška taip pat yra susijusi su vėžio atsinaujinimu, atsaku į chemoterapinį gydymą bei pacientų išgyvenamumą po gydymo. Tai rodo, kad miRNR gali būti panaudojamos kaip biožymenys virškinimo sistemos navikų detekcijai bei nustatymui, kaip vėžinės ląstelės reaguos į gydymą (1.1 lentelė) (202,205,206).

Be to, miRNR gali iš naviko patekti į kraują ir veikti kaip signalinė molekulė tarp ląstelių arba audinių (207). Tai, kad miRNR yra stabili kraujo plazmoje ar serume lemia, kad miRNR gali būti pritaikoma kaip neinvazinis biožymuo. Visgi, kraujo plazmoje ar serume sutinkama gana daug miRNR izomirų, bei cirkuliuojančių miRNR kiekis yra labai mažas, todėl tiriant miRNR tikro laiko PGR metodu ar mikrogardelėmis susiduriama su detekcijos nespecifiškumo problema (208). Šią problemą galima išspręsti visumine sekoskaita, kurios metu efektyviai yra identifikuojami visi miRNR izomirai bei miRNR, kurių raiška ląstelėse yra silpna (209).

1.1 lentelė. miRNR, kaip biožymenų, panaudojimas.

Galimi miRNR pritaikymo būdai
Atsako į gydymą prognozė
Metastazių prognozė arba detekcija
Vėžinių ląstelių miRNR profilio nustatymas, siekiant nustatyti vėžio vystymosi mechanizmus
miRNR, kaip biožymenų, privalumai
Aukštas miRNR stabilumas audiniuose ir kūno skysčiuose
Greita ir pakankamai paprasta detekcija ne tik navikuose, bet ir kraujo plazmoje, serume, šlapime

1.8 Mirtroninių miRNR reikšmė vėžinėse ląstelėse ir jų panaudojimas genų terapijoje

Nors mirtroninių miRNR brendimo kelias skiriasi nuo kanoninių, jų veikimo mechanizmas yra toks pat. Mirtroninės miRNR kartu su AGO šeimos baltymais sudaro miRISC ir dalyvauja baltymus koduojančių genų raiškos valdyme. Identifikuota, svarbi mirtroninių miRNR reikšmė vėžiniuose procesuose.

miR-1224 kiekio sumažėjimas nustatytas storosios žarnos vėžio navikuose (210), plaučių vėžyje (211), bei yra susijęs su glioblastoma sergančių pacientų prastu išgyvenamumu. Glioblastomos ląstelėse miR-1224-5p tiesiogiai atakuoja CREB1, skatindama ląstelių proliferaciją ir invazines savybes bei slopindama apotozės procesus (212).

Nustatyta, kad miR-1226-3p, reguliuodamas MUC1 raišką, slopina krūties vėžinių ląstelių kancerogenezę, paskatindama jų žūtį (20). Taip pat ši miRNR yra susieta su krūties vėžio atsparumu tamoksifenui (213) bei stemplės vėžio atsparumu cisplatinai ir 5-FU (214). Nuslopinus miR-1226-5p raišką net 27 plaučio vėžio ląstelių linijose stipriai sumažėja jų gyvybingumas (215).

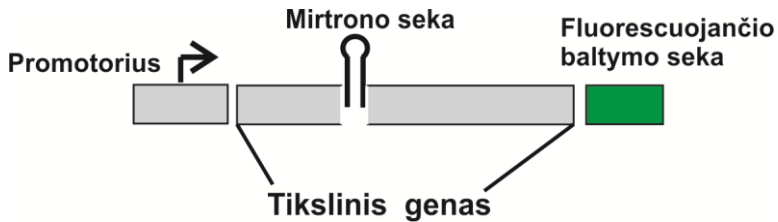
Nedaug duomenų yra apie mirtronines miR-1229 ir miR-1227. miR-1229-3p padidėjusi raiška yra susijusi su prastu krūties vėžio pacienčių išgyvenamumu. Identifikuota, kad miR-1229-3p tiesiogiai aktyvuoja Wnt/ β -katenino signalinį kelią, slopindama šio kelio inhibitorius APC, GSK-3 β , ICAT (216). O miR-1227-3p yra tiesiogiai susijusi su glioblastomos vėžinių ląstelių stipresne migracija (217).

Itin plačiai ištirtos miR-1236 funkcijos. miR-1236-3p raiška yra sumažėjusi skrandžio vėžiniuose audiniuose (218) bei šio vėžio metastazėse limfmazgiuose. Taip pat ši miRNR yra glaudžiai susijusi su ląstelių migracijos procesais. Nustatyta, kad miR-1236-3p slopina Akt signalinį kelią, todėl sumažėjęs miR-1236-3p kiekis skatina skrandžio vėžinių ląstelių migraciją (219). Taip pat, miR-1236-3p susijusi su migracija bei invaziškumu krūties, plaučių ir galvos bei kaklo ertmių vėžinėse ląstelėse. Nustatyta, kad miR-1236-3p yra esminė miRNR reguliuojanti epitelinį-mezenchiminį perėjimą (EMT) ir metastazines ląstelių savybes hipoksijos sąlygomis. Esant deguonies trūkumui transkripcijos faktorius Twist sumažina miR-1236-3p kiekį ir padidėja HDAC3 ir SENP1 raiška, kas skatina EMT (220).

Taip pat, neseniai nustatyta, kad įvairių ligų atveju, siekiant ląstelėje nuslopinti mutantinį baltymą sėkmingai buvo panaudotos „dirbtinės“ mirtronų sistemos (1.12 pav.). Dažniausiai mutacija yra tik viename geno alelyje, todėl panaudojus RNR interferenciją (RNRi) yra sunaikinama ne tik mutavusi baltymo forma, bet ir veiklus baltymas. Tokiu atveju geriausia ne tik nutildyti transliaciją, bet kartu į ląstelę įvesti slopinimui atsparią geno kopiją, palaikančią fiziologinį baltymo aktyvumą. Tam puikiai tinka mirtronų sistema, kai į ląstelę patenka reikalingas genas, kurio introne yra dirbtinai yra įterpta mirtroninė miRNR. Identifikuota, kad dirbtinai į geną įvesta mirtroninė miR-1224-3p efektyviai slopino su Parkinsono liga susijusius genus (221), o miR-1226-3p – su raumenų distrofiją lemiančią kinazę DMPK (222). Taip pat, VEGFA genų tildymui, lemiančiam kancerogenezės slopinimą, sėkmingai pritaikyta ir 3' tipo „dirbtinių“ mirtronų sistema (223).

Lyginant su kanoninėmis miRNR sistemomis, naudojamomis genų tildymui, mirtronų panaudojimas tokio pobūdžio terapijoje turi keletą privalumų: 1) mirtronai gali būti įterpti į bet kokį geną, kol nėra pažeidžiamos

jų splaisingą lemiančios sritys; 2) genas ir mirtronai yra nurašomi to paties Pol II promotoriaus, o tai užtikrina, kad abu terapijai reikalingi komponentai visada bus sintetinami kartu; 3) identifikuota, kad galima sukurti audiniui specifiskas sistemas; 4) nustatyta, kad vienu metu į ląstelę galima įvesti geną, turintį kelias to paties mirtrono arba skirtingų mirtronų sekas, taip sustiprinant to paties mirtrono RNRi arba siekiant vienu metu nutildyti kelis skirtingus genus; 5) mirtronų brendimas priklauso nuo splaisingo proceso ir jie nėra karpomi Droscha, taigi mirtronai išvengia kanoninio kelio prisotinimo ir susidariusių pre-miRNR toksiskumo, kai į ląstelę patenka itin didelis kiekis miRNR (221,223,224). Taip pat identifikuota, kad naudojant 3' tipo „dirbtinių“ mirtronų sistemą modeliuojant sekas susiduriama su žymiai mažiau sekos elementų apribojimų, nei naudojant standartinių trumpų mirtronų sekas (223).



1.12 pav. „Dirbtinių“ mirtronų sistemos schema. Į ląstelę įvedama slopinimui atspari geno kopija, palaikanti fiziologinį baltymo aktyvumą. Tikslinio geno introne yra dirbtinai yra įterpiama mirtrono seka, slopinanti mutantinio baltymo raišką. Vektoriaus stebėjimui ląstelėse, šalia gali būti klonuojama fluorescuojančio baltymo seka.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su kylančiosios aortos aneurizmos audiniais ir kraujo plazmos mėginiais

2.1.1 Pacientų, kuriems susiformavo kylančiosios aortos aneurizma, audinių ir kraujo plazmos mėginiai

Iš viso tyrime dalyvavo 40 pacientų, kuriems buvo nustatyta krūtinės kylančiosios aortos aneurizma (KAA). 23 pacientams buvo atlikta aneurizmos pašalinimo operacija. KAA audiniai surinkti iš didžiojo aortos lanko radiuso, kuriame yra stipriausia stebima patologija. Iš visų 40 pacientų paimti kraujo plazmos mėginiai. Taip pat 4 pacientų kraujo plazmos mėginiai buvo surinkti praėjus 3 mėnesiams po operacijos.

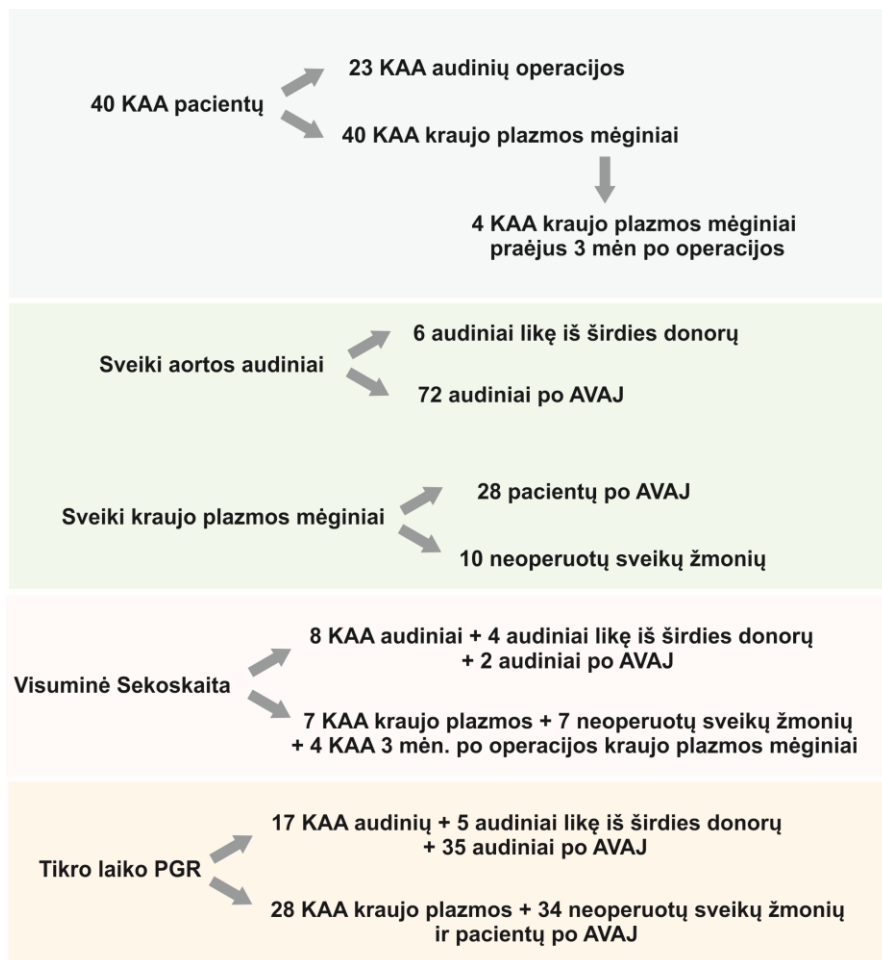
Kontroliniai sveiki aortos audinio ir kraujo plazmos mėginiai, buvo surinkti iš trijų kontrolinių grupių: 1) šeši širdies donorų aortos sienos fragmentai, likę po širdies transplantacijos operacijos; 2) 72 aortos sienos fragmentai, „išmušti“ iš aortos sienos pritvirtinant aortos ir vainikinių arterijų jungtį (AVAJ), ir šių 28 pacientų kraujo plazmos mėginiai; 3) 10 kraujo plazmos mėginių, paimtų iš neoperuotų asmenų, kurių kylančioji aorta pagal echokardiografinius aortos morfometrijos vertinimo duomenis nebuvo išsiplėtusi.

Visumine miRNR sekoskaita iš viso išanalizuoti 32 mėginiai. Audinių atveju – 8 kylančiosios aortos aneurizmos mėginiai, 4 sveiki aortos audiniai, surinkti iš širdies donorų aortos sienos fragmentų, likusių po širdies transplantacijos ir du mėginiai iš aortos sienos fragmentų, „išmuštų“ iš aortos sienos pritvirtinant AVAJ. Plazmos atveju – 7 kraujo plazmos mėginiai, susiformavus KAA, bei 4 šių pacientų, plazmos mėginiai, praėjus 3 mėnesiams po operacijos, ir 7 kontroliniai sveikų pacientų, kai echoskopijos metu nebuvo nustatyti pakitimai kylančiojoje aortoje, plazmos mėginiai.

PGR metodu miRNR raiška audinių atveju tikrinta naudojant 17 kylančiosios aortos aneurizmos mėginių, 5 širdies donorų aortos sienos bei 35 „išmuštus“ iš aortos sienos, fragmentus. Plazmos atveju – 28 kraujo plazmos mėginius, iš pacientų, kuriems nustatyta KAA, ir 34 kontrolinius neoperuotų pacientų, kuriems nebuvo nustatyta KAA, ir pacientų, kuriems buvo „išmušti“ aortos sienos fragmentai, mėginius.

Kadangi išgrynintos iš audinių RNR degradacijos laipsnis dažniausiai priklauso nuo audinio surinkimo sąlygų, nei gryninimo būdo, kiekvienu atveju buvo stengiamasi kuo greičiau aortos audinį supjaustyti 0,5 x 0,5 cm dydžio fragmentais ir kuo trumpiau laikyti kambario temperatūroje. Viena audinių

dalis buvo dedama į RNR degradaciją stabdantį RNAlater™ tirpalą (Thermo Fisher Scientific) ir laikoma -80 °C iki RNR gryninimo, o kita dalis ruošiama histologiniui vertinimui. Kraujo mėginiai buvo renkami naudojant Venosafe™ K2EDTA (Therumo Europe) mėgintuvėlius. Kraujo plazmos mėginiai buvo renkami laikantis aukštų kraujo surinkimo bei plazmos atskyrimo nuo kitų kraujo sudedamųjų dalių reikalavimų.



2.1 pav. Eksperimentams naudoti KAA audinių ir kraujo plazmos mėginiai. Tikro laiko PGR eksperimentams naudoti 35 aortos audiniai po AVAJ. Dėl itin mažų tokio tipo audinių dydžio ir mažo išgryninto RNR kiekio, kiekvienos miRNR atveju tikro laiko PGR patikrinta po 15 audinių po AVAJ. KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma. AVAJ - fragmentai, „išmušti“ iš aortos sienos pritvirtinant aortos ir vainikinių arterijų jungtį.

Plazma nuo kitų kraujo sudedamųjų dalių buvo atskirta per 24 val. pagal miRNeasy Serum/Plasma Handbook protokolą. Cirkuliuojančių miRNR plazmoje yra labai nedaug, todėl labai svarbu, kad kraujo paėmimo, laikymo ir plazmos atskyrimo metu, nebūtų pažeidžiamos kraujo ląstelės - eritrocitai, neutrofilai ir makrofagai. Būtent jiems suirus į kraują patenka itin didžiulis šių ląstelių miRNR kiekis, kurios tyrimo metu gali būti klaidingai registruojamos kaip cirkuliuojančios miRNR. Tai yra viena didžiausių problemų dirbant su plazmos mėginiais (225). Todėl surinkta kraujo plazma buvo tikrinama registruojant hemolizės lygį. Pirmiausia naudojant NanoDrop™ 2000 spektrofotometrą (ThermoFisher Scientific) matuojama hemoglobino sugertis ties 414 nm ilgio banga. Kadangi A(414) sugertį taip pat gali keisti padidėjęs lipidų kiekis kraujyje (226), todėl papildomai tikro laiko PGR metodu buvo identifikuojama ar plazmoje tikrai nėra padidėjusio eritrocitams būdingų miR-16-5p bei miR-451 kiekio (227,228). Tyrimams pasirinkti tik tie mėginiai, kai A(414) nesiekė 0,2 vertės ir miR-16-5p bei miR-451a slenkstinio ciklo (Ct) vertės buvo žemesnės nei 19 ir 22 atitinkamai (p2 lentelė). Plazmos mėginiai laikomi -80 °C.

Echokardiografinis kylančiosios aortos tyrimas atliktas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos klinikoje. Tyrimas buvo paruoštas pagal „The Code of Ethics of the World Medical“ asociacijos reikalavimus (Helsinkio deklaracija) ir patvirtintas Kauno Regioninio Biomedicininiių tyrimų etikos komiteto (Nr. P2-BE-2-12/2012).

2.1.2 RNR gryninimas iš KAA audinių ir RNR kokybės įvertinimas

2.1.2.1 DEPC-H₂O ruošimas

700 µl dietilo pirokarbonato (DEPC) (Roth) skiedžiama 700 ml dejonizuoto vandens, 24 val. inkubuojama maišant ir autoklavuojama 1 atmosferos slėgyje 20 min. Laikoma +4°C temperatūroje.

2.1.2.2 RNR gryninimas

Visuminė RNR iš aortos sienos audinių buvo gryninama naudojant mirVana Ambion rinkinį (ThermoFisher Scientific). RNR gryninimo metu, mėginį centrifuguojant 1000xg greičiu +4 °C temperatūroje taip pašalinant į audinį įsigėrusį RNAlater (ThermoFisher Scientific), audinių gabaliukai buvo sutrupinami grūstuvėje, šaldant skystame azote. Audinio milteliai perkeliama į 600 µl ląsteles ardančio buferio, papildomai pridedant 15 µl RNazių inhibitorių Ribolock, inkubuojama 10 min. lede. Pridedama 600 µl fenolio-choroformo mišinio ir maišoma purtyklėje 1 min. Mišinys centrifuguojamas

5 min 12000xg greičiu 16 °C temperatūroje. Mėgintuvėlis atsargiai ištraukiamas iš centrifugos, į atskirą mėgintuvėlį atskiriama tirpalo viršutinė frakcija, pridedama 1,25 tūrio 96% etanolio, tirpalas perkeliamas į kolonėlę ir centrifuguojama 30 s. Kolonėlė praplaunama du kartus naudojant 700 µl miRNR praplovimo tirpalą, bei vieną užpilant 500 µl praplovimo tirpalo, kiekvieną kartą centrifuguojant 30 s. Tada siekiant pašalinti likusį skystį kolonėlė 2 min. centrifuguojama tuščia. RNR yra eliuojama, užpilant 20-30 µl RNazių neturinčio vandens ir centrifuguojant 1 min. 16000xg greičiu.

2.1.2.3 RNR vientisumo tikrinimas Agilent nanogardelėje

Visuminės RNR integralumas buvo patikrintas Agilent bioanalizatoriumi išmatavus RNR integralumo rodiklį RIN, kuris skaičiuoja ribosominių 28S/18S santykį. RNR molekulinės masės žymuo (200 – 6000 nt) pakaitinamas 70°C temperatūroje 2 min. išpilstomas po 1,1 µl ir laikomas – 80°C temperatūroje. Tiriamos RNR taip pat pakaitinamos 70°C temperatūroje 2 min., taip sumažinant galimų RNR antrinių struktūrų kiekį. Paruošiamas Agilent RNA 6000 Nano gelis - 550 µl gelio centrifuguojama per specialų filtrą 1500xg greičiu 10 min. Į 65 µl filtruoto gelio pilama 1 µl RNA 6000 Nano dažo koncentrato. Mišinys sumaišomas ir centrifuguojamas 13000xg greičiu 10 min. kambario temperatūroje. Pirmiausia į visus pažymėtus gardelės šulinėlius nešama po 9 µl dažo ir gelio mišinio, tada įnešama po 5 µl RNA Nano 6000 žymens (25 nt ilgio vidinio žymens, nuo kurio bus pradėta fiksuoti mėginių fluorescencija) ir po 1 µl pakaitintų tiriamų RNR, išskyrus į pažymėtą šulinėlį įnešamas 1 µl RNR molekulinės masės žymuo. Naudojama 250 ng/µl RNR koncentracija. Gardelė purtoma 2000 apsisukimų per minutę greičiu 60 s. IKA purtyklėje ir patalpinama į Agilent 2100 bioanalizatorių (Agilent Technologies), kur vykdoma kapiliarinė elektroforezė. Gavus duomenis įvertinamas RNR vientisumo skaičius (RIN).

2.1.3 miRNR sekoskaitos bibliotekų ruošimas

2.1.3.1 RNR koncentracijos matavimas

Ruošiant miRNR sekoskaitos bibliotekas, siekiant užtikrinti vienodus RNR kiekius, nešamus į reakcijas, tiksli RNR koncentracija, buvo matuojama Qubit RNA HS (ThermoFisher Scientific) reagentu, specifiskai susirišančiu su RNR, ir itin tiksliai nustatančiu RNR kiekį. Pirmiausia buvo paruošiamas tirpalas, kai 1 µl dažo sumaišoma su 199 µl reakcijos buferio. Šiame dažo-buferio tirpale 20 kartų praskiedžiami RNR kiekio standartai, bei 200 kartų praskiedžiami mėginiai, sumaišoma ir inkubuojama 2 min. kambario

temperatūroje. Koncentracija nustatoma su Qubit fluorimetru (ThermoFisher Scientific).

2.1.3.2 miRNR sekoskaitos bibliotekų paruošimas

miRNR, išgrynintos iš audinių arba kraujo plazmos, sekoskaitos bibliotekos ruoštos, naudojant NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3 (PerkinElmer) rinkinį. Vykdomi žingsniai - 3' Adapterio ligavimas, 3' adapterių pertekliaus pašalinimas naudojant magnetines daleles, 3' adapterio pertekliaus inaktyvacija, 5' adapterio ligavimas, kDNR sintezė, medžiagų likusių po kDNR sintezės pašalinimas, PGR reakcija, tinkamo ilgio PGR produktų gryninimas naudojant magnetines daleles bei PAGE gelį. 3' adapteriai buvo liguojami į reakciją nešant 1,6 µg visuminės RNR arba 10,5 µL RNR išgrynintos iš aortos sienos audinių arba kraujo plazmos, atitinkamai. RNR, išgrynintos iš audinių atveju, 3' ir 5' adapteriai buvo skiedžiami 1/3, išgrynintos iš plazmos – 4 kartus. Adapterių pertekliaus pašalinimas ir inaktyvacija, kDNR sintezė vykdyta pagal gamintojo rekomendacijas. RNR, išgrynintos iš audinių arba plazmos mėginių atvejais kDNR dauginama 18 arba 23 PGR ciklą atitinkamai. miRNR sekoskaitos bibliotekos, paruoštos iš plazmos mėginių, buvo frakcionuojamos 6% akril-amidiniame gelyje, pašalinant 130 bp (susiformavusius adapterių dimerius) ir 160 bp priemaišas, ir išpjaunant ir išgryninant tikslinį 150 bp produktą pagal gamintojo rekomendacijas.

Sekoskaitos bibliotekų paruošimo efektyvumas įvertintas Agilent bioanalizatoriumi (Agilent technologies), naudojant Agilent High Sensitivity DNA (Agilent technologies) rinkinį. Visais miRNR sekoskaitos bibliotekų ruošimo atvejais gautos tikslinės miRNR frakcijos, kurių koncentracija buvo pakankama sekoskaitai. Tiksli bibliotekų koncentracija buvo nustatoma naudojant KAPA Library Quantification (Rosche) rinkinį, identifikuojantį tik abu sekoskaitos pradmenis turinčius, t.y. sekoskaitai tinkamus DNR fragmentus. miRNR sekoskaitos bibliotekos hibridizuotos prie Illumina MiSeq sekoskaitos lusto (Illumina) ir visuminė sekoskaita buvo atlikta su Illumina MiSeq sekoskaitos platforma, naudojant MiSeq™ Reagent Kit v2 reagentus (Illumina) ir sekvenuojant 50 ciklą.

Sekoskaitos bibliotekų paruošimo optimizacija naudojant iš kraujo plazmos išgrynintą RNR buvo atlikta doktorantės S. Gasiulės. Toliau bibliotekas, naudojant iš kraujo plazmos išgrynintą RNR, paruošė dr. V. Stankevičius, DNMTS, BTI.

miRNR sekoskaitos duomenų analizė bei miRNR taikinių paiešką dr. R. Ražanskas, EGIS, BTI.

2.1.3.3 miRNR sekoskaitos bibliotekų įvertinimas Agilent nanogardelėje

Visų sekoskaitos bibliotekų tikslinių produktų ilgis ir priemaišos įvertintos Agilent bioanalizatoriumi (Agilent technologies), naudojant Agilent High Sensitivity DNA (Agilent technologies) rinkinį. Į High Sensitivity DNA gelį pridedama 15 µl High Sensitivity DNA dažo koncentrato ir centrifuguojama per specialų filtrą 2240 x g greičiu 10 min. Į visus pažymėtus gardelės šulinėlius nešama po 9 µl dažo ir gelio mišinio, tada įnešama po 5 µl High Sensitivity DNA žymens (35 nt ilgio vidinio žymens, nuo kurio pradedama fiksuoti mėginių fluorescencija, bei 10380 nt ilgio, ties kuriuo baigiasi mėginių detekcija) ir po 1 µl tiriamos sekoskaitos bibliotekos, išskyrus į pažymėtą šulinėlį įnešamas 1 µl DNR molekulinės masės žymuo. Gardelė purtoma 2000 apsisukimų per minutę greičiu 60 s IKA purtyklėje ir patalpinama į Agilent 2100 bioanalizatorių, kur vykdoma kapiliarinė elektroforezė. Gavus duomenis įvertinamas sekoskaitos bibliotekos grynumas, t.y kiek produktų yra 150 bp ilgio.

2.1.3.4 miRNR sekoskaitos bibliotekų koncentracijos nustatymas

Tiksli sekoskaitos bibliotekų koncentracija nustatoma tikro laiko PGR metodu naudojant KAPA Library Quantification (Roche) rinkinį. Pirmiausia 5 ml 2 x KAPA SYBR FAST qPCR master Mix sumaišomas su 1 ml 10 x specifinių pradmenų mišinio. Tirpalas išpilstomas mažais kiekiais, vengiama šildyti/šaldyti ir laikoma -20°C temperatūroje. Priklausomai nuo pradinės koncentracijos mėginiai yra skiedžiami 100000-500000 kartų RNazių neturinčiame vandenyje (ThermoFisher Scientific) arba 10mM Tris-HCl (Roth), pH = 8.0, buferyje. 12 µl paruošto buferio maišoma su 4 µl vandens ir 4 µl mėginio. Taip pat supilstomi standartai – nurodantys 0.0002 pM, 0.002 pM, 0.002 pM, 0.02 pM, 0.2 pM, 2 pM, 20 pM DNR koncentracijas. Vykdoma tikro laiko PGR. Sąlygos: 1) 95°C 5 min., 2) 95°C 30 s., 3) 60°C 45 s., 2-4 žingsniai kartoti 35 kartus. PGR laikomas tinkamu, jei apskaičiuotas reakcijos efektyvumas svyruoja 90-110%, $R^2 \geq 0.99$. Iš standartinės kreivės paskaičiuojama sekoskaitos bibliotekų koncentracija ir normalizuojama pagal tikslinės bibliotekos nukleotidų skaičių. Standartinei kreivei naudojami DNR produktai yra 452 bp ilgio, mūsų tikslinė biblioteka - 150 bp ilgio. Tam koncentracijos yra padauginamos iš 452/150 santykio.

2.1.3.5 Sekoskaitos bibliotekų paruošimas Illumina sekoskaitai

Prieš pat sekoskaitą 6 sekoskaitos bibliotekos proporcingai sumaišomos į bendrą mišinį, 15-30 µl Rnazių neturinčiame vandenyje (ThermoFisher

Scientific), kad galutinė visų bibliotekų koncentracija būtų 2 nM. Naujai paruošiamas 0,2 N NaOH (Roth). 200 µl 1 N NaOH sumaišoma su 800 µl Rnazių neturiniu vandeniu (ThermoFisher Scientific). Atšildomas HT1 buferis (Illumina) ir laikomas +4°C. 5 µl 2 nM sekoskaitos bibliotekos sumaišoma su 5 µl 0,2 N NaOH, nucentrifuguojama ir inkubuojama 5 min. kambario temperatūroje. Tada į mišinį pridedama 990 µl HT1 buferio, gaunama galutinė 10 pM bibliotekos koncentracija.

Sekoskaitos klasterių formavimo, sekoskaitos ir prisilyginimo efektyvumui nustatyti bei esant dideliame vienodų nukleotidų persidengimui kompensuoti yra naudojama bakteriofago PhiX genomo biblioteka (Illumina), kuri yra sumaišoma su sekoskaitos bibliotekomis. Pirmiausia 2 µl 10 nM PhiX sumaišoma su 3 µl vandens ir denatūruojama su 5 µl 0,2 N NaOH, inkubuojant 5 min. kambario temperatūroje. Tada į mišinį pridedama 990 µl HT1 buferio. 375 µl šio tirpalo sumaišoma dar su 225 µl HT1 buferio, ir gaunama galutinė 12,5 pM PhiX bibliotekos koncentracija.

Paruošiamas sekoskaitos lustas (Illumina), reagentus sumaišant, lustą vartant 10 kartų. Sekoskaitos gardelė (Illumina) yra atplaunama nuo druskų, su 250 ml vandens, leidžiant vandens srovę iš viršaus ir sausai nuvaloma su servetėlėmis nepaliekant jokių atplaišų. 600 µl 10 pM sekoskaitos bibliotekų sumaišoma su 5 µl 12,5 nM PhiX bibliotekos, ir nešama į sekoskaitos lustą.

2.1.4 Tikro laiko RT-PGR

2.1.4.1 Komplementarios DNR (kDNR) sintezė

Kad būtų išvengta užteršimo genomine DNR, visuminė RNR pirmiausia veikiama dsDNase (ThermoFisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Toliau vykdoma miRNR arba informacinės iRNR kDNR sintezė. Reakcijos tūris – 20 µl. Mišinį sudarė 4 µl 5x RT reakcijos buferio, 0,4 µl 25 mM dNTP mišinio (ThermoFisher Scientific), 0,4 µl 40 vnt/µl RNazių slopiklio RiboLock (ThermoFisher Scientific), 1 µl 200 vnt/µl RevertAid (M-MuLV) atvirkštinės transkriptazės (ThermoFisher Scientific), 0,8 µl 0,25 µM miRNR specifiško (Metabion) arba 1 µl 100 µM įvairių atsitiktinių heksamerų pradmenų mišinio (ThermoFisher Scientific). Visuminės RNR į reakciją nešama 100 ng. miRNR atvirkštinės transkripcijos reakcijos sąlygos: 1) 25°C 20 min., 2) 37°C 60 min., 3) 70°C 10 min. iRNR atvirkštinės transkripcijos antras žingsnis vykdytas 42°C. miRNR specifiški pradmenys pateikiami p12 lentelėje.

2.1.4.2 Tikro laiko PGR

Tikro laiko PGR reakcija vykdyta naudojant SYBR Green PGR rinkinį (ThermoFisher Scientific). Kiekybinė PGR atliekama po kDNR sintezės. Bendras reakcijos tūris – 20 µl. Kiekvienai reakcijai naudojama 10 µl 10-32 kartus skiestos kDNR (priklausomai nuo tiriamos miRNR ar iRNR) ir 0,3 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinio bei 10 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCRMaster (2X) mišinio. Kiekybinė PGR vykdoma 0,1 ml mėgintuvėlių juostoje naudojant Rotor-Gene (Qiagen) aparatą. Reakcijos sąlygos: 1) 95°C 10 min. - pradinė denatūracija, 2) 95°C 15 s, 3) 55°C 1 min., 4) 60°C 30 s (2-4 žingsniai kartoti 3 kartus), 5) 95°C 10 s, 6) 60°C 30 s 5-6 žingsniai kartoti 32 kartus. iRNR atveju vykdyta standartinė trijų žingsnių PGR reakcija.

miRNR/iRNR raiška vertinama lyginamojo C_T metodu. Tiriamos miRNR raiška lygi $2^{-\Delta\Delta C_t}$, kur $\Delta\Delta C_t$ yra $(C_{t\text{ miRNR/iRNR}} - C_{t\text{ endogenine}}) - (C_{t\text{ kontrolė}} - C_{t\text{ endogenine}})$. miRNR atveju audinių atveju endogeninė kontrolė naudota miR-152-3p. iRNR atveju endogeninė kontrolė naudota GAPDH. Kiekybinė PGR vykdoma naudojant Rotor-Gene (Corbett Life Science) aparatą. Pradmenų sekos pateikiamos lentelėse p13 ir p14.

2.2 Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su virškinimo sistemos vėžiniais bei sveikais audiniais

2.2.1 Virškinimo sistemos vėžiniai bei sveiki audiniai

Vėžiniai audiniai buvo surinkti navikų šalinimo operacijų metu. Pacientams prieš ir po operacijos nebuvo taikoma nei radioterapija, nei chemoterapija. Mėginys surinkimo metu padalintas į dvi dalis, viena dalis užfiksuota formaline ir išanalizuota histologiškai įvertinant naviko stadiją bei diferenciacijos laipsnį, antra dalis šaldoma skystame azote ir laikoma –80°C iki RNR gryninimo.

Iš viso surinkta 12 kasos, 13 skrandžio ir 12 storosios žarnos navikų. Visi kasos ir storosios žarnos navikų mėginiai buvo paimti iš T3 navikų stadijos (pagal TNM klasifikaciją). Visi vėžiniai audiniai pasižymėjo arba vidutiniškai (G2), arba silpnai (G3) diferencijuotomis ląstelėmis. Kontroliniai kasos audiniai (n=8) buvo surinkti iš sveikų donorų organų transplantacijos metu; kontroliniai skrandžio audiniai (n=15) - skrandžio mažinimo operacijos metu; kontroliniai storosios žarnos audiniai (n=6) - žarnų šalinimo operacijų metu arba esant kitiems žarnyno susirgimams.

Mėginiai buvo surinkti LSMU Virškinimo sistemos tyrimų instituto, Chirurginės gastroenterologijos laboratorijoje. Navikai ir sveiki audiniai buvo paimti iš pacientų gavus jų raštišką sutikimą. Tyrimas buvo paruoštas pagal „The Code of Ethics of the World Medical“ asociacijos reikalavimus (Helsinkio deklaracija).

2.2.2 RNR gryninimas iš vėžinių ir sveikų virškinimo sistemos audinių

RNR iš navikų ir sveikų kontrolinių audinių buvo gryninama naudojant mirvana PARIS rinkinį (ThermoFisher Scientific). Audinys buvo sutrinamas naudojant mažą grūstuvą 300 µl ląsteles ardančiame buferyje, papildomai pridodant 15 µl RNazių inhibitorių Ribolock. Tada užpilama 300 µl denatūruojančio buferio, sumaišoma ir inkubuojama 5 min. lede. Toliau pridodama 600 µl fenolio-choroformo mišinio ir maišoma purtyklėje 1 min. Mišinys centrifuguojamas 5 min. 12000xg greičiu 16 °C temperatūroje. Į atskirą mėgintuvėlį atskiriama tirpalo viršutinė frakcija, pridodama 1/3 tūrio 96% etanolio, tirpalas perkeliamas į kolonėlę (ant jos surenkama ilgujų (>200 nt) RNR frakcija) ir centrifuguojama 30 s. Filtratas surenkamas, į jį pridodama 2/3 tūrio 96% etanolio ir nešama į kitą kolonėlę (ant jos surenkama trumpųjų (<200 nt) RNR frakcija, centrifuguojama 30 s. Abi kolonėlės praplaunamos du kartus naudojant 700 µl miRNR praplovimo tirpalą, bei vieną užpilant 500 µl praplovimo tirpalo kiekvieną kartą centrifuguojant 30 s. Siekiant pašalinti likusį skystį kolonėles centrifuguojamos tuščios. RNR yra eliuojama, užpilant 20-30 µl RNazių neturinio vandens (ThermoFisher Scientific) ir centrifuguojant 30 s 16000xg greičiu. Išskiriamos dvi RNR frakcijos: iki 200 nt ir ilgesnės nei 200 nt.

Trumpųjų RNR (<200nt) frakcija buvo naudojama mirtroninių miRNR atvirkštinei transkripcijos reakcijai ir tikro laiko PGR eksperimentams. Ilgujų RNR (>200nt) RNR integralumas patikrinamas Agilent bioanalizatoriumi (Metodas 2.1.2.3).

2.2.3 kDNR sintezė ir tikro laiko PGR, tiriant mirtronines miRNR

Kad būtų išvengta užteršimo genomine DNR, visi trumpųjų (<200 nt) RNR frakcijos miRNR mėginiai veikiami DNaseI (ThermoFisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas.

miRNR kDNR sintezės ir tikro laiko PGR reakcijos vykdytos kaip ir 2.1.4.1 ir 2.1.4.2 metoduose, su keliais pakeitimais. Į reakciją buvo nešama 200 ng trumpųjų RNR (<200 nt) frakcijos, išgrynintos iš virškinimo sistemos audinių. Į tikro laiko PGR reakciją nešama neskiesta kDNR. Endogeninė kontrolė naudota RNU48 raiška. Pradmenys pateikiami lentelėse p13 ir p14.

2.3 Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su virškinimo ir šalinimo sistemos vėžinėmis ląstelėmis

2.3.1 Eukariotinių ląstelių linijos

HEK 293A - žmogaus embrioninės inkstų ląstelės;
Panc-1 - žmogaus kasos latako epitelinė karcinoma;
SU.86.86 - žmogaus kasos latako karcinoma; metastazė iš kepenų;
T3M4 - žmogaus kasos latako karcinoma; metastazė;
Caki-1 - žmogaus inkstų šviesių ląstelių karcinoma, metastazė iš odos;
786-O - žmogaus inkstų ląstelių adenokarcinoma;
HCT116 - žmogaus storosios žarnos karcinoma;
Kato III - žmogaus skrandžio karcinoma; metastazė iš limfmazgių.

2.3.2 Medžiagos eukariotinių ląstelių kultivavimui

RPMI 1640 – Roswell Park memorial Institute ląstelių auginimo terpė (ThermoFisher Scientific);
FBS – jaučio vaisiaus serumas (ThermoFisher Scientific);
Antibiotikai – 50 mg/ml penicilinas ir streptomocinas (ThermoFisher Scientific);
200mM L-Glutaminas (ThermoFisher Scientific);
Tripsinas (ThermoFisher Scientific);
PBS – ląstelių praplovimo buferis, pH=7,4, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄ (cheminiai reagentai iš Roth);
DMSO (Sigma);
Kultivavimo indai - 75cm² paviršiaus ploto flakonai, 21,2 cm² lėkštelės (Orange Scientific);
Sterilios 5 ml, 10 ml, 25 ml pipetės (Orange Scientific);
2ml kriogeniniai mėgintuvėliai (ThermoFisher Scientific).

2.3.3 Ląstelių linijų kultivavimas

Eukariotinės ląstelės auginamos RPMI 1640 terpėje su 10 % FBS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml ir 2 mM L-glutamino iki kol padengia 70-80% flakono auginimo paviršiaus ploto. Tada nuo flakono paviršiaus atkeliamos praplaunant PBS tirpalu ir užpylus 0,02 mM tripsino/0,4 mM EDTA tirpalu, inkubuojant 37°C temperatūroje 2-7 min. priklausomai nuo ląstelių linijos. Tripsinas inaktyvuojamas užpilant RPMI 1640 su serumu terpės, ląstelės nusodinamos centrifuguojant 1000 x g greičiu 5 min. kambario temperatūroje, suspenduojamos auginimo terpėje, skaičiuojamos ir persėjamos.

2.3.4 Ląstelių atšildymas/ užšaldymas

Ląstelės atšildomos jas laikant 2 min. 37°C temperatūros vandens vonelėje. Ląstelių suspensija pamažu sulašinama į 15 ml RPMI 1640 augimo terpės su priedais 75 cm² flakone ir auginamos 37°C temperatūroje ir 5% CO₂ bei 95% drėgmės atmosferoje. Praėjus 24 val. pakeičiama terpė.

Šaldant ląstelės nucentrifuguojamos ir suspenduojamos 10% DMSO jaučio vaisiaus serumo tirpale. Laikomos leduose, atšalusios išpilstomos į kriogeninius mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai laikomi -80°C temperatūroje, vėliau perkeliama į duiarą su skystu azotu ilgalaikiam saugojimui.

2.3.5 Ląstelių skaičiavimas

Ląstelės skaičiuojamos naudojant „CedexHires“ (Nexelom) ląstelių skaičiavimo aparatą. Ląstelių suspensija sumaišoma su 0,2 % tripano mėlynuoju dažu (Roche). Į gyvybingas ląsteles dažas nepatenka, o negyvybingos ląstelės nusidažo mėlynai. Automatiškai paskaičiuojamas gyvybingų ir negyvybingų ląstelių skaičius 1 ml suspensijose.

2.3.6 Mikoplazmos užkrato nustatymas

Naudojant mikoplazmai specifinius pradmenis GPO3 ir MGSO atliekama PGR. Pradmenys pateikiami lentelėje p15. Reakcijos tūris - 20 µL, vienai reakcijai naudojama 2 µL 10x DreamTaq buferio (ThermoFisher Scientific), 0,4 µL 10 mM dNTP (ThermoFisher Scientific), po 0,16 µL 100 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų, 0,2 µL 5 U/µL DreamTaq DNR polimerazės (ThermoFisher Scientific). Į PGR mišinį įdedama RPMI terpė, kurioje ląstelės yra kultyvuojamos. Reakcijos sąlygos: 1) 98°C 30s, 2) 98°C 10s 3) 58°C 15 s, 4) 72°C 45 s, 5) 72°C 5 min. 2-4 žingsniai kartojami 40 kartų. PGR produktai analizuojami 1% agaroziniame gelyje.

2.3.7 Transfekcija

Vektoriai, pcDNA3-SRSF1, pcDNA3-SRSF2, bei laukinio tipo ir mutacijas turintys vektoriai pcDNA3-DHX30, pcDNA3-PLEKHJ1, pcDNA3-MGAT4B, pcDNA3-NELFE, pcDNA3-ATG4D, pcDNA3-DDX5, pcDNA3-KHSRP, pcDNA3-CARL ir pcDNA3-RPL8 transfekuojami į eukariotines HCT116 storosios žarnos vėžio ląsteles naudojant Lipofectamine LTX ir PLUS reagentus (ThermoFisher Scientific). 24 val. prieš transfekciją užsėjama 0,9 mln. HCT116 ląstelių į 21,2 cm² lėkštutes. Paruošiamas transfekcijos mišinys - 3,5 µg plazmidinės DNR sumaišoma su 3,5 µl PLUS reagento ir praskiedžiama RPMI 1640 terpe be serumo iki 300 µl. Kitame mėgintuvėlyje 18 µl Lipofectamine LTX reagento praskiedžiama iki 300 µl

RPMI 1640 terpe be serumo. Mišiniai sumaišomi ir inkubuojami 5 min. kambario temperatūroje. Pakeičiama auginimo terpė ir transfekcijos mišinys sulašinamas ant HCT116 ląstelių. Ląstelės auginamos 24 val., tada terpė su transfekcijos mišiniu pakeičiama nauja. RNR bei baltymų raiška stebima praėjus 48 val. Atlikti mažiausiai trys nepriklausomi biologiniai pakartojimai.

2.3.8 RNR gryninimas iš ląstelių linijų

RNR iš ląstelių linijų buvo gryninama naudojant RNAzol RT (Molecular Research Center). Ląstelės lizuojamos 21,2 cm² auginimo flakonuose užpilant 2 ml RNAzol RT reagento, suspensija išpilstoma po 1 ml ir laikoma -20°C temperatūroje. Ląstelių lizatai atšildomi 37°C. Ant jų užpilama po 400 µl DEPC paveikto vandens, inkubuojama kambario temperatūroje 15 min., centrifuguojama 16000 x g greičiu 4°C temperatūroje 15 min. Po 1 ml supernatanto nusiurbiami į naujus mėgintuvėlius su 0,4 ml 75% etanolio, inkubuojama 4°C temperatūroje 10 min., tada centrifuguojama 12000 x g greičiu 4°C temperatūroje 8 min. Supernatantai (po 1 ml), kuriuose yra trumpųjų RNR (< 200 nt) frakcijos nusiurbiami į naujus mėgintuvėlius su 0,8 ml 100% izopropanolio, inkubuojami 4°C temperatūroje 30 min., tada centrifuguojami 12000xg greičiu 4°C temperatūroje 15 min. Kol supernatantai laikomi su izopropanoliu, susidariusios ilgųjų RNR (>200 nt) frakcijos nuosėdos 2 kartus praplaunamos 0,5 ml 75% etanolio centrifuguojant 8000xg greičiu 4°C temperatūroje 3 min. ir ištirpinamos RNazių neturinčiame vandenyje (ThermoFisher Scientific). Po centrifugavimo į nuosėdas iškritusios trumposios RNR 2 kartus praplaunamos 0,5 ml 70% izopropanoliu centrifuguojant 8000xg greičiu 4°C temperatūroje 3 min., tada ištirpinamos RNazių neturinčiame vandenyje (ThermoFisher Scientific), išpilstomos mažesniais kiekiais, užšaldomos skystame azote ir saugomos -80°C temperatūroje.

Išskiriamos dvi RNR frakcijos: iki 200 nt ir ilgesnės nei 200 nt. Trumpųjų RNR (<200nt) frakcija buvo naudojama mirtroninių miRNR atvirkštinei transkripcijos reakcijai ir tikro laiko PGR eksperimentams. Ilgųjų RNR (>200nt) frakcija – splaisingo efektyvumo nustatymui. Tikro laiko PGR eksperimentai atliekami kaip aprašyta metode 2.2.3

2.4 Medžiagos ir metodai naudoti, dirbant su *E.coli* bakterijomis

2.4.1 *E.coli* bakterijų kamienas

ER2267 genotipas: F' proA⁺B⁺ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::mini-Tn10 (Kan^R)/ Δ(argF-acZ)U169 glnV44e14⁻(McrA⁻) rfbD1? recA1 endA1 spoT1? thi-1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10

2.4.2 Medžiagos *E.coli* bakterijų kultyvavimui

LB terpė – 1% peptono (BD-Difto), 0,5% mielių ekstrakto (BD-Difto), 0,5% NaCl (Roth)

Agarizuota LB terpė – 2% agaru (BD-Difto), 1% peptono (BD-Difto), 0,5% mielių ekstrakto (BD-Difto), 0,5% NaCl (Roth)

Antibiotikai – Ampicilinas ir kanamicinas (Roth)

HMCK buferis – 10mM HEPES, 55mM MnCl₂, 15mM CaCl₂, 250mM KCl (cheminiai reagentai iš Roth);

2.4.3 Elektroforezės buferiai

Boratinis buferis, pH 8,2 - 100 mM H₃B₃O₃×NaOH (Amresco), 2 mM EDTA (Roth), 15 mM CH₃COOH (Roth);

5x TBE pH 8.3 - 54 g/L Tris-HCl (Roth), 27,5 g/L H₃B₃O₃×NaOH (Amresco).

2.4.4 Genų inžinerijos metodai, naudoti klonuojant genų dalis, kuriose lokalizuoti tiriami mirtronai

pSF2/ASF and pSC35 baltymo raiškos plazmidės buvo sukonstruotos dr. A. Kanopkos grupėje, ILBS, BTI. Sukonstruotų plazmidžių DNR nukleotidų sekos nustatytos Sekvenavimo centre, BTI. Genų inžinerijos metodams, jei neparašyta kitaip, naudoti „Thermo Fischer Scientific“ preparatai.

2.4.4.1 Genų fragmentų padauginimas

Pirmiausia buvo padauginami fragmentai, kuriuose lokalizuoti tiriami mirtronai, ir naudojant restriktazes klonuojami į pcDNA3 vektorius. Genų fragmentai, kuriuose yra tiriami mirtronai, padauginami vykdant PGR reakciją. Mirtroninė miR-1226 lokalizuota DHX30, miR-1227 - PLEKHJ1, miR-1229 – MGAT4B, miR-1236 – NELFE, miR-1238 – ATG4D, miR-3064 – DDX5, miR-3940 – KHSRP, miR-6515 – CARL, miR-6850 – RPL8 genų intronuose (p1 pav). DHX30 atveju padauginama sritis nuo 19 iki 21 egzono (padauginto fragmento ilgis – 578 bp), PLEKHJ1 - 5-7 egzono (fragmento ilgis – 401 bp, 7 egzone padauginama tik baltymą koduojančią dalis,

neįtraukiant 3' UTR sekos), MGAT4B – tarp 11-13 egzonų (fragmento ilgis – 427 bp), NELFE - tarp 3-4 egzonų (fragmento ilgis – 318 bp), ATG4D – tarp 7-9 egzonų (fragmento ilgis – 428 bp), DDX5 - tarp 10-12 egzonų (fragmento ilgis 1675 bp), KHSRP – tarp 13-15 egzonų (fragmento ilgis - 585 bp), CARL – tarp 5-7 egzonų (fragmento ilgis - 645 bp), RPL8 – tarp 2-4 egzonų (fragmento ilgis – 864 bp) (p1 pav.). Naudojami pradmenys, 5' gale turintys sekas, kurias atpažįsta HindIII arba EcoRI ir 3' gale esančias sekas, kurias atpažįsta BamHI, EcoRI arba NotI (p8 lentelė)

PGR reakcijos tūris – 50 µl, kiekvienai reakcijai naudojama 5 µl 1x High Fidelity polimerazės buferio, 5 µl 2 mM dNTP mišinio, po 2,5 µl 10 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų (Metabion), 2 µl 100ng/µl Jurkat ląstelių genominės DNR, 1 µl 1 vnt./µl Phusion High Fidelity DNR polimerazės. Reakcijos sąlygos: 1) 98°C 30 s, 2) 98°C 10 s 3) prilydimo temperatūra naudojama 5°C mažesnė už pradmenų lydymosi temperatūrą, 15 s, 4) 72°C 45 s, 5) 72°C 5 min. 2-4 žingsniai kartojami 40 kartų.

2.4.4.2 DNR išsodinimas

Gauti padauginti genų fragmentai išsodinami 4°C temperatūroje, centrifuguojant 16000 x g greičiu. Po PGR reakcijos mišiniai praskiedžiami vandeniu iki 200 µl ir sumaišoma su 200 µl fenolio-chloroformo mišinio (25:24) (Fluka), centrifuguojama 1 min. Susidariusios viršutinės frakcijos nusiurbiamos į naujus mėgintuvėlius, sumaišomos su 200 µl chloroformo (Fluka) ir 40 µl 3M CH₃COONa (Sigma), pH 5,2 ir centrifuguojama 1 min. Viršutinės frakcijos vėl nusiurbiamos, sumaišomos su 500 µl 96% etanolio (Vilniaus degtinė) ir 3 µl glikogeno, užšaldomos skystame azote 30 s ir centrifuguojamos 10 min. Iškritusios nuosėdos praplaunamos 200 µl 75% etanolio ir centrifuguojamos 5 min. Plovimas kartojamas 2 kartus. Po etanolio pašalinimo DNR nuosėdos džiovinamos 37°C temperatūroje 5 min. ir ištirpinamos 20-25 µl vandens. DNR koncentracija nustatoma naudojant NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific) spektrofotometrą.

2.4.4.3 DNR karpymas restrikcijos endonukleazėmis

2 µg DNR hidrolizė vykdoma naudojant restrikcijos endonukleazes 5' gale esančias sekas atpažįstančias HindIII ir EcoRI ir 3' gale esančias sekas atpažįstančias BamHI, EcoRI ir NotI. Reakcijos tūris – 20 µl, kiekvienai reakcijai naudojama 2 µl 10x Tango (R arba O) buferio, 2 µg DNR, po 1 µl 10 vnt./µl HindIII (EcoRI) ir 10 vnt./µl BamHI (EcoRI arba NotI) endonukleazių. Inkubuojama 37°C temperatūroje 1 val., inaktyvacija vykdoma 80°C

temperatūroje 20 min. Sukarpyti produktai išfrakcionuojami agaroziniame gelyje ir gryninami.

2.4.4.4 DNR gryninimas iš agarozinio gelio

DNR elektroforezė agaroziniame gelyje vykdoma horizontaliame elektroforezės aparate. Naudojamas 1-1,5% agarozinis gelis ir boratinis buferis. DNR mėginiai paruošiami juos sumaišius su DNR užnešimo dažu santykiu 1:6, užnešami į agarozinio gelio šulinėlius ir frakcionuojami. DNR fragmentų dydžiui nustatyti naudojami GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder ir GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder molekulinės masės žymenys. Po elektroforezės išfrakcionuoti DNR fragmentai išryškunami agarozinį gelį laikant 2 µg/ml etidžio bromido tirpale 20 min. ir gryninami naudojant Gene JET Gel Extraction Kit pagal gamintojo rekomendacijas.

2.4.4.5 DNR fragmentų susiuvimas

Padauginti DNR fragmentai susiuvami su klonavimo vektoriumi pcDNA3. Bendras reakcijos tūris – 20 µl. Kiekvienai reakcijai naudojama 2 µl 10x T4 DNR ligazės buferio, pcDNA3 ir/arba DNR fragmentai, 1 µl 5 vnt./µl T4 DNR ligazės. Jei siuvami lipnūs galai, reakcija vykdoma kambario temperatūroje 15 min., jei buki – 60 min. Fermentas inaktyvuojamas 70°C temperatūroje 5 min. Pusė reakcijos mišinio naudojama *E. coli* ER2267 imliųjų ląstelių transformacijai.

2.4.4.6 Imliųjų ląstelių paruošimas ilgalaikiam saugojimui

Imliosios *E. coli* ER2267 kamieno ląstelės biologine kilpele atbraukomos ant agarizuota LB terpe užpiltos lėkštelės ir auginamos per naktį 37°C termostate. Parenkamos atsitiktinės išaugusių bakterijų kolonijos ir atbraukomos ant agarozuots LB terpės. Kitą dieną bakterijų biomasė perkeliama į 250 mL LB terpę. Auginama purtyklėje 210 RPM greičiu 16°C temperatūroje, kol terpės optinis tankis ties 600 nm banga pasiekia 0,6. Užaugusi biomasė surenkama centrifuguojant 1500 x g greičiu 10 min. 4°C temperatūroje. Biomasės nuosėdos suspenduojamos 80 mL steriliame, ledo šaltumo HMCK buferyje ir inkubuojamos 10 min. ledo vonioje. Ląsteles centrifuguojamos taip pat kaip praeitame žingsnyje ir suspenduojamos 20 mL HMCK buferyje. Į suspensiją įdedama DMSO, kad galutinė koncentracija tirpale būtų 7%, inkubuojama 10 min. ledo vonioje ir šaltame kambarielyje išpilstoma į sterilius 1,5 mL mėgintuvėlius, užšaldoma skystame azote ir laikoma -80°C šaldiklyje.

2.4.4.7 *E. coli* imliųjų ląstelių transformacija

Vektorių padauginimui 200 μ l imliųjų *E. coli* ER2267 kamieno ląstelių suspenduojamos su puse tūrio susiuvimo mišinio, inkubuojama ledo vonelėje 25 - 30 min., tada 1,5 min. laikoma 42°C temperatūros vandens vonelėje ir vėl inkubuojama 2 min. lede. Į mėgintuvėlį su ląstelių mišiniu įpilama apie 1 ml LB terpės ir inkubuojama 37°C temperatūroje 1 - 1,5 val. Po inkubacijos ląstelės išsėjamos ant agarizuotos LB terpės lėkštelėse su 100 μ g/ml ampicilino ir 15 μ g/ml kanamicino, auginamos 37°C temperatūroje per naktį.

2.4.4.8 Diagnostinė PGR

Po imliųjų ląstelių transformacijos atliekama diagnostinė PGR, taip atrenkant *E. coli* bakterijų kolonijas, į kurias buvo sėkmingai buvo transformuoti vektoriai, turintys genų fragmentus. Bakterijų biomasė imama nuo vienos izoliuotos kolonijos ir dedama į PGR reakcijos mišinį. Bendras reakcijos tūris – 15 μ l. Kiekvienai reakcijai naudojama 1,5 μ l 10x Taq buferio be MgCl₂, 0,9 μ l 25mM MgCl₂, 1,5 μ l 20 mM dNTP mišinys, po 0,15 μ l 100 μ M atvirkštinio ir tiesioginio pradmenų, 0,15 μ l 5 vnt./ μ l Taq DNR polimerazės. Reakcija vykdyta kaip metode 2.9.2.1. Pradmenys pateikiami p16 lentelėje.

2.4.4.9 Plazmidinės DNR išskyrimas

Po transformacijos atrinktos *E. coli* kolonijos užsėjamos į 5 ml LB terpės su 100 μ g/ml ampicilino ir auginamos 37°C temperatūros purtyklėje 14-16 val. Ląstelių biomasė surenkama centrifuguojant 1 min. maksimaliu greičiu kambario temperatūroje. Plazmidinė DNR skiriama iš surinktos bakterijų biomasės. Išskyrimui naudojamas Gene JET Plasmid Miniprep rinkinys, remiantis gamintojo rekomendacijomis.

2.4.4.10 Tikslinių mutacijų konservatyvose srityse įvedimas

Naudojant pradmenis, su pakeistu nukleotidu, vieno apsisukimo PGR metodu į plazmidės įvedamos dvi tikslinės mutacijos tiriamo introno 5' ir 3' konservatyvose splaisingo srityse, egzono – introno riboje. Nukleotidų pakeitimai vykdomi dvejomis stadijomis, pirmiausia pakeičiant 5' gale esantį konservatyvios introno srities GT guanino nukleotidą į citozino nukleotidą. Antros stadijos metu – 3' gale konservatyvios srities AG guanino nukleotidą pakeičiant į citoziną. Po kiekvienos mutacijos įvedimo prie linijinės plazmidės buvo prikabinama fosfato grupė, plazmidės 5' ir 3' galai susiuvami tarpusavyje ir transformuojamos į *E. coli* ER2267 ląsteles. Naudojami metodai analogiški 2.4.4.1-2.4.4.9. Pradmenys pateikiami p9 ir p10 lentelėse.

Padaugintos ir išgrynintos plazmidės transfekuojamos į HCT116 ląsteles (metodas 2.3.7), tiriamas splaisingo efektyvumas ir galimų mirtroninių miRNR raiška (metodas 2.2.3).

2.4.4.11 Splaisingo efektyvumo nustatymas

Ar į vektorius įvedus mutacijas vyksta tiriamų DHX30, PLEKHJ1, MGAT4B, NELFE, ATG4D, DDX5, KHSRP, CARL, RPL8 genų fragmentų, kuriuose yra tiriami mirtronai, splaisingas buvo nustatyta kokybiniu PGR metodu. Po atvirkštinės transkripcijos reakcijos (Metodas 2.1.4.1) vykdoma kokybinė PGR reakcija. Reakcijos mišinį sudarė 5 µl 10x TrueStart Hot Start Taq polimerazės buferio, 5 µl 2 mM dNTP mišinio, 3 µl 25mM MgCl₂, po 1 µl tiesioginio ir atvirkštinių pradmenų, 0,25 µl TrueStart Hot Start Taq DNR polimerazė (karšto starto polimerazė), 10 µl 10 kartų skiestos ilgųjų frakcijos kDNR. Reakcijos sąlygos: 1) 98°C 1 min., 2) 98°C 30 s 3) prilydimo temperatūra naudojama 5°C mažesnė už pradmenų lydymosi temperatūrą, 30 s, 4) 72°C 45 s, 5) 72°C 5 min. 2-4 žingsniai kartojami 20 kartų. Padauginti produktai atskiriami 1% agaroziniame gelyje ir įvertinami fragmentų ilgai. TBP geno raiška buvo naudojama kaip endogeninė kontrolė (p11 lentelė).

2.5 Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta naudojant t-testą statistikos programose „SigmaPlot11“ arba GraphPad v6.0. Duomenys laikomi patikimais, kai $p \leq 0,05$.

3. REZULTATAI

3.1 Visuminių miRNR raiškos pokyčių audinyje ir kraujo plazmoje, susiformavus krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai, identifikavimas

Iki šiol miRNR kiekis krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos (disertacijoje naudojamas sutrumpinimas KAA arba tiesiog kylančiosios aortos aneurizma) audiniuose buvo tirtas tikro laiko PGR metodu ir miRNR gardelėmis (11-13). Visuminiai miRNR sekoskaitos tyrimai KAA audiniuose nebuvo atlikti, nors tokiu būdu gali būti identifikuojamos naujos iki šiol kylančiosios aortos aneurizmoje netirtos miRNR. Be to šiuo metodu yra nustatomi visi miRNR izomirai bei efektyviai detektuojamos tos miRNR, kurių raiška mėginyje yra žema (229,230). Taip pat siekdami nustatyti, ar esant kylančiosios aortos aneurizmai iš audinio į kraują patenka miRNR, atlikome ne tik audinių, bet ir kraujo plazmoje cirkuliuojančių miRNR sekoskaitą. Naujos identifikuotos cirkuliuojančios miRNR ateiptyje gali būti naudojamos kaip biožymenys šios ligos nustatymui.

Žinoma, kad KAA yra skirstoma į sindromines formas (Marfano, Loeys–Dietz, Shprintzen–Goldberg, Ehlers–Danlos sindromai), šeimyninę nesindrominę ir atsitiktinę. Sindrominės KAA formos išsivysto dėl genų mutacijų ir tarpusavyje yra labai skirtingos (8). Savo tyrimams pasirinkome tik atsitiktinę KAA formą, kuri retai yra siejama su genų mutacijomis ir nėra aišku, kokios priežastys lemia šios aneurizmos atsiradimą (10).

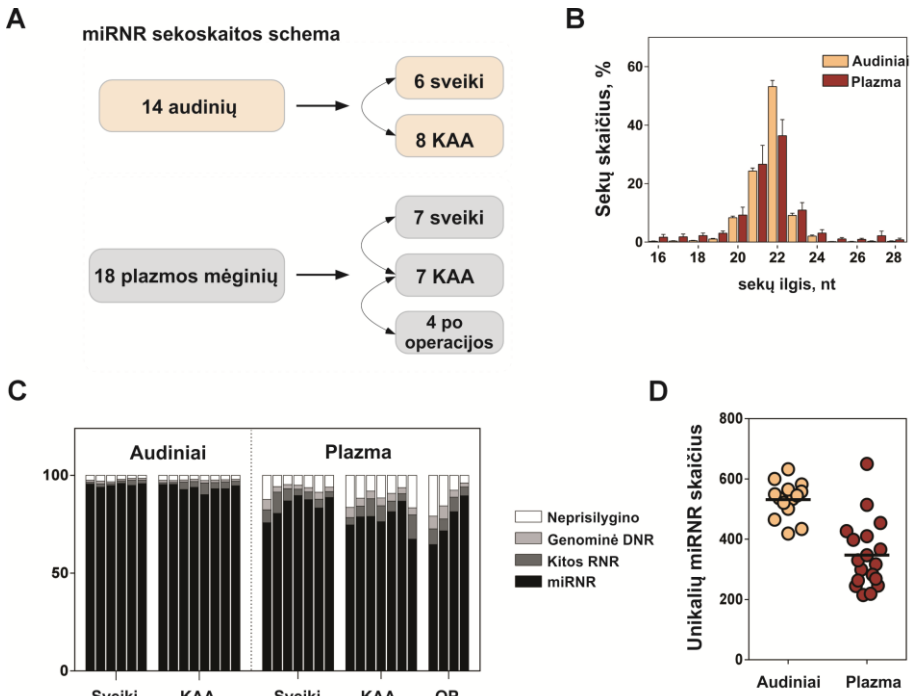
Siekdami nustatyti visuminius miRNR profilio pokyčius atsitiktinės KAA audiniuose bei kraujo plazmoje, visumine sekoskaita naudodami Illumina sekoskaitos platformą išanalizavome 14 KAA audinių bei 18 plazmos mėginių. Sekoskaitos schema pateikiama 3.1 pav. A.

Svarbu pabrėžti, kad šio tyrimo metu buvo tiriamas išorinis, stipriausiai ligos pažeistas ir labiausiai išsiplėtęs krūtinės kylančiosios aortos radiusas. Kontroliniai sveiki aortos audiniai buvo surinkti iš širdies donorų aortos sienos fragmentų, likusių po širdies transplantacijos (n=4), bei iš aortos sienos fragmentų, „išmuštų“ iš aortos sienos pritvirtinant aortos ir vainikinių arterijų jungtį (AVAJ) (n=2). Kontrolinė plazmos mėginių grupė buvo surinkta iš sveikų pacientų, kai echoskopijos metu nebuvo nustatyti pakitimai kylančiojoje aortoje (n=7). Iš dalies šių pacientų, norint nustatyti, kaip pasikeičia miRNR raiškos profilis plazmoje po aneurizmos audinio pašalinimo, plazmos mėginiai buvo surinkti praėjus 3 mėnesiams po

operacijos (n=4). Demografiniai pacientų, kurių audiniai bei kraujo plazma buvo naudoti sekoskaitai, duomenys pateikiami p1 lentelėje.

Nors miRNR audiniuose yra gana stabili (231), siekdami išvengti ilgųjų RNR degradacijos sekų sekoskaitos metu, įvertinome RNR, išgrynintos iš audinių, kokybę (Metodai 2.1.1 ir 2.1.2.3). Išgrynintos iš KAA audinių RIN reikšmė svyravo nuo 6,8 iki 7,9. Didesnė RIN reikšmės variacija stebėta RNR, išgrynintos iš sveikų aortos audinių, atveju - RIN svyravo nuo 6,0 iki 8,2, išskyrus vieną audinį, kai RIN reikšmė buvo nukritusi iki 4,2 (p3 lentelė). Taigi, didžioji dalis RNR mėginių, išgrynintų iš KAA ir sveikų audinių, pasižymėjo aukšta kokybe ir buvo tinkami sekoskaitai.

Svarbu pabrėžti, kad kraujo plazmos mėginiai buvo renkami laikantis aukštų kraujo surinkimo bei plazmos atskyrimo nuo kitų kraujo sudedamųjų



3.1 pav. miRNR sekoskaitos duomenų analizė. A) miRNR visuminės sekoskaitos schema; B) miRNR sekų kiekis, priklausomai nuo ilgio, audinių ir plazmos mėginiuose; C) 16-28 nukleotidų ilgio sekų prisilyginimas prie RNR ar DNR, audinių ir plazmos mėginiuose. Sekos, neprisilyginusios prie žmogaus geno, žymimos – neprisilygino; D) Unikalių miRNR skaičius aortos ir plazmos mėginiuose. Po operacijos/OP – žymimi pacientai, iš kurių kraujas paimtas praėjus 3 mėnesiams po operacijos. KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma.

dalių reikalavimų (Metodas 2.1.1). Sekoskaitai pasirinkti tik tie mėginiai, kai hemoglobino sugertis ties 414 nm, buvo mažesnė už 0,2, bei eritrocitams specifinių mir-16-5p bei mir-451a slenkstinio ciklo (Ct) vertės buvo žemesnės nei 19 ir 22 atitinkamai, kas rodo, kad plazmos atskyrimo metu, neįvyko eritrocitų hemolizė ir į plazmą nepateko miRNR iš eritrocitų (p2 lentelė) (analizę atliko dr. V. Stankevičius, DNMTS, BTI).

Iš viso visuminės sekoskaitos metu buvo gauta 69.1 milijonai sekų, kurios pasižymėjo aukšta nukleotidų identifikavimo kokybe (miRNR sekoskaitos duomenų bioinformatinę analizę atliko dr. R. Ražanskas, EGIS, BTI). Audinių atveju vienam mėginiui teko nuo 1.5 to 3.7 milijonų sekų, plazmos - nuo 1.0 iki 2.5 milijonų. 94% sekų, gautų iš KAA ir sveikų aortos audinių miRNR sekoskaitos bibliotekų, prisilygino su žinomomis miRNR sekomis, pateiktomis miRBase v22 duomenų bazėje (232). Plazmos atveju, kai mėginyje yra itin mažas kiekis miRNR, taip pat pavyko puikiai gauti aukštos kokybės sekoskaitos bibliotekas – net 80% sekų prisilygino prie subrendusių miRNR sekų. Likusios 20% sekų daugiausia persidengė su genomine žmogaus DNR, ribosominėmis, transportinėmis ir ilgosiomis nekoduojančiomis RNR (3.1 pav. C). Nustatėme, kad plazmoje yra daugiau trumpesnių ir ilgesnių nei standartinio 22 nt ilgio cirkuliuojančių miRNR. Tai rodo, kad plazmoje sutinkama daugiau izomirų - miRNR dalinai „nugrauziama“ iš 3' galo arba priešingai yra papildomai pridedama nukleotidų (3.1 pav. B). Taip pat nustatėme, kad aortos audinyje iš viso vidutiniškai yra sintetinosios 531±60, kraujo plazmoje šiek tiek mažiau - 332±95 unikalios miRNR (3.1 pav. D).

Siekdami įvertinti miRNR raiškos skirtumus KAA audiniuose analizę vykdėme tik su miRNR, kurių vidutinis sekų skaičius mėginyje buvo didesnis nei 10. Tokiu būdu atmetėme tas miRNR, kurių ląstelėse yra mažai, jų raiška varijuoja tarp mėginių ir sunku identifikuoti tokių miRNR įtaką bei reikšmę ląstelės procesams. Identifikavome 20 miRNR, kurių raiška skiriasi KAA audiniuose, lyginant su sveikais aortos audiniais (3.2 pav., 3.1 ir 3.2 lentelės).

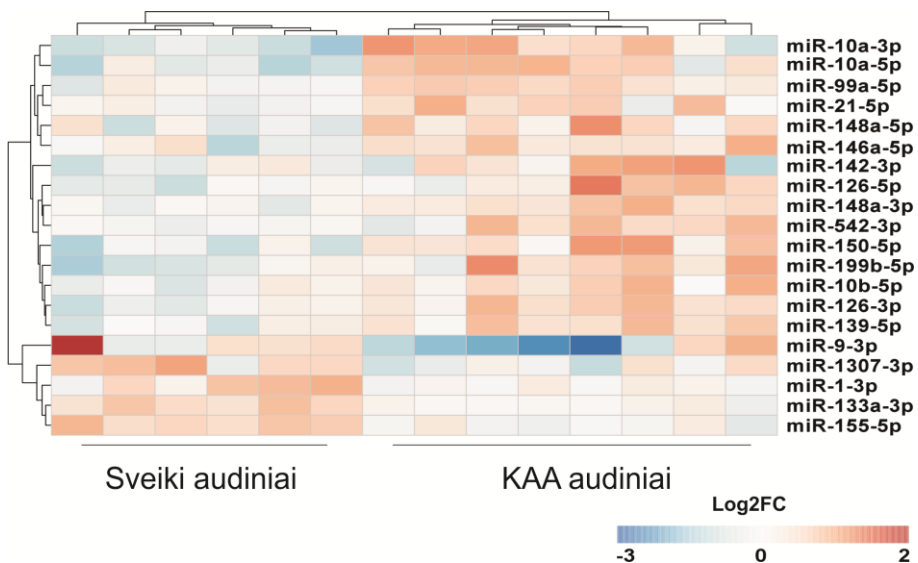
Norint palyginti miRNR raiškos profilius kraujo plazmoje, buvo atlikta trijų tipų analizė: 1) KAA pacientų ir kontrolinių sveikų pacientų grupės; 2) KAA pacientų ir KAA pacientų, praėjus 3 mėn. po operacijos grupės; 3) KAA pacientų ir grupės, gautos apjungus abi kontrolines grupes kontrolinių sveikų pacientų grupę ir KAA grupę, praėjus 3 mėn. po operacijos. Dėl didelės miRNR sekų skaičiaus variacijos tarp pacientų, analizę vykdėme pasirinkdami miRNR, kurių vidutinis sekų skaičius mėginyje buvo didesnis nei 20. Toks kiekis leido patikimiau identifikuoti miRNR plazmoje, o efektyvi detekcija yra būtina norint naudoti miRNR kaip biožymenis.

3.1 lentelė. miRNR sekoskaita nustatytas statistiškai patikimai pakitusių miRNR kiekis. Statistiškai patikimu laikytas pokytis, kai raiška didėja/mažėja >1.5 , $p<0.05$, kai miRNR vidutinis sekų skaičius mėginyje daugiau nei 10.

Grupės	miRNR skaičius	Padidėjusi raiška	Sumažėjusi raiška
<i>Audiniai</i>			
KAA vs Sv	20	15	5
<i>Plazma</i>			
KAA vs Sv	14	3	11
KAA vs Op	6	4	2
KAA vs SV+Op	10	2	8

3.2 lentelė. miRNR, kurių raiška pakitusi KAA audiniuose, lyginant su sveikomis aortomis, sąrašas. Statistiškai patikimu laikytas pokytis, kai raiška didėja/mažėja >1.5 , kai $p<0.05$, kai miRNR vidutinis sekų kiekis daugiau nei 10. KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma.

Nr.	miRNR	Pokytis kartais	P reikšmė
Padidėjusi raiška			
1	hsa-miR-10a-3p	2,69	2,05E-06
2	hsa-miR-10a-5p	2,45	8,63E-07
3	hsa-miR-150-5p	2,21	2,05E-05
4	hsa-miR-199b-5p	2,12	1,19E-04
5	hsa-miR-126-5p	1,89	7,95E-04
6	hsa-miR-126-3p	1,88	2,10E-05
7	hsa-miR-139-5p	1,74	7,22E-04
8	hsa-miR-148a-3p	1,71	3,44E-05
9	hsa-miR-10b-5p	1,70	7,78E-04
10	hsa-miR-148a-5p	1,70	0,0112
11	hsa-miR-99a-5p	1,68	1,76E-05
12	hsa-miR-21-5p	1,67	1,10E-03
13	hsa-miR-146a-5p	1,67	0,002
14	hsa-miR-142-3p	1,66	0,020
15	hsa-miR-542-3p	1,64	0,009
Sumažėjusi raiška			
16	hsa-miR-1-3p	-1,59	0,001
17	hsa-miR-133a-3p	-1,64	2,96E-07
18	hsa-miR-1307-3p	-1,68	0,011
19	hsa-miR-9-3p	-1,79	0,021
20	hsa-miR-155-5p	-1,88	7,34E-08



3.2 pav. miRNR raiškos analizė KAA audiniuose. KAA audiniuose iš viso identifiukuotos 20 statistiškai patikimai pakitusių miRNR. Pokytis kartais >1.5 , $p < 0.05$, analizuojamų miRNR vidutinis sekų kiekis >10 . Raudona spalva žymi išaugusią miRNR raišką, mėlyna – sumažėjusią (pokyčio kartais logaritmas). KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma.

Iš viso trijose skirtingose palyginimo grupėse buvo nustatyta 17 miRNR, kurių kiekis mažėjo arba didėjo kraujo plazmoje, išsivysčius KAA. Pacientuose esant KAA, lyginant su kontroline sveikų pacientų grupe, keitėsi 14 miRNR raiška. O praėjus 3 mėnesiams po KAA išpjovimo operacijos kito šešių miRNR kiekis (3.1 ir 3.3 lentelės, 3.3 pav. A.). Svarbu pabrėžti, kad trijų iš šių miRNR, miR-1255b-5p, miR-122-3p ir miR-23b-5p kiekis beveik sugrįžo į sveikuose pacientuose esantį raiškos lygį (3.3 pav. D). Siekdami identifiukuoti miRNR, kurių raiška reikšmingiausiai keitėsi, analizę atlikome lygindami su grupe, gauta apjungus abi kontrolines grupes. Nustatėme, kad stipriausiai šioje grupėje mažėjo miR-122-3p raiška (3.3 lentelės).

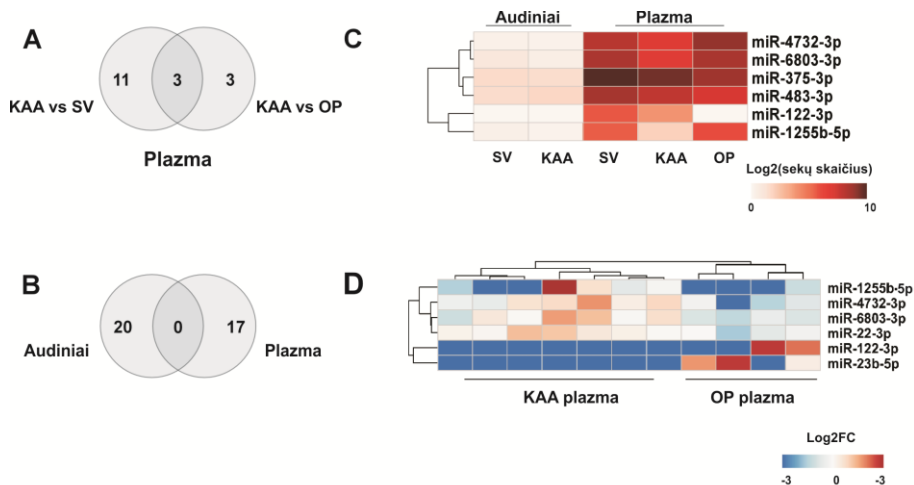
Svarbu pažymėti tai, kad nė viena bendra miRNR, kurios kiekis keitėsi ir KAA audiniuose, ir plazmoje, esant KAA, nebuvo nustatyta (3.3 pav. B). Dar daugiau miR-122-3p, kurios kiekis stipriausiai mažėjo, miR-1255b-5p, kurios kiekis stipriausiai didėjo, bei kitos keturios miRNR miR-4732-3p, miR-6803-3p, miR-375-3p ir miR-483-3p buvo labai silpnai ekspresuojamos KAA audiniuose (3.3 pav. C). Tikėtina, kad šios miRNR patenka į kraują iš kitų organų, kaip sisteminis atsakas į ligą (233). Taip pat įdomu paminėti, kad miR-6803-3p – tai mirtroninė miRNR, kilusi iš 5' tipo mirtronų. Šios miRNR raiška didėja, praėjus 3 mėnesiams po operacijos. Sunku identifiukuoti, kaip ši

mirtroninė miRNR ir dėl kokios priežasties patenka į kraujo plazmą. Visgi, neseniai nustatyta, kad miR-6803-5p, bręstanti iš tos pačios pri-miRNR kaip ir miR-6803-3p, yra detektuojama kraujo serume ir yra puikus biožymuo galintis identifikuoti būsimą insultą (234). Taip pat manoma, kad net 30% cirkuliuojančių kraujo plazmoje miRNR gali kilti iš mirtronų (235).

3.3 lentelė. miRNR, kurių raiška pakitusi KAA plazmos mėginiuose, lyginant su sveikomis kontrolėmis, sąrašas. Statistiškai patikimu laikytas pokytis, kai raiška didėja/mažėja >1.5 , kai $p \leq 0.05$, kai miRNR vidutinis sekų kiekis daugiau nei 20. KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma. OP – žymimi pacientai, iš kurių kraujas paimtas praėjus 3 mėnesiams po operacijos.

Grupė	Nr.	miRNR	Regulacija	Pokytis kartais	P reikšmė
KAA vs SV	1	hsa-miR-146b-3p	didėja	9,11	0,044
	2	hsa-miR-1255b-5p	didėja	8,87	0,015
	3	hsa-miR-889-3p	didėja	7,95	0,047
	4	hsa-miR-375-3p	mažėja	-2,38	0,036
	5	hsa-miR-30a-5p	mažėja	-2,54	0,033
	6	hsa-miR-483-3p	mažėja	-2,68	0,015
	7	hsa-miR-23b-3p	mažėja	-2,79	0,017
	8	hsa-miR-140-3p	mažėja	-4,01	0,010
	9	hsa-miR-100-5p	mažėja	-9,17	0,003
	10	hsa-miR-145-5p	mažėja	-17,36	1,44E-04
	11	hsa-miR-143-3p	mažėja	-17,74	3,27E-05
	12	hsa-miR-23b-5p	mažėja	-24,93	0,013
	13	hsa-miR-122-3p	mažėja	-69,32	3,31E-04
	14	hsa-miR-34a-5p	mažėja	-71,95	4,01E-05
KAA vs Op	1	hsa-miR-1255b-5p	didėja	9,7203	0,045
	2	hsa-miR-4732-3p	didėja	3,9801	0,050
	3	hsa-miR-6803-3p	didėja	3,4495	0,011
	4	hsa-miR-22-3p	didėja	2,5198	0,029
	5	hsa-miR-122-3p	mažėja	-18,4085	0,024
	6	hsa-miR-23b-5p	mažėja	-44,7992	0,001
KAA vs SV ir Op	1	hsa-miR-1255b-5p	didėja	11,68	0,004
	2	hsa-miR-22-3p	didėja	1,73	0,034
	3	hsa-miR-375-3p	mažėja	-2,12	0,049
	4	hsa-miR-483-3p	mažėja	-2,29	0,035
	5	hsa-miR-23b-3p	mažėja	-2,36	0,024
	6	hsa-miR-143-3p	mažėja	-3,83	0,012
	7	hsa-miR-145-5p	mažėja	-4,83	0,019
	8	hsa-miR-23b-5p	mažėja	-29,67	0,003
	9	hsa-miR-34a-5p	mažėja	-48,62	6,26E-05
	10	hsa-miR-122-3p	mažėja	-53,67	2,31E-04

Taigi, visumine sekoskaita identifikavome 20 miRNR, kurių raiška skiriasi KAA audiniuose, lyginant su sveikais aortos audiniais bei 17 miRNR, kurių raiška skiriasi kraujo plazmoje išsivysčius KAA, lyginant su sveikomis kontrolėmis. Bendra miRNR, kurios raiška keičiasi ir audiniuose, ir kraujo plazmoje, susiformavus KAA, nebuvo nustatyta.



3.3 pav. miRNR raiškos analizė KAA audinių bei plazmos mėginiuose. Veno diagrama rodo: **A)** statistiškai patikimai pakitusių miRNR skaičių KAA plazmoje skirtingose palyginimo grupėse. Pokytis kartais >1.5 , $p \leq 0.05$, analizuojamų miRNR vidutinis sekų kiekis >20 ; **B)** bendrą miRNR, kurių raiška pasikeitė ir audinyje, ir plazmoje skaičių. **C)** miRNR raiškos žemėlapis nurodantis šešias miRNR, kurių kiekis pakito plazmos mėginiuose, bet nebuvo detektuotos audiniuose. Raudonos spalvos intensyvumas nurodo miRNR normalizuotų sekų skaičių mėginiuose logaritmą; **D)** miRNR raiškos žemėlapis nurodantis šešias miRNR, kurių kiekis pasikeitė, praėjus 3 mėnesiams po KAA operacijos. KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma. OP – žymimi pacientai, iš kurių kraujas paimtas praėjus 3 mėnesiams po operacijos.

3.2 Sekoskaitos būdu nustatytų miRNR raiškos pokyčių patvirtinimas didesnėje pacientų imtyje tikro laiko PGR metodu

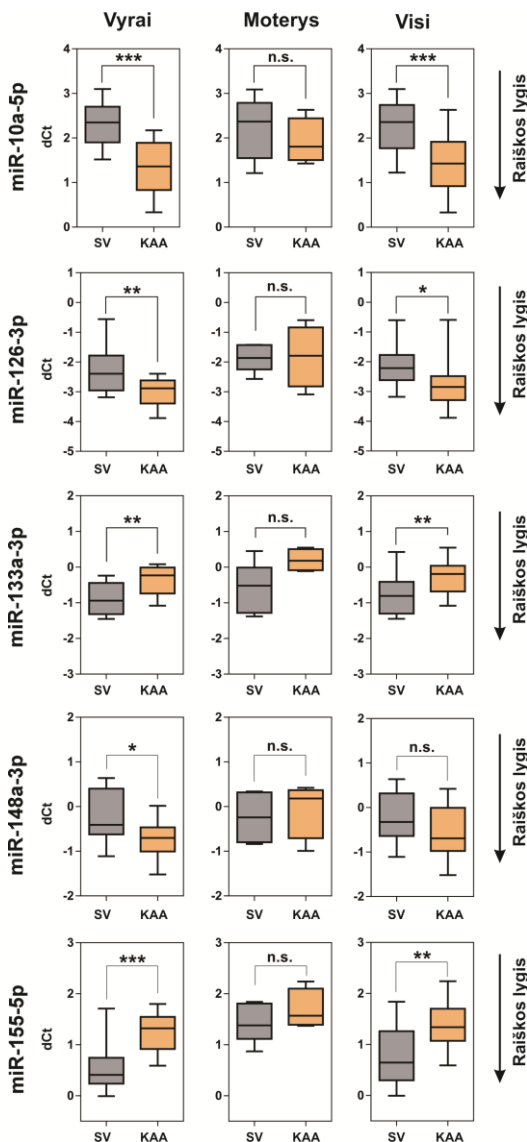
Tiriant audinius bei kraujo plazmos mėginius, dėl gana didelės duomenų variacijos, būtina raiškos pokyčius patvirtinti kuo didesnėje pacientų imtyje. Kadangi sekoskaita buvo vykdyta ribotoje mėginių imtyje, todėl toliau pasirinktų miRNR raišką tikro laiko PGR metodu patikrinome 37 audiniuose (20 kontrolinių ir 17 KAA audinių) bei 62 kraujo plazmos mėginiuose (34 kontroliniai ir 28 KAA plazmos mėginiai). Demografiniai pacientų duomenys pateikiami p4 lentelėje.

Taip pat svarbu paminėti, kad visumine sekoskaita identifikuoti miRNR raiškos skirtumai priklauso nuo duomenų normalizacijos būdo bei jų analizės metu taikomų bioinformatinių algoritmų. Tuo tarpu tikro laiko PGR metodu kiekio skirtumai dažniausiai identifikuojami juos normalizuojant su endogeninės RNR, kurios kiekis nesikeičia tarp tiriamų mėginių, raiška. Dėl skirtingų normalizacijos būdų, sekoskaitos duomenys nevisada koreliuoja su tikro laiko PGR metodu nustatytais skirtumais (236). Taigi, miRNR raiškos pokyčių, identifikuotų visumine sekoskaita, patvirtinimas tikro laiko PGR metodu leidžia užtikrinti, kad šios miRNR kiekis lastelėje tikrai keičiasi.

Taigi, siekdami tikro laiko PGR metodu tiksliai įvertinti miRNR raišką didesnėje mėginių imtyje pirmiausia identifikavome trumpąją RNR, kuri gali būti naudojama, kaip nekintanti endogeninė RNR, tiriant audinius ar kraujo plazmą, išsivysčius KAA. Netinkamai parinkta kontrolinė RNR, lemia klaidingus rezultatus. Su didžiausiomis problemomis susiduriama, dirbant su kraujo plazmos arba serumo mėginiais (237). Iš visuminės sekoskaitos duomenų nustatėme, kad miR-152-3p raiška mažiausiai varijuoja tarp sveikų ir KAA audinių. Taip pat, miR-185-3p kiekis mažiausiai kito tarp sveikų ir KAA plazmos mėginių. Taigi, toliau eksperimentuose kaip endogenines kontroles tiriant audinių ir plazmos mėginius naudojome miR-152-3p ir miR-185-3p, atitinkamai.

Tolimesniems miRNR raiškos tyrimams KAA audiniuose pasirinkome miR-10a-5p, kurios raiška stipriausiai didėjo KAA audiniuose, lyginant su sveikais audiniais (3.2 lentelė). Taip pat su TGF- β signaliniu keliu susijusias miR-155-5p, miR-148a-3p bei miR-133a-3p (žiūrėti skyrelį 3.3), bei miR-126-3p, vieną iš pagrindinių literatūriniais duomenimis su KAA susietų miRNR (13). miR-148a-3p ir miR-10a-5p raiškos skirtumai iki šiol nebuvo identifikuoti KAA audiniuose.

Nustatėme, kad analizuojant visą mėginių imtį statistškai patikimai kito miR-10a-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p ir miR-155-5p raiška (3.4 pav). Tuo tarpu, miR-148a-3p kiekis patikimai didėjo tik tarp vyriškos lyties pacientų (13 sveikų ir 13 KAA audinių). Taip pat, miR-126-3p ($p=0.0062$ ir $p=0.0225$) ir miR-155-5p ($p=0.0003$ ir $p=0.0017$) pokyčiai buvo labiau statistškai patikimi vyriškos lyties pacientų KAA audiniuose, nei bendroje, pagal lytį neišskirstytoje, imtyje. Dėl nedidelio moterų audinių skaičiaus (7 sveiki ir 4 KAA audiniai) tolimesni tyrimai, kurie leistų patikimiau identifikuoti skirtingą miRNR raišką priklausomai nuo lyties turėtų būti atlikti praplėtus moterų pacienčių skaičių.



3.4 pav. miR-10a-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-148a-3p ir miR-155-5p raiška KAA audiniuose, priklausomai nuo pacientų lyties. Pateikiamas slenkstinio ciklų verčių skirtumas (dCt), duomenis normalizuojant su miR-152-3p Ct reikšmėmis. Kuo didesnis verčių skirtumas, tuo mažiau miRNR mėginyje. Linijos grafikuose nurodo vidurkio reikšmę, paklaidos rodo – 5 ir 95 duomenų percentilius. Pokytis kartais žymimas n.s. – statistškai nepatikimas; * p<0.05; ** p<0.01 ir * p<0.001. SV - sveiki aortos audiniai, KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma.**

Taip pat, toliau atlikome koreliacinę skirtingų miRNR raiškos tame pačiame mėginyje analizę. Nustatėme, kad miR-126-3p raiška yra biologiškai susijusi su miR-148a-3p ($R=0.67$) bei miR-10a-5p ($R=0.67$), miR-148a-3p - su miR-10a-5p ($R=0.49$), miR-133a-3p - su miR-155-5p raiška ($R=0.67$) (p5 lentelė).

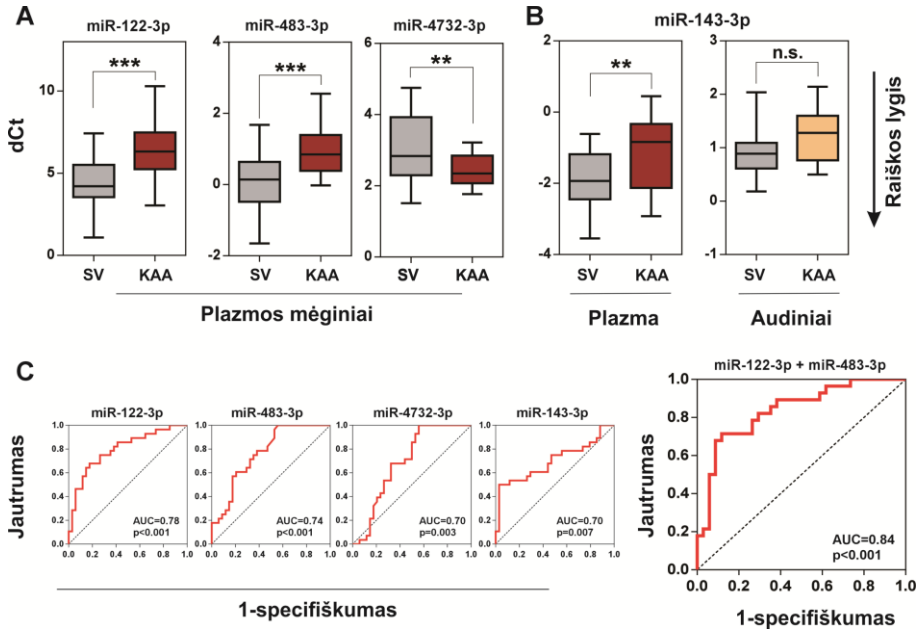
Taigi, nustatėme, kad miR-148a-3p raiška KAA audiniuose statistiškai patikimai išauga tarp vyriškos lyties pacientų. miR-126-3p, miR-155-5p, miR-10a-5p bei miR-133a-3p reikšmingai keičiasi KAA audiniuose, analizę vykdant bendroje, pagal lytį neišskirstytoje, pacientų imtyje, tačiau miR-126-3p ir miR-155-5p atvejais statistiškai patikimesnis skirtumas identifikuojamas tarp vyriškos lyties pacientų.

Tyrimams didesnėje kraujo plazmos mėginių imtyje tirti pasirinkome miR-122-3p, kurios raiška stipriausiai mažėjo, kraujo plazmoje, esant KAA. Taip pat tyrėme ir miR-143-3p vieną pagrindinių miRNR, kurios kiekio pokyčiai KAA audiniuose lemia aneurizmos vystymąsi (190), bei miR-483-3p ir miR-4732-3p, kurios kiekis stipriai išaugo plazmoje praėjus 3 mėnesiams po operacijos (3.3 lentelė). Svarbu paminėti, kad miR-122-3p, miR-483-3p ir miR-4732-3p buvo silpnai ekspresuojamos KAA audiniuose (3.3 pav. C), be to iki šiol nebuvo susietos su KAA vystymusi.

Identifikavome, kad miR-483-3p ir miR-122-3p raiška statistiškai patikimai sumažėjo, o miR-4732-3p - išaugo (3.5 pav. A). Nors kaip jau minėta, miR-143-3p yra laikoma viena pagrindinių su KAA susijusių miRNR, tačiau remiantis literatūriniais duomenimis miR-143-3p raiškos tyrimai KAA audiniuose yra priešaringi ir nustatomas arba sumažėjęs (5,187), arba padidėjęs šios miRNR kiekis (11), lyginant su sveikomis aortomis. Plazmoje taip pat identifikuojama sumažėjusi (5) arba nepakitusi raiška (197). Dėl to šios miRNR raišką tyrėme ne tik kraujo plazmoje, bet ir audiniuose. Nustatėme, kad miR-143-3p raiška statistiškai patikimai krito plazmoje, tačiau KAA audiniuose buvo stebima tik kiekio didėjimo tendencija, kas ir atitinka sekoskaitos rezultatus (3.5 pav. B) (plazmos mėginių tikro laiko PGR reakcijas atliko dr. V. Stankevičius, DNMTS, BTI).

Taip pat nustatėme, kad kraujo plazmoje miR-122-3p raiška koreliuoja su miR-483-3p kiekiu ($R=0.65$) (p6 lentelė). Toliau ROC analize įvertinome galimybę miR-122-3p, miR-483-3p, miR-4732-3p ir miR-143-3p naudoti kaip potencialius biožymenis KAA diagnostikai (3.5 pav. C). Rezultatai parodė, kad didžiausia 78% tikimybė identifikuoti KAA yra radus miR-122-3p kiekio sumažėjimą plazmoje ($p<0.001$). Jei būtų nustatomi miR-122-3p ir miR-483-3p raiškos pokyčiai, patikimumas šią ligą diagnozuoti išaugtų net iki 84 % ($p<0.001$).

Taigi, miR-122-3p, miR-483-3p, miR-4732-3p ir miR-143-3p raiška patikimai keičiasi KAA kraujo plazmoje, lyginant su sveikomis kontrolėmis. miR-122-3p ir miR-483-3p gali būti potencialūs biožymenys KAA identifikacijai.

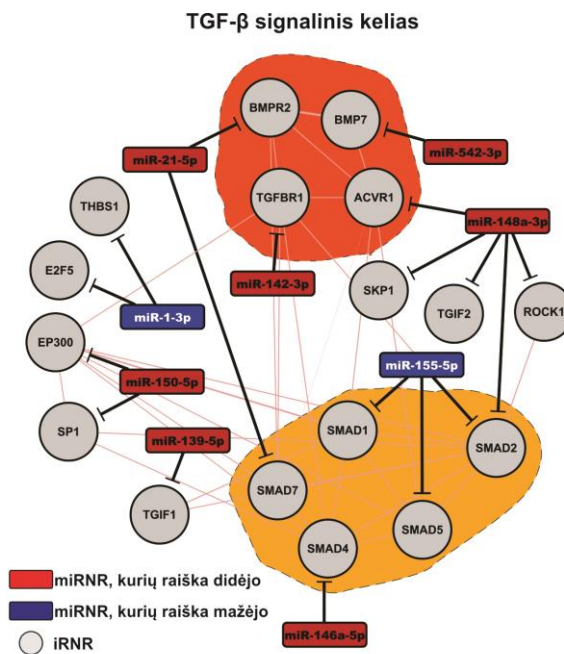


3.5 pav. miRNR raiškos analizė KAA plazmos mėginiuose tikro laiko PGR metodu. Tikro laiko PGR analizė KAA plazmoje (A) audiniuose ir plazmoje (B). Pateikiamas slenkstinio ciklų verčių skirtumas (dCt), duomenis normalizuojant plazmos atveju su miR-185-5p, audinių - su miR-152-3p Ct reikšmėmis. Kuo didesnis verčių skirtumas, tuo mažiau miRNR mėginyje. Linijos grafikuose nurodo vidurkio reikšmę, paklaidos rodo – 5 ir 95 duomenų percentilius. Pokytis kartais žymimas n.s. – statistškai nepatikimas; * p<0.05; ** p<0.01 and *** p<0.001. C) Diagnostinė ROC analizė nurodo cirkuliuojančių miRNR specifiškumą diagnozuojant kylančiosios aortos aneurizmą. SV - sveiki aortos audiniai, KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma.

3.3 TGF- β signalinio kelio reikšmė krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos vystymesi

Identifikavę miRNR, kurių raiška statistiškai patikimai keičiasi KAA audinyje, lyginant su sveikomis aortomis, nustatėme, kokie signaliniai keliai yra įtakojami šių pokyčių. Tam naudodami 8 duomenų bazes RepTar, MirTar, Miranda, PicTar2, MirMap, miRTarget3, TargetScan7, mirTARbase identifikavome iRNR, su kuriomis gali sąveikauti šios miRNR (analizę vykdė dr. R.Ražanskas, EGIS, BTI) ir atlikome KEGG duomenų bazės signalinių kelių praturtinimo analizę (atliko dr.V.Stankevičius, DMTS, BTI). Identifikavome, 48 KEGG kategorijas, kai grupėje daugiau nei 15 įtakojamų genų, $p < 0,05$ (4 priedų lentelė (238)).

Nustatėme, kad net 9 iš 20 miRNR dalyvauja TGF- β signalinio kelio reguliacijoje (3.6 pav.). Taip pat identifikuoti šio signalinio kelio genai, nepersidengė su jokia kita KEGG kategorija, tai rodo aukštesnį miRNR taikinių specifiškumą.

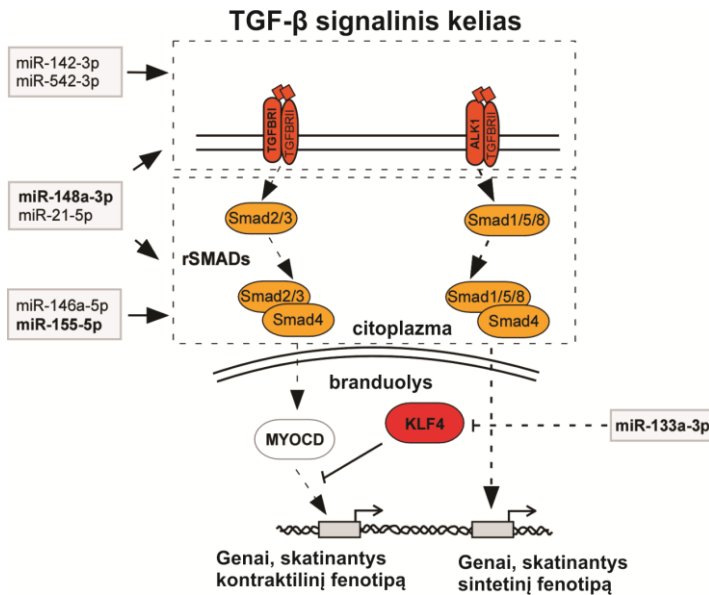


3.6 pav. Molekulinis tinklas, rodantis miRNR ir TGF- β signaliniame kelyje dalyvaujančių iRNR, galimas sąveikas. Pilki apskritimai žymi iRNR; raudoni kvadratai – miRNR, kurių raiška didėjo KAA audiniuose; mėlyni - miRNR, kurių raiška mažėjo KAA audiniuose. Tamsiai oranžinis plotas žymi TGF- β signalinio kelio ligandus ir receptorius; šviesiai oranžinė - SMAD baltymus.

Dar daugiau, analizė atskleidė, kad miRNR gali reguliuoti ir šio signalinio kelio receptorių bei ligandus, ir SMAD baltymus, perduodančius signalą į branduolį. Todėl tolimesniems funkciniais tyrimams pasirinkome TGF- β signalinį kelią.

TGF- β signalinio kelio pakitimai ir reikšmė atsitiktinėje KAA beveik netirti. Daugiausia duomenų atlikta su sindromine, o ne atsitiktine, KAA forma - Marfano sindromu. Būtent šis sutrikimas yra siejamas su mutacijomis fibrilino-1 gene, kas lemia pasikeitusią šio kelio aktyvaciją. Nustatyta, kad TGF- β signalinis kelias dalyvauja tarpląstelinio užpildo homeostazės palaikyme bei gali dalyvauti lygiųjų raumenų ląstelių diferenciacijos stadijų reguliavime (163). Visgi, ar TGF- β signalinio kelio aktyvacija, ar slopinimas sukelia KAA, lieka neaišku (171,174,175,177).

Kanoninis TGF- β signalinis kelias gali vykti dviem kryptimis - TGF- β sąveikaujant su TGFBR1 arba su ALK1 receptoriais (3.7 pav). TGFBR1 jungiasi su SMAD2/3, kurie kartu su SMAD4 patenka į branduolį, ko pasekoje miokardinas (MYOCD) stimuliuoja kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių (VSMC) kontraktilinio fenotipo raišką.



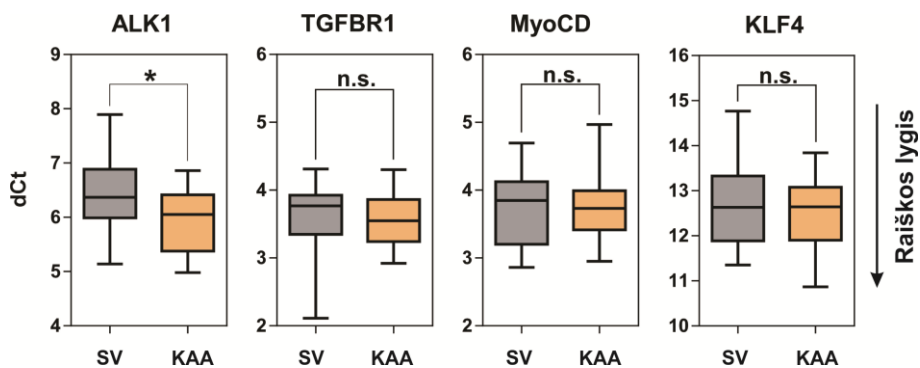
3.7 pav. miRNR reikšmė TGF- β signalo perdavime. Supaprastinta schema rodanti TGF- β signalo perdavimą KAA audinyje. miRNR, kurių raiška keitėsi nurodytos pilkuose rėmeliuose. Pajuodintos tos miRNR, kurių raiška patikrinta tikro laiko PGR didesnėje imtyje. Šios miRNR gali sutrikdyti TGF- β signalo perdavimą sąveikaudamos su TGF- β ligandais, receptoriais ar SMAD baltymais, ko pasekoje yra sukeliama transkripcijos veiksnių MYOCD ir KLF4 pokyčiai.

Jei signalas yra perduodamas per ALK1 receptorių, ALK1 jungiasi su SMAD1/5/8 ir kartu su SMAD4 netiesiogiai gali aktyvinti KLF4 baltymo raišką, taip skatindamas fenotipo pasikeitimą iš kontraktinio į sintetinį.

Taigi, atlikę KEGG duomenų bazės signalinių kelių praturtinimo analizę, nustatėme, kad KAA vystymasis gali būti tiesiogiai įtakojamas: 1) KLF4 ir miokardino raiškos pokyčių, kas lemia pasikeitusią VSMC diferenciacijos stadiją; 2) Sutrikus TGF-β receptorių, ligandų bei signalą į branduolį perduodančių baltymų SMAD raiškai ir/arba aktyvumui, kas gali sukelti kitų nuo miokardino nepriklausomų signalinių kelių aktyvaciją.

Toliau siekdami išsiaiškinti, kaip keičiasi TGF-β signalinis kelias KAA audiniuose, pirmiausia tikrinome TGF-β receptorių *TGFBR1* ir *ALK1*, bei transkripcijos veiksnių, *MYOCD* ir *KLF4*, genų raišką (21 kontroliniai ir 17 KAA audiniai) (3.8 pav.). Nustatėme, kad *ALK1* geno raiška statistiškai patikimai padidėjo KAA audinyje, lyginant su sveikomis aortomis ($p=0.0244$). *TGFBR1*, *KLF4* ir *MYOCD* reikšmingų genų kiekių pokyčių neidentifikavome.

Koreliacinė miRNR ir tirtų genų analizė parodė, kad *ALK1* raiška yra biologiškai susijusi su miR-10a-5p, miR-126-3p ir miR-148a-5p. Taip pat silpna koreliacija nustatyta tarp miR-148a-3p ir *KLF4*, bei miR-133a-3p ir *MYOCD* (p2 paveikslas, p7 lentelė).

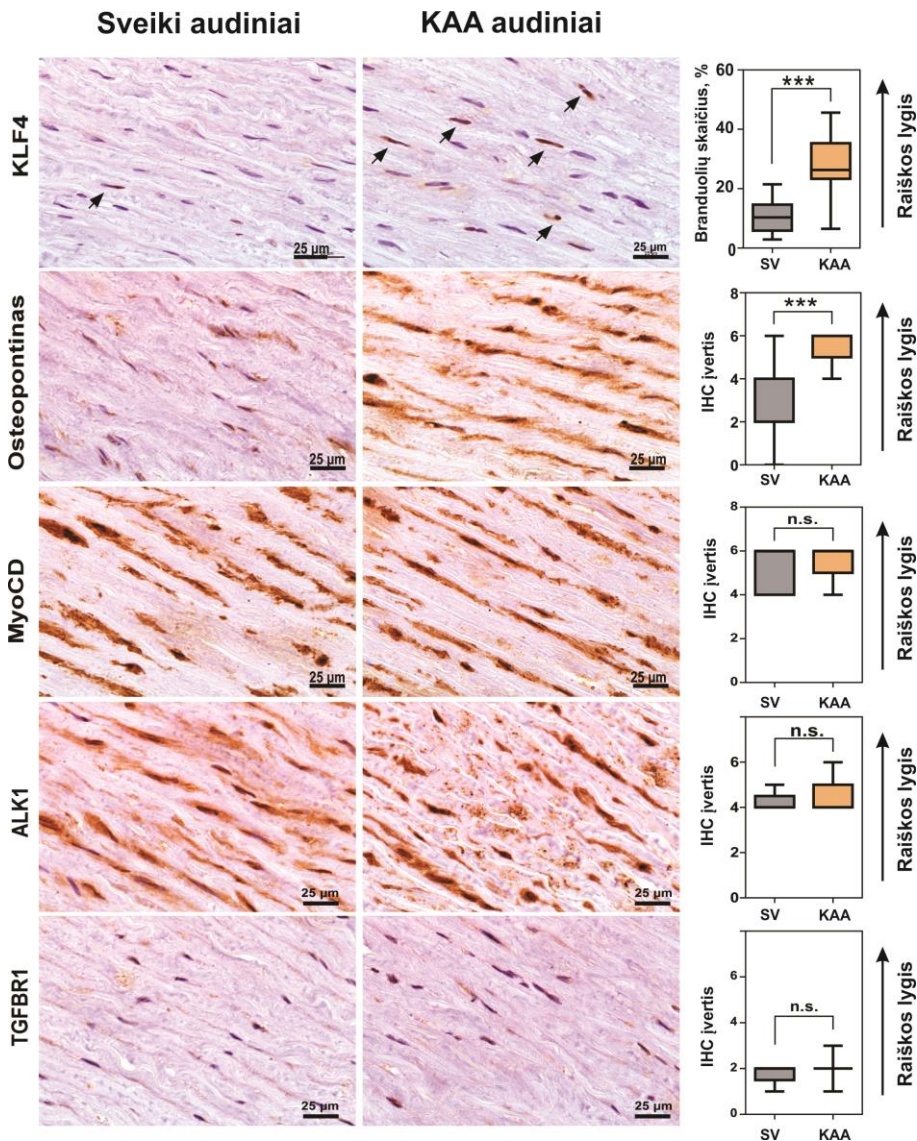


3.8 pav. KLF4, MYOCD, TGFBR1 ir ALK1 genų raiška KAA audiniuose ir sveikose aortose. Pateikiamas slenkstinio ciklų verčių skirtumas (dCt). Raiška normalizuota endogeninę kontrolę naudojant GAPDH geno raišką. Kuo didesnis verčių skirtumas, tuo mažiau iRNR mėginyje. Linijos grafikuose nurodo medianos reikšmę, paklaidos rodo – 5 ir 95 duomenų percentilius. n.s. – statistiškai nepatikimas pokytis ; * $p<0.05$; SV - sveiki aortos audiniai, KAA – krūtinės kylančiosios aortos aneurizma.

Yra žinoma, kad ne visada miRNR skatina iRNR degradaciją ir iRNR kiekio mažėjimą ląstelėje, dažnai tiesiog yra slopinama translacija (2). Todėl toliau įvertinome TGFBR1 ir ALK1, bei transkripcijos veiksnių MYOCD ir KLF4 baltymų raišką KAA ir kontroliniuose audiniuose. Imunohistocheminė analizė buvo atlika viduriniame aortos audinio sluoksnyje, tirtos kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelės. Du tyrėjai įvertino baltymo raišką skalėje nuo 0 (nėra raiškos) iki 3 (stipri raiška). Duomenys buvo susumuojami ir pateikiami skalėje nuo 0 iki 6. KLF4 atveju buvo skaičiuojami visi branduoliai ir tie, kuriuose matoma padidėjusi šio baltymo raiška (analizę atliko dokt. V.Patamsytė ir prof. habil. dr. V. Lesauskaitė, Kardiologijos institutas, LSMU).

Pirmiausia identifikavome KAA biožymens osteopontino baltymo kiekio padidėjimą ($p=0.00311$), kuris yra susijęs su VSMC ląstelių fenotipo pasikeitimu iš kontraktilinio į sintetinį (239-241). Parodėme, kad KAA audiniuose net 27% VSMC ląstelių branduolių padidėja KLF4 baltymo kiekis ($p=0.0037$), kai sveikuose aortos audiniuose išaugusi KLF4 raiška nustatoma tik 10% branduolių. MYOCD kiekio skirtumų neidentifikavome, tačiau šio baltymo yra ne tik branduolyje, bet ir citoplazmoje, kai KLF4 specifiskai stebimas ląstelių branduoliuose (3.9 pav.). Taip pat buvo pastebėta, kad MYOCD baltymo ląstelėse yra žymiai daugiau nei KLF4, tai rodo, kad norint tiksliau įvertinti nežymius MYOCD raiškos svyravimus, kaip atsaką į KLF4 pokyčius, reikalinga tikslesnė kiekio detekcijos sistema. ALK1 ir TGFBR1 baltymų kiekio pokyčių KAA audiniuose, lyginant su kontroliniais audiniais, nenustatėme.

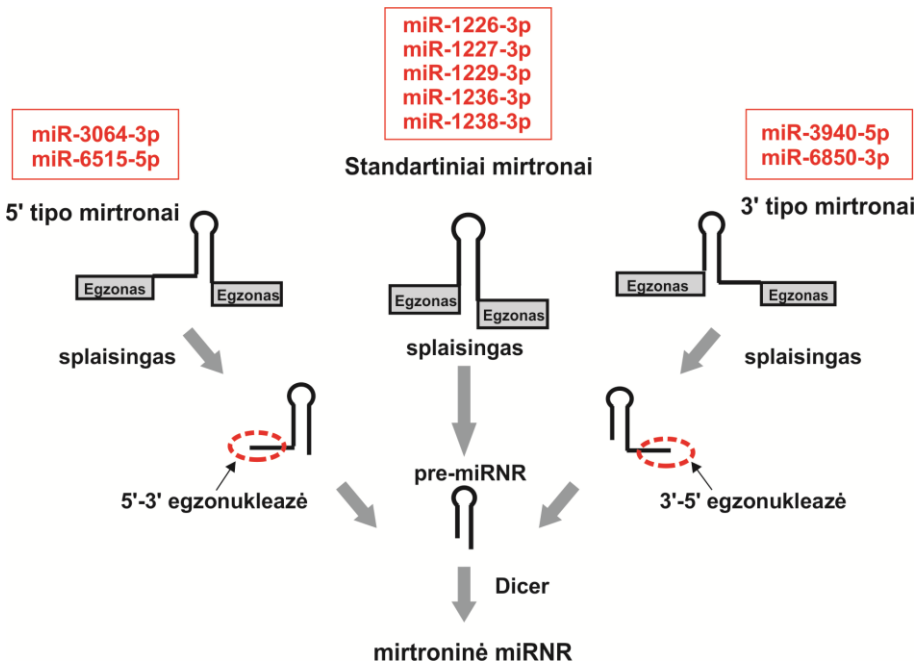
Taigi, ALK1 geno raiška statistiskai patikimai išaugo KAA audiniuose, lyginant su sveikomis kontrolėmis. Išsivysčius aneurizmai net 27% kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių branduolių padidėjo KLF4 baltymo raiška, kai sveikuose aortos audiniuose išaugęs kiekis identifikuojamas tik 10% ląstelių branduolių.



3.9 pav. Imunohistologinės ALK1, TGFBR1, MYOCD ir KLF4 baltymų raiškos nuotraukos ir įvertinimas. Tirtos kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelės. Du tyrėjai įvertino baltymo raišką skalėje nuo 0 (nėra raiškos) iki 3 (stipri raiška). Duomenys buvo susumuojami ir pateikiami skalėje nuo 0 iki 6. Kiekybinė KLF4 analizė buvo atlikta suskaičiavus branduolius su KLF4 raiška. Rodyklės žymi branduolius su KLF4 raiška. ** $p < 0.01$. KLF4 atveju iš viso patikrinti 48 audiniai, osteopontino – 46, MYOCD, ALK1, TGFBR1 – 20.

3.4 Mirtroninių miRNR brendimo mechanizmo ir jų raiškos tyrimas žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose

Žinoma, kad miRNR gali būti lokalizuotos segtuką formuojančiuose genų intronuose, vadinamuose mirtronuose, kuriuos brendimo metu vietoj Drosha/DGRC8 kerpa splaisosoma ir susiformuoja mirtroninės miRNR (18). Mirtroniai yra skirstomi į keturius tipus - standartinius mirtronus, 5' tipo mirtronus, 3' tipo mirtronus ir 5' – 3' tipo mirtronus. Standartiniai mirtroniai formuoja trumpus segtukus, 5' tipo mirtroniai 5' gale turi ilgas segtukų neformuojančias sekas intronuose, 3' tipo mirtroniai turi tokias sekas 3' gale. O 5' – 3' tipo mirtronuose ilgos segtukų neformuojančios sekos yra abiejuose 5' ir 3' introno galuose (1.7 pav., 3.10 pav.). Dauguma mirtronų buvo nustatyti bioinformatiškai analizuojant mažųjų miRNR sekoskaitos duomenis. Tokiu būdu žinduoliuose identifikuota apie 1000 mirtroninių miRNR (131).



3.10 pav. Tirti mirtroniai ir jų tipai. Standartiniai mirtroniai suformuoja trumpus segtukus, 5' tipo mirtroniai 5' gale turi ilgas segtukų neformuojančias sekas intronuose, 3' tipo mirtroniai turi tokias sekas 3' gale. 3' gale tokias esančias sekas brendimo metu nukerpa egzozomos kompleksas. Kaip yra pašalinamos sekos 5' gale nėra žinoma. Raudonai pažymėti tyrimams pasirinkti galimi mirtroniai.

Tačiau tik dviejų žmogaus hsa-miR-877, hsa-miR-1226, vieno pelės mmu-miR-1224 standartinių mirtroninių miRNR ir vieno drozofilos 3' tipo mirtrono dme-miR-1017 priklausomybė nuo splaisingo buvo įrodyta eksperimentiškai (15-17). Tuo tarpu laikytų mirtroninėmis miRNR hsa-miR-1225, hsa-miR-1228 ir hsa-miR-1233 brendimas nepriklauso nuo splaisingo proceso (16,136). Taigi, bioinformatiškai nustatytos introninės miRNR nebūtinai yra iškerpamos splaisosomos ir jų brendimo priklausomybę nuo splaisingo bei priskyrimo mirtroninių miRNR tipui būtina patikrinti. Be to buvo įdomu iširti mirtroninių miRNR brendimo priklausomybę ir reikšmę biologiniuose procesuose. Pradedant tyrimus mirtroninių miRNR raiška, reikšmė bei pritaikymas naudojimui kaip biožymenis praktiškai nebuvo tirtas. Buvo nustatyti tik keli atvejai, kai mirtroninės miRNR dalyvauja kancerogenezės vystymesi (19,20). Taip pat buvo identifikuota kanoniniu keliu bręstančios miRNR svarba bei pritaikymas klinikoje tiriant virškinimo sistemos (storosios žarnos, kasos ir skrandžio) navikus (242-244). Todėl nusprendėme mirtroninių miRNR brendimą ir raišką tirti virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse.

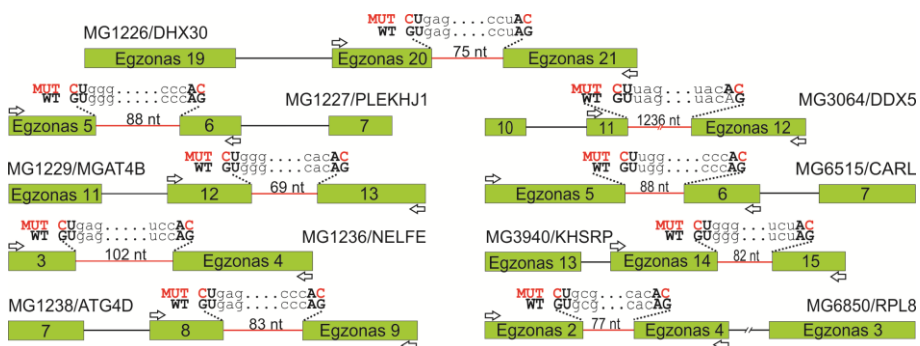
3.4.1 Mirtroninių miRNR identifikavimas ir jų brendimo priklausomybės nuo splaisingo tyrimas

Savo tyrimams pasirinkome devynias žmogaus intronines miRNR: penkias lokalizuotas standartiniuose mirtronuose - miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, miR-1238-3p; dvi lokalizuotas 5p tipo mirtronuose - miR-3064-3p, miR-6515-5p; dvi lokalizuotas 3p tipo mirtronuose - miR-3940-5p, miR-6850-3p (3.10 pav). Šešios iš jų - miR-1229-3p, miR-1236-3p, miR-1238-3p, miR-3064-3p, miR-3940-5p ir miR-6515-5p, aptinkamos su vėžiu susijusiuose genuose, atitinkamai *MGAT4B* (245), *NELFE* (246), *ATG4D* (247), *DDX5* (248), *KHSRP* (249) ir *CARL* (250).

Siekdami nustatyti šių miRNR brendimo priklausomybę nuo splaisingo, naudodami genų inžinerijos metodus, pirmiausia į pcDNA3 plazmidę klonavome genų dalis, kuriose yra tiriami mirtroni (3.11 pav., p1 pav.). Visais atvejais, padauginome genų fragmentus sudarytus iš 3 egzonų ir 2 intronų, išskyrus miR-1236-3p atveju dauginome fragmentą, sudarytą iš 2 egzonų ir 1 introno. 3 egzonų ir 2 intronų genų fragmentai pasirinkti todėl, kad splaisingo metu splaisosomos veikimui įtakos gali turėti ne tik šalia introno esantys egzonai, bet ir egzonai, esantys toliau nuo iškerpamo introno (145). Mirtroną, kuriame lokalizuota miR-1236-3p, supančių egzonų galuose esantys intronai yra labai ilgi. Per didelis klonuojamo fragmento ilgis sunkina klonavimo procesą, todėl šiuo atveju pasirinkome klonuoti geno fragmentą,

sudarytą iš 2 egzonų ir 1 introno. Splaisosomos susirinkimui itin svarbūs konservatyvūs nukleotidai esantys introno galuose – 5' gale - GU su kuriuo sąveikauja U1 snRNR, o 3' gale – AG nukleotidai, su kuriuo sąveikauja U2AF veiksniai. Pakeitus bent vieną iš šių nukleotidų, susilpnėja RNR sąveika su splaisosomos komponentais ir intronas nėra iškerpamas. Sutrikdžius splaisingą, mirtrono brendimas turėtų būti nuslopintas. Todėl mutacijos įvedėme egzono ir introno ribose - introno 5' gale, konservatyvios introno srities GT, guanino nukleotidą ir introno 3' gale, konservatyvios srities AG, guanino nukleotidą keitėme į citozino nukleotidą. Taigi, sukonstravome vektorius – į pcDNA3 plazmidę įterpėme genų fragmentus, kurie ląstelėje nuo plazmidės yra nurašomi kaip atskiri transkriptai.

Siekdami iširti, kaip nuslopintas intronų splaisingas veikia introninių miRNR brendimą, vektorius su įvestomis tikslinėmis mutacijomis (žymima - vektorius-MUT) ir be jų (žymima – vektorius-WT), transfekavome į HCT116 žmogaus storosios žarnos ląsteles. Išskyrę RNR, atlikome kokybinę PGR, naudodami pradmenis, kurie specifiskai jungiasi prie egzonų, tarp kurių yra tiriamas intronas, galų. Nustatėme, kad RNR, nurašytos nuo vektorių-MUT, splaisingas yra blokuojamas – visais atvejais nustatėme ilgesnius fragmentus, kurių ilgiai atitinka teorinius fragmentų (introno, kuriame lokalizuotas mirtronas, ir dviejų gretimų egzonų) ilgius (3.12 pav. A, MUT). Taip pat parodėme, kad RNR, nurašytos nuo laukinio tipo vektorių-WT, splaisingas vyksta efektyviai ir intronas yra iškerpamas, o PGR produktai atitinka teorinius fragmentų, sudarytų tik iš dviejų egzonų ilgius (3.12 pav. A, WT).



3.11 pav. Klonuojamų genų fragmentų schema. Dežutės žymi egzonus, linijos - intronus. Raudonai pažymėti intronai, kuriuose yra mirtrona. WT – laukinio tipo seka, MUT – splaisingą blokuojančias mutacijas turintys vektoriai, kur 5' gale GT ir 3' gale AG esantys guaninai pakeisti į citoziną. Rodyklėmis pažymėtos pradmenų prisijungimo prie tiriamų fragmentų vietos. Raudona spalva pažymėtos tikslinės mutacijos. Schemoje išlaikytas egzonų ir intronų santykinis ilgis. Pavadinimai virš genų fragmentų rodo klonuojamo mirtrono (pvz., hsa-miR-1226) ir geno (pvz., DHX30), kuriame jis lokalizuotas pavadinimą.

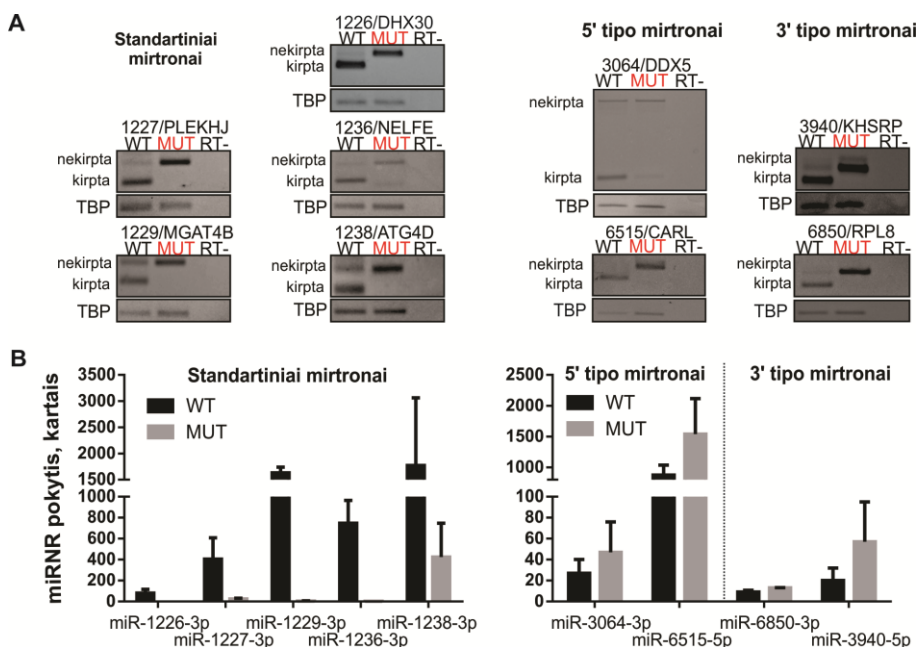
Kai kuriais atvejais transfekavę vektorius-WT, taip pat, nors ir mažesni kiekį, detektavome PGR produktus, kurių ilgiai atitinka genų fragmentų su neiškirptu intronu ilgus. Manome, kad transfekcijos metu į ląstelę patenka labai didelis vektoriaus kiekis ir susidariusių transkriptų yra per daug, kad splaisosoma spėtų efektyviai visus sukirti. Be to, pačios ląstelės gali slopinti šių transkriptų kirpimą, kad apsisaugotų nuo pernelyg didelio miRNR kiekio. Jog RNR mėginiai nėra užteršti genomine DNR, įsitikinome PGR reakcijoje naudodami RNR, prieš tai neatlikę komplemetarios DNR sintezės. Visais atvejais negavome produkto (3.12 pav. A, RT-).

Transfekavę mutacijų neturinčius vektorius į HCT116 ląsteles, visais atvejais nustatėme stipriai, nuo 9 iki 1772 kartų, padidėjusią tiriamų miRNR raišką (3.4 lentelė, 3.12 pav. B, WT). Tai rodo, kad iš suklonuotų genų fragmentų transkriptų ląstelėje efektyviai subręsta visos tiriamos miRNR. Transfekavus mutacijas turinčius vektorius pcDNA3-1226-MUT, pcDNA3-1227-MUT, pcDNA3-1229-MUT, pcDNA3-1236-MUT ląstelėse tikslinių miRNR raiška beveik nesikeičia (3.12 pav. B, MUT). Nuslopinus splaisosomos kirpimą, miR-1226-3p kinta 1,9%, miR-1227-3p - 5,9%, miR-1229-3p – 0,3%, miR-1236-3p – 0,3% lyginant su kiekiu, subręstančiu, kai į ląstelę patenka laukinio tipo vektoriai (3.4 lentelė). Šie rezultatai rodo, kad miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, lokalizuotų standartiniuose mirtronuose, brendimui yra būtinas splaisingas.

3.4 lentelė. miRNR kiekio pokyčiai ląstelėse transfekavus laukinio tipo (WT) ir splaisingo procesą slopinančias mutacijas (MUT) turinčius vektorius. Skaičiai rodo pokytį kartais lyginant su kontroliniu vektoriumi pcDNA3 (-) transfekuotomis ląstelėmis.

miRNR	WT vektorius	MUT vektorius	MUT/WT, %
<i>Lokalizotos standartiniuose mirtronuose</i>			
miR-1226-3p	81 +/- 36	1.5 +/- 0.3	1.9
miR-1227-3p	405 +/- 204	24 +/- 8	5.9
miR-1229-3p	1633 +/- 106	4.1 +/- 2.1	0.3
miR-1236-3p	747 +/- 217	2.6 +/- 0.5	0.3
miR-1238-3p	1772 +/- 1289	425 +/- 322	24
<i>Lokalizotos 5' tipo mirtronuose</i>			
miR-3064-3p	27 +/- 13	47 +/- 29	173
miR-6515-5p	875 +/- 162	1541 +/- 576	176
<i>Lokalizotos 3' tipo mirtronuose</i>			
miR-3940-5p	9.1 +/- 1.7	13 +/- 0.3	141
miR-6850-3p	20 +/- 12	57 +/- 38	286

Įvedus į ląsteles pcDNA3-1238-MUT, miR-1238-3p raiška padidėjo vidutiniškai net 425 kartus, o lyginant su kiekiu, kai buvo transfekuojamas pcDNA3-1238-WT, tai sudaro net 24%. Tai rodo, kad miR-1238-3p brendimas ląstelėje dalinai yra įtakojamas splaisingo, tačiau panašu, kad ši miRNR gali susiformuoti ir kitu brendimo keliu. miR-3064-3p ir miR-6515-5p, lokalizuotų 5' tipo mirtronuose, bei miR-3940-5p ir miR-6850-3p, lokalizuotų 3' tipo mirtronuose, atvejais nuslopinę splaisingą nustatėme statistiškai nepatikimą, bet tendencingą 1,4-2,8 kartų miRNR kiekio didėjimą, lyginant su laukinio tipo vektoriais. Taigi, nei vienai iš tirtų 5' ir 3' tipo mirtoninių miRNR brendimui splaisingas neturi įtakos ir šios miRNR negali būti priskiriamos mirtoninių miRNR tipui.



3.12 pav. miRNR, lokalizuotų mirtronuose, brendimo priklausomybės nuo splaisingo nustatymas. (A) Splaisingo efektyvumo nustatymas vektoriais transfekuotose HCT116 ląstelėse. iRNR tirta panaudojus kokybinę RT-PGR reakciją. RT- kontrolinė reakcija, rodanti, kad nėra DNR užteršimo. Nekirpta forma rodo fragmentą, kai splaisingas blokuojamas ir intronas, kuriame lokalizuotas mirtronas, išlaikomas; kirpta - rodo fragmentą, kai splaisingas vyksta. TBP – endogeninė kontrolė; (B) miRNR raiška HCT116 ląstelėse, transfekavus laukinio (WT) ir splaisingą slopinančias mutacijas turinčius (MUT) vektorius. Kiekybinė analizė vykdyta tikro laiko RT-PGR. Analizė vykdyta lyginant su ląstelėmis transfekuotomis kontroline pcDNA3 (-) plazmide.

Taigi, galime teigti, kad miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, lokalizuotų standartiniuose mirtronuose, brendimas priklauso nuo splaisingo proceso ir šios miRNR gali būti priskiriamos mirtroninių miRNR tipui miR-1238-3p, lokalizuota standartiniame mirtrone, bei miR-3064-3p ir miR-6515-5p, lokalizuotos 5p tipo mirtronuose, bei miR-3940-5p ir miR-6850-3p, lokalizuotos 3p mirtronuose, gali bręsti ir nevykstant splaisingui.

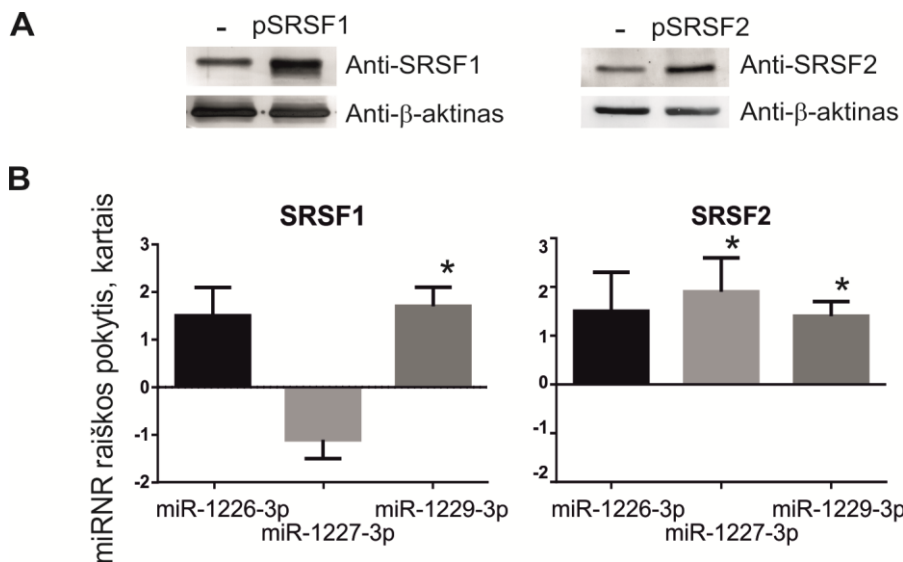
3.4.2 SRSF1 bei SRSF2 splaisingo veiksnių įtaka mirtroninių miRNR brendimui

Parodę, kad miR-1226-3p, miR-1227-3p ir miR-1229-3p lokalizuotų standartiniuose mirtronuose, brendimas priklauso nuo splaisingo proceso, toliau norėjome nustatyti, kaip šių mirtroninių miRNR brendimą veikia splaisingą reguliuojantys veiksniai. Tyrimams parinkome dažniausiai splaisingo reguliacijoje sutinkamus veiksnius - SRSF1 (dažnai sutinkamu pavadinimu SF2/ASF) bei SRSF2 (dažnai sutinkamu pavadinimu SC35). Šie baltymai priklauso SR veiksnių klasei ir dažniausiai aktyvina splaisingo procesą (63). Taip pat, SRSF1 yra laikomas onkogenu, kurio raiška yra dažnai pakitusi vėžinėse ląstelėse (251). Su vėžiniais procesais susijęs ir SRSF2 splaisingo veiksnys (252).

Transfekavę SRSF1 ir SRSF2 baltymus koduojančias plazmides į HCT116 ląsteles (baltymus koduojančias plazmides konstravo dokt. L. Vilys, ILBS, BTI), ląstelių branduoliuose nustatėme 3.2 karto SRSF1 baltymo kiekio išaugimą, bei 1.6 karto SRSF2 baltymo raiškos padidėjimą (western blot analizę atliko dr. E. Jakubauskienė, ILBS, BTI) (3.13 pav., 3.5 lentelė). Toliau tyrėme, kaip šių baltymų poveikyje kinta miR-1226-3p, miR-1227-3p ir miR-1229-3p raiška. Ląstelėse, padidėjus SRSF1 kiekiui, specifiskai 1.7 karto išaugo tik miR-1229-3p raiška ($p < 0.05$).

3.5 lentelė. Mirtroninių miRNR raiškos pokytis kartais, padidinus splaisingo veiksnių SRSF1 bei SRSF2 raišką HCT116 ląstelėse. Iš viso SRSF1 atveju buvo atlikti trys biologiniai pakartojimai, SRSF2 atveju – 5 biologiniai pakartojimai. * nurodo statistiskai patikimą skirtumą.

Splaisingo veiksnys (pokytis kartais)	Mirtroninių miRNR raiškos pokytis, kartais (p-reikšmė)		
	miR-1226	miR-1227	miR-1229
SRSF1 (3.2 ± 0.6)	1.5 ± 0.6 (p = 0.23)	- 1.1 ± 0.4 (p = 0.47)	1.7 ± 0.4* (p = 0.05)
SRSF2 (1.6 ± 0.5)	1.5 ± 0.8 (p = 0.15)	1.9 ± 0.7* (p = 0.008)	1.4 ± 0.3* (p = 0.008)



3.13 pav. Splaisingo veiksmų SRSF1 ir SRSF2 įtaka mirtronų miRNR brendimui. (A) SRSF1 (pSRSF1) bei SRSF2 (pSRSF2) baltymus koduojančių plazmidžių transfekcija į HCT116 ląstelių liniją. Western-blot analizė vykdyta naudojant ląstelių branduolių ekstraktą. β-aktinas buvo naudotas kaip endogeninė kontrolė (B) Mirtroninių miRNR raiškos pokytis kartais, padidinus SRSF1 arba SRSF2 baltymų kiekį ląstelėse. Iš viso SRSF1 atveju buvo atlikti trys biologiniai pakartojimai, SRSF2 atveju – 5 biologiniai pakartojimai. * nurodo statistiškai patikimą skirtumą, $p < 0.05$. Paklaidos nurodo standartinę nuokrypį. Analizė vykdyta lyginant su ląstelėmis transfekuotomis kontroline pcDNA3 (-) plazmide.

Intronas, kuriame lokalizuotas miR-1226 ir DHX30 21 egzonas

GTGAGGGCATGCAGGCCTGGATGGGGCAGCTGGGATGGTCCAAAAGGGTGGCCTCACCAG
 CCCTGTCTCCCTAAGGAGGCACACGGTTACGGAGCCGATGGCTGACGTATTTTCATGGC
 AGTCAAGTCCAATGGCAGCGTCTTCGTCCGGGACTCCTCTCAGGTGCACCCGCTAGCTGT
 GCTGCTGCTGACCGACGGGGACGTGCACATCCGTG

Intronas, kuriame lokalizuotas miR-1227 ir PLEKHJ1 7 egzonas

GTGGGGCCAGGCGGTGGTGGGCACTGCTGGGGTGGGCACAGCAGCCATGCAGAGCGGGCA
 TTTGACCCCGTGCCACCCTTTTCCCAGCTACGAGTTCATGCGGAGAAGCCATCTTCT
 ACAGGAACGAAATCCGGAAGGTGACGGGCAAG

Intronas, kuriame lokalizuotas miR-1229 ir MGAT4B 14 egzonas

GTGGGTAGGGTTTGGGGGAGAGCGTGGGCTGGGGTTCAGGGACACCCTCTCACCCTGCC
 CTCCCACAGGCTCCTTCTACAAGGGAGTGGCAGAGGGAGAGGTGGACCCAGCCTTCGGCC
 CTCTGGAAGCACTGCGCCTCTCGATCCAGACGGACTCCCCTGTGTGGGTGATTCTGAGCG
 AG

3.14 pav. SRSF1 bei SRSF2 specifinių sekų identifikavimas naudojant Human Splicing Finder programą. Sekos su kuriomis jungiasi SRSF1 pažymėtos geltonai, SRSF2 – žaliai. Mirtronai pažymėti raudonos spalvos kursyvu, egzonai – juoda spalva.

Išaugus SRSF2 raiškai, nustatėme, kad miR-1227-3p kiekis padidėjo 1.9 karto ($p=0.008$), o miR-1229-3p - 1.4 karto ($p=0.008$). miR-1226-3p raiška abiem atvejais išaugo 1.5 karto, tačiau stipriai varijavo priklausomai nuo biologinio pakartojimo (3.5 lentelė, 3.13 pav.). Taigi, SRSF1 ir SRSF2 splaisingo veiksniai skirtingai veikia mirtroninių miRNR brendimą.

Norėdami paaiškinti SRSF1 ir SRSF2 skirtingą įtaką mirtroninių miRNR raiškai, naudodami Human Splicing Finder internetinę duomenų bazę (253) egzonuose, šalia tiriamų mirtronų, nustatėme specifines sekas, su kuriomis gali sąveikauti šie splaisingo veiksniai (3.14 pav.). Egzone, šalia mirtrono, kuriame lokalizuotas miR-1229-3p, identifikavome specifinę seką, kurią gali atpažinti SRSF1. Egzone, šalia mirtrono, kuriame sutinkamas miR-1227-3p, nustatėme specifinę seką, su kuria gali sąveikauti SRSF2. Egzone, šalia mirtrono, kuriame lokalizuotas miR-1226-3p, identifikavome vieną seką, su kuria gali sąveikauti SRSF2, ir net dvi sekas, kurias gali atpažinti SRSF1.

Remiantis šiais duomenimis galima daryti prielaidą, kad HCT116 vėžinėse ląstelėse miR-1226-3p splaisingas yra įtakojamas abiejų ląstelėse esančių SRSF1 ir SRSF2 splaisingo veiksnių ir padidinus vieno raišką jie tarpusavyje gali konkuruoti, arba sąveikauti su kitais splaisingą slopinančiais baltymais. Taip pat nustatytos specifinės sekos, su kuriomis gali sąveikauti šie splaisingo veiksniai, paaiškina tai, kad SRSF2 veiksnys labiausiai skatina miR-1227-3p, o SRSF1 – miR-1229-3p splaisingą.

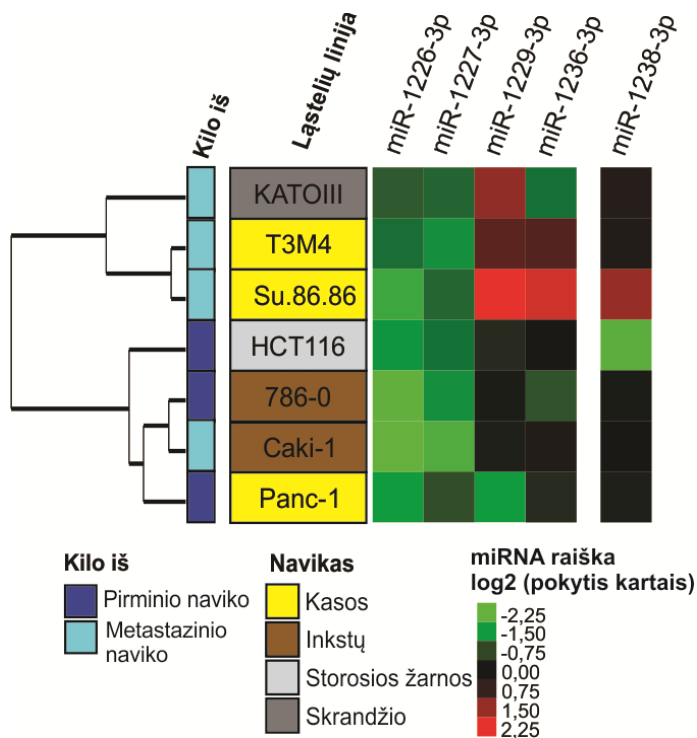
3.4.3 Mirtroninių miRNR raiška žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose

Pradedant tyrimus, apie mirtroninių miRNR reikšmę kancerogenezės vystymėsi buvo praktiškai nežinoma. Todėl toliau siekdami išsiaiškinti ar mirtroninės miRNR dalyvauja vėžiniuose procesuose, nustatėme mirtroninių miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p bei nuo splaisingo nepriklausomu keliu bręstančios miR-1238-3p raišką vėžinėse virškinimo bei taip pat šalinimo sistemos vėžinėse ląstelėse. Tyrimus atlikome trijose kasos (Panc-1, T3M4, Su86.86), dviejose inkstų (Caki-1, 786-O), storosios žarnos (HCT116) bei skrandžio (KATO III) vėžinėse ląstelėse. miRNR raišką vėžinėse ląstelėse lyginome su šių miRNR kiekiu žmogaus embrioninėse inkstų ląstelėse HEK 293A.

Nustatėme, kad miR-1226-3p bei miR-1227-3p raiška buvo sumažėjusi visose tirtose linijose (3.6 lentelė). Didžiausias beveik 5 kartų kiekio pokytis miR-1226-3p atveju nustatytas inkstų Caki-1 bei 786-O vėžinėse ląstelėse. miR-1236-3p raiška išaugo kasos T3M4 ir Su.86.86, bei mažėjo inkstų 786-O bei skrandžio KATOIII linijose.

3.6 lentelė. miRNR raiška kastos, inkstų, storosios žarnos bei skrandžio ląstelėse. Visi pokyčiai kartais, didesni už 1,5 buvo statistiškai patikimi ($p < 0.05$).

Organas	Ląstelių linija	Priklauso nuo splaisingo				Nepriklauso
		1226-3p	-1227-3p	-1229-3p	-1236-3p	-1238-3p
Kasa	PANC-1	-2,8±1,8	-1,7±0,3	-2,8±0,9	-1,4±0,2	-1,2±0,6
	SU.86.86	-3,4±0,9	-2,1±0,4	+5,0±2,7	+3,8±0,6	+2,8±0,9
	T3M4	-2,2±0,4	-2,6±0,4	+2,1±0,3	+1,9±0,4	+1,3±0,2
Inkstų	CaKi-1	-4,9±2,1	-3,9±1,6	-1,2±0,6	+1,3±0,7	1,0±0,8
	786-O	-4,6±2,2	-2,6±0,7	-1,1±0,2	-1,8±0,2	-1,1±0,2
Storosios žarnos	HCT116	-2,7±0,8	-2,2±0,8	-1,3±0,2	1,0±0,7	-4,2±0,3
Skrandžio	KATOIII	-1,9±0,3	-2,0±0,4	+2,7±0,3	-2,2±0,3	+1,3±0,0



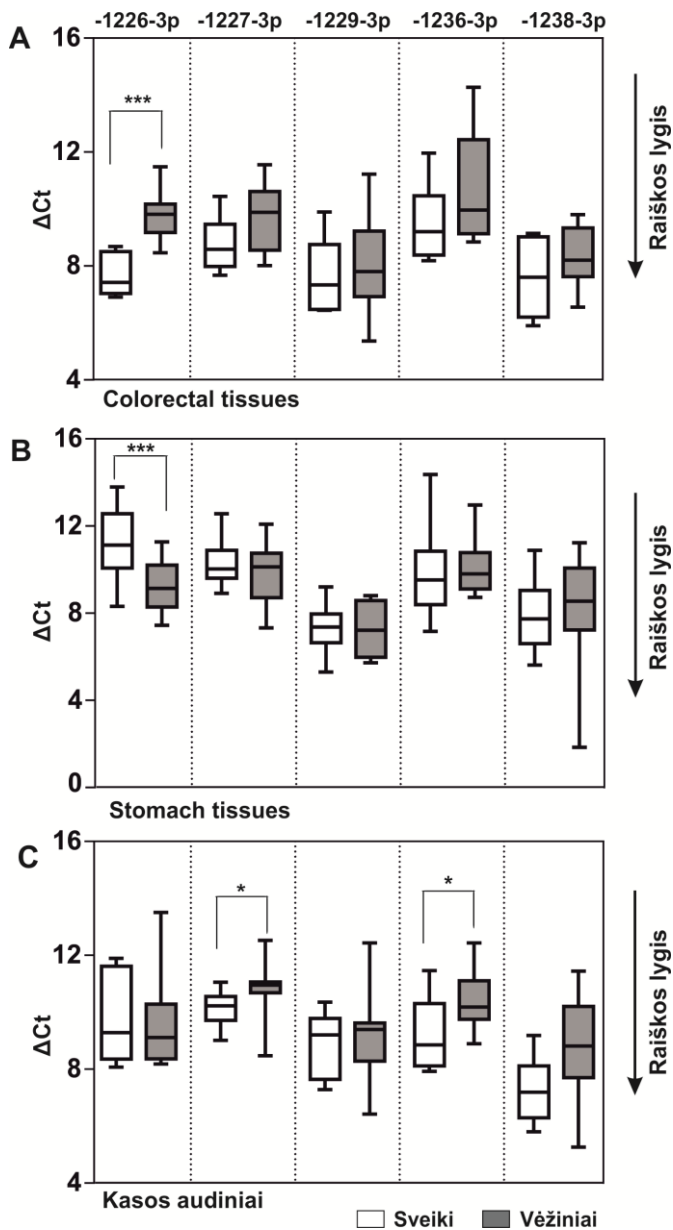
3.15 pav. Klasterinė mirtroninių miRNR raiškos vėžinėse ląstelėse analizė. Lastelių linijos nurodytos eilutėse, miRNR – stulpeliuose. Duomenys pateikiami logaritminėje skalėje log₂ (pokytis kartais), lyginta su HEK 293A. Raudona spalva žymi išaugusį miRNR kiekį; žalia – sumažėjusį; juoda – skirtumo nėra. Hierarchinės klasterizacijos dendrograma pateikta kairėje. Tamsiai mėlyna spalva nurodomos ląstelių linijos iš pirminio naviko, šviesiai - iš metastazių.

miR-1238-3p kiekis krito storosios žarnos HCT116 ir didėjo kasos Su.86.86 vėžinėse ląstelėse. Taigi, nustatėme, kad mirtroninių miRNR raiška yra skirtinga žmogaus virškinimo ir šalinimo sistemos vėžinėse ląstelėse.

Toliau, atlikę hierarchinę klasterizaciją identifikavome, kad ląstelių linijos kilusios iš pirminių navikų ir metastazių grupuojasi į atskirus klasterius (3.15 pav.). Stiprus miR-1229-3p raiškos padidėjimas nustatytas trijose iš keturių tirtų metastazinių linijų – kasos T3M4, Su.86.86 bei skrandžio KATOIII. Vienintelėse metastazinėse inkstų Caki-1 ląstelėse šios mirtroninės miRNR kiekis nesikeitė. Taigi, iškelta prielaida, kad miR-1229-3p gali būti susijusi su vėžinių ląstelių metastazinėmis savybėmis.

Toliau siekdami įvertinti mirtroninių miRNR galimybę jas naudoti kaip biožymenis vėžio diagnostikai, tikrinome šių miRNR raišką storosios žarnos (12 navikų ir 6 sveiki), skrandžio (13 navikų ir 15 sveikų) ir kasos navikuose (12 navikų ir 8 sveiki), lygindami su sveikais audiniais. Nustatėme, kad miR-1226-3p kiekis statistiškai reikšmingai sumažėjo storosios žarnos navikuose ($p < 0.001$) (3.16 pav. A). Priešingai, skrandžio vėžiniuose audiniuose miR-1226-3p raiška išaugo ($p < 0.001$) (3.16 pav. B). Kasos navikuose ši miRNR nesikeitė, tačiau nustatėme, dviejų miR-1227-3p ($p < 0.028$) bei miR-1236-3p ($p < 0.017$) kiekio sumažėjimą (3.16 pav. C).

Taigi, mirtroninių miRNR raiška skiriasi virškinimo sistemos (kasos, storosios žarnos ir skrandžio) navikuose, lyginant su sveikais audiniais. Tai leidžia daryti prielaidą, kad mirtronines miRNR galima naudoti kaip biožymenis vėžio diagnostikai.



3.16 pav. Mirtroninių miRNR raiška storosios žarnos (A), skrandžio (B) ir kasos (C) audiniuose. ΔC_t reikšmės lygintos su RNU48 reikšme ($\Delta C_t = \Delta C_{miR} - \Delta C_{RNU48}$). Linijos grafikuose nurodo vidurkio reikšmę, paklaidos rodo – 5 ir 95 duomenų percentilius. Kuo didesnis verčių skirtumas, tuo mažiau miRNR mėginyje Pokytis kartais žymimas * $p < 0.05$ ir *** $p < 0.001$. Balta spalva nurodyti sveikų audinių duomenys, pilka – vėžinių.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

miRNR reguliuoja daugumą ląstelėje vykstančių procesų - vystymąsi, ląstelių diferenciaciją, ląstelių homeostazės palaikymą (2). Todėl nenuostabu, kad miRNR raiškos pokyčiai yra siejami su širdies bei vėžiniais susirgimais (22), kurie nusineša daugiausia žmonių mirčių. Kanoninės miRNR intensyviai tiriamos šiose abiejose ligų grupėse (4,203). Taip pat miRNR patekusios į kūno skysčius išlieka stabilios, o tai suteikia puikią galimybę panaudoti miRNR kaip biožymenis (85).

Šioje disertacijoje pirmą kartą miRNR profiliai audiniuose ir kraujo plazmoje, susiformavus KAA, buvo identifikuoti visumine sekoskaita. Nustatėme, kad pakitusi miRNR raiška KAA audiniuose įtakoja TGF- β signalinį kelią bei, tikėtina, todėl dalyje kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių keičiasi transkripcijos veiksnio KLF4 baltymo raiška. Svarbu pabrėžti, kad iki šiol dauguma tyrimų buvo atlikta su sindromine KAA forma - Marfano sindromu, kuris išsivysto dėl mutacijų fibrilino-1, lizino oksidazės LOX ir biglikano BGN genuose. Šiame darbe tyrimus atlikome analizuodami tik atsitiktinę KAA formą, kuri retai yra siejama su genų mutacijomis ir kurios atsiradimo priežastys nėra žinomos (7,8).

Šiame darbe tyrėme ne tik kanonines miRNR, bet ir nekanoniniu keliu bręstančias mirtronines miRNR. Tokios miRNR yra lokalizuotos segtuką formuojančiuose genų intronuose, vadinamuose mirtronuose, kuriuos jų brendimo metu vietoj Drosha/DGRC8 kerpa splaisosoma. Nepaisant to, kad galimų mirtroninių miRNR bioinformatiškai identifikuota apie tūkstantį (14), iki šiol nėra aišku ar šias sekas tikrai kerpa splaisosoma. Todėl pirmiausia nustatėme tyrimams pasirinktų standartinių, 5' ir 3' tipo mirtroninių miRNR brendimo priklausomybę nuo splaisingo. Taip pat įvertinome splaisingo veiksnių SRSF1 ir SRSF2 įtaką mirtroninių miRNR raiškai. Mirtroninių miRNR raiška ir reikšmė tyrimų metu praktiškai nebuvo tiriama. Keletas tyrėjų buvo nustatę, kad mirtroninės miRNR dalyvauja kancerogenezeje (19,20). Taip pat buvo žinoma, kad kanoniniu keliu bręstanti miRNR labai svarbi ir yra puikiai tinkama kaip biožymenis tiriant virškinimo sistemos (storosios žarnos, kasos ir skrandžio) vėžinius audinius (242-244), todėl mirtroninių miRNR profilius nustatėme virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse bei navikuose.

4.1 miRNR raiškos pokyčių audiniuose bei kraujo plazmoje, susiformavus krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai, reikšmė

Visumine sekoskaita nustatėme 20 miRNR, kurių raiška skiriasi KAA audiniuose, lyginant su sveikais aortos audiniais. KAA fiziologiškai yra panaši į pilvo aortos aneurizmą (PAA). Tačiau KAA ir PAA kyla iš skirtingų ląstelių embriono vystymosi metu ir priežastys sukeliančios šias aneurizmas dažnai yra skirtingos. PAA vystymasis, kitaip nei KAA, dažnai yra siejamas su ateroskleroze ir stipriu uždegiminiu procesu (254). Nors dalis mūsų tirtų miRNR miR-126-3p, miR-155-5p ir miR-133a-3p dalyvauja ir PAA vystymesi (186), tačiau bendrai nustatėme, kad PAA ir KAA miRNR raiškos profiliai skiriasi.

Siekdami patvirtinti sekoskaitos būdu identifikuotus skirtumus, penkių miRNR (miR-126-3p, miR-155-5p, miR-10a-5p, miR-133a-3p, miR-148a-3p) raiškos pokyčius tikro laiko PGR metodu nustatėme ir didesnėje mėginių imtyje. Parodėme, kad analizuojant visų mėginių imtį miR-126-3p, miR-155-5p, miR-10a-5p bei miR-133a-3p reikšmingai keitėsi KAA audiniuose, lyginant su sveikomis aortomis. Tuo tarpu, nustatėme, kad miR-148a-3p raiška statistiškai patikimai išaugo tik vyrų KAA audiniuose. Taip pat, miR-126-3p ir miR-155-5p atvejais statistiškai patikimesnį skirtumą identifikavome tarp vyriškos lyties pacientų. Analizę vykdant su moterų audiniais, statistiškai patikimo tiriamų miRNR skirtumo nenustatėme. Tačiau moteriškos lyties mėginių imtis buvo maža. Nors šiuo metu kylančiosios aortos aneurizmos vystymosi vyrų ir moterų aortos audiniuose mechanizmo skirtumai nėra ištirti, vis dėlto tikėtina, kad yra du skirtingi KAA vystymosi mechanizmai tarp vyrų ir moterų. Tai netiesiogiai patvirtina tai, kad KAA vyrams yra nustatoma 6 kartus dažniau nei moterims. Be to, jei KAA susiformuoja moterims, aorta plečiasi tris kartus greičiau (164). Taip pat yra nustatyta, kad moterų KAA audiniuose yra daugiau metalo proteinazių MMP-2 ir MMP-9, fermentų skaidančių tarpląstelinį užpildą ir taip pagreitinančių aortos plėtimąsi (165). Taigi, galime daryti prielaidą, kad miRNR raiška gali skirtis KAA audiniuose priklausomai nuo lyties, tačiau tam patvirtinti reikalingi tolimesni tyrimai praplėtus moterų mėginių imtį.

PAA audiniuose nustatyta, kad išaugęs miR-155-5p kiekis koreliuoja su makrofagų imuniniu atsaku ir tarpląstelinio užpildo ardymu (254). Priešingai, KAA audiniuose nustatėme stipriai sumažėjusį šios miRNR kiekį. Gali būti, kad miR-155-5p raiškos sumažėjimas rodo silpnesnį imuninį atsaką KAA audiniuose. Panašu, kad KAA atveju ši miRNR veikia kitaip nei PAA atveju.

Neseniai identifiukuota, kad miR-148a-3p sumažėjusi raiška per STAT3 signalinį kelią stiprina atsaką į citokinus esant dilatacinei kardiomiopatijai (255). Priešingai, KAA atveju nustatėme šios miRNR padidėjusią raišką, tai rodo, kad STAT3 signalinis kelias gali būti slopinamas. Taip pat identifiukuota, kad PAA padidėjusi raiška specifinės endotelio miRNR miR-126-3p, kuri palaiko kraujagyslių integralumą bei homeostazę, koreliuoja su sumažėjusiu uždegiminį procesą sukeliančiu citokino TNF- α kiekiu. miR-126-3p kiekis KAA audiniuose taip pat išauga (256). Taigi, galime daryti prielaidą, kad miR-155-5p, miR-148a-3p ir miR-126-3p gali slopinti imuninį atsaką KAA audiniuose.

Taip pat nustatyta, kad miR-126-3p pūslelėse gali būti perduodama VSMC ląstelėms ir dalyvauti reguliuoti jų diferenciacijos stadiją (257). Identifiukuota, kad sumažėjusi miR-133a-3p raiška lemia išaugusį transkripcijos veiksnio Sp1 kiekį, kuris aktyvuoja KLF4, kas lemia VSMC ląstelių fenotipo pasikeitimą iš kontraktinio į sintetinį (194,258). Tuo tarpu išaugusi miR-10a-5p raiška slopina histonų deacetilazę HDAC4, kas lemia embrioninių ląstelių diferenciaciją į VSMC (259). Taigi, miR-126-3p, miR-133a-3p ir miR-10a-5p gali dalyvauti VSMC fenotipo reguliacijoje.

Svarbu paminėti, kad miR-10a-5p ir miR-148a-3p raiškos pokyčiai iki šiol nebuvo nustatyti KAA audiniuose. Šiems duomenims sustiprinti, parodėme, kad vienos pagrindinių su KAA susijusių miR-126-3p raiška koreliuoja ir su miR-148a-3p ($R=0.67$) bei miR-10a-5p ($R=0.67$) kiekiu mėginiuose.

Taigi, galime daryti prielaidą, kad tirtos miRNR gali būti susijusios su imuninio atsako slopinimu, endotelio ląstelių homeostazės palaikymu bei lygiųjų raumenų ląstelių diferenciacija.

Šiame darbe identifikavome 17 cirkuliuojančių miRNR, kurių raiška keitėsi kraujo plazmoje, susiformavus KAA, lyginant su sveikomis kontrolėmis. Didesnėje pacientų imtyje parodėme, kad yra net 84 % tikimybė diagnozuoti KAA, kai yra nustatomas miR-122-3p ir miR-483-3p kiekio sumažėjimas plazmoje. Taigi, šios dvi miRNR gali būti panaudotos kaip potencialūs KAA biožymenys. Svarbu pabrėžti, kad dauguma visumina sekoskaita nustatytų cirkuliuojančių miRNR raiškos pokyčių anksčiau nebuvo nustatyti kylančiosios aortos aneurizmos atveju.

Visgi, bendrų miRNR, kurių raiška keičiasi ir audiniuose, ir kraujo plazmoje, susiformavus KAA, nebuvo nustatyta. Taip pat, šešios miRNR, kurių kiekis keitėsi plazmoje, buvo labai silpnai sintetinės KAA audiniuose. Taigi, pakitusios miRNR patenka į kraujo plazmą ne iš KAA audinio.

Mažai yra žinoma apie miR-122-3p, kurios raiška stipriausiai krenta plazmoje, esant KAA. Vis dėlto, miR-122-3p kyla iš to paties pri-miRNR, kaip ir miR-122-5p - pagrindinė miRNR dalyvaujanti kepenų ląstelių homeostazės palaikyme ir metabolizmo procesuose (260). miR-122-5p raiškos sumažėjimas yra siejamas su kepenų ligomis (261), ko pasekoje išsivysto metabolinis sindromas ir širdies sutrikimai (262). Be to, miR-122-5p raiškos kritimas kraujo plazmoje buvo identifikuotas esant tokioms širdies ligoms kaip miokardo infarktas, širdies sustojimas bei esant dviburio aortos vožtuvo patologijai (263). Sumažėjusi miR-483-3p raiška yra susijusi su endotelio ląstelių atsaku į pažaidas (264), bei migracija ir kraujagyslių formavimu (265). Panašu, kad dalis miRNR, esant KAA, gali patekti į kraują iš kitų organų, šiuo atveju – iš kepenų, širdies ir endotelio ląstelių, kaip sisteminis atsakas į ligą. Yra nustatyta, kad cirkuliuojanti miRNR gali veikti kaip signalinė molekulė tarp atskirų organų – kepenų, kasos, raumenų, imuninių ir endotelio ląstelių (233).

Identifikavę miRNR, kurių raiška statistiškai patikimai keičiasi KAA audinyje, lyginant su sveikomis aortomis, ir nustatę iRNR, su kuriomis gali sąveikauti šios miRNR, atlikome KEGG duomenų bazės signalinių kelių praturtinimo analizę. Nustatėme, kad KAA vystymėsi dalyvauja TGF- β signalinis kelias. miRNR sąveikauja su šio signalinio kelio receptoriais ir ligandais, bei SMAD baltymais, perduodančiais signalą į branduolį. Jei TGF- β signalas perduodamas per TGFBR1/Smad2, miokardinas stimuliuoja VSMC kontraktinio fenotipo raišką. Jei signalas yra perduodamas per ALK1/Smad1/5/8, išauga KLF4 baltymo raiška, kuri skatina VSMC fenotipo perėjimą į sintetinį. Taigi, KAA vystymasis gali būti tiesiogiai įtakojamas KLF4 ir miokardino raiškos pokyčių, kas lemia pasikeitusią VSMC diferenciacijos stadiją.

Buvo nustatyta, kad TGF- β receptorių ir SMAD baltymų disbalansas gali sukelti KAA. Marfano sindromo atveju buvo nustatytas padidėjęs TGF- β aktyvumas, kas sukelia TGF- β ir SMAD2 baltymo raiškos padidėjimą (172,173). Tačiau neseniai taip pat parodyta, kad šio sindromo atveju nėra nustatomi TGF- β signalinio kelio pakitimai (174). Be to, nustatyta, kad SMAD4 ir TGRBR2 genų ištyrinimas VSMC lemia aortos išsiplėtimą pelėse (175,176). O išaugęs SMAD2 aktyvumas yra nesusijęs su TGF- β signalu (176,266). Taip pat identifikuota, kad signalo pasikeitimas nuo TGFBR1/Smad2 į ALK1/Smad1/5/8 lėmė sintetinio VSMC fenotipo genų raišką pelėse, vystantis KAA (267). Taigi, iki šiol nėra aišku ar TGF- β signalinio kelio aktyvacija, ar slopinimas sukelia KAA. Taip pat svarbu pabrėžti, kad iki šiol KAA vystymosi mechanizmai buvo atlikti VSMC

ląstelių linijose arba pelės modeliuose, kas tik dalinai atspindi tikruosius mechanizmus vykstančius žmogaus audiniuose (9). Todėl siekdami tiksliau atskleisti KAA vystymąsi, baltymų ir genų raiškos tyrimus atlikome žmogaus KAA audiniuose.

Tyrėme TGF- β receptorių *TGFBR1* ir *ALK1*, bei transkripcijos veiksnių, *MYOCD* ir *KLF4*, genų raišką. Identifikavome, kad KAA audinyje statistiškai patikimai padidėjo *ALK1* geno raiška. Koreliacinė miRNR ir *ALK1* geno analizė parodė, kad šio geno kiekis koreliuoja su miR-10a-5p, miR-126-3p ir miR-148a-5p raiška. Reikšmingų *TGFBR1*, *KLF4* ir *MYOCD* genų raiškos skirtumų nenustatėme. Kadangi miRNR, sąveikaudama su iRNR, nevisada keičia jos kiekį, o dažnai tiesiog yra slopinama translacija (2), toliau imunohistochemine analize buvo nustatytas TGFBR1 ir ALK1, bei transkripcijos veiksnių, MYOCD ir KLF4 baltymų kiekį audiniuose. Nors MYOCD kiekio skirtumų neidentifikavome, KAA audiniuose net 27% VSMC ląstelių branduolių padidėjo KLF4 baltymo kiekis, kai sveikuose aortos audiniuose išaugusi KLF4 raiška nustatoma tik 10% branduolių. Būtent, šio baltymo padidėjęs kiekis ir lemia dalies VSMC ląstelių fenotipo keitimą iš kontraktilinio į sintetinį. Imunohistocheminę analizę pasirinkome, siekdami identifikuoti stipriausius pokyčius audiniuose, išsivysčius KAA. Be to ši analizė leidžia nustatyti baltymų lokalizaciją ląstelėje, kas yra itin svarbu, norint įvertinti baltymų veiklumą. MYOCD raišką stebime ir citoplazmoje, ir branduolyje, tai gali paaiškinti tai, kodėl nepastebime kiekio svyravimų, kaip atsako į KLF4 baltymo kiekio išaugimą. Taip pat nustatėme, kad ALK1 baltymo kiekis nekito. Tikėtina, kad miRNR, su kuriomis šio geno raiška koreliuoja, miR-10a-5p, miR-126-3p ir miR-148a-5p, gali veikti kaip atsakas į padidėjusią ALK1 geno raišką ir ją slopinti, ko pasekoje ALK1 baltymo raiška nėra nustatoma. Tačiau norint tiksliau nustatyti nežymius ALK1 ir MYOCD baltymų kiekio svyravimus, tolimesniuose tyrimuose reikėtų įvertinti visų baltymų kiekį toje pačioje ląstelėje bei atlikti analizę naudojant tikslesnę baltymų kiekio detekcijos sistemą.

4.2 Mirtroninių miRNR brendimo mechanizmo ir jų raiškos žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose, analizė

Nors bioinformatiškai analizuojant miRNR sekoskaitos duomenis mirtroninių miRNR nustatyta apie tūkstantį (14), iki šiol nėra aišku, ar šios miRNR tikrai bręsta nuo splaisingo priklausomu keliu. Parodėme, kad miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p ir miR-1236-3p, lokalizuotų standartiniuose mirtronuose, brendimas priklauso nuo splaisingo proceso. Tuo

tarpu miR-1238-3p, sutinkama standartiniame mirtrone, tik dalinai priklauso nuo splaisosomos kirpimo. Taip pat, kad ne visi standartiniai mirtronai bręsta nuo splaisingo priklausomu keliu jau buvo parodžiusios keletas tyrėjų grupių. Ištyrus tris intronines miRNR miR-1226, miR-887, miR-1233 – nustatyta, kad tik miR-1226 ir miR-887 brendime dalyvauja splaisosoma (16). Kitame tyrime iš keturių pasirinktų miR-1226, miR-887, miR-1225, miR-1228 – nuo splaisingo priklausomos buvo tik tos pačios dvi miRNR - miR-1226 ir miR-887 (136).

Identifikavome, kad miR-3064-3p ir miR-6515-5p, lokalizuotos 5' tipo, bei miR-3940-5p ir miR-6850-3p, lokalizuotos 3' tipo mirtronuose, gali bręsti ir nevykstant splaisingui. Iki šiol žinduoliuose eksperimentiškai nėra nustatyta nė vienos mirtrininės miRNR, lokalizuotos 5' tipo ir 3' tipo mirtronuose, priklausomybė nuo splaisosomos kirpimo. Identifikuotas tik vienas atvejis drozofilėje, kai 3' tipo mirtronas dme-miR-1017 bręsta nuo splaisingo priklausomu būdu (17). Tai leidžia manyti, kad iš daugumos bioinformatiniais metodais nustatytų 5' ir 3' tipo mirtronų nesusiformuoja mirtrininės miRNR. Bei iškelia klausimą ar 5' ir 3' tipo mirtronai iš tikrųjų egzistuoja žinduoliuose.

Tai, kad ne visi bioinformatiškai nustatyti mirtronai iš tikrųjų yra kerpami splaisosomos, paskatino plačiau tirti nekanoniu keliu susiformuojančių miRNR brendimą. Kaip jau minėta, nustatyta, kad laikytų mirtrininėmis miRNR miR-1225, miR-1228 ir miR-1233 iškirpimas gali vykti nepriklausomai nuo splaisingo (16,136). Identifikuota, kad šių miRNR brendimas taip pat yra nepriklausomas ir nuo Dicer, AGO2 ir eksportino-5, ir tokios miRNR pavadintos simtrininėmis miRNR. Manoma, kad simtronių miRNR brendimas gali vykti ir nuo splaisingo priklausomu ir nepriklausomu keliu (136). Taip pat neseniai identifikuoti agotronai, intronai, kurie yra iškerpami splaisosomos, bet jų brendimas nėra priklausomas nuo Dicer, kaip mirtronių miRNR, ir citoplazmoje su AGO baltymais rišasi pilno ilgio intronas (apie 100 nt), o ne trumpa miRNR. Agotronai gali veikti, kaip miRNR ir slopinti iRNR, bet manoma, kad svarbiausia jų funkcija stabilizuoti ir apsaugoti AGO baltymus nuo degradacijos. Pasiūlyta, kad simtrone miRNR laikoma miR-1225 ir mirtrininė miR-1236 iš tikrųjų gali veikti kaip agotronai (137). Taip pat naujai atrastos specifinės miRNR, kylančios iš 50-200 nt ilgio segtuko formos struktūrą formuojančių trumpų intronų, kurie yra iškerpami alternatyvaus splaisingo metu. Šiuo atveju, identifikuota, kad ta pati miRNR gali bręsti kanoniniu bei alternatyviu mirtronų ar simtronų brendimo keliu (139). Taigi, šie duomenys atskleidė, kad tiriant nekanoninių miRNR raišką, būtina detektuoti ir įvertinti ne tik subrendusią miRNR formą, bet ir jos

pirmtakus. Taip pat identifikuojau, kad kanoninis ir alternatyvūs brendimo keliai tarpusavyje yra stipriau susiję nei buvo manoma. Taigi, tikėtina, kad ta pati miRNR gali bręsti skirtingais būdais, todėl visgi sunku priskirti tik vieną brendimo kelią tiriamai miRNR (137,139). Tikėtina, kad miR-1238-3p, kurios brendimas tik dalinai priklauso nuo splaisingo, gali bręsti ne tik mirtronų, bet ir kitu alternatyviu arba kanoniniu keliu.

Parodė, kad miR-1226-3p, miR-1227-3p ir miR-1229-3p lokalizuotų standartiniuose mirtronuose, brendimas priklauso nuo splaisingo proceso toliau nustatėme, kaip šių mirtroninių miRNR brendimą veikia vėžiniuose procesuose svarbūs SRSF1 ir SRSF2 splaisingo veiksniai (152,251,252). Anksčiau buvo nustatyta, kad SRSF1 gali tiesiogiai ir nepriklausomai nuo splaisingo sąveikauti su pri-miR-7-1 ir aktyvinti Drosha kirpimą (155). Identifikavome, kad storosios žarnos HCT116 vėžinių ląstelių branduoliuose padidėjus SRSF1 baltymo kiekiui statistiškai patikimai išauga miR-1229-3p raiška, o padidėjus SRSF2 kiekiui - miR-1227-3p ir miR-1229-3p raiška. SRSF1 ir SRSF2 dažniausiai aktyvina splaisingo eigą (152), tai stebime ir šiuo atveju. Splaisingo veiksmų SF3B1 ir SRSF2 sąsaja su mirtroninių miRNR brendimu buvo nustatyta ir esant mielodisplastiniui sindromui, kai SF3B1 ir SRSF2 genuose esančios mutacijos koreliavo su sumažėjusia galimų 5' tipo mirtroninių miRNR miR-3605-5p ir miR-4728-5p raiška, atitinkamai (268). Taigi, mūsų grupė viena iš pirmųjų nustatė splaisingo veiksmų ir mirtroninių miRNR brendimo sąryšį.

Šiame darbe nustatėme, kad mirtroninių miRNR miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p ir miR-1236-3p raiška yra skirtinga virškinimo ir šalinimo sistemos vėžinėse ląstelėse, lyginant su HEK293A. Taip pat atlikę hierarchinę klasterizaciją identifikuojau, kad ląstelių linijos kilusios iš pirminių navikų ir metastazių pagal mirtroninių miRNR raišką grupuojasi į atskirus klasterius. Mūsų rezultatai leido iškelti prielaidą, kad miR-1229-3p padidėjusi raiška yra susijusi su vėžinių ląstelių metastazinėmis savybėmis, tačiau tam patvirtinti reikalingi detalesni tyrimai. Taip pat identifikuojau, kad miR-1227-3p ir miR-1236-3p raiška mažėja T3 stadijos kasos navikuose, lyginant su sveikais kontroliniais audiniais. Taip pat parodėme, kad miR-1226-3p kiekis mažėja T3 stadijos storosios žarnos navikuose, ir didėja skrandžio vėžiniuose audiniuose. Taigi, mirtroninių miRNR raiška yra skirtinga virškinimo sistemos navikuose, o tai leidžia daryti prielaidą, kad mirtroninės miRNR gali būti naudojamos kaip biožymenys vėžio diagnostikai. Visgi, tam reikalingi tolimesni tyrimai praplečiant mėginių skaičių. Pradedant tyrimus buvo tik keli atvejai, kuriuose buvo nustatyta mirtroninių miRNR reikšmė vėžiniams procesams (19,20). Taigi, vieni iš

pirmųjų identifikavome mirtroninių miRNR raiškos pokyčius vėžinėse ląstelėse ir navikuose. Vėliau, kiti tyrėjai atliko daug mirtroninių miRNR raiškos ir įtakos vėžiniams procesams tyrimų. miR-1226-3p buvo susieta su krūties vėžio atsparumu tamoksifenui (213) bei stemplės vėžio atsparumu cisplatinai ir 5-FU (214). Identifikuota, kad padidėjusi miR-1229-3p raiška lemia prastą krūties vėžio pacienčių išgyvenamumą (216). Nustatyta, kad miR-1227-3p tiesiogiai įtakojo padidėjusią glioblastomos vėžinių ląstelių migraciją (217), o sumažėjęs miR-1236-3p kiekis skatino skrandžio (219) krūties, plaučių ir galvos bei kaklo ertmių (220) vėžinių ląstelių migraciją.

Svarbu paminėti, kad lygiagrečiai su mirtroninių miRNR analize naudojant tas pačias ląstelių linijas bei navikus ir sveikus audinius taip pat buvo tirta, kaip keičiasi SRSF1 ir SRSF2 baltymų kiekis virškinimo ir šalinimo sistemos vėžinėse ląstelėse bei virškinimo sistemos navikuose (tyrimus atliko dr. A. Kanopkos grupė, ILBS, BTI) (269). Nustatyta, kad SRSF1 ir SRSF2 baltymų kiekis buvo sumažėjęs kasos, inkstų, storosios žarnos ir skrandžio vėžinėse ląstelėse. Taip pat sumažėjusi SRSF2 raiška buvo detektuota skrandžio, SRSF1 – kasos, storosios žarnos ir skrandžio navikuose. Nors transfekavę SRSF1 ir SRSF2 baltymus koduojančias plazmides į HCT116 ląsteles identifikavome, kad SRSF2 veiksnys skatina miR-1227-3p, o SRSF1 – miR-1227-3p ir miR-1229-3p splaisingą, visgi, nustatyti splaisingo veiksnių kiekio skirtumai silpnai koreliavo su šių mirtroninių miRNR pokyčiais tose pačiose vėžinėse ląstelėse bei navikuose. Tai galima paaiškinti tuo, kad vėžinėse ląstelėse ir navikuose taip pat buvo identifikuoti ir kitų splaisingo veiksnių U2AF35, U2AF65 ir KHSRP kiekių skirtumai. Nustatyta, kad tas pats splaisingo veiksnys priklausomai nuo prisijungimo vietos gali ir aktyvinti, ir slopinti splaisingą (153). Taip pat du splaisingo veiksniai gali tarpusavyje konkuruoti, kas gali lemti skirtingų intronų splaisingą (145). Būtent dėl kompleksiško splaisingo veiksnių veikimo ir dėl sąveikos su nehomologinėmis sekomis įvairovės, dažnai yra ypatingai sunku nuspėti splaisingo eigą vėžinėse ląstelėse (154).

IŠVADOS

1. Vystantis krūtinės kylančiosios aortos aneurizmai (KAA), audiniuose ir kraujo plazmoje, lyginant su sveikų pacientų mėginiais, atitinkamai keičiasi 20 ir 17 miRNR raiška. Nė vienos miRNR, kurios raiška keitėsi KAA audiniuose, kiekis nekito kraujo plazmoje, susiformavus KAA. Tai rodo, kad kraujo plazmos miRNR profilio pakitimai nėra tiesiogiai susiję su miRNR raiškos pokyčiais aortos audiniuose.
2. miRNR raiška žmogaus kylančiosios aortos aneurizmos audiniuose gali priklausyti nuo paciento lyties. miR-148a-3p kiekis kylančiosios aortos aneurizmos audiniuose, lyginant su sveikomis aortomis, statistiškai patikimai išauga tik tarp vyriškos lyties pacientų. miR-126-3p ir miR-155-5p atvejais statistiškai patikimesnis raiškos skirtumas nustatomas tarp vyriškos lyties pacientų nei analizę vykdant bendroje, pagal lytį neišskirstytoje, pacientų imtyje.
3. 10 iš 20 miRNR, kurių raiška keičiasi KAA vystymosi metu, gali dalyvauti TGF- β signalinio kelio reguliacijoje. Tikėtina, dėl miRNR raiškos pokyčių KAA audiniuose, išauga TGF- β signalinio kelio receptoriaus *ALK1* geno raiška ir 2,7 kartus didesnis kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių kiekis turi padidėjusį transkripcijos veiksnio KLF4 kiekį branduoliuose. KLF4 raiškos išaugimas sukelia kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių fenotipo pasikeitimą į sintetinį.
4. miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p ir miR-1236-3p, lokalizuotų standartiniuose trumpuose mirtronuose, brendimas priklauso nuo splaisingo. miR-1238-3p, lokalizuota standartiniame mirtrone, bei visos tirtos introninės miRNR, lokalizuotos bioinformatiškai nustatytuose 5' tipo arba 3' tipo mirtronuose, gali bręsti ir nevykstant splaisingui. Taigi, gali būti, kad žinduoliuose egzistuoja tik standartinio tipo mirtronai.
5. Splaisingo veiksnys SRSF1 skatina mirtroninės miR-1229-3p, o SRSF2 - miR-1227-3p ir miR-1229-3p brendimą storosios žarnos HCT116 vėžinėse ląstelėse.
6. Mirtroninių miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p ir miR-1236-3p raiška yra skirtinga žmogaus virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse, lyginant su nevēžine HEK293A ląstelių linija, bei virškinimo sistemos navikuose, lyginant su sveikais audiniais. Tai rodo, kad mirtroninės miRNR gali dalyvauti vėžinių procesų reguliacijoje ir turi potencialą būti naudojamos kaip biožymenys.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Kozomara, A., Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, **47**, D155-D162.
2. Jonas, S. and Izaurralde, E. (2015) NON-CODING RNA Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, **16**, 421-433.
3. Walayat, A., Yang, M. and Xiao, D. (2019) Therapeutic Implication of miRNA in Human Disease. *IntechOpen*.
4. Zhou, S.S., Jin, J.P., Wang, J.Q., Zhang, Z.G., Freedman, J.H., Zheng, Y. and Cai, L. (2018) miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, **39**, 1073-1084.
5. Ikonomidis, J.S., Ivey, C.R., Wheeler, J.B., Akerman, A.W., Rice, A., Patel, R.K., Stroud, R.E., Shah, A.A., Hughes, C.G., Ferrari, G. *et al.* (2013) Plasma biomarkers for distinguishing etiologic subtypes of thoracic aortic aneurysm disease. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **145**, 1326-1333.
6. Erbel, R., Aboyans, V., Boileau, C., Bossone, E., Bartolomeo, R.D., Eggebrecht, H., Evangelista, A., Falk, V., Frank, H., Gaemperli, O. *et al.* (2014) 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, **35**, 2873-2926.
7. Quintana, R.A. and Taylor, W.R. (2019) Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ Res*, **124**, 607-618.
8. Pinard, A., Jones, G.T. and Milewicz, D.M. (2019) Genetics of Thoracic and Abdominal Aortic Diseases. *Circ Res*, **124**, 588-606.
9. Raffort, J., Lareyre, F., Clement, M. and Mallat, Z. (2016) MicroRNAs in abdominal aortic aneurysms: insights from animal models and relevance to human disease. *Cardiovascular Research*, **110**, 165-177.
10. Guo, D.C., Hostetler, E.M., Fan, Y.X., Kulmacz, R.J., Zhang, D., Nickerson, D.A., Leal, S.M., LeMaire, S.A., Regalado, E.S., Milewicz, D.M. *et al.* (2017) Heritable Thoracic Aortic Disease Genes in Sporadic Aortic Dissection. *Journal of the American College of Cardiology*, **70**, 2728-2730.
11. Licholai, S., Blaz, M., Kapelak, B. and Sanak, M. (2016) Unbiased Profile of MicroRNA Expression in Ascending Aortic Aneurysm Tissue Appoints Molecular Pathways Contributing to the Pathology. *Annals of Thoracic Surgery*, **102**, 1245-1252.

12. Patuzzo, C., Pasquali, A., Malerba, G., Trabetti, E., Pignatti, P.F., Tessari, M. and Faggian, G. (2012) A PRELIMINARY microRNA ANALYSIS OF NON SYNDROMIC THORACIC AORTIC ANEURYSMS. *Balkan Journal of Medical Genetics*, **15**, 51-55.
13. Venkatesh, P., Phillippi, J., Chukkapalli, S., Rivera-Kweh, M., Velsko, I., Gleason, T., VanRyzin, P., Aalaei-Andabili, S.H., Ghanta, R.K., Beaver, T. *et al.* (2017) Aneurysm-Specific miR-221 and miR-146a Participates in Human Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**.
14. Wen, J.Y., Ladewig, E., Shenker, S., Mohammed, J. and Lai, E.C. (2015) Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *Plos Computational Biology*, **11**.
15. Sibley, C.R., Seow, Y., Saayman, S., Dijkstra, K.K., El Andaloussi, S., Weinberg, M.S. and Wood, M.J.A. (2012) The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Research*, **40**, 438-448.
16. Schamberger, A., Sarkadi, B. and Orban, T.I. (2012) Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner. *Rna Biology*, **9**, 1177-1185.
17. Flynt, A.S., Greimann, J.C., Chung, W.J., Lima, C.D. and Lai, E.C. (2010) MicroRNA Biogenesis via Splicing and Exosome-Mediated Trimming in Drosophila. *Molecular Cell*, **38**, 900-907.
18. Ruby, J.G., Jan, C.H. and Bartel, D.P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, **448**, 83-86.
19. Gao, R., Cai, C.L., Gan, J.C., Yang, X., Shuang, Z.Y., Liu, M., Li, S.P. and Tang, H. (2015) miR-1236 down-regulates alpha-fetoprotein, thus causing PTEN accumulation, which inhibits the PI3K/Akt pathway and malignant phenotype in hepatoma cells. *Oncotarget*, **6**, 6014-6028.
20. Jin, C.N., Rajabi, H. and Kufe, D. (2010) miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. *International Journal of Oncology*, **37**, 61-69.
21. Axtell, M.J., Westholm, J.O. and Lai, E.C. (2011) Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology*, **12**.
22. Esteller, M. (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, **12**, 861-874.
23. Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V. and Hannon, G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, **35**, 215-217.
24. Chong, M.M.W., Zhang, G.A., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J. and Littman, D.R. (2010) Canonical and alternate functions of

- the microRNA biogenesis machinery. *Genes & Development*, **24**, 1951-1960.
25. Friedman, R.C., Farh, K.K.H., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, **19**, 92-105.
 26. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M. *et al.* (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, **129**, 1401-1414.
 27. Lee, Y., Kim, M., Han, J.J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo Journal*, **23**, 4051-4060.
 28. Berezikov, E. (2011) Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics*, **12**, 846-860.
 29. Nguyen, T.A., Jo, M.H., Choi, Y.G., Park, J., Kwon, S.C., Hohng, S., Kim, V.N. and Woo, J.S. (2015) Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell*, **161**, 1374-1387.
 30. Kim, Y.K., Kim, B. and Kim, V.N. (2016) Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E1881-E1889.
 31. Kim, B., Jeong, K. and Kim, V.N. (2017) Genome-wide Mapping of DROSHA Cleavage Sites on Primary MicroRNAs and Noncanonical Substrates. *Molecular Cell*, **66**, 258-+.
 32. Nielsen, C.T., Goodall, G.J. and Bracken, C.P. (2012) IsomiRs - the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends in Genetics*, **28**, 544-549.
 33. Rand, T.A., Petersen, S., Du, F.H. and Wang, X.D. (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, **123**, 621-629.
 34. Ha, M. and Kim, V.N. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**, 509-524.
 35. Sheu-Gruttadauria, J. and MacRae, I.J. (2017) Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *Journal of Molecular Biology*, **429**, 2619-2639.
 36. Diederichs, S. and Haber, D.A. (2007) Dual role for argonautes in MicroRNA processing and Posttranscriptional regulation of MicroRNA expression. *Cell*, **131**, 1097-1108.
 37. Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E. and Meister, G. (2012) microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Research*, **40**, 9850-9862.
 38. Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y. and Daub, C.O. (2011) Deep-sequencing of human argonaute-associated small RNAs provides insight into

- miRNA sorting and reveals argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *Rna Biology*, **8**, 158-177.
39. Gebert, L.F.R. and MacRae, I.J. (2019) Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **20**, 21-37.
 40. Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, **136**, 215-233.
 41. Kaufman, E.J. and Miska, E.A. (2010) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **21**, 728-737.
 42. Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J., Chandradoss, S.D., Joo, C. and MacRae, I.J. (2015) Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute2 to microRNA targets. *Elife*, **4**.
 43. Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W. and Bartel, D.P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*, **4**.
 44. Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J. and MacRae, I.J. (2014) Structural basis for microRNA targeting. *Science*, **346**, 608-613.
 45. Moore, M.J., Scheel, T.K.H., Luna, J.M., Park, C.Y., Fak, J.J., Nishiuchi, E., Rice, C.M. and Darnell, R.B. (2015) miRNA-target chimeras reveal miRNA 3' -end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nature Communications*, **6**.
 46. Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, **455**, 58-63.
 47. Uhlmann, S., Mannsperger, H., Zhang, J.T.D., Horvat, E.A., Schmidt, C., Kublbeck, M., Henjes, F., Ward, A., Tschulena, U., Zweig, K. *et al.* (2012) Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Molecular Systems Biology*, **8**.
 48. Eichhorn, S.W., Guo, H.L., McGeary, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S.H., Ghoshal, K., Villen, J. and Bartel, D.P. (2014) mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues. *Molecular Cell*, **56**, 104-115.
 49. Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M. and Izaurralde, E. (2011) GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylase Complexes to miRNA Targets. *Molecular Cell*, **44**, 120-133.
 50. Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F. *et al.* (2012) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT (vol 18, pg 1211, 2011). *Nature Structural & Molecular Biology*, **19**, 365-365.

51. Braun, J.E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M. and Izaurralde, E. (2012) A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature Structural & Molecular Biology*, **19**, 1324-+.
52. Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. and Izaurralde, E. (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1 : DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *Rna*, **11**, 1640-1647.
53. Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., Sonenberg, N., Thoma, C. and Fujiwara, T. (2014) MicroRNAs Trigger Dissociation of eIF4AI and eIF4AII from Target mRNAs in Humans. *Molecular Cell*, **56**, 79-89.
54. Paroo, Z., Ye, X.C., Chen, S. and Liu, Q.H. (2009) Phosphorylation of the Human MicroRNA-Generating Complex Mediates MAPK/Erk Signaling. *Cell*, **139**, 112-122.
55. Yang, Q., Li, W.M., She, H., Dou, J., Duong, D.M., Du, Y.H., Yang, S.H., Seyfried, N.T., Fu, H.A., Gao, G.D. *et al.* (2015) Stress Induces p38 MAPK-Mediated Phosphorylation and Inhibition of Drosha-Dependent Cell Survival. *Molecular Cell*, **57**, 721-734.
56. Shen, J., Xia, W.Y., Khotskaya, Y.B., Huo, L.F., Nakanishi, K., Lim, S.O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W.C., Chen, C.H. *et al.* (2013) EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature*, **497**, 383-387.
57. Treiber, T., Treiber, N. and Meister, G. (2019) Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **20**, 5-20.
58. Ye, P.Y., Liu, Y., Chen, C., Tang, F., Wu, Q., Wang, X., Liu, C.G., Liu, X.P., Liu, R.H., Liu, Y. *et al.* (2015) An mTORC1-Mdm2-Drosha Axis for miRNA Biogenesis in Response to Glucose- and Amino Acid-Deprivation. *Molecular Cell*, **57**, 708-720.
59. Bronevetsky, Y., Villarino, A.V., Easley, C.J., Barbeau, R., Barczak, A.J., Heinz, G.A., Kremmer, E., Heissmeyer, V., McManus, M.T., Erle, D.J. *et al.* (2013) T cell activation induces proteasomal degradation of Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire. *Journal of Experimental Medicine*, **210**, 417-432.
60. Zhu, C.H., Chen, C., Huang, J., Zhang, H.L., Zhao, X., Deng, R., Dou, J.Z., Jin, H., Chen, R., Xu, M. *et al.* (2015) SUMOylation at K-707 of DGCR8 controls direct function of primary microRNA. *Nucleic Acids Research*, **43**, 7945-7960.
61. Sahin, U., Lapaquette, P., Andrieux, A., Faure, G. and Dejean, A. (2014) Sumoylation of Human Argonaute 2 at Lysine-402 Regulates Its Stability. *Plos One*, **9**.
62. Josa-Prado, F., Henley, J.M. and Wilkinson, K.A. (2015) SUMOylation of Argonaute-2 regulates RNA interference activity.

- Biochemical and Biophysical Research Communications*, **464**, 1066-1071.
63. Ratnadiwakara, M., Mohenska, M. and Anko, M.L. (2018) Splicing factors as regulators of miRNA biogenesis - links to human disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **79**, 113-122.
 64. Roush, S. and Slack, F.J. (2008) The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol*, **18**, 505-516.
 65. Wang, Y.R., Luo, J.J., Zhang, H. and Lu, J. (2016) microRNAs in the Same Clusters Evolve to Coordinately Regulate Functionally Related Genes. *Molecular Biology and Evolution*, **33**, 2232-2247.
 66. Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J. *et al.* (2008) A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 13556-13561.
 67. Scott, G.K., Mattie, N.D., Berger, C.E., Benz, S.C. and Benz, C.C. (2006) Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Research*, **66**, 1277-1281.
 68. Yamane, D., Selitsky, S.R., Shimakami, T., Li, Y., Zhou, M., Honda, M., Sethupathy, P. and Lemon, S.M. (2017) Differential hepatitis C virus RNA target site selection and host factor activities of naturally occurring miR-122 3' variants. *Nucleic Acids Research*, **45**, 4743-4755.
 69. Wyman, S.K., Knouf, E.C., Parkin, R.K., Fritz, B.R., Lin, D.W., Dennis, L.M., Krouse, M.A., Webster, P.J. and Tewari, M. (2011) Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Research*, **21**, 1450-1461.
 70. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T. and Suzuki, T. (2009) Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes & Development*, **23**, 433-438.
 71. Jones, M.R., Quinton, L.J., Blahna, M.T., Neilson, J.R., Fu, S.N., Ivanov, A.R., Wolf, D.A. and Mizgerd, J.P. (2009) Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nature Cell Biology*, **11**, 1157-U1258.
 72. Han, B.W., Hung, J.H., Weng, Z.P., Zamore, P.D. and Ameres, S.L. (2011) The 3'-to-5' Exoribonuclease Nibbler Shapes the 3' Ends of MicroRNAs Bound to Drosophila Argonaute1. *Current Biology*, **21**, 1878-1887.
 73. Xue, Z.H., Yuan, H.Y., Guo, J.H. and Liu, Y. (2012) Reconstitution of an Argonaute-Dependent Small RNA Biogenesis Pathway Reveals

- a Handover Mechanism Involving the RNA Exosome and the Exonuclease QIP. *Molecular Cell*, **46**, 299-310.
74. Humphreys, D.T., Hynes, C.J., Patel, H.R., Wei, G.H., Cannon, L., Fatkin, D., Suter, C.M., Clancy, J.L. and Preiss, T. (2012) Complexity of Murine Cardiomyocyte miRNA Biogenesis, Sequence Variant Expression and Function. *Plos One*, **7**.
 75. Tan, G.C., Chan, E., Molnar, A., Sarkar, R., Alexieva, D., Isa, I.M., Robinson, S., Zhang, S.C., Ellis, P., Langford, C.F. *et al.* (2014) 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic Acids Research*, **42**, 9424-9435.
 76. Wang, S.Q., Zheng, Z.H., Chen, P.C. and Wu, M.J. (2019) Tumor classification and biomarker discovery based on the 5'isomiR expression level. *Bmc Cancer*, **19**.
 77. Kawahara, Y., Megraw, M., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A.G. and Nishikura, K. (2008) Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Research*, **36**, 5270-5280.
 78. Alon, S., Mor, E., Vigneault, F., Church, G.M., Locatelli, F., Galeano, F., Gallo, A., Shomron, N. and Eisenberg, E. (2012) Systematic identification of edited microRNAs in the human brain. *Genome Research*, **22**, 1533-1540.
 79. Denzler, R., Agarwal, V., Stefano, J., Bartel, D.P. and Stoffel, M. (2014) Assessing the ceRNA Hypothesis with Quantitative Measurements of miRNA and Target Abundance. *Molecular Cell*, **54**, 766-776.
 80. Thomson, D.W. and Dinger, M.E. (2016) Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. *Nature Reviews Genetics*, **17**, 272-283.
 81. Bosson, A.D., Zamudio, J.R. and Sharp, P.A. (2014) Endogenous miRNA and Target Concentrations Determine Susceptibility to Potential ceRNA Competition. *Molecular Cell*, **56**, 347-359.
 82. Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K. and Kjems, J. (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, **495**, 384-388.
 83. Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M. *et al.* (2013) Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, **495**, 333-338.
 84. Piwecka, M., Glazar, P., Hernandez-Miranda, L.R., Memczak, S., Wolf, S.A., Rybak-Wolf, A., Filipchuk, A., Klironomos, F., Jara, C.A.C., Fenske, P. *et al.* (2017) Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science*, **357**.

85. Chim, S.S.C., Shing, T.K.F., Hung, E.C.W., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W.K. and Lo, Y.M.D. (2008) Detection and characterization of placental MicroRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, **54**, 482-490.
86. Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boultonwood, J., Wainscoat, J.S. *et al.* (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, **141**, 672-675.
87. Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E. and Wong, D.T. (2009) Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. *Clinical Cancer Research*, **15**, 5473-5477.
88. Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M. and Sczakiel, G. (2010) A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, **28**, 655-661.
89. Alsaweed, M., Hepworth, A.R., Lefevre, C., Hartmann, P.E., Geddes, D.T. and Hassiotou, F. (2015) Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation. *Journal of Cellular Biochemistry*, **116**, 2397-2407.
90. Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X.L., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L.B., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L.T., Schmittgen, T.D. *et al.* (2008) Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *Plos One*, **3**.
91. Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E. *et al.* (2009) Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Science Signaling*, **2**.
92. Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J. and Lotvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, **9**, 654-U672.
93. Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinze, A. and Burwinkel, B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, **39**, 7223-7233.
94. Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D. and Remaley, A.T. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, **13**, 423-U182.
95. Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L. *et al.* (2011) Argonaute2 complexes carry a

- population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 5003-5008.
96. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. and Illei, G.G. (2012) The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. *Plos One*, **7**.
 97. Max, K.E.A., Bertram, K., Akat, K.M., Bogardus, K.A., Li, J., Morozov, P., Ben-Dov, I.Z., Li, X., Weiss, Z.R., Azizian, A. *et al.* (2018) Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, E5334-E5343.
 98. Wang, K., Yuan, Y., Cho, J.H., McClarty, S., Baxter, D. and Galas, D.J. (2012) Comparing the MicroRNA Spectrum between Serum and Plasma. *Plos One*, **7**.
 99. Turchinoyich, A., Toneyitsky, A.G. and Burwinkel, B. (2016) Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. *Trends in Biochemical Sciences*, **41**, 883-892.
 100. Zhou, W.Y., Fong, M.Y., Min, Y.F., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M.R., Yu, Y., Chow, A., O'Connor, S.T.F., Chin, A.R. *et al.* (2014) Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. *Cancer Cell*, **25**, 501-515.
 101. Giusti, I., Delle Monache, S., Di Francesco, M., Sanita, P., D'Ascenzo, S., Gravina, G.L., Festuccia, C. and Dolo, V. (2016) From glioblastoma to endothelial cells through extracellular vesicles: messages for angiogenesis. *Tumor Biology*, **37**, 12743-12753.
 102. Turchinovich, A., Samatov, T.R., Tonevitsky, A.G. and Burwinkel, B. (2013) Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*, **4**, 119.
 103. Guduric-Fuchs, J., O'Connor, A., Camp, B., O'Neill, C.L., Medina, R.J. and Simpson, D.A. (2012) Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *Bmc Genomics*, **13**.
 104. Ahadi, A., Brennan, S., Kennedy, P.J., Hutvagner, G. and Tran, N. (2016) Long non-coding RNAs harboring miRNA seed regions are enriched in prostate cancer exosomes. *Scientific Reports*, **6**.
 105. Villarroya-Beltri, C., Gutierrez-Vazquez, C., Sanchez-Cabo, F., Perez-Hernandez, D., Vazquez, J., Martin-Cofreces, N., Martinez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F. (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, **4**.
 106. Santangelo, L., Giurato, G., Cicchini, C., Montaldo, C., Mancone, C., Tarallo, R., Battistelli, C., Alonzi, T., Weisz, A. and Tripodi, M.

- (2016) The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Reports*, **17**, 799-808.
107. Teng, Y., Ren, Y., Hu, X., Mu, J., Samykutty, A., Zhuang, X., Deng, Z., Kumar, A., Zhang, L., Merchant, M.L. *et al.* (2017) MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun*, **8**, 14448.
 108. Shurtleff, M.J., Temoche-Diaz, M.M., Karfilis, K.V., Ri, S. and Schekman, R. (2016) Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*, **5**.
 109. Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I.V., van Eijndhoven, M.A.J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J.M., Ylstra, B., de Menezes, R.X. *et al.* (2014) Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. *Cell Reports*, **8**, 1649-1658.
 110. McKenzie, A.J., Hoshino, D., Hong, N.H., Cha, D.J., Franklin, J.L., Coffey, R.J., Patton, J.G. and Weaver, A.M. (2016) KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Reports*, **15**, 978-987.
 111. Cifuentes, D., Xue, H.L., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E.B., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D. *et al.* (2010) A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity. *Science*, **328**, 1694-1698.
 112. Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A.J. and Tomari, Y. (2013) Poly(A)-Specific Ribonuclease Mediates 3'-End Trimming of Argonaute2-Cleaved Precursor MicroRNAs. *Cell Reports*, **5**, 715-726.
 113. Jee, D., Yang, J.S., Park, S.M., Farmer, D.T., Wen, J.Y., Chou, T., Chow, A., McManus, M.T., Kharas, M.G. and Lai, E.C. (2018) Dual Strategies for Argonaute2-Mediated Biogenesis of Erythroid miRNAs Underlie Conserved Requirements for Slicing in Mammals. *Molecular Cell*, **69**, 265-+.
 114. Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M.J., Park, J.E., Kwon, S.C., Chang, H. and Kim, V.N. (2012) Mono-Uridylation of Pre-MicroRNA as a Key Step in the Biogenesis of Group II let-7 MicroRNAs. *Cell*, **151**, 521-532.
 115. Kim, B., Ha, M., Loeff, L., Chang, H., Simanshu, D.K., Li, S., Fareh, M., Patel, D.J., Joo, C. and Kim, V.N. (2015) TUT7 controls the fate of precursor microRNAs by using three different uridylation mechanisms. *Embo Journal*, **34**, 1801-1815.
 116. Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. and Meister, G. (2008) A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Molecular Cell*, **32**, 519-528.

117. Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L. and Gruber, J. (2011) Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic Acids Research*, **39**, 675-686.
118. Kishore, S., Gruber, A.R., Jedlinski, D.J., Syed, A.P., Jorjani, H. and Zavolan, M. (2013) Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing. *Genome Biology*, **14**.
119. Patterson, D.G., Roberts, J.T., King, V.M., Houserova, D., Barnhill, E.C., Crucello, A., Polska, C.J., Brantley, L.W., Kaufman, G.C., Nguyen, M. *et al.* (2017) Human snoRNA-93 is processed into a microRNA-like RNA that promotes breast cancer cell invasion. *Npj Breast Cancer*, **3**.
120. Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S.B. and Dutta, A. (2014) Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *Bmc Biology*, **12**.
121. Hasler, D., Lehmann, G., Murakawa, Y., Klironomos, F., Jakob, L., Grasser, F.A., Rajewsky, N., Landthaler, M. and Meister, G. (2016) The Lupus Autoantigen La Prevents Mis-channeling of tRNA Fragments into the Human MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, **63**, 110-124.
122. Hasler, D. and Meister, G. (2016) From tRNA to miRNA: RNA-folding contributes to correct entry into noncoding RNA pathways. *Febs Letters*, **590**, 2354-2363.
123. Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W.S., Green, P.J., Barton, G.J. and Hutvagner, G. (2009) Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *Rna*, **15**, 2147-2160.
124. Kuscu, C., Kumar, P., Kiran, M., Su, Z.L., Malik, A. and Dutta, A. (2018) tRNA fragments (tRFs) guide Ago to regulate gene expression post-transcriptionally in a Dicer-independent manner. *Rna*, **24**, 1093-1105.
125. Maute, R.L., Schneider, C., Sumazin, P., Holmes, A., Califano, A., Basso, K. and Dalla-Favera, R. (2013) tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 1404-1409.
126. Xie, M.Y., Li, M.F., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.D., Yartseva, V., Sestan, N. and Steitz, J.A. (2013) Mammalian 5'-Capped MicroRNA Precursors that Generate a SingleMicroRNA. *Cell*, **155**, 1568-1580.
127. Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M. and Lai, E.C. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, **130**, 89-100.

128. Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E. and Lai, E.C. (2007) Mammalian mirtron genes. *Molecular Cell*, **28**, 328-336.
129. Meng, Y.J. and Shao, C.G. (2012) Large-Scale Identification of Mirtrons in Arabidopsis and Rice. *Plos One*, **7**.
130. Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A.S., Westholm, J.O. and Lai, E.C. (2012) Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Research*, **22**, 1634-1645.
131. Da Fonseca, B.H.R., Domingues, D.S. and Paschoal, A.R. (2019) mirtronDB: a mirtron knowledge base. *Bioinformatics*.
132. Westholm, J.O., Ladewig, E., Okamura, K., Robine, N. and Lai, E.C. (2012) Common and distinct patterns of terminal modifications to mirtrons and canonical microRNAs. *Rna-a Publication of the Rna Society*, **18**, 177-192.
133. Titov, I.I. and Vorozheykin, P.S. (2018) Comparing miRNA structure of mirtrons and non-mirtrons. *Bmc Genomics*, **19**.
134. Chung, W.J., Agius, P., Westholm, J.O., Chen, M., Okamura, K., Robine, N., Leslie, C.S. and Lai, E.C. (2011) Computational and experimental identification of mirtrons in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans. *Genome Research*, **21**, 286-300.
135. Rorbach, G., Unold, O. and Konopka, B.M. (2018) Distinguishing mirtrons from canonical miRNAs with data exploration and machine learning methods. *Scientific Reports*, **8**.
136. Havens, M.A., Reich, A.A., Duelli, D.M. and Hastings, M.L. (2012) Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Research*, **40**, 4626-4640.
137. Hansen, T.B., Veno, M.T., Jensen, T.I., Schaefer, A., Damgaard, C.K. and Kjems, J. (2016) Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nature Communications*, **7**.
138. Smibert, P., Yang, J.S., Azzam, G., Liu, J.L. and Lai, E.C. (2013) Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nature Structural & Molecular Biology*, **20**, 789+.
139. Hube, F., Ulveling, D., Sureau, A., Forveille, S. and Francastel, C. (2017) Short intron-derived ncRNAs. *Nucleic Acids Research*, **45**, 4768-4781.
140. Agranat-Tamir, L., Shomron, N., Sperling, J. and Sperling, R. (2014) Interplay between pre-mRNA splicing and microRNA biogenesis within the supraspliceosome. *Nucleic Acids Research*, **42**, 4640-4651.
141. Coltri, P.P., dos Santos, M.G.P. and da Silva, G.H.G. (2019) Splicing and cancer: Challenges and opportunities. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna*, **10**.
142. Baralle, M. and Baralle, F.E. (2018) The splicing code. *Biosystems*, **164**, 39-48.
143. Stevens, M. and Oltean, S. (2016) Alternative Splicing in CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, **27**, 1596-1603.

144. Zhang, X.H.F., Heller, K.A., Hefter, L., Leslie, C.S. and Chasin, L.A. (2003) Sequence information for the splicing of human Pre-mRNA identified by support vector machine classification. *Genome Research*, **13**, 2637-2650.
145. Fu, X.D. and Ares, M. (2014) Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature Reviews Genetics*, **15**, 689-701.
146. Keren, H., Lev-Maor, G. and Ast, G. (2010) Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews Genetics*, **11**, 345-355.
147. Manley, J.L. and Krainer, A.R. (2010) A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes & Development*, **24**, 1073-1074.
148. Graveley, B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna*, **6**, 1197-1211.
149. Geuens, T., Bouhy, D. and Timmerman, V. (2016) The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Human Genetics*, **135**, 851-867.
150. Chaudhury, A., Chander, P. and Howe, P.H. (2010) Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *Rna-a Publication of the Rna Society*, **16**, 1449-1462.
151. Weighardt, F., Biamonti, G. and Riva, S. (1995) Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1. *J Cell Sci*, **108 (Pt 2)**, 545-555.
152. Jeong, S. (2017) SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA. *Molecules and Cells*, **40**, 1-9.
153. Erkelenz, S., Mueller, W.F., Evans, M.S., Busch, A., Schoneweis, K., Hertel, K.J. and Schaal, H. (2013) Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. *Rna-a Publication of the Rna Society*, **19**, 96-102.
154. Barash, Y., Calarco, J.A., Gao, W.J., Pan, Q., Wang, X.C., Shai, O., Blencowe, B.J. and Frey, B.J. (2010) Deciphering the splicing code. *Nature*, **465**, 53-59.
155. Wu, H., Sun, S.Y., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A.R. and Zhu, J. (2010) A Splicing-Independent Function of SF2/ASF in MicroRNA Processing. *Molecular Cell*, **38**, 67-77.
156. Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E. and Bartel, D.P. (2013) Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing. *Cell*, **152**, 844-858.
157. Kim, K., Nguyen, T.D., Li, S. and Nguyen, T.A. (2018) SRSF3 recruits DROSHA to the basal junction of primary microRNAs. *Rna*, **24**, 892-898.

158. Guil, S. and Caceres, J.F. (2007) The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature Structural & Molecular Biology*, **14**, 591-596.
159. Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A. and Caceres, J.F. (2008) Posttranscriptional Regulation of miRNAs Harboring Conserved Terminal Loops. *Molecular Cell*, **32**, 383-393.
160. Kim, H.R., Shin, C.H., Lee, H., Choi, K.H., Nam, D.H., Ohn, T. and Kim, H.H. (2017) MicroRNA-1908-5p contributes to the oncogenic function of the splicing factor SRSF3. *Oncotarget*, **8**, 8342-8355.
161. Kim, H.R., Hwang, S.J., Shin, C.H., Choi, K.H., Ohn, T. and Kim, H.H. (2017) SRSF3-regulated miR-132/212 controls cell migration and invasion by targeting YAP1. *Experimental Cell Research*, **358**, 161-170.
162. Ruddy, J.M., Jones, J.A. and Ikonomidis, J.S. (2013) Pathophysiology of Thoracic Aortic Aneurysm (TAA): Is It Not One Uniform Aorta? Role of Embryologic Origin. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **56**, 68-73.
163. de Pol, V.V., Kurakula, K., DeRuiter, M.C. and Goumans, M.J. (2017) Thoracic Aortic Aneurysm Development in Patients with Bicuspid Aortic Valve: What Is the Role of Endothelial Cells? *Frontiers in Physiology*, **8**.
164. Cheung, K., Boodhwani, M., Chan, K.L., Beauchesne, L., Dick, A. and Coutinho, T. (2017) Thoracic Aortic Aneurysm Growth: Role of Sex and Aneurysm Etiology. *Journal of the American Heart Association*, **6**.
165. Sokolis, D.P. and Iliopoulos, D.C. (2014) Impaired mechanics and matrix metalloproteinases/inhibitors expression in female ascending thoracic aortic aneurysms. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **34**, 154-164.
166. Nicolini, F., Vezzani, A., Corradi, F., Gherli, R., Benassi, F., Manca, T. and Gherli, T. (2018) Gender differences in outcomes after aortic aneurysm surgery should foster further research to improve screening and prevention programmes. *European Journal of Preventive Cardiology*, **25**, 32-41.
167. Shen, Y.H. and LeMaire, S.A. (2017) Molecular pathogenesis of genetic and sporadic aortic aneurysms and dissections. *Current Problems in Surgery*, **54**, 95-155.
168. LeMaire, S.A., McDonald, M.L.N., Guo, D.C., Russell, L., Miller, C.C., Johnson, R.J., Bekheirnia, M.R., Franco, L.M., Nguyen, M., Pyeritz, R.E. *et al.* (2011) Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21.1. *Nature Genetics*, **43**, 996-U109.

169. Kuang, S.Q., Guo, D.C., Prakash, S.K., McDonald, M.L.N., Johnson, R.J., Wang, M., Regalado, E.S., Russell, L., Cao, J.M., Kwartler, C. *et al.* (2011) Recurrent Chromosome 16p13.1 Duplications Are a Risk Factor for Aortic Dissections. *Plos Genetics*, **7**.
170. Chaudhury, A. and Howe, P.H. (2009) The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigne enigma. *IUBMB Life*, **61**, 929-939.
171. Verstraeten, A., Luyckx, I. and Loeys, B. (2017) Aetiology and management of hereditary aortopathy. *Nature Reviews Cardiology*, **14**, 197-208.
172. Habashi, J.P., Judge, D.P., Holm, T.M., Cohn, R.D., Loeys, B.L., Cooper, T.K., Myers, L., Klein, E.C., Liu, G.S., Calvi, C. *et al.* (2006) Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, **312**, 117-121.
173. Kaartinen, V. and Warburton, D. (2003) Fibrillin controls TGF-beta activation. *Nat Genet*, **33**, 331-332.
174. Wei, H., Hu, J.H., Angelov, S.N., Fox, K., Yan, J., Enstrom, R., Smith, A. and Dichek, D.A. (2017) Aortopathy in a Mouse Model of Marfan Syndrome Is Not Mediated by Altered Transforming Growth Factor beta Signaling. *Journal of the American Heart Association*, **6**.
175. Li, W., Li, Q.L., Jiao, Y., Qin, L.F., Ali, R., Zhou, J., Ferruzzi, J., Kim, R.W., Geirsson, A., Dietz, H.C. *et al.* (2014) Tgfbr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, **124**, 755-767.
176. Zhang, P., Hou, S.Y., Chen, J.C., Zhang, J.S., Lin, F.Y., Ju, R.J., Cheng, X., Ma, X.W., Song, Y., Zhang, Y.Y. *et al.* (2016) Smad4 Deficiency in Smooth Muscle Cells Initiates the Formation of Aortic Aneurysm. *Circulation Research*, **118**, 388-399.
177. Gomez, D., Zen, A.A.H., Borges, L.F., Philippe, M., Gutierrez, P.S., Jondeau, G., Michel, J.B. and Vranckx, R. (2009) Syndromic and non-syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *Journal of Pathology*, **218**, 131-142.
178. Nagasawa, A., Yoshimura, K., Suzuki, R., Mikamo, A., Yamashita, O., Ikeda, Y., Tsuchida, M. and Hamano, K. (2013) Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. *Journal of Surgical Research*, **183**, 472-477.
179. Rabkin, S.W. (2014) Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm - comparison with and without bicuspid aortic valve: a meta-analysis. *Vasa-European Journal of Vascular Medicine*, **43**, 433-442.
180. Milewicz, D.M., Trybus, K.M., Guo, D.C., Sweeney, H.L., Regalado, E., Kamm, K. and Stull, J.T. (2017) Altered Smooth Muscle Cell Force Generation as a Driver of Thoracic Aortic Aneurysms and

- Dissections. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **37**, 26-34.
181. Kang, H. and Hata, A. (2012) MicroRNA regulation of smooth muscle gene expression and phenotype. *Current Opinion in Hematology*, **19**, 224-231.
 182. Malashicheva, A., Kostina, D., Kostina, A., Irtyuga, O., Voronkina, I., Smagina, L., Ignatieva, E., Gavriliuk, N., Uspensky, V., Moiseeva, O. *et al.* (2016) Phenotypic and Functional Changes of Endothelial and Smooth Muscle Cells in Thoracic Aortic Aneurysms. *International Journal of Vascular Medicine*.
 183. Mao, N.H., Gu, T.X., Shi, E.Y., Zhang, G.W., Yu, L. and Wang, C. (2015) Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in animal model of rat thoracic aortic aneurysm. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, **21**, 62-70.
 184. He, R.M., Guo, D.C., Sun, W., Papke, C.L., Duraisamy, S., Estrera, A.L., Safi, H.J., Ahn, C., Buja, L.M., Arnett, F.C. *et al.* (2008) Characterization of the inflammatory cells in ascending thoracic aortic aneurysms in patients with Marfan syndrome, familial thoracic aortic aneurysms, and sporadic aneurysms. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **136**, 922-U925.
 185. Sulkava, M., Raitoharju, E., Mennander, A., Levula, M., Seppala, I., Lyytikainen, L.P., Jarvinen, O., Illig, T., Klopp, N., Mononen, N. *et al.* (2017) Differentially expressed genes and canonical pathways in the ascending thoracic aortic aneurysm - The Tampere Vascular Study. *Scientific Reports*, **7**.
 186. Kumar, S., Boon, R.A., Maegdefessel, L., Dimmeler, S. and Jo, H. (2019) Role of Noncoding RNAs in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm. *Circ Res*, **124**, 619-630.
 187. Liao, M.F., Zou, S.L., Weng, J.F., Hon, L.W., Yang, L., Zhao, Z.Q., Bao, J.M. and Jing, Z.P. (2011) A microRNA profile comparison between thoracic aortic dissection and normal thoracic aorta indicates the potential role of microRNAs in contributing to thoracic aortic dissection pathogenesis. *Journal of Vascular Surgery*, **53**, 1341-1349.
 188. Pei, H., Tian, C., Sun, X., Qian, X., Liu, P., Liu, W. and Chang, Q. (2015) Overexpression of MicroRNA-145 Promotes Ascending Aortic Aneurysm Media Remodeling through TGF-beta 1. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, **49**, 52-59.
 189. Ella, L., Quintavalle, M., Zhang, J., Contu, R., Cossu, L., Latronico, M.V.G., Peterson, K.L., Indolfi, C., Catalucci, D., Chen, J. *et al.* (2009) The knockout of miR-143 and-145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death and Differentiation*, **16**, 1590-1598.
 190. Cordes, K.R., Sheehy, N.T., White, M.P., Berry, E.C., Morton, S.U., Muth, A.N., Lee, T.H., Miano, J.M., Ivey, K.N. and Srivastava, D.

- (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, **460**, 705-U780.
191. Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J.G., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X.K., Mayr, M. *et al.* (2012) Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, **14**, 249-+.
 192. Boon, R.A., Seeger, T., Heydt, S., Fischer, A., Hergenreider, E., Horrevoets, A.J.G., Vinciguerra, M., Rosenthal, N., Sciacca, S., Pilato, M. *et al.* (2011) MicroRNA-29 in Aortic Dilatation: Implications for Aneurysm Formation. *Circulation Research*, **109**, 1115-U1166.
 193. Jones, J.A., Stroud, R.E., O'Quinn, E.C., Black, L.E., Barth, J.L., Elefteriades, J.A., Bavaria, J.E., Gorman, J.H., Gorman, R.C., Spinale, F.G. *et al.* (2011) Selective MicroRNA Suppression in Human Thoracic Aneurysms Relationship of miR-29a to Aortic Size and Proteolytic Induction. *Circulation-Cardiovascular Genetics*, **4**, 605-U264.
 194. Torella, D., Iaconetti, C., Catalucci, D., Ellison, G.M., Leone, A., Waring, C.D., Bochicchio, A., Vicinanza, C., Aquila, I., Curcio, A. *et al.* (2011) MicroRNA-133 Controls Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch In Vitro and Vascular Remodeling In Vivo. *Circulation Research*, **109**, 880-U146.
 195. Frisantiene, A., Philippova, M., Erne, P. and Resink, T.J. (2018) Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cellular Signalling*, **52**, 48-64.
 196. Akerman, A.W., Blanding, W.M., Stroud, R.E., Nadeau, E.K., Mukherjee, R., Ruddy, J.M., Zile, M.R., Ikonomidis, J.S. and Jones, J.A. (2019) Elevated Wall Tension Leads to Reduced miR-133a in the Thoracic Aorta by Exosome Release. *Journal of the American Heart Association*, **8**.
 197. Moushi, A., Michailidou, K., Soteriou, M., Cariolou, M. and Bashiardes, E. (2018) MicroRNAs as possible biomarkers for screening of aortic aneurysms: a systematic review and validation study. *Biomarkers*, **23**, 253-264.
 198. Boileau, A., Lino Cardenas, C.L., Courtois, A., Zhang, L., Rodosthenous, R.S., Das, S., Sakalihasan, N., Michel, J.B., Lindsay, M.E. and Devaux, Y. (2019) MiR-574-5p: A Circulating Marker of Thoracic Aortic Aneurysm. *Int J Mol Sci*, **20**.
 199. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424.

200. Hibner, G., Kimsa-Furdzik, M. and Francuz, T. (2018) Relevance of MicroRNAs as Potential Diagnostic and Prognostic Markers in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**.
201. Zheng, Q., Chen, C.Y., Guan, H.Y., Kang, W.B.A. and Yu, C.J. (2017) Prognostic role of microRNAs in human gastrointestinal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, **8**, 46611-46623.
202. Baradaran, B., Shahbazi, R. and Khordadmehr, M. (2019) Dysregulation of key microRNAs in pancreatic cancer development. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **109**, 1008-1015.
203. Peng, Y. and Croce, C.M. (2016) The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **1**.
204. Kuninty, P.R., Schnittert, J., Storm, G. and Prakash, J. (2016) MicroRnA Targeting to Modulate Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, **6**.
205. Link, A. and Kupcinskas, J. (2018) MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: Current insights and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, **24**, 3313-3329.
206. Fadaka, A.O., Pretorius, A. and Klein, A. (2019) Biomarkers for Stratification in Colorectal Cancer: MicroRNAs. *Cancer Control*, **26**.
207. Filipow, S. and Laczmanski, L. (2019) Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response. *Frontiers in Genetics*, **10**.
208. Rubio, M., Bustamante, M., Hernandez-Ferrer, C., Fernandez-Orth, D., Pantano, L., Sarria, Y., Pique-Borras, M., Vellve, K., Agramunt, S., Carreras, R. *et al.* (2018) Circulating miRNAs, isomiRs and small RNA clusters in human plasma and breast milk. *Plos One*, **13**.
209. Eminaga, S., Christodoulou, D.C., Vigneault, F., Church, G.M. and Seidman, J.G. (2013) Quantification of microRNA expression with next-generation sequencing. *Curr Protoc Mol Biol*, **Chapter 4**, Unit 4 17.
210. Mosakhani, N., Lahti, L., Borze, I., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Sundstrom, J., Ristamaki, R., Osterlund, P., Knuutila, S. and Sarhadi, V.K. (2012) MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF. *Cancer Genetics*, **205**, 545-551.
211. Nymark, P., Guled, M., Borze, I., Faisal, A., Lahti, L., Salmenkivi, K., Kettunen, E., Anttila, S. and Knuutila, S. (2011) Integrative Analysis of microRNA, mRNA and aCGH Data Reveals Asbestos- and Histology-Related Changes in Lung Cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*, **50**, 585-597.
212. Qian, J., Li, R., Wang, Y.Y., Shi, Y., Luan, W.K., Tao, T., Zhang, J.X., Xu, Y.C. and You, Y.P. (2015) MiR-1224-5p acts as a tumor

- suppressor by targeting CREB1 in malignant gliomas. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **403**, 33-41.
213. Zhou, Q., Zeng, H., Ye, P., Shi, Y., Guo, J. and Long, X.H. (2018) Differential microRNA profiles between fulvestrant-resistant and tamoxifen-resistant human breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, **29**, 539-548.
214. Lindner, K., Eichelmann, A.K., Matuszcak, C., Hussey, D.J., Haier, J. and Hummel, R. (2018) Complex Epigenetic Regulation of Chemotherapy Resistance and Biology in Esophageal Squamous Cell Carcinoma via MicroRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**.
215. Borkowski, R., Du, L.Q., Zhao, Z.Z., McMillan, E., Kosti, A., Yang, C.R., Suraokar, M., Wistuba, I.I., Gazdar, A.F., Minna, J.D. *et al.* (2015) Genetic Mutation of p53 and Suppression of the miR-17 similar to 92 Cluster Are Synthetic Lethal in Non-Small Cell Lung Cancer due to Upregulation of Vitamin D Signaling. *Cancer Research*, **75**, 666-675.
216. Tan, Z.Y., Zheng, H.Q., Liu, X.X., Zhang, W.H., Zhu, J.R., Wu, G.Y., Cao, L.X., Song, J.W., Wu, S., Song, L.B. *et al.* (2016) MicroRNA-1229 overexpression promotes cell proliferation and tumorigenicity and activates Wnt/beta-catenin signaling in breast cancer. *Oncotarget*, **7**, 24076-24087.
217. Munthe, S., Halle, B., Boldt, H.B., Christiansen, H., Schmidt, S., Kaimal, V., Xu, J., Zabludoff, S., Mollenhauer, J., Poulsen, F.R. *et al.* (2017) Shift of microRNA profile upon glioma cell migration using patient-derived spheroids and serum-free conditions. *Journal of Neuro-Oncology*, **132**, 45-54.
218. Zhu, X.P., Wang, X.L., Ma, J., Fang, Y.F., Zhang, H.J., Zhang, C. and Feng, M.C. (2018) Down-regulation of miR-1236-3p is correlated with clinical progression and unfavorable prognosis in gastric cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **22**, 5914-5919.
219. An, J.X., Ma, M.H., Zhang, C.D., Shao, S., Zhou, N.M. and Dai, D.Q. (2018) miR-1236-3p inhibits invasion and metastasis in gastric cancer by targeting MTA2. *Cancer Cell International*, **18**.
220. Chen, S.Y., Teng, S.C., Cheng, T.H. and Wu, K.J. (2016) miR-1236 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and cell migration/invasion through repressing SENP1 and HDAC3. *Cancer Letters*, **378**, 59-67.
221. Sibley, C.R., Seow, Y., Curtis, H., Weinberg, M.S. and Wood, M.J.A. (2012) Silencing of Parkinson's disease-associated genes with artificial mirtron mimics of miR-1224. *Nucleic Acids Research*, **40**, 9863-9875.

222. Seow, Y.Q., Sibley, C.R. and Wood, M.J.A. (2012) Artificial mirtron-mediated gene knockdown: Functional DMPK silencing in mammalian cells. *Rna-a Publication of the Rna Society*, **18**, 1328-1337.
223. Kock, K.H., Kong, K.W., Hoon, S. and Seow, Y. (2015) Functional VEGFA knockdown with artificial 3'-tailed mirtrons defined by 5' splice site and branch point. *Nucleic Acids Research*, **43**, 6568-6578.
224. Curtis, H.J., Seow, Y., Wood, M.J.A. and Varela, M.A. (2017) Knockdown and replacement therapy mediated by artificial mirtrons in spinocerebellar ataxia 7. *Nucleic Acids Research*, **45**, 7870-7885.
225. Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F. and Tewari, M. (2012) Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. *Cancer Prevention Research*, **5**, 492-497.
226. Tiberio, P., Callari, M., Angeloni, V., Daidone, M.G. and Appierto, V. (2015) Challenges in Using Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers. *Biomed Research International*.
227. Kirschner, M.B., Kao, S.C., Edelman, J.J., Armstrong, N.J., Valley, M.P., van Zandwijk, N. and Reid, G. (2011) Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma. *Plos One*, **6**.
228. Kirschner, M.B., Edelman, J.J., Kao, S.C., Valley, M.P., van Zandwijk, N. and Reid, G. (2013) The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet*, **4**, 94.
229. Guo, L. and Lu, Z.H. (2010) Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data. *Computational Biology and Chemistry*, **34**, 165-171.
230. Moody, L., He, H.S., Pan, Y.X. and Chen, H. (2017) Methods and novel technology for microRNA quantification in colorectal cancer screening. *Clinical Epigenetics*, **9**.
231. Jung, M., Schaefer, A., Steiner, I., Kempkensteffen, C., Stephan, C., Erbersdobler, A. and Jung, K. (2010) Robust MicroRNA Stability in Degraded RNA Preparations from Human Tissue and Cell Samples. *Clinical Chemistry*, **56**, 998-1006.
232. Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research*, **42**, D68-D73.
233. Guay, C. and Regazzi, R. (2017) Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes Obesity & Metabolism*, **19**, 137-146.
234. Sonoda, T., Matsuzaki, J., Yamamoto, Y., Sakurai, T., Aoki, Y., Takizawa, S., Niida, S. and Ochiya, T. (2019) Serum MicroRNA-Based Risk Prediction for Stroke. *Stroke*, **50**, 1510-1518.

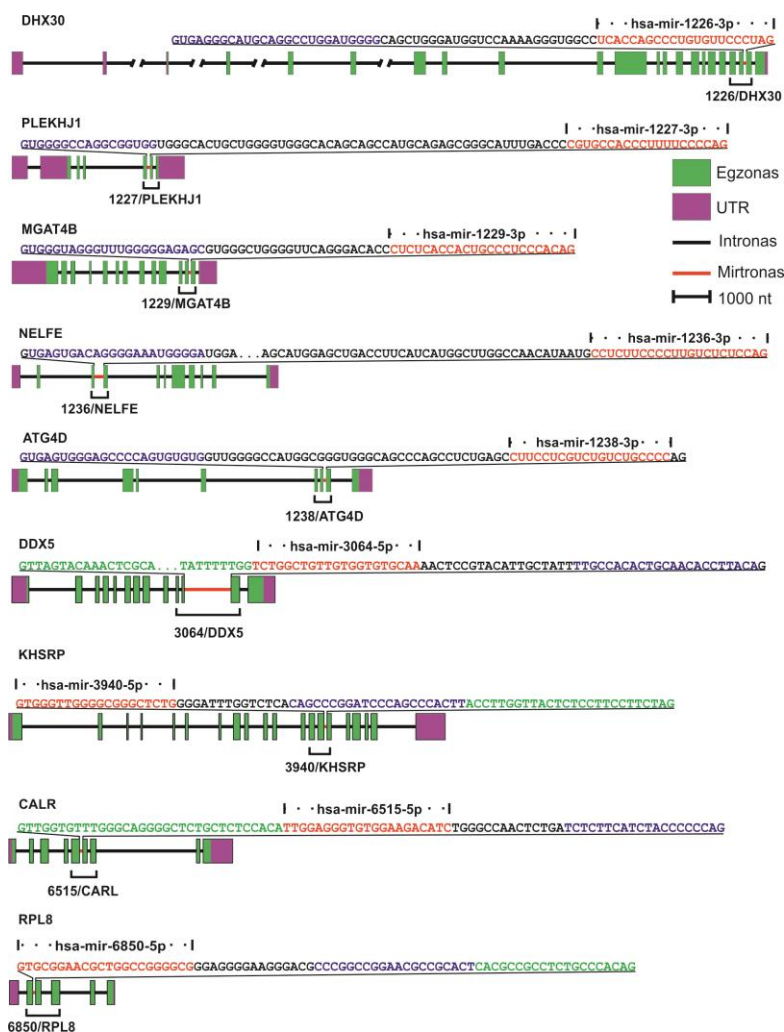
235. Skurnikov, M.Y., Makarova, Y.A., Knyazev, E.N., Fomicheva, K.A., Nyushko, K.M., Saribekyan, E.K., Alekseev, B.Y. and Kaprin, A.D. (2016) Profile of microRNA in Blood Plasma of Healthy Humans. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **160**, 632-634.
236. Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P. and Caldas, C. (2010) Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *Rna-a Publication of the Rna Society*, **16**, 991-1006.
237. Moldovan, L., Batte, K.E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C.B. and Piper, M. (2014) Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **18**, 371-390.
238. Gasiule, S., Stankevicius, V., Patamsyte, V., Razanskas, R., Zukovas, G., Kapustina, Z., Zaliaduonyte, D., Benetis, R., Lesauskaite, V. and Vilkaitis, G. (2019) Tissue-Specific miRNAs Regulate the Development of Thoracic Aortic Aneurysm: The Emerging Role of KLF4 Network. *J Clin Med*, **8**.
239. Huusko, T., Salonurmi, T., Taskinen, P., Liinamaa, J., Juvonen, T., Paakko, P., Savolainen, M. and Kakko, S. (2013) Elevated messenger RNA expression and plasma protein levels of osteopontin and matrix metalloproteinase types 2 and 9 in patients with ascending aortic aneurysms. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **145**, 1117-1123.
240. Lesauskaite, V., Tanganelli, P., Sassi, C., Neri, E., Diciolla, F., Ivanoviene, L., Epistolato, M.C., Lalinga, A.V., Alessandrini, C. and Spina, D. (2001) Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: Morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Human Pathology*, **32**, 1003-1011.
241. Wang, L.X., Zhang, J., Fu, W.G., Guo, D.Q., Jiang, J.H. and Wang, Y.Q. (2012) Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *Journal of Vascular Surgery*, **56**, 1698-+.
242. Rawat, M., Kadian, K., Gupta, Y., Kumar, A., Chain, P.S.G., Kovbasnjuk, O., Kumar, S. and Parasher, G. (2019) MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. *Genes (Basel)*, **10**.
243. Schubert, M., Junker, K. and Heinzelmann, J. (2016) Prognostic and predictive miRNA biomarkers in bladder, kidney and prostate cancer: Where do we stand in biomarker development? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **142**, 1673-1695.
244. Tam, C., Wong, J.H., Tsui, S.K.W., Zuo, T., Chan, T.F. and Ng, T.B. (2019) LncRNAs with miRNAs in regulation of gastric, liver, and

- colorectal cancers: updates in recent years. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 4649-4677.
245. Ashkani, J. and Naidoo, K.J. (2016) Glycosyltransferase Gene Expression Profiles Classify Cancer Types and Propose Prognostic Subtypes. *Scientific Reports*, **6**.
 246. Dang, H., Takai, A., Forgues, M., Pomyen, Y., Mou, H.W., Xue, W., Ray, D., Ha, K.C.H., Morris, Q.D., Hughes, T.R. *et al.* (2017) Oncogenic Activation of the RNA Binding Protein NELFE and MYC Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*, **32**, 101-+.
 247. Gil, J., Ramsey, D., Pawlowski, P., Szmida, E., Leszczynski, P., Bebenek, M. and Sasiadek, M.M. (2018) The Influence of Tumor Microenvironment on ATG4D Gene Expression in Colorectal Cancer Patients. *Medical Oncology*, **35**.
 248. Janknecht, R. (2010) Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *American Journal of Translational Research*, **2**, 223-234.
 249. Fujita, Y., Masuda, K., Hamada, J., Shoda, K., Naruto, T., Hamada, S., Miyakami, Y., Kohmoto, T., Watanabe, M., Takahashi, R. *et al.* (2017) KH-type splicing regulatory protein is involved in esophageal squamous cell carcinoma progression. *Oncotarget*, **8**, 101130-101145.
 250. Venkateswaran, K., Verma, A., Bhatt, A.N., Shrivastava, A., Manda, K., Raj, H.G., Prasad, A., Len, C., Parmar, V.S. and Dwarakanath, B.S. (2018) Emerging Roles of Calreticulin in Cancer: Implications for Therapy. *Current Protein & Peptide Science*, **19**, 344-357.
 251. Das, S. and Krainer, A.R. (2014) Emerging Functions of SRSF1, Splicing Factor and Oncoprotein, in RNA Metabolism and Cancer. *Molecular Cancer Research*, **12**, 1195-1204.
 252. Liang, Y., Tebaldi, T., Rejeski, K., Joshi, P., Stefani, G., Taylor, A., Song, Y.B., Vasic, R., Maziarz, J., Balasubramanian, K. *et al.* (2018) SRSF2 mutations drive oncogenesis by activating a global program of aberrant alternative splicing in hematopoietic cells. *Leukemia*, **32**, 2659-2671.
 253. Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M. and Beroud, C. (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, **37**.
 254. Zhang, Z.D., Liang, K., Zou, G.Q., Chen, X.S., Shi, S.T., Wang, G.Q., Zhang, K.W., Li, K. and Zhai, S.T. (2018) Inhibition of miR-155 attenuates abdominal aortic aneurysm in mice by regulating macrophage-mediated inflammation. *Bioscience Reports*, **38**.
 255. Raso, A., Dirkx, E., Philippen, L.E., Fernandez-Celis, A., De Majo, F., Sampaio-Pinto, V., Sansonetti, M., Juni, R., el Azzouzi, H.,

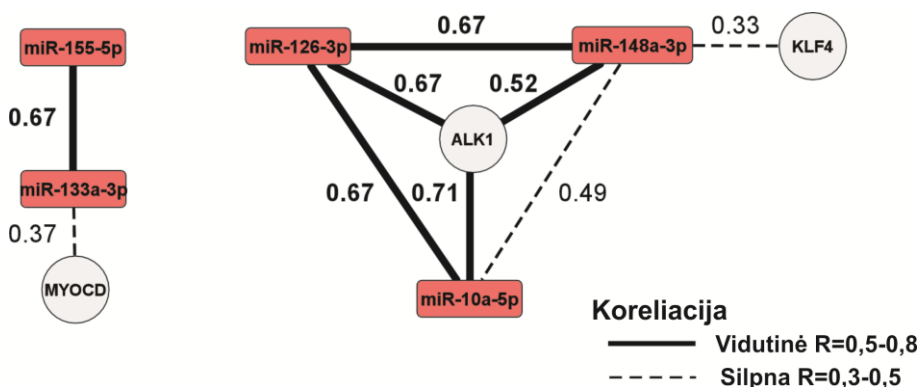
- Calore, M. *et al.* (2019) Therapeutic Delivery of miR-148a Suppresses Ventricular Dilation in Heart Failure. *Molecular Therapy*, **27**, 584-599.
256. Kin, K., Miyagawa, S., Fukushima, S., Shirakawa, Y., Torikai, K., Shimamura, K., Daimon, T., Kawahara, Y., Kuratani, T. and Sawa, Y. (2012) Tissue- and Plasma-Specific MicroRNA Signatures for Atherosclerotic Abdominal Aortic Aneurysm. *Journal of the American Heart Association*, **1**.
257. Welten, S.M.J., Goossens, E.A.C., Quax, P.H.A. and Nossent, A.Y. (2016) The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodelling. *Cardiovascular Research*, **110**, 6-22.
258. Deaton, R.A., Gan, Q. and Owens, G.K. (2009) Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **296**, H1027-H1037.
259. Huang, H.R., Xie, C.Q., Sun, X., Ritchie, R.P., Zhang, J.F. and Chen, Y.E. (2010) miR-10a Contributes to Retinoid Acid-induced Smooth Muscle Cell Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 9383-9389.
260. Hu, J., Xu, Y.X., Hao, J.L., Wang, S.F., Li, C.F. and Meng, S.D. (2012) MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein & Cell*, **3**, 364-371.
261. Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F. and Zeisel, M.B. (2015) miR-122-A key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of Hepatology*, **62**, 448-457.
262. Olijhoek, J.K., van der Graaf, Y., Banga, J.D., Algra, A., Rabelink, T.J., Visseren, F.L.J. and Grp, S.S. (2004) The Metabolic Syndrome is associated with advanced vascular damage in patients with coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *European Heart Journal*, **25**, 342-348.
263. D'Alessandra, Y., Devanna, P., Limana, F., Straino, S., Di Carlo, A., Brambilla, P.G., Rubino, M., Carena, M.C., Spazzafumo, L., De Simone, M. *et al.* (2010) Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal*, **31**, 2765-2773.
264. Kraenkel, N., Kuschnerus, K., Briand, S., Luescher, T.F. and Landmesser, U. (2013) miR-483 impairs endothelial homeostasis and response to vascular injury: upregulation by high-glucose and in patients with type-2 diabetes. *European Heart Journal*, **34**, 762-762.
265. Kong, L.S., Hu, N., Du, X.L., Wang, W.B., Chen, H., Li, W.D., Wei, S., Zhuang, H., Li, X.Q. and Li, C.L. (2016) Upregulation of miR-483-3p contributes to endothelial progenitor cells dysfunction in deep vein thrombosis patients via SRF. *Journal of Translational Medicine*, **14**.

266. Gomez, D., Coyet, A., Ollivier, V., Jeunemaitre, X., Jondeau, G., Michel, J.B. and Vranckx, R. (2011) Epigenetic control of vascular smooth muscle cells in Marfan and non-Marfan thoracic aortic aneurysms. *Cardiovascular Research*, **89**, 446-456.
267. Jones, J.A., Barbour, J.R., Stroud, R.E., Bouges, S., Stephens, S.L., Spinale, F.G. and Ikonomidis, J.S. (2008) Altered Transforming Growth Factor-Beta Signaling in a Murine Model of Thoracic Aortic Aneurysm. *Journal of Vascular Research*, **45**, 457-468.
268. Aslan, D., Garde, C., Nygaard, M.K., Helbo, A.S., Dimopoulos, K., Hansen, J.W., Severinsen, M.T., Treppendahl, M.B., Sjo, L.D., Gronbaek, K. *et al.* (2016) Tumor suppressor microRNAs are downregulated in myelodysplastic syndrome with spliceosome mutations. *Oncotarget*, **7**, 9951-9963.
269. Jakubauskiene, E., Peciuliene, I., Vilys, L., Mocevicius, P., Vilkaitis, G. and Kanopka, A. (2015) Gastrointestinal tract tumors and cell lines possess differential splicing factor expression and tumor associated mRNA isoform formation profiles. *Cancer Biomarkers*, **15**, 575-581.

PRIEDAI



p1 paveikslas. Genų, kuriuose lokalizuoti mirtroniai, schema. Žali stačiakampiai žymi baltymus koduojančių genų egzonus, violetiniai stačiakampiai – netransliuojamas sritis, juodos linijos – intronus, raudonos linijos – intronus, kuriuose yra lokalizuoti mirtroniai. Virš schemų pateiktos tiriamų intronų sekos, raudona spalva pažymėta dažniau sutinkama subrendusi miRNR, mėlyna – rečiau sutinkama, žalia spalva pažymėtos struktūrų nesudarantių sekos. Brūkšniai po schemomis nurodo, kuri geno vieta klonuota. PLEKHJ1 geno atveju padauginta sritis nuo 5 iki 7 egzono, MGAT4B atveju – tarp 11-13 egzono, NELFE – tarp 3-4 egzono, ATG4D – tarp 7-9 egzono, DDX5 – tarp 10-12 egzono, KHSRP – tarp 13-15 egzono, CALR – tarp 5-7 egzono, RPL8 – tarp 2-4 egzono, kontrolinio geno DHX30 atveju – tarp 19-21 egzono. Pateikiamas mastelis (1000 nt). Išlaikytas santykinis egzono ir introno ilgis.



p2 pav. miRNR ir iRNR raiškos koreliacijos reprezentatyvus paveikslas. Vientisa linija žymi vidutinį koreliacijos stiprumą; punktyrinė - silpną koreliaciją; skaičiai - koreliacijos koeficiento reikšmė. Raudonais kvadratais pažymėta miRNR, pilkais apskritimais – baltymai.

p1 lentelė. Pacientų su kylančiosios aortos aneurizma bei kontrolinių pacientų su sveika aorta, pasirinktų visuminės sekoskaitai, sveikatos būklės rodikliai. * Duomenų trūksta iš 4 širdies donorų.

Rodikliai	Auginiai		Plazma		
	SV (n=6)	KAA (n=8)	SV (n=7)	KAA (n=7)	Op (n=4)
Amžius, metai ±SD	47 ±5	62 ±10	54 ±12	63 ±11	64 ±12
Lytis, vyrai (%)	4 (67 %)	6 (75 %)	4 (57 %)	5 (71 %)	3 (75 %)
Kylančiosios aortos diametras, mm	36 ±0.7*	50 ±3	35 ±3	53 ±5	52 ±4
Aortos vožtuvo stenozė (%)	0 (0 %)	3 (38 %)	1 (14 %)	2 (29 %)	1 (25 %)
Dviburis aortos vožtuvus (%)	0 (0 %)	5 (63 %)	0 (0 %)	4 (57 %)	2 (50 %)
Aortos vožtuvo nepakankamumas (%)	0 (0 %)	5 (63 %)	1 (14 %)	3 (43 %)	1 (25 %)
Aukštas kraujospūdis (%)	2 (100 %)*	7 (88 %)	4 (57 %)	6 (86 %)	4 (100 %)
Rūkaliai (%)	2 (100 %)*	1 (13 %)	1 (14 %)	1 (14 %)	0 (0 %)
Diabetas (%)	0 (0 %)	1 (13 %)	0 (0%)	3 (43 %)	1 (25 %)

p2 lentelė. Hemolizės lygio įvertinimas. Plazmos mėginių, kurie buvo pasirinkti sekoskaitos bibliotekų ruošimui, absorbcijos ties 414 nm ilgiu bei miR-16-5p ir miR-451a slenksinio ciklo Ct tikro laiko PGR nustatytos vertės.

Mėginiai	Sugertis, 414 nm	Ct, miR-16-5p	Ct, miR-451a
<i>Hemolizuotas mėginys</i>	0.36	21.13	17.03
SV 1	0.11	23.21	21.35
SV 2	0.12	23.93	24.39
SV 3	0.10	22.97	20.94
SV 4	0.13	24.00	23.31
SV 5	0.17	24.88	23.24
SV 6	0.20	25.43	24.96
SV 7	0.20	24.94	23.04
KAA 1	0.13	22.93	19.40
KAA 3	0.20	23.40	21.77
KAA 4	0.20	23.02	20.88
KAA 5	0.16	22.03	19.21
KAA 6	0.16	22.57	20.76
KAA 7	0.14	23.67	19.59
KAA 8	0.13	23.85	19.62
Op 1	0.13	22.88	20.15
Op 2	0.17	22.34	22.36
Op 3	0.15	22.73	19.97
Op 4	0.18	24.03	20.83
<i>Nehemolizuotas mėginys</i>	0.18	24.28	19.92

p3 lentelė. RNR kokybės, išgrynintos iš sekoskaitai naudotų KAA ir sveikų audinių, įvertinimas RIN reikšme.

KAA audiniai, Nr	RIN	Sveiki audiniai, Nr	RIN
1	7,7	1	8,2
2	7,3	2	6,6
3	7,3	3	6,6
4	7,9	4	4,2
5	6,8	5	6,0
6	7,2	6	7,2
7	7,9		
8	6,9		

p4 lentelė. Pacientų su kylančiosios aortos aneurizma bei kontrolinių pacientų su sveika aorta sveikatos būklės rodikliai. * Duomenų trūksta iš 5 širdies donorų.

Rodikliai	Audiniai			Plazma		
	SV (n=35)	KAA (n=17)	P reikšmė	SV (n=34)	KAA (n=28)	P reikšmė
Amžius, metai ±SD	64 ±12	62 ±13	0.610	69 ±12	65 ±12	0.161
Lytis, vyrai (%)	25 (71 %)	13 (76 %)	0.779	17 (50 %)	21 (75 %)	0.092
Kylančiosios aortos diametras, mm	36 ±4*	53 ±6	<0.001	35 ±4	49 ±6	<0.001
Aortos vožtuvo stenozė (%)	0 (0 %)	5 (29 %)	0.091	4 (12 %)	7 (25 %)	0.379
Dviburis aortos vožtuvas (%)	0 (0 %)	11 (65 %)	<0.001	0 (0 %)	11 (39 %)	<0.001
Aortos vožtuvo nepakankamumas (%)	10 (29 %)	11 (65 %)	0.042	13 (38 %)	16 (57 %)	0.080
Aukštas kraujospūdis (%)	30 (100 %)*	14 (82 %)	0.322	29 (85 %)	26 (93 %)	0.460
Rūkaliai (%)	6 (20 %)*	3 (18 %)	0.904	4 (11 %)	2 (7 %)	0.857
Diabetas (%)	3 (9 %)	2 (12 %)	0.928	3 (9 %)	4 (14 %)	0.718

p5 lentelė. miRNR raiškos koreliacija KAA audiniuose. Skaičiai žymi koreliacijos koeficiento reikšmę R. ** p<0.01; *** p<0.001.

miR-	-126-3p	-148a-3p	-155-5p	-133a-3p	-10a-5p
-126-3p	x	0.67***	0.11	0.18	0.67***
-148a-3p		x	-0.17	-0.01	0.49**
-155-5p			x	0.67***	-0.27
-133a-3p				x	-0.25
-10a-5p					x

p6 lentelė. miRNR raiškos koreliacija KAA plazmoje. Skaičiai žymi koreliacijos koeficiento reikšmę R. ** p<0.01; ***p<0.001

miR-	-4732-3p	-483-3p	-122-3p	-143-3p
-4732-3p	x	-0.22	-0.33**	0.05
-483-3p		x	0.65***	0.24
-122-3p			x	0.14
-143-3p				x

p7 lentelė. miRNR ir genų raiškos koreliacija KAA audiniuose. Skaičiai žymi koreliacijos koeficiento reikšmę R. ** p<0.01; *** p<0.001.

	KLF4	MYOCD	TGFR1	ALK1
miR-126-3p	0.27	-0.04	-0.14	0.67***
miR-148a-3p	0.33*	0.21	0.03	0.52**
miR-155-5p	-0.22	0.21	-0.08	-0.28
miR-133a-3p	-0.22	0.37 *	0.09	0.05
miR-10a-5p	0.20	0.03	0.03	0.71***

p8 lentelė. Genų klonavimo pradmenys.

miR-1226-FW	CCCTAGAAGCTTACTCATCAAGCAGTTCTC
miR-1226-REV	ACCCACGGATCCACGGATGTGCACGTCCC
miR-1227-FW	CCCCAGAAGCTTGCTTCATTGAGGACCCTGAGAGG
miR-1227-REV	CTGCGCGGATCCCTCACGCCTGCAAGCCACTC
miR-1229-FW	CTGCAGCGAAGCTTGTCTTCTTCCGCAGTGGGAAC
miR-1229-REV	CCTCACCGGGATCCCTCGCTCAGAATCACCCACACA
miR-1236-FW	TCCCAGAAGCTTAAAAAGGCATTGTGGCT
miR-1236-REV	GCTCACGGATCCCTTTAACTTCCCCTCAAG
miR-1238-FW	CTGCAGAAGCTTGAACCTCTGCGTTGCGAGCT
miR-1238-REV	GCTCACGGATCCCTGGTCAGCTCTGAGCAGAGTG
miR-3064-FW	ACTTAGAAGCTTGTGGCCTGCCATGGGTAT
miR-3064-REV	CCTTACGGATCCCTGAACCTCTGTCTTCGA
miR-3940-FW	TTGCAGAAGCTTAGTGGTCCCCAGGTCTCT
miR-3940-REV	ACTCACGAATTCGTGGGGGAGCCCCGGGT
miR-6515-FW	CTTCAGAAGCTTGATGATGAGTTACACACCT
miR-6515-REV	TCTCACGAATTCCTGCCAGAGGTCCA
miR-6850-FW	CCCCAGGAATTCGACCCGTCGCCATG
miR-6850-REV	ACTCACGGCCGCCAACACAGCTCTGTTGGCTG

p9 lentelė. Pirmos tikslinės mutacijos splaisingo sekoje įvedimo pradmenys.

miR-1226-1-FW	ACCATTAACAGCTGAGGGCATGCA
miR-1226-1-REV	CGACTTGTGCAGCAGGATGTTGCC
miR-1227-1-FW	CGTCGGGCCAGCTGGGGCCAGGGC
miR-1227-1-REV	AGAGCCTCCATCCACTCCTGACAC
miR-1229-1-FW	CCTCCAGATCGCTGGGTAGGGTTT
miR-1229-1-REV	TAGCCGTCGGGGCTCCGAGGGTAC
miR-1236-1-FW	TGTCAAACGCTCTGAGTGACAGGG
miR-1236-1-REV	CCACCTTGGCTGGTTGTGCTGCTG
miR-1238-1-FW	TCCCCCTGGAGCTGAGTGGGAGCC
miR-1238-1-REV	AGTCGGCCTGGCTGACATCCACAG
miR-3064-1-FW	CAGAGGGCTAGCTTAGTACAAACT
miR-3064-1-REV	GAGGCCACATCTGTAGCAATC
miR-3940-1-FW	AAAAGATCGAGCTGGGTTGGGGCG
miR-3940-1-REV	CCTCGATAAGCTGCTTGGCGTGGT
miR-6515-1-FW	CCAAGCCTGAGCTTGGTGTGGG
miR-6515-1-REV	AGTCTGTGGGATCATCGATCTTGGCC
miR-6850-1-FW	GCATCGTCAAGCTGCGGAACGCT
miR-6850-1-REV	CCTTGATGTAGCCGTGCCGCTCAG

p10 lentelė. Antros tikslinės mutacijos splaisingo sekoje įvedimo pradmenys.

miR-1226-2-FW	CTGTGTTCCCTACGGAGGCCACAC
miR-1226-2-REV	GGCTGGTGAGGCCACCCTTTGGGA
miR-1227-2-FW	TTCCCCACCTACGAGTTCATGCGG
miR-1227-2-REV	AAGGGTGGCACGGGGTCAAATGCC
miR-1229-2-FW	GCCCTCCCACACGCTCCTTCTACA
miR-1229-2-REV	AGTGGTGAGAGGGGTGTCCTGAAC
miR-1236-2-FW	TTGTCTCTCCACCCTATCAGAGC
miR-1236-2-REV	GGGGAAGAGGCATTATGTTGGCCA
miR-1238-2-FW	TGTCTGCCCCACTCCTTCCACTGC
miR-1238-2-REV	GACGAGGAAGGCTCAGAGGCTGGG
miR-3064-2-FW	AACACCTTACACATGTGGAAGATG
miR-3064-2-REV	GCAGTGTGGCAAAATAGCAATGTA
miR-3940-2-FW	CCTTCCTTCTACGGTCTCTCTGC
miR-3940-2-REV	AGAGTAACCAAGGTAAGTGGGCTG
miR-6515-2-FW	TCTACCCCCACGACTGGGACAAG
miR-6515-2-REV	TGAAGAGATCAGAGTGGCCAGA
miR-6850-2-FW	CTCTGCCACACGACATCATCCACGAC
miR-6850-2-REV	GCGGCGTGAGTGC GGCGTT

p11 lentelė. Kokybinės PGR pradmenys.

TBP-FW	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGT
TBP-REV	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
miR-1226-FW	GTGAGGCAGGGCAAGGTCAC
miR-1226-REV	CACGGATGTGCACGTCCCC
miR-1227-FW	GCTTCATTGAGGACCCTGAG
miR-1227-REV	CTTGCCCGTCACTTCC
miR-1229-FW	AACCCTCAGTCAGACAAGG
miR-1229-REV	CTCGCTCAGAATCACCCACA
miR-1236-FW	AGCTTAAAAAGGCATTGCTG
miR-1236-REV	GATCCCTTTAACTTCCCCTC
miR-1238-FW	ATGACTTCTGTGTACCTG
miR-1238-REV	CCTGGTCAGCTCTGAGCA
miR-3064-FW	AATTCAAACATGGAAAAGCTCC
miR-3064-REV	CTGAACCTCTGTCTTCGACC
miR-3940-FW	GTGGCGAGAATGTGAAAGC
miR-3940-REV	CTGGTTGAAGGGCCAGG
miR-6515-FW	CCTGTACACACTGATTGTGCG
miR-6515-REV	CTTGTA CT CAGGGTCTGAATCAC
miR-6850-FW	CCATGGGCCGTGTGATCCG

p12 lentelė. Atvirkštinės transkripcijos pradmenys.

RNU48	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCTAGAGC
miR-1226-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTAGGGA
miR-1227-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTGGGG
miR-1229-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTGTGG
miR-1236-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTGGAG
miR-1238-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGGGCA
miR-3064-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTGCAC

miR-3940-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGAGC
miR-6515-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGATGTC
miR-6850-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGCCCC
miR-185-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCAGGAAC
miR-122-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATTTAGTG
miR-483-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAGACGGG
miR-4732-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGAACAG
miR-152-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCCAAGTTC
miR-126-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGCATT
miR-451a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCTCA
miR-133a-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGCTGGT
miR-10a-5p	GCTTGTCGGTTAAACACTGTCACAAATTCG
miR-155-5p	CCAGAAACCGATCAGAGTGTACCCTATCA
miR-148a-3p	CCGTTCACGATCCAAAGACACAAAGTTCT
miR-143-3p	TCGTGAGATAAGCTGTGTGTGAGCTACA
miR-16-5p	CCTTTGAGGTTGGTACTACGGCGCCAATA

p13 lentelė. miRNR tikro laiko PGR pradmenys.

Universalus REV	GTGCAGGGTCCGAGGT
RNU48-FW	GCGTGCCATCACC GCAGC
miR-1226-3p FW	GCGTACCAGCCCCTGTGT
miR-1227-3p FW	GCGCGTGCCACCCTTTT
miR-1229-3p FW	GCGCTCTCACCCTGCCTC
miR-1236-3p FW	GCGCCTCTTCCCCTTGTCT
miR-1238-3p FW	GCGCTCCTCGTCTGTC
miR-3064-3p FW	GCGTCTGGCTGTTGTGGT
miR-3940-5p FW	GCGGTGGGTTGGGGCGG
miR-6515-5p FW	GCGTTGGAGGGTGTGGAA
miR-6850-3p FW	GTGCGGAACGCTGGCC
miR-185-5p-FW	GCGTGGAGAGAAAGGCAGT
miR-483-3p FW	GCGTCACTCCTCTCCTCC
miR-4732-3p FW	GGCCCTGACCTGTCTT
miR-152-3p FW	CGCGTCAGTGCATGACAGA
miR-126-3p FW	CGCGTTCGTACCGTGAGTAAT
miR-122-3p- FW	CCGCGAACGCCATTATCACA
miR-133a-3p FW	GCGTTTGGTCCCCTTCAAC
miR-10a-5p FW	AGGCTTGTCGGTTAAACACTGT
miR-10a-5p REV	CCGGTACTACCCTGTAGATCCG
miR-143-3p FW	GCTCGTTCGAGATAAGCTGTGTG
miR-143-3p REV	GTTTCGCTGAGATGAAGCACTG
miR-155-5p FW	TTCCAGAAACCGATCAGAGTGT
miR-155-5p REV	CGCCATGTTTTAATGCTAATCGTGA
miR-16-5p FW	ACCTTTGAGGTTACTACGG
miR-16-5p REV	GTGCAGTAGCAGCACGTAAT
miR-451a FW	CGCGAAACCGTTACCATTAC

p14 lentelė. iRNR tikro laiko PGR pradmenys.

GAPDH FW	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
GAPDH REV	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
KLF4 FW	CAGCTTCACCTATCCGATCCG
KLF4 REV	GACTCCCTGCCATAGAGGAGG
MYOCD FW	ACGGATGCTTTTGCCTTTGAA
MYOCD REV	AACCTGTCGAAGGGGTATCTG
ALK1 FW	CTCACAGGGCAGCGATTACC
ALK1 REV	CCAGATGTCAGTCCACTTGTAGG
TGFR1 FW	CACAGAGTGGGAACAAAAGGT
TGFR1 REV	CCAATGGAACATCGTCGAGCA

p15 lentelė. Mikoplazmos užkrato nustatymo pradmenys.

GPO3	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC

p16 lentelė. Sekoskaitos ir diagnostinės PGR pradmenys.

T7	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG
pMTCdir1	TGGCACAAAATCAACGGGAC

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Stasė
GASIULĖ

Functional analysis of canonical and
mirtronic miRNAs in thoracic ascending
aortic aneurysm tissues and digestive
system tumors

Nature sciences,
Biochemistry N 004

VILNIUS 2020

LIST OF ABBREVIATIONS

ALK1 - activin receptor-like kinase 1
AUC - area under the ROC curve
CABG - coronary artery bypass graft surgery
cDNA – complementary DNA
Ct - The cycle threshold
dCt – cycle threshold normalized to endogenous RNA
IHC - Immunohistochemical analysis
FC - fold change
KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KLF4 – Kruppel-like factor 4
miRNAs – microRNAs
mRNA – messenger RNA
MUT - minigenes carrying mutations in 5'-donor and 3'-acceptor splice sites
MYOC - myocardin
non-TAA – samples from healthy patients
Op – operated
qPCR - quantitative real-time PCR
RC – normalized read count
ROC – receiver operating characteristic curve
rSMAD - receptor-regulated Smads
RT - reverse transcription
RT-qPCR - quantitative reverse transcription PCR
TAA - ascending thoracic aortic aneurysm
TGF- β - transforming growth factor-beta
VSMC - vascular smooth muscle cells
WT – wild type

INTRODUCTION

microRNAs (miRNAs) are single-stranded non-coding RNAs typically containing 18-25 nucleotides and are involved in the post-transcriptional regulation of gene expression. Although human miRNAs were identified in 2000, the functions of miRNAs are still extensively under investigation. miRNAs are involved in the regulation of many cellular processes (1). Previously it was identified that expression of miRNAs could be altered in all types of cancer and other diseases, including cardiac, digestive and neurological disorders (2). Various pathologies usually are characterized by altered miRNA expression profiles. Therefore, miRNAs can be used as biomarkers for disease diagnosis, prognosis or treatment selection (3,4). miRNAs are identified in all human body fluids such as blood plasma and serum, urine, saliva, and human milk. Furthermore, miRNAs are relatively easily detected not only in frozen but also in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues (3). Hence, miRNAs have a huge potential for applications during clinical practice.

miRNA expression is altered in ascending thoracic aortic tissues and blood plasma during the development of an aneurysm (5). An aortic aneurysm is formed when the aorta diameter expands 1.5 times the size of the healthy aorta (6). Although ascending thoracic aortic aneurysm (TAA) is not a common disease, this type of aneurysm develops asymptotically and if not diagnosed in time TAA may suddenly rupture and be deadly (7). TAA is categorized as syndromic (Marfan, Loyaes-Dietz, Ehlers-Danlos, etc.), familial non-syndromic and sporadic. Syndromic forms of TAA are caused by mutations of different genes and therefore are highly heterogeneous (8).

The development of sporadic TAA, which is rarely associated with gene mutations, remains weakly investigated. Studies of sporadic TAA were performed using vascular smooth muscle cell lines and animal models. However, these experimental models only partially reflect certain changes that occur in human tissues (9). Thus, until today, there is not enough data about the development of TAA (10). In order to reveal the impact of miRNAs on TAA development, we selected only the sporadic form of TAA. Moreover, most of the previous studies determining the association of the miRNAs with sporadic TAA tissues or plasma were performed only using PCR or microarray techniques (11-13). Despite that only high-throughput miRNA sequencing ensures the discovery of new miRNAs associated with TAA, miRNA high-throughput sequencing data of sporadic TAA tissue and blood plasma samples were still missing. Detected alterations in miRNA expression

could enable us to understand better the development of this disease. In addition, newly identified circulating miRNAs could be applied as non-invasive biomarkers to detect TAA or prognose further disease development.

During the canonical miRNA biogenesis pathway, the miRNAs are cleaved by Drosha and Dicer ribonucleases. However, alternative pathways of miRNA biogenesis were lately described in eukaryotes – miRNAs can be produced in Drosha or Dicer independent manner (14,15). It was shown, that miRNA can be located in short introns, termed mirtrons. These mirtrons are spliced and appear to bypass Drosha cleavage. Based on terminal overhangs, four distinct mirtrons subtypes are recognized: conventional (hairpin without tails), 3'-tailed, 5'-tailed, two-tailed. Despite that, a large number of mirtronic miRNAs have been predicted by bioinformatic analysis, only two human hsa-miR-877-5p and hsa-miR-1226-3p, and one mouse mmu-miR-1224 were experimentally proven to be directly depended on splicing. Moreover, only one 3'-tailed mirtronic miRNA dme-miR-1017 was experimentally validated in *Drosophila* (16). It is still unclear whether biogenesis of conventional, 5'- or 3'-tailed mirtrons actually depends on splicing. Hence, the biogenesis of bioinformatically predicted mirtrons must be validated experimentally. Furthermore, little is known about the impact of splicing factors on mirtronic miRNA biogenesis.

Although the biogenesis of mirtronic miRNAs differs from the canonical pathway, mirtronic miRNAs also interact with AGO proteins and regulate silencing of mRNA expression (17). However, the significance of mirtronic miRNAs in biological processes was weakly investigated. It was determined, that such miRNAs could regulate cancerogenesis (18,19). Nonetheless, it is very little known about mirtronic miRNAs significance in digestive system cancerous cells.

Aim of the dissertation – to investigate the global expression changes of miRNA expression in ascending thoracic aortic aneurysm tissues and blood plasma samples, and experimentally determine the dependency on splicing of bioinformatically predicted mirtronic miRNAs and evaluate expression changes of these mirtronic miRNAs in digestive system cancer cell lines and tissues.

MAIN TASKS OF THE DISSERTATION

1. To investigate the expression changes of miRNAs in human aortic tissues and blood plasma samples during ascending thoracic aorta aneurysm development using high-throughput miRNA sequencing, and to validate the altered expression of selected miRNAs in a larger cohort of samples by qRT-PCR.
2. To identify the signaling pathway, which is altered by dysregulated miRNAs in ascending thoracic aorta aneurysm tissues compared with healthy aortas, and to investigate the expression changes of selected target genes and proteins.
3. To determine the dependency of biogenesis on the splicing of bioinformatically predicted mirtronic miRNAs: five located in conventional mirtrons miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, miR-1238-3p; two located in 5'-tailed mirtrons - miR-3064-3p, miR-6515-5p; two located in 3'-tailed mirtrons - miR-3940-5p, miR-6850-3p.
4. To determine the impact of splicing factors SRSF1 and SRSF2 on the biogenesis of mirtronic miRNAs in colorectal cancer HCT116 cell line.
5. To identify the expression changes of mirtronic miRNAs in human digestive system cancer cell lines and tissues.

SCIENTIFIC NOVELTY

1. miRNAs, differentially expressed in ascending thoracic aortic aneurysm tissues and blood plasma samples compared with healthy samples, were identified. It was determined that the alterations in blood plasma miRNA profile do not overlap with differentially expressed miRNAs in tissues.
2. The significant upregulation of the TGF- β signaling pathway receptor *ALK1* mRNA expression and a nearly three-fold higher number of cells strongly expressing transcription factor KLF4 in the nucleus were determined in ascending thoracic aortic aneurysm tissues compared to healthy aorta. The upregulation of KLF4 could promote the phenotypic transition of vascular smooth muscle cells from contractile to synthetic.
3. The dependency of biogenesis on splicing of three miRNAs miR-1227-3p, miR-1229-3p, and miR-1236-3p, hosted in conventional

mirtrons, was experimentally validated. These miRNAs were assigned to the call of mirtronic miRNAs.

4. Splicing factor SRSF1 promotes the biogenesis of miR-1229-3p, SRSF2 - biogenesis of miR-1227-3p and miR-1229-3p in colorectal cancer HCT116 cell line.
5. Differentially expressed mirtronic miRNAs were identified in the digestive system cancer cell lines and tumors. That indicates that mirtronic miRNAs are related to cancerogenesis and suggests their potential for exploiting as diagnostic biomarkers.

STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. miRNAs are associated with the development of the human ascending thoracic aortic aneurysm. Changes of miRNAs expression in blood plasma do not depend on alteration in miRNAs expression in ascending thoracic aortic aneurysm tissues.
2. Differentially expressed miRNAs may regulate the TGF- β signaling pathway and vascular smooth muscle cells phenotypic transition in ascending thoracic aortic aneurysm tissues. The increase of transcription factor KLF4 expression in a part of cells could induce the phenotypic transition of vascular smooth muscle cells from contractile to synthetic.
3. The biogenesis of only a part of bioinformatically predicted mirtrons is dependent on splicing.
4. Splicing factors SRSF1 and SRSF2 promote mirtronic miRNA biogenesis in colorectal cancer HCT116 cell line.
5. Mirtronic miRNAs are associated with cancerogenesis in the digestive system of cancer cell lines and tumors.

MATERIALS AND METHODS

Methods used for experiments with ascending thoracic aortic aneurysm tissue and blood plasma samples

Samples of patients, with sporadic ascending thoracic aorta aneurysm

All experimental procedures using human tissue and plasma samples conform to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and were approved by Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee (Nr. P2-BE-2-12/2012).

The study included 40 patients with sporadic non-syndromic ascending thoracic aorta aneurysm (TAA group). Atherosclerosis showing calcified or ulcerating plaques of the ascending aorta, aortitis, Marfan, Ehlers Danlos and other syndromes were excluded from the study. TAA group included patients (n = 23) who underwent aortic reconstruction surgery at the Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery, LUHS and non-operated patients (n = 17) with ascending aorta aneurysm.

Study subjects without TAA (non-TAA group) included i) heart transplantation donors (n = 6), ii) patients who underwent isolated coronary artery bypass graft surgery (CABG) (n = 72) and iii) healthy volunteers (n = 10).

RNA isolation from aortic tissues

Total RNA from aortic tissue was isolated using mirVana Ambion miRNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were eluted in nuclease-free water, aliquoted and stored at -80°C until further analysis. The integrity of total RNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer. Total RNA isolated from aortic tissue samples was treated with dsDNase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

cDNA library preparation for Illumina sequencing

cDNA libraries for sequencing were prepared using the NEXTflex Small RNA-Seq v3 kit (PerkinElmer) according to manufacturer's instructions. ligation reactions of 3' and 5' adapters were performed using 1,6 µg of total RNA or 10,5 µL of each RNA samples isolated from aortic tissues or blood plasma, respectively. The cDNA was amplified 18 or 23 PCR cycles for tissue or plasma cDNA samples, respectively. PCR products were analyzed with Bioanalyzer (Agilent technologies) using a DNA high sensitivity chip. In

order to deplete adapter dimers, plasma cDNA samples were size-selected (150 bp fragment) on a 6 % PAGE and purified according to manufacturer's protocol. The resulting cDNA libraries were quantified by KAPA Library Quantification Kit (Rosche), hybridized to Illumina MiSeq flow cell (Illumina) and subsequently sequenced using Illumina MiSeq instrument and MiSeq Reagent Kit v2 chemistry (Illumina) for 50 sequencing cycles.

RT-qPCR analysis using total RNA isolated from aortic tissue

For the miRNA expression analysis, 100 ng of total RNA isolated from aortic tissue were used for the cDNA synthesis. Each 20 μ l of the reverse transcription reaction in RT buffer contained 200 units of RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), 1mM dNTP (ThermoFisher Scientific), 1 μ M RT primer mixture (Metabion), 16 units of RNase inhibitor RiboLock (ThermoFisher Scientific). The mixture was incubated for 20 min at 25°C and for 60 min at 37°C and then heat-inactivated for 10 min at 70°C. qPCR was performed with SYBR Green PCR master mix (ThermoFisher Scientific) (35 cycles): initial denaturation for 10 min at 95°C, followed by three cycles of amplification 15 sec at 95°C, 1 min at 55°C, and 30 sec at 60°C, then 32 cycles 10 sec at 95°C and 30 sec at 60°C. For mRNA expression analysis, 100 ng of total RNA isolated from aortic tissue samples used for cDNA synthesis with RevertAid RT reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. qPCR analysis was carried out on Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). The miRNA expression levels were normalized to the expression levels of miR-152-3p, mRNA – of GAPDH.

Methods used for experiments with digestive system tumors

Tumors and healthy tissues

The study conforms with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). Patients underwent neither chemotherapy nor radiotherapy before surgery. Overall, 12 pancreatic, 13 stomach and 12 colorectal cancer tumors were collected. Healthy pancreatic tissues (n=8) were obtained from healthy donors during the multiorgan donor explantation operations, healthy tissues of the stomach (n=15) - during the bariatric surgery, healthy tissues of the colon - from patients with benign diseases of the colon (diverticulitis, etc.).

RNA isolation from tumors

Total RNA from tumors and healthy tissues were purified from the same sample using mirVana PARIS kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The fraction of short RNAs (< 200nt) was used for miRNA reverse transcription (RT) and qPCR experiments. To avoid DNA contamination before reverse transcription reaction, RNA samples were treated with DNase I (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR analysis using RNA isolated from tumors

cDNA synthesis was prepared as described in Method „RT-qPCR analysis using RNA isolated from aortic tissue“. For the miRNA expression analysis 200 ng fraction of short RNAs (< 200nt) were used. Relative quantification was performed with normalization to the expression of endogenous control RNU48.

Methods used for experiments with digestive system cancer cell lines

Human cell culture maintenance

HEK 293A (embryonic kidney), HCT116 (colon, colorectal carcinoma), Kato III (stomach, gastric carcinoma; derived from metastatic site: pleural effusion and supraclavicular and axillary lymph nodes and Douglas cul-de-sac), Panc-1 (pancreas/duct, epithelioid carcinoma), SU.86.86 (pancreas, ductal carcinoma; derived from metastatic site: liver), T3M4 (pancreas, ductal carcinoma; metastasis), Caki-1 (kidney, clear cell carcinoma, derived from metastatic site: skin), 786-O (kidney, renal cell adenocarcinoma) cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml).

RNA isolation from cell lines

RNA from cell lines was isolated using an RNazol RT reagent according to the manufacturer's instructions (Molecular Research Center). cDNA synthesis and qPCR analysis were carried out as described in Methods „RT-qPCR analysis using RNA isolated from aortic tissue“ and „RT-qPCR analysis using RNA isolated from tumors“.

Transfection

Transfections were performed using Lipofectamine LTX transfection reagent (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. HCT116 allowed growing for 24 h prior to transfection with pcDNA3-SRSF1, pcDNA3-SRSF2, pcDNA3-DHX30, pcDNA3-PLEKHJ1, pcDNA3-MGAT4B, pcDNA3-NELFE, pcDNA3-ATG4D, pcDNA3-DDX5, pcDNA3-KHSRP, pcDNA3-CARL or pcDNA3-RPL8 constructs. A pcDNA3 vector was transfected to be used as a reference. RNA and protein were isolated after 48h. The experiments were repeated at least three times.

Methods used for experiments with *E.coli* bacteria

Construction of plasmids

Minigenes constructs of 1226/DHX30 (from exon 19 to exon 21; mirtronic intron – 20), 1227/PLEKHJ1 (exons 5 to 7; mirtronic intron – 5), 1229/MGAT4B (exons 11 to 13; mirtronic intron – 12), 1236/NELFE (exons 3 to 4; mirtronic intron - 3), 1238/ATG4D (exons 7 to 9; mirtronic intron – 8), 3064/DDX5 (exons 10 to 12, mirtronic intron – 11), 3940/KHSRP (exons 13 to 15, mirtronic intron – 14), 6515/CARL (exons 5 to 7, mirtronic intron 5), 6850/RPL8 (exons 2 to 4, mirtronic intron – 2) were amplified from human Jurkat cells genomic DNA (ThermoFisher Scientific) using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. PCR products were digested with BamHI and HindIII restriction endonucleases, except 3940/KHSRP, 6515/CARL (digested with HindIII and EcoRI) and 6850/RPL8 (EcoRI and NotI), and inserted into pcDNA3 plasmid. 5'- and 3'-splice site mutations were inserted by PCR using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase with primers containing splicing site mutations. Amplification products were ligated using T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific).

Total RNA, extracted from HCT116 cells, was converted to cDNA using RevertAid reverse transcription kit (ThermoFisher Scientific). The genes were amplified using primers containing HindIII and BamHI sites by PCR, digested with appropriate restriction enzymes and the fragments ligated into pcDNA3. All final plasmids were confirmed by Sanger sequencing.

Detection of spliced and unspliced forms of mRNA

Spliced and unspliced DHX30, PLEKHJ1, MGAT4B, NELFE, ATG4D, DDX5, KHSRP, CARL, RPL8 mRNA isoforms were detected by RT-PCR.

cDNA synthesis was carried out using RevertAid Reverse Transcriptase and random hexamer primer according to the manufacturer's (ThermoFisher Scientific) instructions. PCR was carried out using TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Amplification products were separated on 1% agarose gel. TBP was used as a loading control.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad v6.0 and Sigma Plot software v. 11. Student t-test and Mann-Whitney Rank Sum Test were used to compare the differences in distribution between experimental results. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Differential miRNA expression analysis in ascending thoracic aortic aneurysm tissue and blood plasma samples

During high-throughput sequencing, new unexplored miRNAs associated with TAA may be identified (20,21). However, to date, the miRNA expression levels were analyzed only by real-time PCR and microarray techniques (11-13) and the global high-throughput miRNA sequencing data of TAA tissues was still missing. Therefore, in order to determine the global miRNA profile, we performed the high-throughput sequencing of TAA tissue samples. Moreover, to reveal whether miRNAs were transported from TAA tissues to the blood during TAA development, we also carried out the sequencing of circulating miRNAs of plasma. Newly identified circulating miRNAs may be used as non-invasive biomarkers for the detection of this disease.

We evaluated miRNA expression profiles in a set of patient tissue (n=14) and plasma samples (n=18) using Illumina high-throughput miRNA sequencing platform. The experimental design of miRNA-Seq is depicted in Figure S1 A. Study subjects selected for miRNA expression profiling in aortic tissue consisted of surgical TAA patients (n = 8), donors (n = 4) and CABG patients (n = 2). miRNA expression profiling in plasma was done in samples from surgical TAA patients (n = 7) before and 3 months after the aortic surgery (denoted as operated, n = 4), respectively. Seven volunteers without health complaints (n= 7) were used as non-TAA controls.

To evaluate differences of miRNAs expression we performed the analysis only with miRNAs using the base mean higher than 10. miRNA-Seq data analysis revealed 20 differentially expressed miRNAs (fold change > 1.5, $p < 0.05$) in TAA tissue samples compared to non-TAA group (Figure S1, B, Table S1, Table S2). Three types of analysis were performed to compare miRNA expression profiles in plasma: 1) surgical TAA patients and healthy volunteers (non-TAA); 2) surgical TAA patients before and 3 months after the aortic surgery (Op); 3) surgical TAA patients before and 3 months after the aortic surgery combine with the data of healthy volunteers (Op+non-TAA).

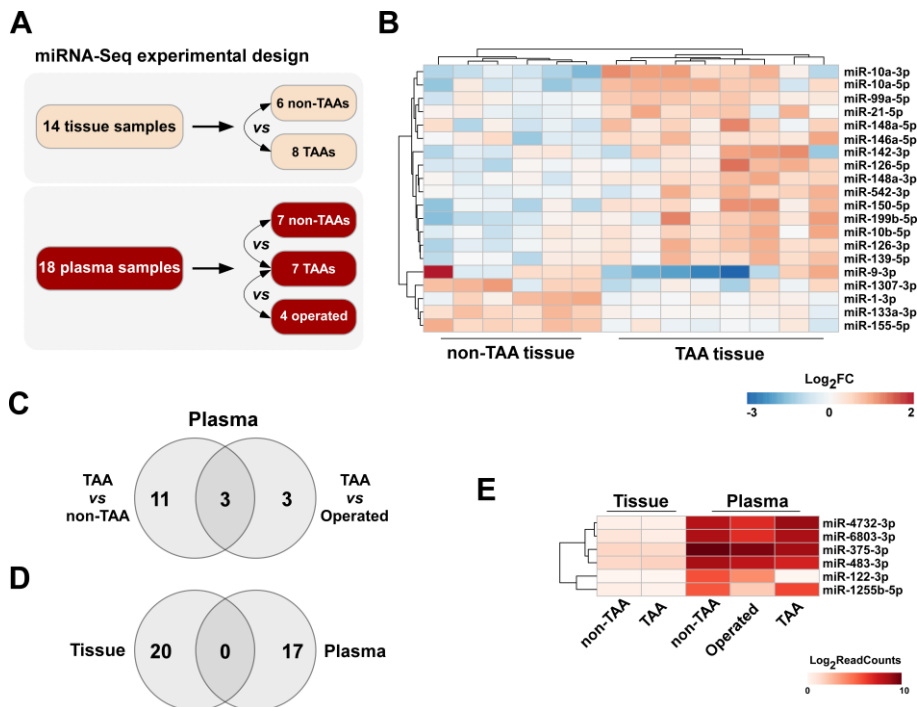


Figure S1. Differential miRNA expression analysis in TAA tissue and plasma samples using high-throughput miRNA sequencing. (A) miRNA-Seq experiment design. (B) Heat map showing differentially expressed miRNAs (fold change, FC > 1.5, $p < 0.05$, normalized read count average, RC > 10) in TAA tissue samples (n = 8) compared to normal aorta tissue (n = 6). Red color indicates upregulated log-transformed miRNAs, blue – downregulated; (C) Venn's diagram showing the number of differentially expressed miRNAs (FC > 1.5, $p \leq 0.05$ and RC > 20) in TAA plasma samples (n = 7) compared to non-aneurysmal group (n = 7) and plasma samples obtained 3 months after aortic reconstructive surgery (n = 4); (D) Venn's diagram demonstrating the number of differentially expressed miRNAs in TAA tissue and plasma samples; (E) Heat map demonstrating the expression of six miRNAs, which were significantly downregulated in TAA plasma samples, but were almost absent in TAA tissue samples. Color intensity indicates log-transformed normalized read counts of miRNA.

Because of the large variation in the number of miRNA sequences among patients in this case, the analysis was performed only with miRNAs which the base read mean was higher than 20. Such levels of miRNAs expression allowed us to detect efficiently miRNAs. Accurate and optimal detection is essential for the use of miRNAs as biomarkers.

Table S1. miRNAs differentially expressed (fold change > 1.5 *p* value < 0.05, RC >10) in TAA tissue and blood plasma samples compared to non-TAA controls. Op – Operated.

Groups	Number of miRNAs	Upregulated	Downregulated
<i>Tissue</i>			
TAA v.s. non-TAA	20	15	5
<i>Plazma</i>			
TAA v.s. non-TAA	14	3	11
TAA v.s Op	6	4	2
TAA v.s. non-TAA + Op	10	2	8

Table S2. List of differentially expressed miRNAs (fold change > 1.5, *p* value < 0.05, RC >10) in TAA aortic tissue samples compared to miRNA expression levels in non-TAA controls.

No.	miRNAs	Fold change	<i>P</i> value
Upregulated			
1	hsa-miR-10a-3p	2.69	2.05E-06
2	hsa-miR-10a-5p	2.45	8.63E-07
3	hsa-miR-150-5p	2.21	2.05E-05
4	hsa-miR-199b-5p	2.12	1.19E-04
5	hsa-miR-126-5p	1.89	7.95E-04
6	hsa-miR-126-3p	1.88	2.10E-05
7	hsa-miR-139-5p	1.74	7.22E-04
8	hsa-miR-148a-3p	1.71	3.44E-05
9	hsa-miR-10b-5p	1.70	7.78E-04
10	hsa-miR-148a-5p	1.70	0.0112
11	hsa-miR-99a-5p	1.68	1.76E-05
12	hsa-miR-21-5p	1.67	1.10E-03
13	hsa-miR-146a-5p	1.67	0.002
14	hsa-miR-142-3p	1.66	0.020
15	hsa-miR-542-3p	1.64	0.009
Downregulated			
16	hsa-miR-1-3p	-1.59	0.001
17	hsa-miR-133a-3p	-1.64	2.96E-07
18	hsa-miR-1307-3p	-1.68	0.011
19	hsa-miR-9-3p	-1.79	0.021
20	hsa-miR-155-5p	-1.88	7.34E-08

Table S3. List of differentially expressed miRNAs (fold change > 1.5, p value ≤ 0.05-fold, RC ≥ 20) in TAA patient blood plasma samples compared to miRNA expression levels in non-TAA controls.

Group	No.	miRNA	Regulation	Fold change	P value
TAA vs non-TAA	1	hsa-miR-146b-3p	up	9,11	0,044
	2	hsa-miR-1255b-5p	up	8,87	0,015
	3	hsa-miR-889-3p	up	7,95	0,047
	4	hsa-miR-375-3p	down	-2,38	0,036
	5	hsa-miR-30a-5p	down	-2,54	0,033
	6	hsa-miR-483-3p	down	-2,68	0,015
	7	hsa-miR-23b-3p	down	-2,79	0,017
	8	hsa-miR-140-3p	down	-4,01	0,010
	9	hsa-miR-100-5p	down	-9,17	0,003
	10	hsa-miR-145-5p	down	-17,36	1,44E-04
	11	hsa-miR-143-3p	down	-17,74	3,27E-05
	12	hsa-miR-23b-5p	down	-24,93	0,013
	13	hsa-miR-122-3p	down	-69,32	3,31E-04
	14	hsa-miR-34a-5p	down	-71,95	4,01E-05
TAA vs Op	1	hsa-miR-1255b-5p	up	9,7203	0,045
	2	hsa-miR-4732-3p	up	3,9801	0,050
	3	hsa-miR-6803-3p	up	3,4495	0,011
	4	hsa-miR-22-3p	up	2,5198	0,029
	5	hsa-miR-122-3p	down	-18,4085	0,024
	6	hsa-miR-23b-5p	down	-44,7992	0,001
TAA vs non-TAA and Op	1	hsa-miR-1255b-5p	up	11,68	0,004
	2	hsa-miR-22-3p	up	1,73	0,034
	3	hsa-miR-375-3p	down	-2,12	0,049
	4	hsa-miR-483-3p	down	-2,29	0,035
	5	hsa-miR-23b-3p	down	-2,36	0,024
	6	hsa-miR-143-3p	down	-3,83	0,012
	7	hsa-miR-145-5p	down	-4,83	0,019
	8	hsa-miR-23b-5p	down	-29,67	0,003
	9	hsa-miR-34a-5p	down	-48,62	6,26E-05
	10	hsa-miR-122-3p	down	-53,67	2,31E-04

Evaluation of miRNA expression changes in plasma samples revealed a total of 17 differentially expressed miRNAs in TAA samples compared to non-TAA samples. 14 miRNAs expression changes were identified in TAA patient plasma samples compared to the non-TAA group. After 3 months after surgery, the expression of six miRNAs was changed (Figure S1, C, Table S1, Table S3).

Surprisingly, the alterations in blood plasma miRNAs profiles did not overlap with differentially expressed miRNAs in tissues (Figure S1, D). Moreover, six significantly deregulated miRNAs in TAA plasma samples, miR-4732-3p, miR-6803-3p, miR-375-3p, miR-483-3p, miR-122-3p and miR-1255b-5p, were almost absent in aortic tissue samples (Figure S1, E). Finally, to identify the most significantly dysregulated miRNAs, the analysis was performed using a combined group of healthy samples (Op+non-TAA). It was determined that the miR-122-3p was the most significantly downregulated in TAA plasma samples. According to these findings, we can propose that changes in miRNAs expression in blood plasma are not directly associated with miRNAs expression alterations in ascending thoracic aortic aneurysm tissues.

Validation of Selected miRNAs in TAA Tissue and Plasma Samples by qRT-PCR

Due to the variation in high-throughput miRNA sequencing data, it is necessary to validate the expression changes in a larger cohort of samples. Because sequencing was performed on a limited number of samples, we validated the expression of selected miRNAs by qPCR. Overall 37 tissues (20 non-TAA and 17 TAA) and 62 blood plasma (34 non-TAA and 28 TAA) samples were analyzed. The miRNA expression levels were normalized to the miR-152-3p or mir-185-3p for tissue or plasma samples, respectively. These endogenous miRNAs were selected according to our miRNA-Seq analysis having the lowest expression deviation between samples.

For tissue analysis, we performed qRT-PCR of five selected miRNAs - miR-10a-5p and miR-155-5p displayed the most significant up/down fold changes; miR-126-3p according to literature was the main miRNA related to TAA (13); miR-133a-3p and miR-148a-3p were involved in TGF- β signaling pathway. Our analysis validated the altered expression of miR-10a-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p and miR-155-5p in the sex-undivided set of TAA tissue samples compared to the non-TAA group (Figure S2). Although, the changes in miR-148a-3p expression levels was significant only in male TAA samples ($p = 0.0203$) (13 TAA and 13 non-TAA samples). Interestingly, a significantly greater differential expression of miR-126-3p ($p = 0.0062$ vs. $p = 0.0225$ for sex-undivided set) and miR-155-5p ($p = 0.0003$ vs. $p = 0.0017$) also was detected between male patients showing sex-related miRNA expression variances in the TAA tissue. Because of the small number of female tissues (7

non-TAA v.s. 4 TAA), further studies for more reliable data should be performed in a larger female patients cohort.

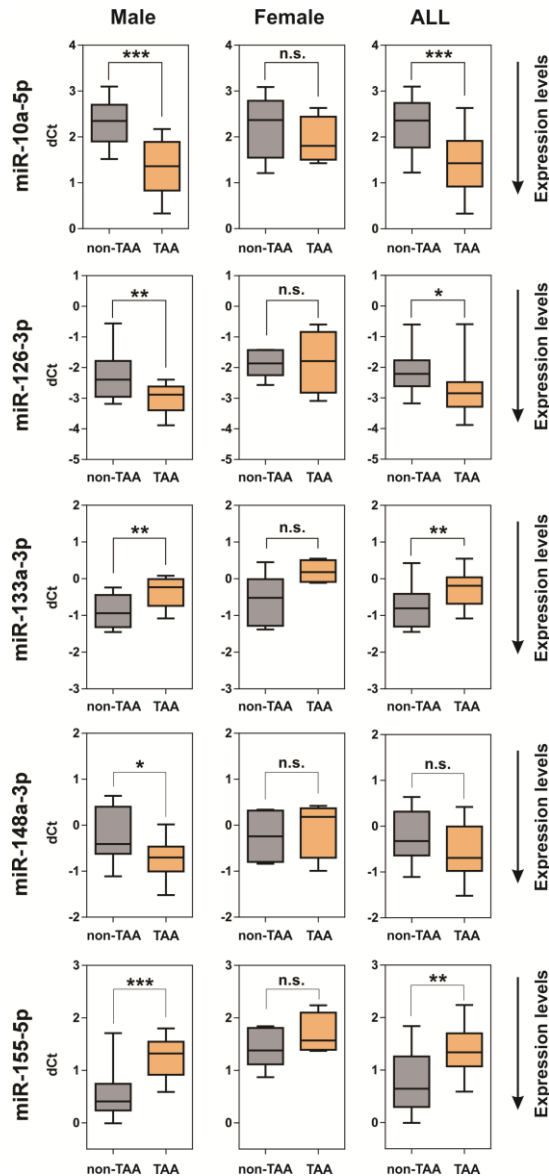


Figure S2. The differential expression of miR-10a-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-148a-3p and miR-155-5p in non-TAA and TAA patient tissue samples according to patient's sex. The expression threshold (Ct) values of each miRNA were normalized to miR-152-3p as the endogenous control. Lines within boxes indicate normalized cycle threshold (dCt) mean values; whiskers – 5-95 percentile of the relative miRNA expression values. Significance between each group is shown as follows: n.s. – not significant; * p<0.05; ** p<0.01 and *** p<0.001.

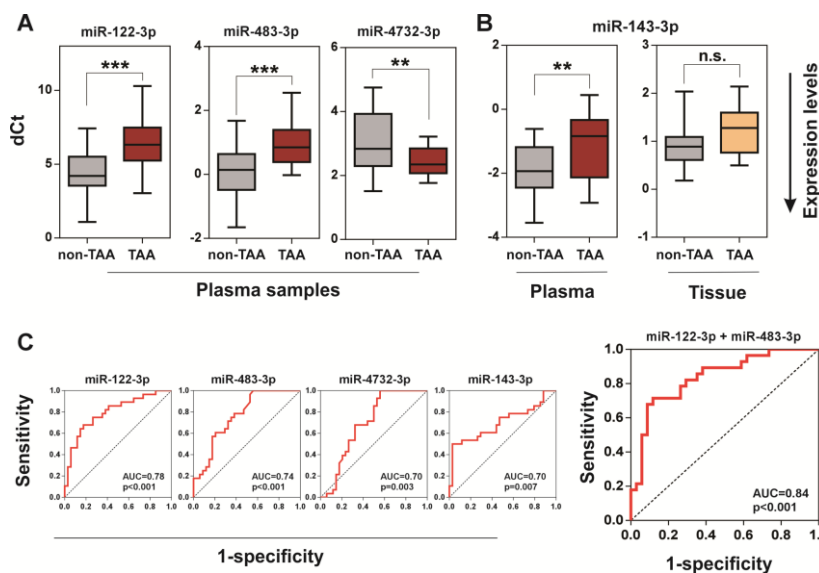


Figure S3. Validation of differentially expressed miRNAs in TAA tissue and plasma samples by qRT-PCR. The qRT-PCR analysis was used for the comparison of relative miRNA expression levels between non-TAA and TAA groups in plasma (A) and both types (B) of samples. The cycle threshold (Ct) values of observed miRNAs were normalized to miR-152-3p and miR-185-5p for tissue and plasma samples, respectively, which were revealed as the most reliable endogenous controls according to miRNA-Seq data. Lines within boxes indicate relative miRNA expression median values; whiskers – 5-95 percentile of the relative miRNA expression values. Significance is shown as follows: n.s. – not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. (C) Diagnostic ROC curve analysis showing sensitivity and specificity of miR-122-3p, miR-483-3p, miR-4732-3p and miR-143-3p selected circulating miRNAs or the combination of miR-122-3p and miR-483-3p together. AUC denotes area under the ROC curve.

For circulating miRNAs studies we selected four miRNAs - miR-4732-3p, miR-483-3p, and miR-143-3p and miR-122-3p. Statistically significant expression differences of all selected miRNAs were successfully validated by qPCR (Figure 3A, Figure 3B). The changes in miR-122-3p expression levels were the most significant ($p < 0.0001$). Moreover, the diagnostic sensitivity and specificity of selected circulating miRNAs were performed by ROC curve analysis (Figure 2C). The results demonstrated that a combined analysis of miR-122-3p and miR-483-3p miRNAs revealed the most significant prognostic accuracy (AUC = 0.84, $p < 0.001$) indicating that these miRNAs could be applied as TAA non-invasive biomarkers.

Functional Analysis of miRNA Target Genes Involved in TAA Development

Next, using a bioinformatics approach, we determined KEGG pathways enriched in genes targeted by differentially expressed miRNAs in TAA tissue cells. About half of differentially expressed miRNAs have predicted targets in 17 genes involved in the TGF- β signaling pathway (Figure S4). These miRNAs could affect two groups of target genes - TGF- β ligands/receptors and regulatory SMADs. Dysregulation in the TGF- β signaling pathway can influence the expression changes of the key downstream regulators, Kruppel-like factor 4 (KLF4) and/or myocardin (MyoCD). On the other hand, the disrupted balance between TGF- β receptors, ligands and rSMADs might impact MyoCD-independent TGF- β signaling (22).

Indeed, previous reports revealed the important roles of TGF- β signaling in syndromic TAA (23). However, it still not clear whether activation or up-regulation of this signaling pathway genes causes the development of TAA (24-27). During the canonical TGF- β signaling pathway, TGF- β can interact with TGFBR1 or ALK1 receptors (Figure S5). If the signal is mediated through the TGFBR1 receptor, TGFBR1 binds to SMAD2/3 and, together with SMAD4, can activate the expression of the transcription factor myocardin. Myocardin stimulates the contractile phenotype of vascular smooth muscle cells (VSMC). If the signal is transmitted through the ALK1 receptor, ALK1 binds to SMAD2/3 and, together with SMAD4, can indirectly stimulate the expression of transcription factor KLF4 promoting the synthetic phenotype of VSMC. It was determined, that a signaling switch from canonical TGFBR1/Smad2-dependent to ALK1/Smad1/5/8 signaling can activated genes related to synthetic VSMC phenotype in mice model (28). Moreover, miR-133a-3p, which was significantly downregulated in TAA tissue samples, could indirectly deregulate KLF4 (29). To further explore the alteration in TGF- β signaling pathway, we determined the mRNA expression levels of TGF- β receptors, *TGFBR1* and *ALK1* (also known as *ACVRL1*), and transcription factors, *MyoCD* and *KLF4*, in non-TAA ($n=21$) and TAA ($n = 17$) tissue samples (Figure S6). A significant change of *ALK1* gene transcription was identified in TAA tissues ($p=0.0244$) compared to non-TAA group of normal aortas, but no significant difference in cellular mRNA levels of *TGFBR1*, *KLF4*, and *MyoCD* was observed.

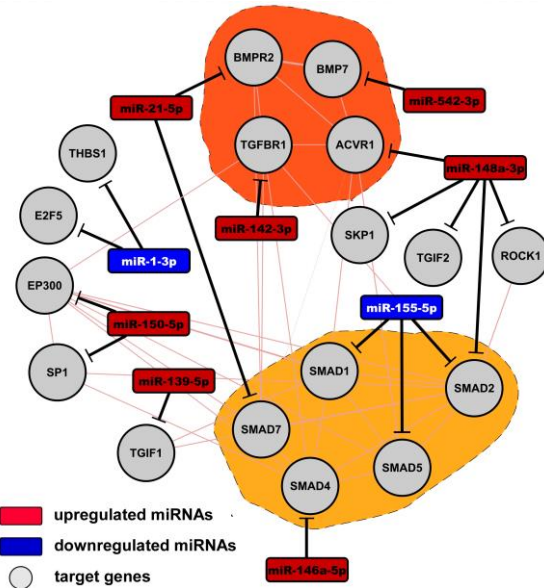


Figure S4. Molecular network of miRNAs and their potential target genes involved in the TGF- β signaling pathway. Grey nodes denote target genes, red and blue – upregulated and downregulated miRNAs, respectively. The dark orange area covers TGF- β ligands and receptors; light orange – regulatory SMADs (rSMADs).

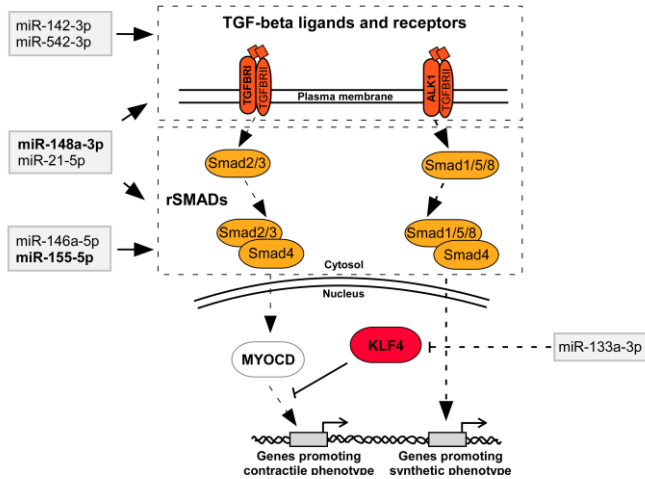


Figure S5. Simplified hypothetical schema of TGF- β signal transduction in TAA tissue cells. miRNAs, which were differentially expressed in TAA tissue (grey boxes), could potentially deregulate TGF- β signaling by targeting TGF- β ligands, receptors or rSMADs leading to alteration of MyoCD–KLF4 transcription regulator axis and further TAA progression. miRNAs, which differential expression was confirmed by qRT-PCR analysis are marked in bold.

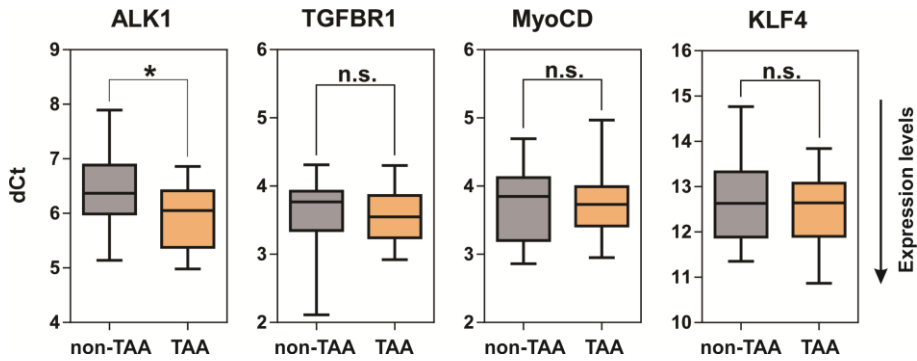


Figure S6. Differential expression of ALK1, TGFBR1, MyoCD and KLF4 mRNA in non-TAA (n=21) and TAA (n=17) tissue samples. The expression threshold (Ct) values of each gene were normalized to GAPDH expression levels. Lines within boxes indicate normalized cycle threshold (dCt) mean values; whiskers – 5-95 percentile of the relative mRNA expression values. Significance between each group is shown as follows: n.s. – not significant; * p<0.05.

miRNAs do not always promote the degradation of mRNA, often miRNAs simply inhibits translation of mRNA (2). Therefore, we further evaluated the protein expression levels of the selected genes in non-TAA and TAA tissue samples using immunohistochemical analysis (IHC). The upregulated expression of a positive marker of aortic aneurysms osteopontin was determined (p=0.0311). Also, it was determined that the increase of osteopontin stimulates the switch of vascular smooth muscles from contractile to synthetic phenotype (30-32) (Figure S7). Moreover, the number of cells strongly expressing the KLF4 factor in the nucleus was shown to be nearly three-fold higher in TAA tissues compared to non-TAA (27% v.s. 10%) (p = 0.0037). The myocardin expression level remained the same, however, the myocardin was detected not only in the nucleus but also in the cytoplasm, whereas, KLF4 is specifically observed in the cell nucleus. Therefore, the more accurate quantification method is required to evaluate minor fluctuations in myocardin expression as a response to alteration in KLF4.

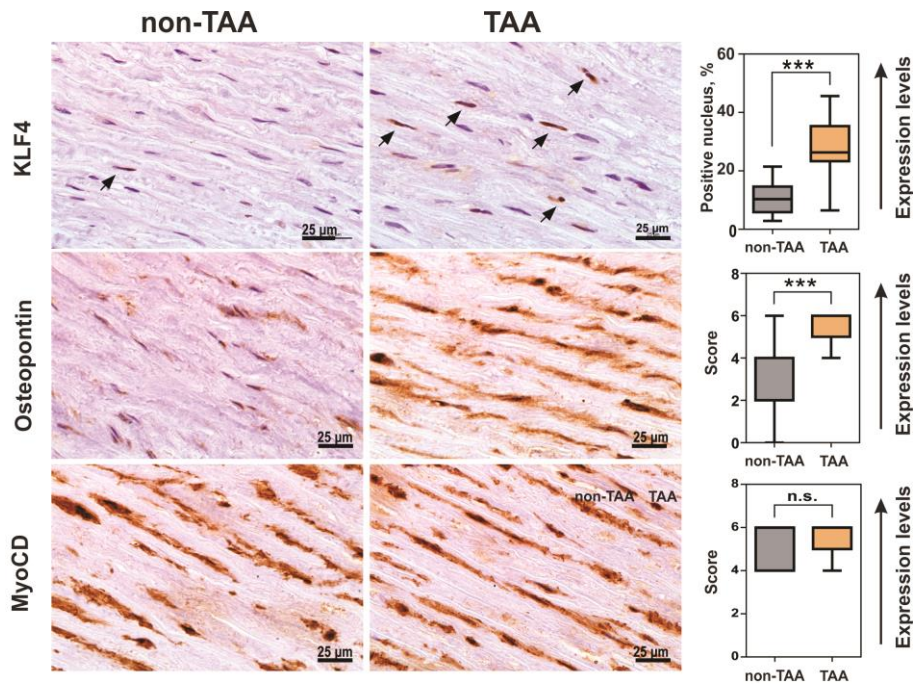


Figure S7. Immunohistochemical (IHC) analysis of KLF4, MyoCD, and osteopontin expression in non-TAA and TAA tissue samples. The quantity of proteins was examined by immunostaining and visualized with diaminobenzidine (brown). The sections were counterstained with hematoxylin (blue). Histological quantification of KLF4 was performed by counting KLF4 positive cell nucleus (black arrows; $n = 43$), whereas osteopontin ($n = 46$) and MyoCD ($n = 20$) by IHC score (graphs in right panel). Lines within boxes indicate KLF4 positive nucleus mean or MyoCD and osteopontin IHC score median values, whiskers – 5-95 percentile of KLF4 positive nucleus or MyoCD and osteopontin IHC score values. The significance of each group is shown as follows: n.s. – not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Analysis of splicing dependent mirtronic miRNAs expression in human digestive system cancer cell lines and tumors

Experimental validation of new splicing-dependent human mirtronic miRNAs

In order to expand the number of validated mirtronic miRNAs for our study, we selected five miRNAs localized in conventional mirtrons - miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, miR-1238-3p; two miRNAs localized in 5'-tailed mirtrons - miR-3064-3p, miR-6515-5p; two miRNAs localized in 3'-tailed mirtrons - miR-3940-5p, miR-6850-3p (Figure S8). Six of them - miR-1229-3p, miR-1236-3p, miR-1238-3p, miR-3064-3p, miR-3940-5p and miR-6515-5p are localized in genes related with

cancerogenesis, respectively *MGAT4B* (33), *NELFE* (34), *ATG4D* (35), *DDX5* (36), *KHSRP* (37) and *CARL* (38).

To determine the dependence of their biogenesis on mRNA splicing, we constructed plasmids with minigenes of two or one introns spanned by three and two coding exons, respectively (Figure S9). Wild type (WT) minigenes include natural introns. MUT variants of minigenes contained the mutations affecting the G residues at 5' splice donor (GU changed to CU) and 3' splice acceptor (AG changed to AC) sites in an intron, in which located potential mirtronic miRNA.

To investigate the effect of inhibited intron splicing on potential mirtronic miRNA biogenesis, constructed plasmids were transfected in colorectal carcinoma HCT116 cells. mRNAs from the MUT variants maintained the unspliced exon-intron-exon structure (Figure S10, A, MUT). mRNA from WT minigenes were successfully spliced (Figure S10 A, WT). A significantly high 9-1772 fold upregulation of miRNAs expression was detected after WT minigenes transfection in HCT116 cells (Figure S10, B, WT, Table S4). However, after splicing-deficient MUT plasmids transfection, miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p miRNAs quantity remained practically the same (Figure S10, B, MUT, Table S4). These results confirmed that the biogenesis of miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, located in conventional mirtrons, is strictly splicing-dependent and can be assigned to the mirtronic miRNA type.

However, the miR-1238-3p expression level in the cell lines after MUT minigene transfection was 425-fold higher compared to cells lacking the minigene. Moreover, we determined statistically unreliable 1,4-2,8 fold upregulation of miRNAs levels in cells maintaining splicing deficient MUT minigene of 5'-tailed miR-3064-3p, miR-6515-5p and 3'-tailed mirtrons - miR-3940-5p, miR-6850-3p. Hence, miR-1238-3p, located in conventional mirtron, also all investigated miRNAs located in 5'-tailed and 3'-tailed mirtrons can mature independently from splicing. It is possible that only conventional mirtrons exist in mammals.

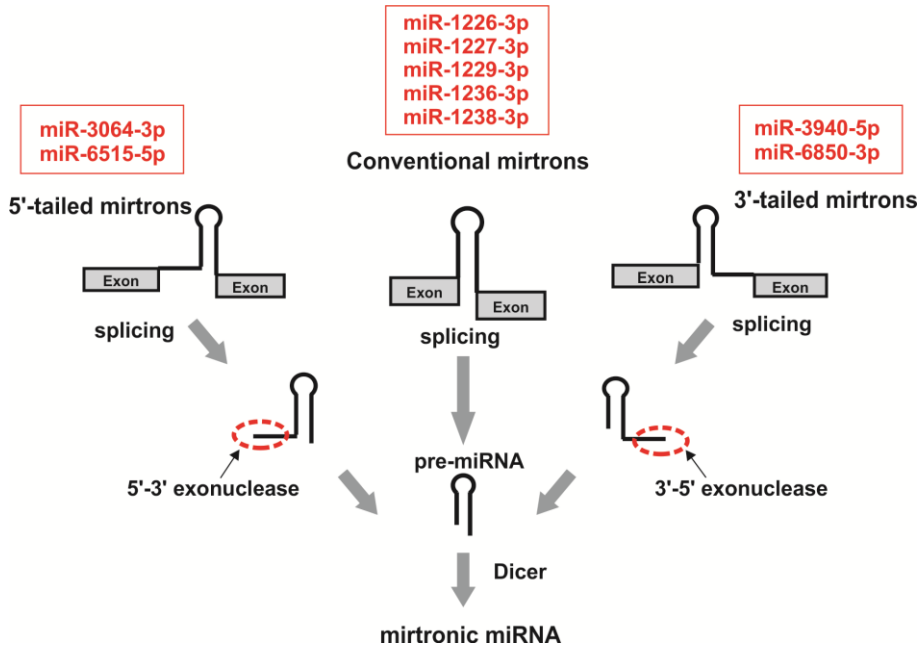


Figure S8. Mirtrons investigated in this study. miRNA can be located in short introns, termed mirtrons. These mirtrons are spliced and bypass Drosha cleavage. Based on terminal overhangs, four distinct mirtrons subtypes are recognized: conventional (hairpin without tails), 3'-tailed, 5'-tailed, two-tailed. Mirtronic miRNAs selected for study are marked in red.

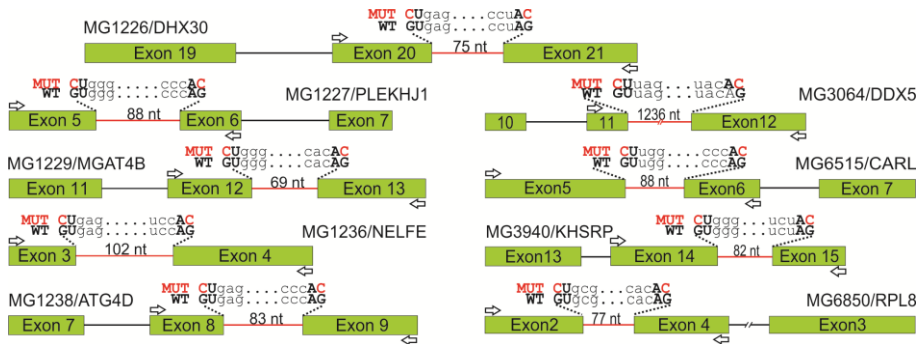


Figure S9. Schematic representation of exon-intron structures of analyzed human minigenes. Boxes and lines indicate exons and introns, respectively. miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, miR-1238-3p located in conventional, miR-3064-5p, miR-6515-5p – located in 5'-tailed and miR-3940-5p, miR-6850-5p located in 3'-tailed mirtrons. Potential mirtrons are depicted as red lines. WT - wild type sequences, MUT - minigenes carrying the double mutant with GT to CT and AG to AC changes (changed nucleotides are marked in red) in 5'-donor and 3'-acceptor splice sites, correspondingly. The position of primers used for RT-PCR analysis is indicated by white arrows.

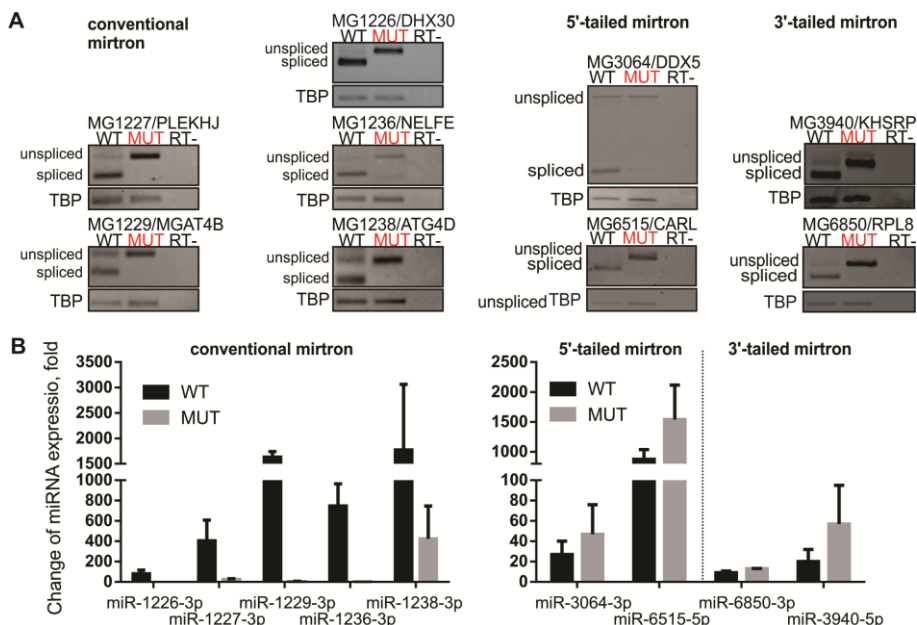


Figure S10. Identification of splicing dependent miRNAs processed from mirtrons. (A) Splicing analysis of minigene transcripts in transfected HCT116 cells. Control reactions, RT-, were performed without prior reverse transcription to exclude DNA contamination. The unspliced form indicates transcript retaining mirtronic intron, spliced – intron is excised. TBP – loading control. (B) miRNAs expression in colorectal cancer HCT116 cell line transfected with native (WT) or splicing-deficient (MUT) minigenes were analyzed using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR

Table S4. Changes of miRNA expression levels in cells transfected with native (WT) or splicing-deficient (MUT) minigenes.

miRNA	WT minigene	MUT minigene	MUT/WT, %
<i>Hosted on conventional mirtron</i>			
miR-1226-3p	81 +/- 36	1.5 +/- 0.3	1.9
miR-1227-3p	405 +/- 204	24 +/- 8	5.9
miR-1229-3p	1633 +/- 106	4.1 +/- 2.1	0.3
miR-1236-3p	747 +/- 217	2.6 +/- 0.5	0.3
miR-1238-3p	1772 +/- 1289	425 +/- 322	24
<i>Hosted on 5'-tailed mirtron</i>			
miR-3064-3p	27 +/- 13	47 +/- 29	173
miR-6515-5p	875 +/- 162	1541 +/- 576	176
<i>Hosted on 3'-tailed mirtron</i>			
miR-3940-5p	9.1 +/- 1.7	13 +/- 0.3	141
miR-6850-3p	20 +/- 12	57 +/- 38	286

Effect of splicing factors SRSF1 and SRSF2 on the biogenesis of mirtronic miRNAs

In order to evaluate the regulatory function of specific splicing factors (SF) in biogenesis of mirtronic miRNAs, we overexpressed two splicing factors of serine-arginine rich (SR) protein family, SRSF1 (also known as SF2/ASF) and the SRSF2 (also known as SC35) in human HCT116 cells and determined expression levels of three mirtronic miRNAs, miR-1226-3p, miR-1227-3p and miR-1229-3p. SRSF1 and SRSF2 splicing factors activate splicing (39). Moreover, SRSF1 expression is frequently altered in cancer cells (40). SRSF2 is also associated with cancerogenesis (41).

Western blot analysis revealed an increase in SRSF1 and SRSF2 proteins yield in the nuclear extracts after the transfection of the pSRSF1 or pSRSF2 constructs in HCT116 cells (Figure S11, A). In response to the upregulation of SRSF1, we determined a significant increase in miR-1229-3p (Figure S11, B). After SRSF2 construct transfection, the significant upregulation of miR-1227-3p ($p=0.008$) and miR-1229-3p ($p=0.008$) was detected. Thus, splicing factors SRSF1 and SRSF2 promote mirtronic miRNAs biogenesis in colorectal cancer HCT116 cell line.

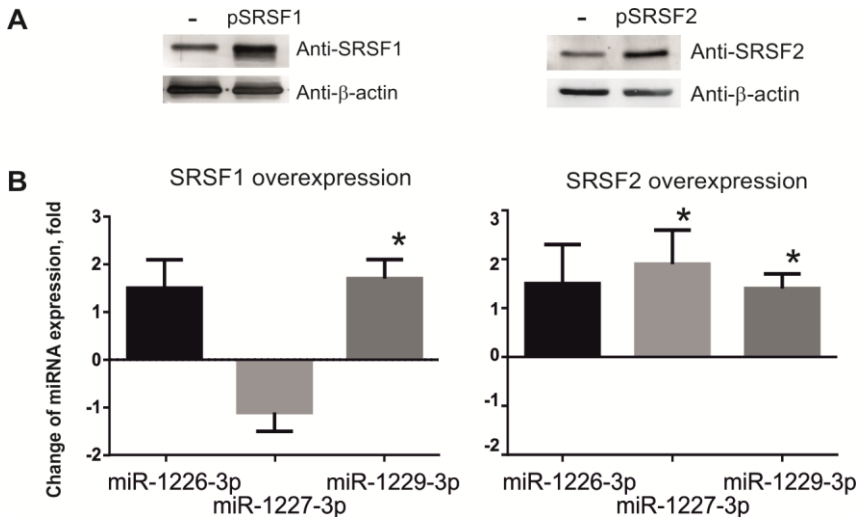


Figure S11. Splicing factors influence the biogenesis of specific mirtronic miRNAs. (A) The amount of SRSF1 and SRSF2 proteins increased in the transfected HCT116 cell line. Western-blot analysis was performed on nuclear extracts of cells transfected with empty vector pcDNA3 (-) or plasmid containing recombinant SRSF1 gene (pSRSF1) or SRSF2 gene (pSRSF2). Beta-actin was used as an internal loading control. (B) Splicing factor-dependent impact on mirtronic miRNAs expression was determined using RT-qPCR. The mean values were calculated of three (SRSF1) and five (SRSF2) biological replicates. * indicates statistically significant results, $p < 0.05$.

Differential expression of mirtronic miRNAs in digestive system cancer cell lines and tumors

Mirtronic miRNA significance in cancerogenesis was weakly investigated. In order to evaluate whether mirtronic miRNAs are associated with processes in cancer cells, we determine expression changes of mirtronic miRNAs miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p, miR-1236-3p, and splicing-independent miR-1238-3p in different digestive system organs (pancreas PANC-1, SU.86.86, T3M4, stomach KATO III, colon HCT116) or excretory system (kidney CaKi-1, 786-O) cancer cell lines compared to the human embryonic kidney HEK 293A cells.

The downregulation of miR-1226-3p and miR-1227-3p expression were observed in all tested cell lines (Figure S12). miR-1236-3p expression was upregulated in pancreatic T3M4 and Su.86.86 and downregulated in kidney 786-O and stomach KATO III cancer cell lines.

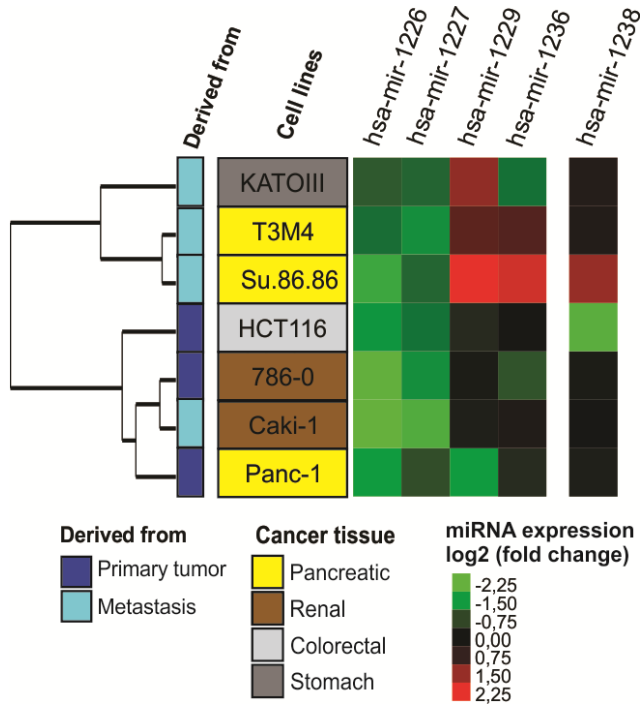


Figure S12. Heatmap of mirtronic miRNAs expression in human cancer cell lines. Cell lines are in rows, miRNAs in columns. Data are presented as log₂ fold changes relative to embryonic cell line HEK293A. Red color indicates higher expression; green, lower expression; black, no difference. The dendrogram of hierarchical clustering analysis is presented at the left.

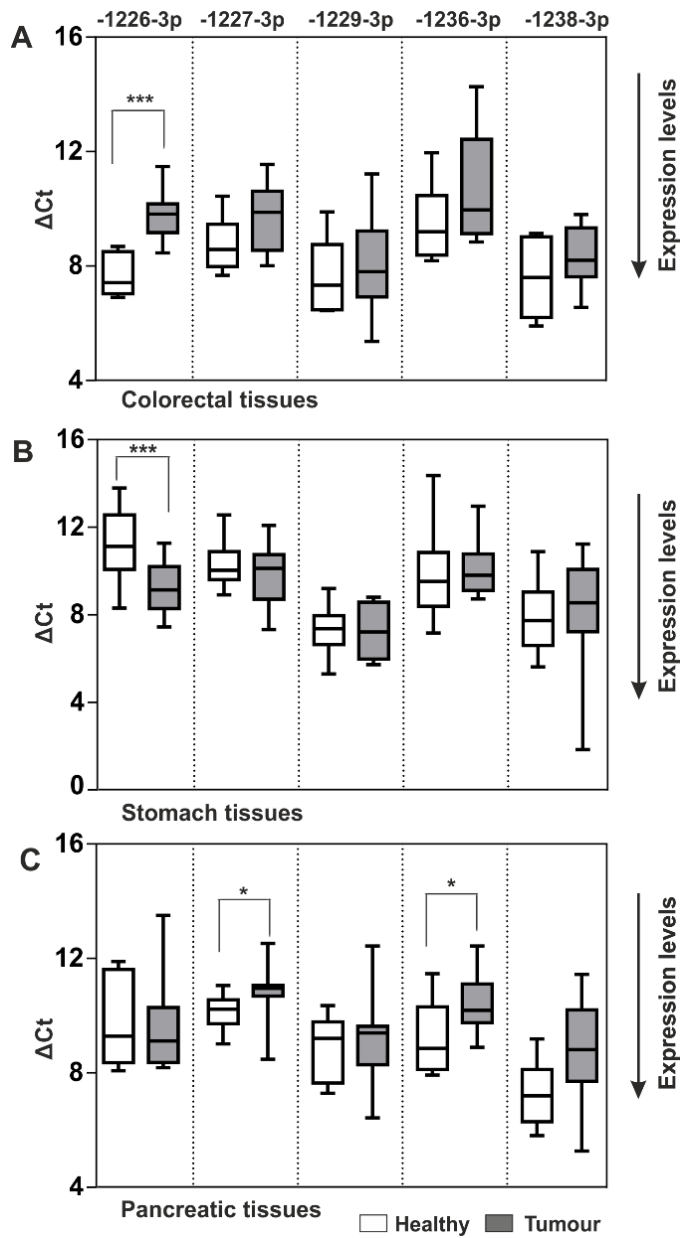


Figure S13. Variability in expression of mirtronic miRNAs in colorectal (A), stomach (B) and pancreatic adenocarcinoma (C) tissues. The expression threshold (ΔCt) values of each miRNA were normalized to RNU48 as the endogenous control. Lines within boxes indicate normalized cycle threshold (dCt) mean values; whiskers – 5-95 percentile of the relative miRNA expression values. * $p < 0.05$.

Interestingly, hierarchical clustering identified the majority of the cell lines derived from metastatic sites as a unique group. A high increase in expression of miR-1229-3p was determined in 3 of 4 metastatic cell lines - pancreatic T3M4, Su.86.86, and stomach KATO III. However, further studies are required to estimate whether miR-1229-3p is associated with metastatic cancer cells. Thus, differential mirtronic miRNAs expression was identified in the digestive system cancer cell lines.

To further identified the significance of mirtronic miRNAs in human cancer development and the possibility to use these miRNAs as biomarkers, we determine mirtronic miRNAs expression in digestive system tumors (pancreatic, colorectal and stomach) compared to healthy tissue samples of the same organ. We identified that miR-1226-3p was significantly downregulated in the colorectal tumor ($p < 0.001$) (Figure S13, A) and upregulated in stomach cancer compared to non-tumor tissues ($p < 0.001$) (Figure S13, B). miR-1227-3p ($p = 0.028$) and miR-1236-3p ($p = 0.017$) were significantly altered in pancreatic tumors (Figure S13, C). Hence, different expression profiles of mirtronic miRNAs were observed in digestive organ tumors. According to these findings, we can indicate, that mirtronic miRNAs are associated with cancerogenesis and in the future might be applied as biomarkers.

CONCLUSIONS

1. During the development of the human ascending thoracic aortic aneurysm (TAA), the differential expression of a total of 20 and 17 miRNAs was identified in TAA tissue and blood plasma samples, respectively, compared to the non-TAA samples. Changes of miRNA expression in blood plasma were not directly associated with miRNA expression alterations in ascending thoracic aortic aneurysm tissues.
2. miRNA expression profiles in TAA tissues may be influenced by the patient's sex. It was evaluated that miR-148a-3p varied significantly only in the male TAA cohort. Also, miR-126-3p and miR-155-5p and expression changes were more statistically significant in male TAA patients compared to the sex-undivided group of samples.
3. 10 of 20 miRNAs differentially expressed in TAA tissue potentially regulate the TGF- β signaling pathway. Differentially expressed miRNAs could influence the upregulation of the TGF- β signaling pathway receptor *ALK1* mRNA expression. Alterations in miRNA expression also could evoke the increase of transcription factor KLF4 expression in a nearly three-fold higher number of cells compared to healthy tissues. The upregulation of KLF4 could promote the transition of vascular smooth muscle cells phenotypic from contractile to synthetic.
4. Biogenesis of miRNAs miR-1226-3p, miR-1227-3p, miR-1229-3p and miR-1236-3p, hosted in conventional mirtrons, biogenesis is strictly splicing dependent. miR-1238-3p, located in conventional mirtron, and all investigated miRNAs located in 5'-tailed and 3'-tailed mirtrons can mature independently from splicing. It is possible that only conventional mirtrons exist in mammals.
5. Splicing factor SRSF1 enhances the biogenesis of mirtronic miRNA miR-1229-3p, meanwhile SRSF2 – the biogenesis of miR-1227-3p and miR-1229-3p in colorectal cancer HCT116 cell line.
6. Differential expression of mirtronic miRNAs was identified in the digestive system cancer cell lines and tumors. Hence, the mirtronic miRNAs are associated with cancerogenesis and potentially might be applied as biomarkers.

REFERENCES

1. Kozomara, A., Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, **47**, D155-D162.
2. Jonas, S. and Izaurralde, E. (2015) NON-CODING RNA Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, **16**, 421-433.
3. Walayat, A., Yang, M. and Xiao, D. (2019) Therapeutic Implication of miRNA in Human Disease. *IntechOpen*.
4. Zhou, S.S., Jin, J.P., Wang, J.Q., Zhang, Z.G., Freedman, J.H., Zheng, Y. and Cai, L. (2018) miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, **39**, 1073-1084.
5. Ikonomidis, J.S., Ivey, C.R., Wheeler, J.B., Akerman, A.W., Rice, A., Patel, R.K., Stroud, R.E., Shah, A.A., Hughes, C.G., Ferrari, G. *et al.* (2013) Plasma biomarkers for distinguishing etiologic subtypes of thoracic aortic aneurysm disease. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **145**, 1326-1333.
6. Erbel, R., Aboyans, V., Boileau, C., Bossone, E., Bartolomeo, R.D., Eggebrecht, H., Evangelista, A., Falk, V., Frank, H., Gaemperli, O. *et al.* (2014) 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, **35**, 2873-2926.
7. Quintana, R.A. and Taylor, W.R. (2019) Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ Res*, **124**, 607-618.
8. Pinard, A., Jones, G.T. and Milewicz, D.M. (2019) Genetics of Thoracic and Abdominal Aortic Diseases. *Circ Res*, **124**, 588-606.
9. Raffort, J., Lareyre, F., Clement, M. and Mallat, Z. (2016) MicroRNAs in abdominal aortic aneurysms: insights from animal models and relevance to human disease. *Cardiovascular Research*, **110**, 165-177.
10. Guo, D.C., Hostetler, E.M., Fan, Y.X., Kulmacz, R.J., Zhang, D., Nickerson, D.A., Leal, S.M., LeMaire, S.A., Regalado, E.S., Milewicz, D.M. *et al.* (2017) Heritable Thoracic Aortic Disease Genes in Sporadic Aortic Dissection. *Journal of the American College of Cardiology*, **70**, 2728-2730.
11. Licholai, S., Blaz, M., Kapelak, B. and Sanak, M. (2016) Unbiased Profile of MicroRNA Expression in Ascending Aortic Aneurysm Tissue Appoints Molecular Pathways Contributing to the Pathology. *Annals of Thoracic Surgery*, **102**, 1245-1252.
12. Patuzzo, C., Pasquali, A., Malerba, G., Trabetti, E., Pignatti, P.F., Tessari, M. and Faggian, G. (2012) A PRELIMINARY microRNA

- ANALYSIS OF NON SYNDROMIC THORACIC AORTIC ANEURYSMS. *Balkan Journal of Medical Genetics*, **15**, 51-55.
13. Venkatesh, P., Phillippi, J., Chukkapalli, S., Rivera-Kweh, M., Velsko, I., Gleason, T., VanRyzin, P., Aalaei-Andabili, S.H., Ghanta, R.K., Beaver, T. *et al.* (2017) Aneurysm-Specific miR-221 and miR-146a Participates in Human Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**.
 14. Westholm, J.O. and Lai, E.C. (2011) Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, **93**, 1897-1904.
 15. Curtis, H.J., Sibley, C.R. and Wood, M.J. (2012) Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **3**, 617-632.
 16. Flynt, A.S., Greimann, J.C., Chung, W.J., Lima, C.D. and Lai, E.C. (2010) MicroRNA Biogenesis via Splicing and Exosome-Mediated Trimming in *Drosophila*. *Molecular Cell*, **38**, 900-907.
 17. Ruby, J.G., Jan, C.H. and Bartel, D.P. (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, **448**, 83-86.
 18. Gao, R., Cai, C.L., Gan, J.C., Yang, X., Shuang, Z.Y., Liu, M., Li, S.P. and Tang, H. (2015) miR-1236 down-regulates alpha-fetoprotein, thus causing PTEN accumulation, which inhibits the PI3K/Akt pathway and malignant phenotype in hepatoma cells. *Oncotarget*, **6**, 6014-6028.
 19. Jin, C.N., Rajabi, H. and Kufe, D. (2010) miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. *International Journal of Oncology*, **37**, 61-69.
 20. Guo, L. and Lu, Z.H. (2010) Global expression analysis of miRNA gene cluster and family based on isomiRs from deep sequencing data. *Computational Biology and Chemistry*, **34**, 165-171.
 21. Moody, L., He, H.S., Pan, Y.X. and Chen, H. (2017) Methods and novel technology for microRNA quantification in colorectal cancer screening. *Clinical Epigenetics*, **9**.
 22. Takeda, N., Hara, H., Fujiwara, T., Kanaya, T., Maemura, S. and Komuro, I. (2018) TGF-beta Signaling-Related Genes and Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Int J Mol Sci*, **19**.
 23. de Pol, V.V., Kurakula, K., DeRuiter, M.C. and Goumans, M.J. (2017) Thoracic Aortic Aneurysm Development in Patients with Bicuspid Aortic Valve: What Is the Role of Endothelial Cells? *Frontiers in Physiology*, **8**.
 24. Verstraeten, A., Luyckx, I. and Loeys, B. (2017) Aetiology and management of hereditary aortopathy. *Nature Reviews Cardiology*, **14**, 197-208.
 25. Gomez, D., Zen, A.A.H., Borges, L.F., Philippe, M., Gutierrez, P.S., Jondeau, G., Michel, J.B. and Vranckx, R. (2009) Syndromic and non-

- syndromic aneurysms of the human ascending aorta share activation of the Smad2 pathway. *Journal of Pathology*, **218**, 131-142.
26. Wei, H., Hu, J.H., Angelov, S.N., Fox, K., Yan, J., Enstrom, R., Smith, A. and Dichek, D.A. (2017) Aortopathy in a Mouse Model of Marfan Syndrome Is Not Mediated by Altered Transforming Growth Factor beta Signaling. *Journal of the American Heart Association*, **6**.
 27. Li, W., Li, Q.L., Jiao, Y., Qin, L.F., Ali, R., Zhou, J., Ferruzzi, J., Kim, R.W., Geirsson, A., Dietz, H.C. *et al.* (2014) Tgfr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*, **124**, 755-767.
 28. Jones, J.A., Barbour, J.R., Stroud, R.E., Bouges, S., Stephens, S.L., Spinale, F.G. and Ikonomidis, J.S. (2008) Altered Transforming Growth Factor-Beta Signaling in a Murine Model of Thoracic Aortic Aneurysm. *Journal of Vascular Research*, **45**, 457-468.
 29. Torella, D., Iaconetti, C., Catalucci, D., Ellison, G.M., Leone, A., Waring, C.D., Bochicchio, A., Vicinanza, C., Aquila, I., Curcio, A. *et al.* (2011) MicroRNA-133 Controls Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch In Vitro and Vascular Remodeling In Vivo. *Circulation Research*, **109**, 880-U146.
 30. Huusko, T., Salonurmi, T., Taskinen, P., Liinamaa, J., Juvonen, T., Paakko, P., Savolainen, M. and Kakko, S. (2013) Elevated messenger RNA expression and plasma protein levels of osteopontin and matrix metalloproteinase types 2 and 9 in patients with ascending aortic aneurysms. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **145**, 1117-1123.
 31. Lesauskaite, V., Tanganelli, P., Sassi, C., Neri, E., Diciolla, F., Ivanoviene, L., Epistolato, M.C., Lalinga, A.V., Alessandrini, C. and Spina, D. (2001) Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: Morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Human Pathology*, **32**, 1003-1011.
 32. Wang, L.X., Zhang, J., Fu, W.G., Guo, D.Q., Jiang, J.H. and Wang, Y.Q. (2012) Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *Journal of Vascular Surgery*, **56**, 1698-+.
 33. Ashkani, J. and Naidoo, K.J. (2016) Glycosyltransferase Gene Expression Profiles Classify Cancer Types and Propose Prognostic Subtypes. *Scientific Reports*, **6**.
 34. Dang, H., Takai, A., Forgues, M., Pomyen, Y., Mou, H.W., Xue, W., Ray, D., Ha, K.C.H., Morris, Q.D., Hughes, T.R. *et al.* (2017) Oncogenic Activation of the RNA Binding Protein NELFE and MYC Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*, **32**, 101-+.
 35. Gil, J., Ramsey, D., Pawlowski, P., Szmida, E., Leszczynski, P., Bebenek, M. and Sasiadek, M.M. (2018) The Influence of Tumor

- Microenvironment on ATG4D Gene Expression in Colorectal Cancer Patients. *Medical Oncology*, **35**.
36. Janknecht, R. (2010) Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *American Journal of Translational Research*, **2**, 223-234.
 37. Fujita, Y., Masuda, K., Hamada, J., Shoda, K., Naruto, T., Hamada, S., Miyakami, Y., Kohmoto, T., Watanabe, M., Takahashi, R. *et al.* (2017) KH-type splicing regulatory protein is involved in esophageal squamous cell carcinoma progression. *Oncotarget*, **8**, 101130-101145.
 38. Venkateswaran, K., Verma, A., Bhatt, A.N., Shrivastava, A., Manda, K., Raj, H.G., Prasad, A., Len, C., Parmar, V.S. and Dwarakanath, B.S. (2018) Emerging Roles of Calreticulin in Cancer: Implications for Therapy. *Current Protein & Peptide Science*, **19**, 344-357.
 39. Ratnadiwakara, M., Mohenska, M. and Anko, M.L. (2018) Splicing factors as regulators of miRNA biogenesis - links to human disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **79**, 113-122.
 40. Das, S. and Krainer, A.R. (2014) Emerging Functions of SRSF1, Splicing Factor and Oncoprotein, in RNA Metabolism and Cancer. *Molecular Cancer Research*, **12**, 1195-1204.
 41. Liang, Y., Tebaldi, T., Rejeski, K., Joshi, P., Stefani, G., Taylor, A., Song, Y.B., Vasic, R., Maziarz, J., Balasubramanian, K. *et al.* (2018) SRSF2 mutations drive oncogenesis by activating a global program of aberrant alternative splicing in hematopoietic cells. *Leukemia*, **32**, 2659-2671.

SANTRAUKA

mikroRNR (miRNR) – tai 18-25 nukleotidų ilgio trumposios baltymų nekoduojančios RNR, reguliuojančios genų raišką. miRNR raiška keičiasi esant vėžiniams susirgimams, širdies sutrikimams, virškinimo sistemos ir neurologinėms ligoms. miRNR turi didelį potencialią pritaikymui klinikoje, nes yra gana lengvai detektuojamos žmogaus audiniuose. Taip pat miRNR gali patekti į kūno skysčius (kraujo plazmą, serumą, šlapimą), kuriuose išlieka stabili. Taigi, nustačius miRNR pokyčius ne tik galima identifikuoti ligos vystymosi mechanizmą, taip pat miRNR gali būti panaudotos kaip biožymenys ligų diagnostikai naudojant audinius ir kraujo plazmą ar serumą. Žinoma, kad miRNR raiška keičiasi krūtinės kylančiosios aortos audiniuose ir kraujo plazmoje, išsivysčius aneurizmai. Iki šiol turime mažai žinių, kodėl ir kaip atsitiktinė krūtinės kylančiosios aortos aneurizma (KAA) išsivysto. Nors tik visumine sekoskaita gali būti identifikuojamos naujos su KAA atsiradimu susietos miRNR, miRNR sekoskaitos tyrimai iki šiol nebuvo atlikti. Taip pat buvo nustatyta, kad miRNR gali bręsti alternatyviu brendimo keliu, kai miRNR yra sutinkama segtuką formuojančiuose intronuose, mirtronuose, kuriuos kerpa splaisosoma. Mirtronių gali būti skirstomi į keturius tipus - standartinius mirtronus, 5' tipo mirtronus, 3' tipo mirtronus ir 5'-3' tipo mirtronus. Nors bioinformatiškai žinduoliuose nustatyta beveik 1000 potencialių mirtroninių miRNR sekų, tačiau eksperimentiškai nustatyta, kad tik kelių mirtroninių miRNR brendimas tikrai priklauso nuo splaisingo. Be to, mirtroninių miRNR reikšmė biologiniuose procesuose buvo tirta itin mažai. Todėl buvo svarbu išsiaiškinti, ar mirtroninės miRNR yra susijusios su procesais vėžinėse ląstelėse.

Taigi, šios **disertacijos tikslas** buvo visumine sekoskaita nustatyti miRNR raiškos pokyčius krūtinės kylančiosios aortos audiniuose ir kraujo plazmoje, susiformavus aneurizmai, ir nustatyti kaip miRNR gali įtakoti KAA vystymąsi. Taip pat eksperimentiškai įrodžius mirtroninių miRNR brendimo priklausomybę nuo splaisingo, identifikuoti tokių miRNR raišką virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse ir navikuose.

Taigi, visumine sekoskaita identifikavome miRNR profilio pokyčius žmogaus kylančiosios aortos audiniuose bei kraujo plazmoje, susiformavus aneurizmai. Toliau nustatėme, kad miRNR, kurių raiška pakinta, esant KAA, į kraujo plazmą patenka ne iš KAA audinio. Taip pat identifikavome, kad miRNR raiška KAA audiniuose gali priklausyti nuo paciento lyties. Be to, parodėme, kad miRNR kiekio pokyčiai KAA audiniuose gali įtakoti TGF-β

signalinio kelio pokyčius bei dalies kraujagyslių lygiųjų raumens ląstelių diferenciacijos stadiją – dėl dalyje ląstelių išaugusios transkripcijos veiksnio KLF4 raiškos, daugiau ląstelių nei sveikuose audiniuose pasižymi sintetiniu fenotipu.

Toliau nustatėme, kad tik dalies bioinformatiškai nustatytų mirtronų brendimas priklauso nuo splaisingo. Parodėme, kad sutinkamas standartiniuose mirtronuose miR-1227-3p, miR-1229-3p ir miR-1236-3p brendimo metu tikrai kerpa spaisosoma ir šios naujai įrodytos miRNR gali būti priskirtos mirtroninių miRNR tipui. Taip pat identifikavome, kad splaisingo veiksnys SRSF1 ir SRSF2 skatina mirtroninių miRNR brendimą storosios žarnos HCT116 vėžinėse ląstelėse. Be to nustatėme, kad mirtroninių miRNR raiška yra skirtinga virškinimo sistemos vėžinėse ląstelėse, lyginant su su nevėžine HEK293A ląstelių linija, bei virškinimo sistemos navikuose, lyginant su sveikais audiniais. Taigi vieni iš pirmųjų parodėme, kad mirtroninės miRNR gali būti susijusios su vėžiniais procesais bei turi potencialą būti naudojamos kaip biožymenys vėžio diagnostikai.

DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Gasiulė, S.***; Stankevičius, V.*; Patamsytė, V.; Ražanskas, R.; Žukovas, G.; Kapustina, Ž.; Žaliaduonytė, D.; Benetis, R.; Lesauskaitė, V.; Vilkaitis, G. Tissue-Specific miRNAs Regulate the Development of Thoracic Aortic Aneurysm: The Emerging Role of KLF4 Network. *Journal of Clinical Medicine*. 2019, 8, 1609. (Cituojamumo rodiklis – 5,688).
2. **Butkytė S**, Čiupas L, Jakubauskienė E, Vilys L, Mocevicius P, Kanopka A, and Vilkaitis G. Splicing-dependent expression of microRNAs of mirtron origin in human digestive and excretory system cancer cells. *Clinical Epigenetics*, 2016, 8:33. (Cituojamumo rodiklis – 5,496).

KITOS PUBLIKACIJOS

1. **Gasiulė, S.***; Dreize, N.*; Kaupinis, A.; Ražanskas, R.; Čiupas, L.; Stankevičius, V.; Kapustina, Ž.; Laurinavičius, A.; Valius, M.; Vilkaitis, G. Molecular Insights into miRNA-Driven Resistance to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin Chemotherapy: miR-23b Modulates the Epithelial–Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer Cells. *Journal of Clinical Medicine*. 2019, 8, 2115. (Cituojamumo rodiklis – 5,688).
2. Stankevicius V, Vasauskas G, Bulotiene D, **Butkyte S**, Jarmalaite S, Rotomskis R and Suziedelis K. „Gene and miRNA expression signature of Lewis lung carcinoma LLC1 cells in extracellular matrix enriched microenvironment“. *BMC cancer*, 2016. (Cituojamumo rodiklis – 2,933).
3. Sasnauskienė A, Jonušienė V, Krištaponienė A, **Butkytė S**, Dabkevičienė D, Kanopienė D, Kazbarienė B, and Didžiapetrienė J. NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, and JAG2 protein levels in human endometrial cancer. *Medicina*, 2014, 50: 14-18. (Cituojamumo rodiklis – 1,467).

*Abu autoriai straipsnio ruošimui turėjo vienodą indėlį.

DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

1. **Gasiule S**, Stankevičius V, Patamsyte V, Gecys D, Zukovas G, Zaliaduonyte-Peksiene D, Lesauskaite V and Vilkaitis G. Role of miRNAs in development of ascending thoracic aneurysm. EMBO/EMBL Symposia The Complex Life of RNA, 2018, Germany.
2. Patamsyte V, Gecys D, Zukovas G, **Gasiule S**, Stankevičius V, Vilkaitis G, Benetis R, Lesauskaite V. Thoracic aortic aneurysm and age-related vascular remodelling: study of epigenetic mechanisms. Journal of clinical and experimental cardiology:proceedings of 27th European cardiology conference:October 22-24, 2018, Rome, Italy.
3. **Butkytė S**, Čiupas L, Jakubauskienė E, Vilys L, Mocevicius P, Kanopka A, and Vilkaitis G. Splicing-dependent mirtronic miRNAs expression in digestive system cancerous cells. Vita Scientia Conference, 2016, Vilnius, Lithuania
4. Vilkaitis G, **Butkytė S**, Jakubauskienė E, Ščerbakovaitė A, and Kanopka A. Simultaneous analysis of the expression of splicing factors and mirtrons in digestive system tumours and cell lines. Anticancer Research, 2014, 34: 6233, Greece.
5. Jakubauskienė E, **Butkyte S**, Ščerbakovaitė A, Vilkaitis G, Kanopka A. The expression of splicing factors in digestive system tumours and cell lines. FEBS, 2014, 281:690, France.

KITI PRANEŠIMAI

1. **Butkytė S**, Dreizė N, Čiupas L, Mazelis I, Kukcinaviciute E, Valius M, and Vilkaitis G. miRNA mediated chemoresistance to 5-fluorouracil and oxaliplatin in colorectal cells. EMBO/EMBL Symposia: The Non-Coding Genome, 2017, Germany.
2. **Butkytė S**, Šumilova N, Ger M, Ražanskas R, Čiupas L, Jonušienė V, Valius M, Vilkaitis G. MiRNA mediated chemoresistance to 5-fluorouracil and oxaliplatin in 3D colorectal cell culture. EMBO/EMBL Symposium "Organoids, Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture", 2016, Germany.
3. Daugelaviciene N, **Butkyte S**, Sasnauskiene A, Kirvelienu V. (2014) Hallmarks of cornification, apoptosis and autophagy: primary keratinocytes HEKa vs A-431 cells. Gordon Research Conferences: Autophagy in Stress, Development & Disease. Italy.

4. Daugelaviciene N, **Butkyte S**, Sasnauskiene A, Kirveliėne V. (2014) Keratinocytes response to photodynamic therapy: cornification, apoptosis, autophagy (2014). XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, Lithuania.
5. Daugelaviciene N, **Butkyte S**, Sasnauskiene A, Kirveliėne V. (2014) Hallmarks of cornification, apoptosis and autophagy in photodynamically treated primary keratinocytes HEKa vs carcinoma A-431 cells. 22nd Euroconference on Apoptosis Cell Death & Rejuvenation. Greece.
6. **Butkyte S**, Osipenko A, Plotnikova A, Masevičius V, Klimašauskas S and Vilkaitis G. HEN1-directed labeling of small non-coding RNA's. EMBO/EMBL Symposia: The Non-Coding Genome, 2013, Germany.

PEDAGOGINĖ IR MOKSLO POPULIARINIMO VEIKLA

1. Molekulinės Biotechnologijos laboratorinių darbų vedimas Medicinos genetikos magistro studijų studentams.
2013, 2017, 2018
2. Vadovavimas Laurynui Čiupui ruošiant biochemijos bakalauro baigiamąjį darbą.
2015
3. Vadovavimas Ignui Maželiui ir Laurynui Čiupui ruošiant biochemijos bakalauro ir magistro baigiamuosius darbus. *2018*
4. Biochemijos ir molekulinės biologijos studijų programos darbų recenzentė.
2012, 2013, 2017, 2019
5. Dalyvavimas žinių reportaže kartu su prof.habil. Klimašausku apie naują ERC projektą (Panorama, TV3 žinios, LNK). *2017*
6. Mokslo populiarinimo straipsnis „Epigenetiniai aortos sienos remodeliavimosi mechanizmai“ žurnale "Kardiologijos praktika". Patamsytė V, Butkytė S, Stankevičius V, Žukovas G, Vilkaitis G, Lesauskaitė V.
2017

DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE

1. VPI-3.1-ŠMM-08-K-001-005 "Biotechnologija ir biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai", Žmogiškųjų išteklių plėtros veiksmų programos projektas iš ES struktūrinių fondų lėšų. Vadovas – prof. dr. K. Sasnauskas. *2013-2014*
2. LIG-10/2012 "Splaisingo faktoriai ir jų reguliuojamos miRNR kaip virškinimo sistemos vėžinių susirgimų biožymenys". vadovas Dr. A.Kanopka. *2012-2014*
3. SEN-15069, "Nauji žymenys storosios žarnos vėžio individualizuotai terapijai: proteomika, mikroRNRomika, klinika", finansuojanti institucija LMT, vadovas - prof. dr. A. Laurinavičius. *2015-2018*
4. SEN-16081, "Amžinis aortos remodeliavimas ir kylančios aortos dilatacinė patologija: epigenetinių biožymenų paieška", finansuojanti institucija - LMT, vadovė - habil. prof. dr. V. Lesauskaitė. *2016-2018*
5. Advanced grant „Single-cell temporal tracking of epigenetic DNA marks - Epitrack“. Finansuojanti institucija – ES. Vadovas habil. prof. dr. S. Klimašauskas. *nuo 2019*

CURRICULUM VITAE

Stasė Gasiulė

1987-09-28

867205704; stase.gasiule@bti.vu.lt

IŠSILAVINIMAS

Vilniaus Universitetas, Biotechnologijos institutas 2012-2017

Doktorantūros studijos (Gamtos mokslai, Biochemija).

Disertacijos pavadinimas „Kanoninių ir mirtroninių miRNR funkcinis tyrimas krūtinės kylančiosios aortos aneurizmos audiniuose ir virškinimo sistemos navikuose“.

Vilniaus Universitetas, Biochemijos ir biofizikos katedra 2010-2012

Magistro studijos (fiziniai mokslai, Biochemija).

Magistrinio darbo pavadinimas „Fotosensibilizacijos sukelti ragėjimo, apoptozės ir autofagijos požymiai pirminiuose keratinocituose ir epidermoidinės karcinomos A-431 ląstelėse“

Vilniaus Universitetas, FERMENTAS (Dabar - ThermoFisher Scientific)

2006-2010

Bakaluro studijos (fiziniai mokslai, Biochemija).

Bakalaurinio darbo pavadinimas „Katijoninių polimerų panaudojimas baltymų transfekcijai“

DARBINĖ VEIKLA

Vilniaus universitetas, Biochemijos ir biofizikos katedra, Ląstelės biologijos laboratorija **Tyrėja** 2011-2012

Vilniaus universitetas, Onkologijos institutas, Kancerogenezės ir navikų patofiziologijos laboratorija **Tyrėja** 2012

Vilniaus universitetas, Biotechnologijos institutas, DNR modifikacijos tyrimų skyrius **Biologė-Tyrėja** 2012-2017

Jaunesnioji mokslo darbuotoja nuo 2017

TARPTAUTINĖS KONFERENCIJOS

EMBO/EMBL Symposia: The Non-Coding Genome, Heidelbergas, Vokietija. 2013

EMBO/EMBL Symposia: Organoids, Heidelbergas, Vokietija 2016

EMBO/EMBL Symposia: The Complex Life of RNA. Heidelbergas, Vokietija 2018

APDOVANOJIMAI

Kanados lietuvių fondo Eileen ir Vincent Kadis vardinė stipendija už puikius ir labai gerus mokymosi rezultatus 2009

EMBO/EMBL stipendija tarptautinei konferencijai 2016

LMT doktorantų stipendija už akademinis pasiekimus 2016- 2017

PUBLIKACIJŲ KOPIJOS

Gasiulė, S.*; Stankevičius, V.*; Patamsytė, V.; Ražanskas, R.;
Žukovas, G.; Kapustina, Ž.; Žaliaduonytė, D.; Benetis, R.;
Lesauskaitė, V. and Vilkaitis, G.

**Tissue-Specific miRNAs Regulate the Development of Thoracic
Aortic Aneurysm: The Emerging Role of KLF4 Network**

Journal of Clinical Medicine
2019, 8, 1609

Copyright 2019 MDPI
Reproduced with permission

Article

Tissue-Specific miRNAs Regulate the Development of Thoracic Aortic Aneurysm: The Emerging Role of KLF4 Network

Stasė Gasiulė^{1,†}, Vaidotas Stankevičius^{1,*}, Vaiva Patamsytė², Raimundas Ražanskas¹, Giedrius Žukovas³, Žana Kapustina⁴, Diana Žaliaduonytė⁵, Rimantas Benetis², Vaiva Lesauskaitė² and Giedrius Vilkaitis^{1,*}

¹ Institute of Biotechnology, Vilnius University, LT-10257 Vilnius, Lithuania; stase.gasiule@bti.vu.lt (S.G.); raimundas.razanskas@bti.vu.lt (R.R.)

² Institute of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50103 Kaunas, Lithuania; vaiva.patamsyte@lsmuni.lt (V.P.); rimantas.benetis@kaunoklinikos.lt (R.B.); vaiva.lesauskaite@lsmuni.lt (V.L.)

³ Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50103 Kaunas, Lithuania; giedrews@yahoo.com

⁴ Thermo Fisher Scientific Baltics, LT-02241 Vilnius, Lithuania; zana.kapustina@thermofisher.com

⁵ Department of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, LT-50161 Kaunas, Lithuania; diana.zaliaduonyte@kaunoklinikos.lt

* Correspondence: vaidotas.stankevicius@gmc.vu.lt (V.S.); giedrius@ibt.lt (G.V.)

† These authors contributed equally to this manuscript.

Received: 5 August 2019; Accepted: 27 September 2019; Published: 3 October 2019



Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are critical regulators of the functional pathways involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Understanding of the disease-associated alterations in tissue and plasma will elucidate the roles of miRNA in modulation of gene expression throughout development of sporadic non-syndromic ascending thoracic aortic aneurysm (TAA). This will allow one to propose relevant biomarkers for diagnosis or new therapeutic targets for the treatment. The high-throughput sequencing revealed 20 and 17 TAA-specific miRNAs in tissue and plasma samples, respectively. qRT-PCR analysis in extended cohort revealed sex-related differences in miR-10a-5p, miR-126-3p, miR-155-5p and miR-148a-3p expression, which were the most significantly dysregulated in TAA tissues of male patients. Unexpectedly, the set of aneurysm-related miRNAs in TAA plasma did not resemble the tissue signature suggesting more complex organism response to the disease. Three of TAA-specific plasma miRNAs were found to be restored to normal level after aortic surgery, further signifying their relationship to the pathology. The panel of two plasma miRNAs, miR-122-3p, and miR-483-3p, could serve as a potential biomarker set (AUC = 0.84) for the ascending TAA. The miRNA-target enrichment analysis exposed TGF- β signaling pathway as sturdily affected by abnormally expressed miRNAs in the TAA tissue. Nearly half of TAA-specific miRNAs potentially regulate a key component in TGF- β signaling: TGF- β receptors, SMADs and KLF4. Indeed, using immunohistochemistry analysis we detected increased KLF4 expression in 27% of TAA cells compared to 10% of non-TAA cells. In addition, qRT-PCR demonstrated a significant upregulation of ALK1 mRNA expression in TAA tissues. Overall, these observations indicate that the alterations in miRNA expression are sex-dependent and play an essential role in TAA via TGF- β signaling.

Keywords: aortic disease; aneurysm; miRNA; TGF- β pathway; KLF4; synthetic phenotype

1. Introduction

Thoracic aortic aneurysms (TAAs) are usually silent and therefore deadly if not detected and repaired on time [1]. Most of them are affecting the root or ascending aorta [2]. TAA is categorized as syndromic (Marfan, Loeys-Dietz, Ehlers-Danlos, etc.), familial non-syndromic and sporadic [3]. The incidence of TAA is permanently increasing and remains much higher in males than females [4]. Similar trends are observed in hospital admissions for TAA [5]. The aortic diseases are more common in males but the outcome is worse in female patients, although reasons for sex differences are unknown [6]. Therefore, further investigation of molecular mechanisms for these differences are required as well [7]. Vascular smooth muscle cells (VSMC) have been shown to possess a natural plasticity to switch between contractile and synthetic phenotypes in order to repair small vascular injuries [8]. For the last few decades, VSMC dedifferentiation has been recognized as one of the key processes involved in arterial maintenance and development of vascular diseases [9]. This led to the identification of various regulators of VSMC phenotype including a transcription activator myocardin (*MyoCD*) [10], transcription factor Krüppel-like factor 4 (*KLF4*) [11], and components of a transforming growth factor beta (*TGF-β*) signalling pathway [12]. During the formation of TAA, VSMCs are thought to lose their contractile ability and start secretion of various extracellular matrix proteins and their inhibitors, but the mechanism of this phenotypic shift remains unknown.

Recent studies have focused on the emerging epigenetic regulation of gene expression and the short non-coding microRNAs (miRNAs) involved in post-transcriptional regulation of a target messenger RNA (mRNA) [13]. MiRNAs have been implicated in the pathogenesis of various cardiovascular diseases [14] and show the potential to be utilised as biomarkers in diagnosis, prognosis, and selection of treatment [15]. Over the last decade a variety of miRNAs have been identified in the regulation of VSMC phenotype [16–18] some of which have been associated with the formation of TAA [19,20]. The majority of miRNAs association studies were done using PCR or microarray techniques [21] and only a fraction of miRNAs have been validated in plasma samples [22]. However, to date, the global high-throughput miRNA sequencing data of TAA tissue is still missing. Furthermore, most of miRNA-related mechanistic insights of TAA development are made using cell cultures or knock-out animal models which only mildly represents human disease and could further lead to misinterpretation of biological processes occurring in human tissue *in vivo* [23].

A multidimensional approach is needed in order to uncover the complex mechanisms occurring in the human aortic wall during the formation of TAA and to evaluate the possibility of using circulating miRNAs as biomarkers for the development of the disease. In the present study, we aimed to profile miRNA changes in TAA tissue and blood plasma samples and to assess their role in the pathogenesis of the disease as well as to evaluate their potential to be used as biomarkers. Using high-throughput miRNA sequencing we identified 20 and 17 differentially expressed miRNAs in TAA tissue and TAA plasma samples compared to non-TAA specimens, respectively. Deregulation of selected miRNAs in TAA samples were further confirmed by qRT-PCR analysis, thus verifying reliability of miRNA-Seq results. A subsequent pathway enrichment analysis of miRNA target genes revealed significant relationship between nearly half of dysregulated miRNAs and *TGF-β* signalling pathway. Finally, we for the first time showed accumulation of *KLF4*, a master regulator of VSMC differentiation state, in TAA tissue obtained from patients. Altogether our results define potential candidates for TAA diagnostic biomarkers and provide new insights in regulatory miRNA-related mechanisms of TAA development.

2. Materials and Methods

2.1. Patient Samples

All experimental procedures using human tissue and plasma samples conform to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and were approved by Kaunas Regional Biomedical Research Ethics Committee (Nr. P2-BE-2-12/2012).

The study included 40 patients with sporadic non-syndromic ascending thoracic aorta aneurysm (TAA group). Exclusion criteria were severe atherosclerosis showing calcified or ulcerating plaques of the ascending aorta, aortitis, phenotypic characteristics of the known genetic disorders such as Marfan, Ehlers Danlos and other syndromes. The diagnosis was confirmed by two-dimensional thoracic aorta echocardiography according to the 2014 ESC guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases. Echocardiography was performed at the Department of Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences (LUHS). TAA group included patients ($n = 23$) who underwent aortic reconstruction surgery at the Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery, LUHS and non-operated patients ($n = 17$) with ascending aorta aneurysm.

Study subjects without TAA (non-TAA group) included i) heart transplantation donors ($n = 6$), ii) patients who underwent isolated coronary artery bypass graft surgery (CABG) ($n = 72$) and iii) healthy volunteers ($n = 10$). All healthy volunteers were screened using two-dimensional transthoracic echocardiography to ensure the ascending aorta was not dilated. Detailed preparation of patients' tissue and plasma samples can be found in the Supplementary Methods.

2.2. Study Design

Study subjects ($n = 32$) selected for miRNA expression profiling in aortic tissue consisted of surgical TAA patients ($n = 8$), donors ($n = 4$) as well as CABG patients ($n = 2$). miRNA expression profiling in plasma was done in samples from surgical TAA patients ($n = 7$) before and 3 months after the aortic surgery (denoted as operated, $n = 4$), respectively. Seven volunteers without health complaints ($n = 7$) were used as non-TAA controls. Clinical and demographic characteristics of the groups are summarized in Table 1.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of control and thoracic aortic aneurysm (TAA) patients selected for profiling of microRNA (miRNA) expression.

Variables	Tissue		Plasma		
	non-TAA ($n = 6$)	TAA ($n = 8$)	non-TAA ($n = 7$)	TAA ($n = 7$)	Operated ($n = 4$)
Age, years \pm SD	47 \pm 5	62 \pm 10	54 \pm 12	63 \pm 11	64 \pm 12
Sex, male (%)	4 (67 %)	6 (75 %)	4 (57 %)	5 (71 %)	3 (75 %)
Ascending aortic diameter, mm	36 \pm 0.7 *	50 \pm 3	35 \pm 3	53 \pm 5	52 \pm 4
Aortic valve stenosis (%)	0 (0 %)	3 (38 %)	1 (14 %)	2 (29 %)	1 (25 %)
Bicuspid aortic valve (%)	0 (0 %)	5 (63 %)	0 (0 %)	4 (57 %)	2 (50 %)
Aortic valve insufficiency (%)	0 (0 %)	5 (63 %)	1 (14 %)	3 (43 %)	1 (25 %)
Hypertension (%)	2 (100 %) *	7 (88 %)	4 (57 %)	6 (86 %)	4 (100 %)
Smokers (%)	2 (100 %) *	1 (13 %)	1 (14 %)	1 (14 %)	0 (0 %)
Diabetes (%)	0 (0 %)	1 (13 %)	0 (0%)	3 (43 %)	1 (25 %)

Notes: * Data is missing from four aorta donors. Operated denotes patient samples collected after aortic surgery.

Validation group for miRNA expression in aortic tissue consisted of TAA surgical patients ($n = 17$), donors and CABG patients ($n = 35$). For the miRNA validation in plasma samples, we were able to collect larger TAA group ($n = 28$) and non-TAA group ($n = 34$) which consisted of healthy volunteers and CABG patients. Clinical and demographic characteristics of each validation group are presented in Supplementary Table S1. A significant difference in ascending aortic diameter ($p < 0.001$) was observed between TAA patients and non-TAA in both miRNA profiling groups supporting the selection criteria. Patients with bicuspid aortic valve were predominant in both TAA groups ($p < 0.001$) compared with non-TAA group.

Total RNA isolation, cDNA library sequencing, and miRNA-Seq differential and functional analysis are described in detail in Supplementary Methods. miRNA-Seq data are available at GEO database using accession number GSE122266. Validation of miRNA-Seq data was performed as described previously [24] and detailed qRT-PCR and immunohistochemistry analysis are depicted in Supplementary Methods.

3. Results

3.1. Differential miRNA Expression Analysis in TAA Tissue and Blood Plasma Samples

In order to determine miRNAs which expression levels are potentially deregulated in aorta tissue and blood plasma during the formation of TAA, in the present study we evaluated miRNA expression profiles in a learning set of patient tissue and plasma samples ($n = 32$) using Illumina high-throughput miRNA sequencing platform (Table 1; Figure 1A). The overview of miRNA-Seq experimental design and data quality is depicted in Supplementary Results. miRNA-Seq data analysis revealed a total of 20 differentially expressed miRNAs (selection criteria were fold change ≥ 1.5 , p value < 0.05 and base mean higher than 10) in TAA tissue samples compared to non-TAA group (Table 2), among which the majority (15 of 20 miRNAs) were upregulated (Table 3). A detailed differential miRNA-Seq data evaluation of each sample assessed in the present study is depicted in Supplementary File 1 and Supplementary File 2. A heat map of expression signature for these dysregulated miRNAs in all 14 samples clearly clustered aorta tissues according to the presence or absence of aneurysm (Figure 1B).

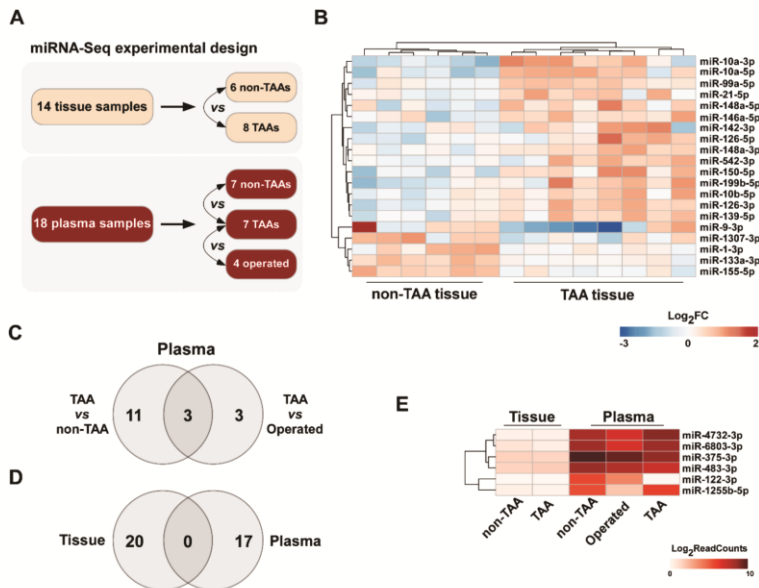


Figure 1. Differential miRNA expression analysis in TAA tissue and plasma samples using high-throughput RNA sequencing. (A) Schematic diagram of miRNA-Seq experiment. (B) Heat map showing a total of 20 miRNAs differentially expressed (fold change, FC > 1.5, $p < 0.05$, normalized read count average, RC > 10) in TAA tissue samples ($n = 8$) compared to normal aorta tissue ($n = 6$). Red color indicates upregulated log-transformed expression level ratios of corresponding miRNAs, blue – downregulated; (C) Venn’s diagram showing the number of differentially expressed miRNAs (FC > 1.5, $p \leq 0.05$ and RC > 20) in TAA plasma samples ($n = 7$) compared to non-aneurysmal group ($n = 7$) and plasma samples obtained 3 months after aortic reconstructive surgery ($n = 4$); (D) Venn’s diagram demonstrating the number of differentially expressed miRNAs in TAA tissue and plasma samples; (E) Heat map demonstrating the expression of six miRNAs, which were significantly deregulated in TAA plasma samples, but were almost absent in TAA tissue samples. Color intensity indicates log-transformed normalized read counts of corresponding miRNA.

Table 2. A number of miRNAs differentially expressed (fold change > 1.5) in TAA tissue and blood plasma samples compared to non-TAA controls.

Groups	Number of miRNAs	Upregulated	Downregulated
Tissue			
TAA vs. non-TAA	20	15	5
Plasma			
TAA vs. non-TAA	14	3	11
TAA v.s Op	6	4	2
TAA vs. non-TAA + Op	10	2	8

Notes: TAA—Thoracic Ascending Aneurysm; Op—Operated.

Table 3. List of differentially expressed miRNAs (selection criteria were fold change > 1.5, *p* value < 0.05 and base mean higher than 10) in TAA aortic tissue samples compared to miRNA expression levels in non-TAA controls.

No.	miRNAs	Fold Change	<i>p</i> Value
Upregulated			
1	hsa-miR-10a-3p	2.69	2.05E-06
2	hsa-miR-10a-5p	2.45	8.63E-07
3	hsa-miR-150-5p	2.21	2.05E-05
4	hsa-miR-199b-5p	2.12	1.19E-04
5	hsa-miR-126-5p	1.89	7.95E-04
6	hsa-miR-126-3p	1.88	2.10E-05
7	hsa-miR-139-5p	1.74	7.22E-04
8	hsa-miR-148a-3p	1.71	3.44E-05
9	hsa-miR-10b-5p	1.70	7.78E-04
10	hsa-miR-148a-5p	1.70	0.0112
11	hsa-miR-99a-5p	1.68	1.76E-05
12	hsa-miR-21-5p	1.67	1.10E-03
13	hsa-miR-146a-5p	1.67	0.002
14	hsa-miR-142-3p	1.66	0.020
15	hsa-miR-542-3p	1.64	0.009
Downregulated			
16	hsa-miR-1-3p	-1.59	0.001
17	hsa-miR-133a-3p	-1.64	2.96E-07
18	hsa-miR-1307-3p	-1.68	0.011
19	hsa-miR-9-3p	-1.79	0.021
20	hsa-miR-155-5p	-1.88	7.34E-08

Using the same workflow of miRNA-Seq analysis, we found 14 differentially expressed miRNAs in TAA patient plasma samples compared to non-TAA group. Out of these, 3 were upregulated and 11 were downregulated (Tables 2 and 4). Next, to determine alterations after the removal of aneurysm, we compared the miRNA expression levels between TAA plasma samples collected before and 3 months after aortic surgery. This analysis led to the detection of six differentially expressed miRNAs (Table 4; Supplementary Figure S1). Remarkably, the expression of three of TAA-specific plasma miRNAs, miR-1255b-5p, miR-122-3p and miR-23b-5p, returned to near non-TAA levels after the operation. Finally, to identify the most significantly dysregulated miRNAs in TAA plasma samples, we pooled data from both non-aneurysmal (non-TAA and TAA samples collected after the surgery) cohorts and compared to TAA group. The differential analysis determined ten differentially expressed miRNAs revealing the greatest fold change for miR-122-3p. Thus, the overall evaluation of miRNA expression changes in plasma samples discovered a total of 17 differentially expressed miRNAs in TAA samples compared to non-TAA samples, samples collected after aortic surgery or both groups of samples (Figure 1C).

Table 4. List of differentially expressed miRNAs (fold change > 1.5, *p* value ≤ 0.05-fold and base mean ≥ 20) in TAA patient blood plasma samples compared to miRNA expression levels in non-TAA controls.

Group	No.	miRNA	Regulation	Fold Change	<i>p</i> Value
TAA vs. non-TAA	1	hsa-miR-146b-3p	up	9.11	0.044
	2	hsa-miR-1255b-5p	up	8.87	0.015
	3	hsa-miR-889-3p	up	7.95	0.047
	4	hsa-miR-375-3p	down	-2.38	0.036
	5	hsa-miR-30a-5p	down	-2.54	0.033
	6	hsa-miR-483-3p	down	-2.68	0.015
	7	hsa-miR-23b-3p	down	-2.79	0.017
	8	hsa-miR-140-3p	down	-4.01	0.010
	9	hsa-miR-100-5p	down	-9.17	0.003
	10	hsa-miR-145-5p	down	-17.36	1.44E-04
	11	hsa-miR-143-3p	down	-17.74	3.27E-05
	12	hsa-miR-23b-5p	down	-24.93	0.013
	13	hsa-miR-122-3p	down	-69.32	3.31E-04
	14	hsa-miR-34a-5p	down	-71.95	4.01E-05
TAA vs. Operated	1	hsa-miR-1255b-5p	up	9.7203	0.045
	2	hsa-miR-4732-3p	up	3.9801	0.050
	3	hsa-miR-6803-3p	up	3.4495	0.011
	4	hsa-miR-22-3p	up	2.5198	0.029
	5	hsa-miR-122-3p	down	-18.4085	0.024
	6	hsa-miR-23b-5p	down	-44.7992	0.001
TAA vs. non-TAA & Operated	1	hsa-miR-1255b-5p	up	11.68	0.004
	2	hsa-miR-22-3p	up	1.73	0.034
	3	hsa-miR-375-3p	down	-2.12	0.049
	4	hsa-miR-483-3p	down	-2.29	0.035
	5	hsa-miR-23b-3p	down	-2.36	0.024
	6	hsa-miR-143-3p	down	-3.83	0.012
	7	hsa-miR-145-5p	down	-4.83	0.019
	8	hsa-miR-23b-5p	down	-29.67	0.003
	9	hsa-miR-34a-5p	down	-48.62	6.26E-05
	10	hsa-miR-122-3p	down	-53.67	2.31E-04

Surprisingly, a pattern of aneurysm-related alterations in plasma’s miRNA profiles showed no resemblance to the tissue set. Indeed, none of the differentially expressed miRNAs overlapped in Venn’s diagram (Figure 1D). Moreover, the expression levels of the six significantly deregulated miRNAs in TAA plasma samples, miR-4732-3p, miR-6803-3p, miR-375-3p, miR-483-3p, miR-122-3p and miR-1255b-5p, were negligible in aortic tissue samples (Figure 1E).

3.2. Validation of Selected miRNAs in TAA Tissue and Plasma Samples by qRT-PCR

In order to corroborate the RNA sequencing-based predictions, we performed qRT-PCR analysis to examine the abundance of five selected miRNAs (mir-10a-5p and miR-155-5p exhibited the greatest up/down fold changes; miR-126-3p, mir-133a-3p and miR-148a-3p were implicated in TGF-β signaling routes, see below) in the independent group of 37 samples containing 20 non-TAA and 17 thoracic aortic aneurysm tissues (Supplementary Table S1). Our analysis validated the up- and downregulated expression of miR-10a-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p and miR-155-5p, respectively, in the sex-undivided set of TAA tissue samples compared to the non-TAA group (Figure 2A, Supplementary Figure S2). Whereas, the difference in miR-148a-3p expression levels was significant among the groups only when stratifying by sex (*p* = 0.0203 for a male patient set). Interestingly, a significantly greater differential expression of miR-126-3p (*p* = 0.0062 vs. *p* = 0.0225 for sex-undivided set), miR-155-5p (*p* = 0.0003 vs. *p* = 0.0017) and miR-10a-5p (*p* = 0.0001 vs. *p* = 0.0002), except miR-133a-3p (*p* = 0.0068 vs. *p* = 0.0031), also was observed between 13 TAA and 13 normal aorta tissue samples from male patients showing sex-related miRNA expression variances in the TAA tissue. Because of the scarce representation of

female samples (7 non-TAA vs. 4 TAA) the extent of involvement of these miRNAs in the thoracic aneurysm formation in female patients requires further analysis.

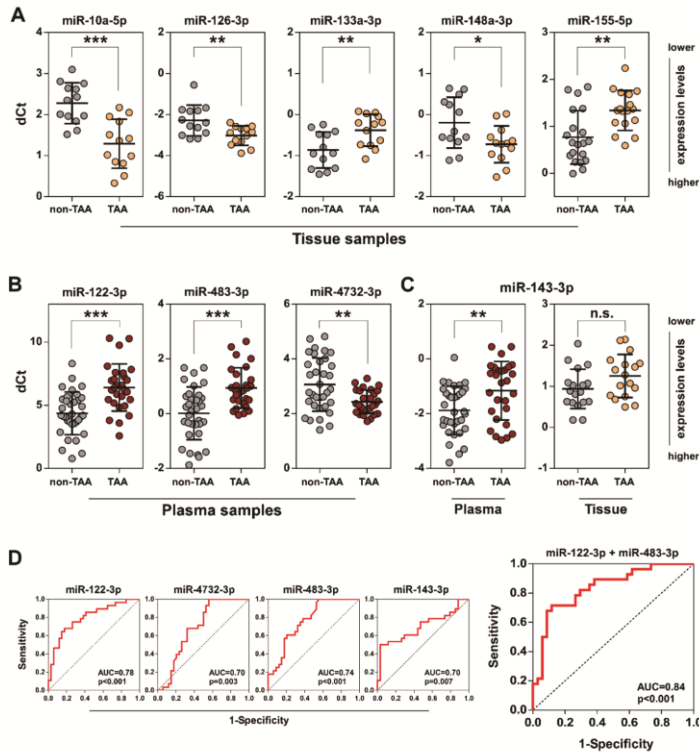


Figure 2. Validation of differentially expressed miRNAs in TAA tissue and plasma samples by qRT-PCR. qRT-PCR analysis was used for the comparison of relative miRNA expression levels between non-TAA and TAA groups in tissue (A) and plasma (B) both types (C) of samples. The cycle threshold (Ct) values of observed miRNAs were normalized to miR-152-3p and miR-185-5p for tissue and plasma samples, respectively, which were revealed as the most reliable endogenous controls according to miRNA-Seq data. Lines within boxes indicate relative miRNA expression median values; whiskers—5–95 percentile of the relative miRNA expression values. Significance between each group was evaluated using Student’s t test and is shown as follows: n.s.—not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. (D) Diagnostic ROC curve analysis showing sensitivity and specificity of miR-122-3p, miR-483-3p, miR-4732-3p and miR-143-3p selected circulating miRNAs or the combination of miR-122-3p and miR-483-3p together. AUC denotes area under the ROC curve.

In contrast, the evaluation of the miRNA expression levels in 62 plasma samples (34 non-TAA vs. 28 TAA) demonstrated that all selected miRNAs, miR-4732-3p, miR-483-3p and miR-122-3p, exhibited statistically significant expression changes in TAA plasma samples compared to non-TAA group showing a good reliability of our miRNA-Seq data (Figure 2B). Of those, the difference of miR-122-3p expression levels was the most significant ($p < 0.0001$) between two plasma sample groups.

RNA-Seq analysis displayed that the difference of miR-143-3p expression was not statistically significant in TAA tissue samples compared to non-TAA. Consistently with this observation, a significant

downregulation ($p = 0.0051$) was observed only in TAA plasma samples (Figure 2C) despite the decrement of miR-143-3p expression level in both TAA specimen groups compared to non-TAA group.

The diagnostic sensitivity and specificity of selected plasma circulating miRNAs which could serve as potential biomarkers of TAA was examined by ROC curve analysis (Figure 2D). The results demonstrated that miR-122-3p reached the most significant prognostic accuracy (AUC = 0.78, $p < 0.001$). Moreover, a combined analysis of miR-122-3p and miR-483-3p miRNAs showed even better diagnostic discrimination (AUC = 0.84, $p < 0.001$) indicating that these miRNAs could be applied as TAA biomarkers.

Finally, the statistical analysis showed no significant correlations between selected differential miRNAs, miR-10a-5p, miR-126-3p, miR-133a-3p, miR-155-5p, miR-148a-3p, miR-122-3p, miR-483-3p, miR-4732-3p, miR-143-3p and chosen patient characteristics such as patients' age, aorta diameter, bicuspid (BAV)/tricuspid aortic valves (TAV)-associated aneurysms (data is not shown).

On the other hand, we revealed a significant moderate positive correlations between expression level of miR-126-3p and miR-148a-3p ($R = 0.67$) or miR-10a-5p ($R = 0.67$), miR-148a-3p and miR-10a-5p ($R = 0.49$), miR-133a-3p and miR-155-5p ($R = 0.67$) (Supplementary Table S2). Meanwhile, in plasma samples, the strongest correlation was observed between the expression of miR-122-3p and miR-483-3p ($R = 0.65$) (Supplementary Table S3).

3.3. Functional Analysis of miRNA Target Genes Involved in TAA Development

Next, we performed KEGG pathway enrichment analysis of dysregulated miRNA target genes to unravel the miRNA-mediated biological processes associated with TAA development. To provide the best set of relevant candidates for the bona fide miRNA-mRNA interactions, we evaluated combined scores from eight different miRNA target site prediction databases (see details in Methods). The examination identified 1133 target genes (exceeding combined score threshold value of 4) for group consisting of miRNAs which were differently expressed in TAA tissue (Supplementary File 3). The subsequent pathway enrichment analysis of the defined miRNA target sets revealed 48 KEGG categories significantly enriched in targeted genes (> 15 target genes in functional category, FDR < 0.05 ; Supplementary Table S4). In order to visualize the interconnection between signaling pathways regulated by miRNAs, we generated KEGG pathway network using Cytoscape plugin ClueGo. The network analysis clearly exposed three large functional clusters of KEGG categories closely related to immune response, cancer development and kinase signaling pathways, while any significant association of the remaining ten pathways to any other category was absent (Figure 3A, Supplementary Table S5). Transforming growth factor beta (*TGF- β*) signaling pathway, which plays a key role during aorta development and subsequent remodeling, was represented among these categories. To make a more detailed assessment of the miRNA-target interaction network, we additionally introduced target genes which were significantly related to differentially expressed miRNAs (target score > 4).

The expanded analysis revealed 17 target genes which could be potentially regulated by 9 out of 20 of miRNAs differentially expressed in TAA tissue (Figure 3B). Furthermore, our results defined two groups of genes sharing the similar functions which could be potentially affected by miRNAs - (i) *TGF- β* receptors and ligands and (ii) regulating *SMADs* (r*SMADs*) (Figure 3C, grey boxes). As shown above, the differential expression of two of them, miR-148a-3p and miR-155-5p, were additionally confirmed by qRT-PCR analysis. Moreover, miR-133a-3p, which was significantly downregulated in TAA tissue samples, has been previously described as a prominent indirect downregulator of Kruppel-like factor 4 (*KLF4*) [25]. According to these findings, we hypothesized that the miRNAs related to TAA could contribute significantly to critical changes in tissue remodeling in diseased aorta through of *TGF- β* signaling pathway: (i) leading to the functional dysregulation of the key regulators, *KLF4* and/or *MyoCD*, which determine the differentiation state of aorta smooth muscle cells (Figure 3C); (ii) the altered signaling balance between *TGF- β* receptors, ligands and r*SMADs* could provoke alternative *MyoCD*-independent *TGF- β* signaling routes which could boost TAA development.

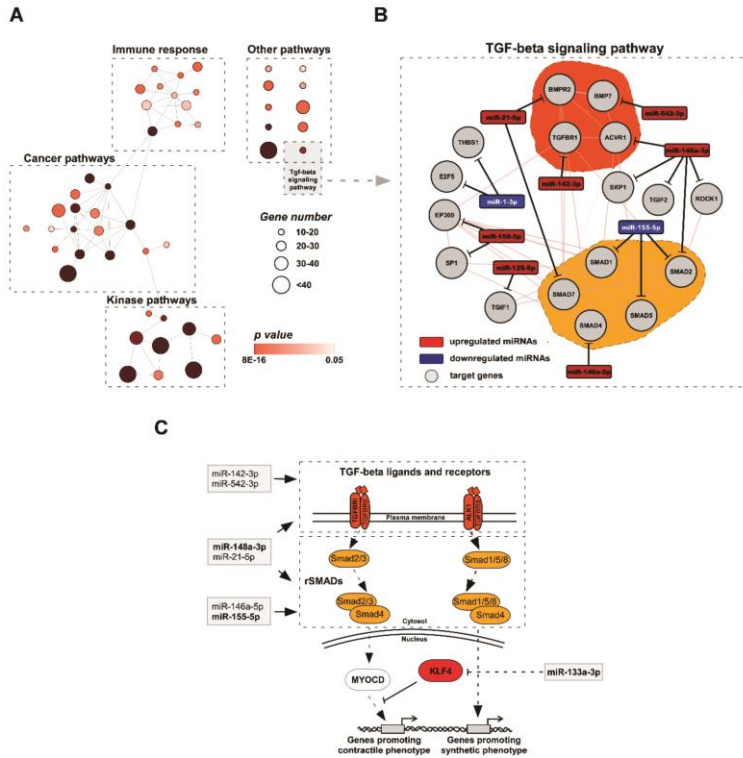


Figure 3. Functional analysis of target genes of miRNAs dysregulated in TAA. (A) Network analysis of 48 KEGG categories specified three clusters of closely related categories including immune response, cancer, kinase signaling pathways and ten separate groups that were not significantly associated with any other category. *TGF-β* signaling pathway is included in a grey box. The size of node represents gene number in particular, KEGG category, the node color – the significance level value of particular KEGG category. Edges indicate a statistically significant association between categories. (B) Expanded molecular network of miRNAs and their potential target genes involved in *TGF-β* signaling pathway. Grey nodes denote target genes, red and blue – upregulated and downregulated miRNAs, respectively. Dark orange area covers *TGF-β* ligands and receptors; light orange – regulatory *SMADs* (r*SMADs*). (C) Simplified hypothetical schema of *TGF-β* signal transduction in TAA tissue cells. miRNAs, which were differentially expressed in TAA tissue (grey boxes), could potentially disturb *TGF-β* signaling by targeting *TGF-β* ligands, receptors or r*SMADs* leading to dysregulation of *MyoCD*–*KLF4* transcription regulator axis and further TAA progression.

3.4. Number of VSMCs Expressing *KLF4* Dramatically Increases during TAA Development

To further explore the compelling connection of the reprogramed miRNA network with *TGF-β* signaling pathway, we assessed the mRNA expression levels of *TGF-β* receptors, *TGFBR1* and *ALK1* (also known as *ACVRL1*), and transcription factors, *MyoCD* and *KLF4*, in non-TAA ($n = 21$) and TAA ($n = 17$) tissue samples (Supplementary Figure S3A). We observed a relevant elevation of *ALK1* gene transcription in TAA tissues ($p = 0.0244$) compared to non-TAA group of normal aortas but found no significant difference in cellular mRNA levels of *TGFBR1*, *KLF4*, and *MyoCD*. It is noteworthy that

we revealed a moderate positive correlation between the changes in expression of *ALK1*, miR-10a-5p, miR-126-3p and miR-148a-5p (Supplementary Table S6; Supplementary Figure S4) suggesting a putative biological relationship between these miRNAs and *TGF-β* signaling pathway. Thus, the obtained data pointed out to a weak regulation of studied genes, except *ALK1*, on transcription or mRNA decay level. However, it has been reported that many human miRNAs control post-transcriptional processes at the protein translation stage [26]. Therefore, we further evaluated the protein expression levels of the selected genes in non-TAA and TAA tissue samples using immunohistochemical analysis (IHC) (Figure 4; Supplementary Figure S3B). The IHC analysis revealed higher expression of *ALK1* both in normal and TAA tissues (IHC score median = 4), whereas the expression levels of *TGFBR1* remained lower in both aortic sample groups (IHC score median = 2). However, the difference of expression levels of both *TGF-β* receptors remained insignificant between TAA and non-TAA specimens (Supplementary Figure S3B). In contrast, although the overall expression levels of *KLF4* were low in both groups of aortic samples, we detected a significant three-fold accumulation ($p = 0.0037$) of *KLF4* positive cells in TAA tissues compared to non-TAA group (Figure 4). Meanwhile, IHC analysis strongly supported upregulated expression of osteopontin ($p = 0.0311$), which is indicating shift of vascular smooth muscles from contraction to synthetic phenotype and is a positive marker of aortic aneurysms [27,28]. Finally, despite IHC results displaying high levels of *MyoCD* in both groups of samples (IHC score median = 6), a significant expression difference was absent between groups (Figure 4, lower panel).

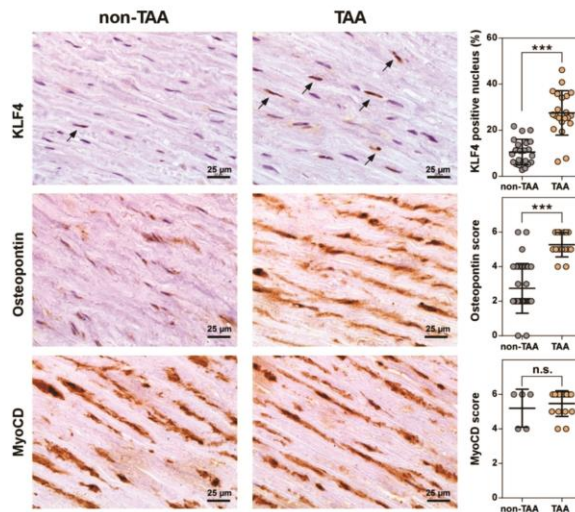


Figure 4. Immunohistochemical (IHC) analysis of KLF4, MyoCD, and osteopontin expression in non-TAA and TAA tissue samples. The abundance of proteins was examined by immunostaining and visualized with diaminobenzidine (brown). The sections were counterstained with hematoxylin (blue). Histological quantification of KLF4 was performed by counting KLF4 positive cell nucleus (black arrows; $n = 43$), whereas osteopontin ($n = 46$) and MyoCD ($n = 20$) by IHC score (graphs in right panel). Lines within boxes indicate KLF4 positive nucleus mean or MyoCD and osteopontin IHC score median values, whiskers – 5-95 percentile of KLF4 positive nucleus or MyoCD and osteopontin IHC score values. The histological data were assessed using Student’s t test (for KLF4) or non-parametric Mann-Whitney U test (for MyoCD and osteopontin). The significance between each group is shown as follows: n.s.—not significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Aneurysm is one of the most frequent diseases of the aorta [29]. The aortic aneurysms rarely cause any symptoms and thereby are commonly diagnosed incidentally. Consequently, the rupture or dissection of the aneurysm leads to lethal outcomes in over 15000 cases annually in the USA only [30]. Classification of aortic aneurysms is based on the anatomic location, with thoracic aortic aneurysms involving the ascending and descending aorta and abdominal aortic aneurysm [31]. The ascending aorta is derived from distinct embryonic origin defining some specific pathological aspects of aneurysms appearing in different locations [32]. The distinct disease entities at the molecular level may be regulated by specific, at least partially, miRNA networks. Previous studies have demonstrated that miRNAs play key roles during the formation of AAA by dysregulating VSMC homeostasis and extracellular matrix (ECM) composition or inducing vascular inflammatory response [33,34]. However, a global high-throughput miRNA-sequencing data of TAA tissue and plasma was still missing, despite some experimental data obtained by miRNA microarrays [19,20,35].

4.1. miRNA Expression Patterns in Tissues May Be Influenced by Aneurysmal Location and Sex

In the present study we determined a total of 20 miRNAs which were differentially expressed in ascending TAA tissues compared to non-aneurysmal group. A qRT-PCR testing further validated the differential expression of four selected miR-10a-5p, miR-133a-3p, miR-126-3p, miR-155-5p and miR-148a-3p in a larger set of independent samples supporting the reliability of miRNA-Seq results.

Despite a partial overlap (miR-126-3p, miR-155-5p and miR-133a-3p appeared to be involved in AAA [22,29,30]), our results confirmed previous assumptions indicating a quite distinct miRNA expression patterns between TAA and AAA tissues. This might be explained by different pathophysiological mechanism for ascending aneurysm development in comparison to AAA. The latter is most commonly caused by atherosclerosis [31]. In agreement with the present study, the dysregulated expression of miR-133a-3p, miR-126-3p and miR-155-5p has been previously associated with TAA [32]. However, the pathophysiological functions of selected miRNAs in TAA formation and how they modulate disease progression remain poorly understood. A significant upregulation of miR-155-5p was identified in various cardiovascular diseases including AAA and was linked to the inflammatory response in aortic wall. It was demonstrated that expression of miR-155 correlated with inflammatory macrophage response and extracellular matrix destruction in AAA model mice [33]. On the contrary, we identified miR-155-5p as the most strongly downregulated miRNA in TAA tissue. It might be explained by the absence of advanced atherosclerosis leading to inflammatory response in the studied ascending aorta samples obtained during aortic reconstruction. Meanwhile, vascular endothelium specific miR-126-3p is required for the maintenance of vascular integrity and endothelial cell homeostasis [34]. Reduced in proliferating VSMC miR-133a-3p switch on transcription factor *Sp1*, which activates *KLF4*, thus promoting synthetic phenotype [25,35]. miR-10a-5p, one of the most upregulated miRNAs in this study, and miR-148a-3p previously were not related to TAA. It was reported that increased miR-10a-5p expression leads to VSMC differentiation from embryonic stem cells through repression of histone deacetylase *HDAC4* [36]. Thus, we inferred that miR-10a-5p may be a potential modulator of VSMC phenotype as well.

We identified a positive correlation between expression levels of miR-126-3p and newly predicted TAA-related miR-10a-5p and miR-148a-3p (Supplementary Figure S4) indicating a possible functional or regulatory link between these miRNAs. Therefore, further studies of the molecular impact of miR-148a-3p and miR-10a-5p on TAA development is of interest.

An evaluation of sex-dependence revealed that miR-148a-3p varied significantly only in male TAA cohort (Supplementary Figure S1). Furthermore, miR-126-3p, miR-155-5p and miR-10a-5p expression changes were more statistically significant in male TAA patients. Notably, the incidence of TAA is more prevalent in males than females [4]. Moreover, previous reports emphasized relevant sex differences in the pathology of TAA, although underlying molecular mechanisms are unknown. Accordingly, aortic dilation rate was more than 3 times greater in women than in men [6]. This observation was

associated with different levels of metalloproteinases *MMP2* and *MMP9*, inhibitory enzymes *TIMP1* and *TIMP2* and overall aortic stiffness highlighting a different ECM remodeling in female aortas [37]. Altogether, these findings suggest that sex-dependent physiological differences could be associated with different changes of miRNA levels in male aorta tissue during TAA development. Otherwise, a deregulation of miRNAs in sex-dependent manner could promote distinct pathways leading to different TAA progression and pathology rates in male patients.

4.2. Circulating miRNA Profile Does Not Match to Aneurysmal Signature of TAA Tissues

Herein we revealed 17 differentially expressed miRNAs in the TAA patients' plasma samples compared to the non-TAA group. The combination of two of them, miR-122-3p and miR-483-3p, allowed to distinguish TAA patients from non-TAA subjects suggesting a novel set of prognostic biomarkers for TAA non-invasive diagnostic. Notably, the majority of altered miRNAs were associated with TAA for the first time, and so far, have not been previously identified in AAA samples [22].

Surprisingly, the pattern of aneurysm-related alterations in TAA patients' plasma miRNA profile does not overlap with the tissue set (Figure 1D). Moreover, the expression of six miRNAs, which were among the most strongly deregulated in TAA plasma samples, was almost absent in TAA tissue. We can speculate that miRNA expression changes in TAA patient's plasma could be evoked by a complex physiological organismal response to the aortic aneurysm development passed by circulating miRNAs that are essential vehicles for organ-to-organ cross-talk between liver, pancreas, muscle, immune and endothelial cells [38]. For instance, miR-122, the most strongly downregulated miRNA in this study, is a key factor in liver development, homeostasis and metabolic functions [39]. The downregulation of miR-122 in the liver cells correlates with hepatic pathology [40], which could be further associated with metabolic syndrome and cardiovascular diseases [41]. In blood plasma, the downregulation of miR-122 was previously associated with other cardiovascular diseases including bicuspid aortic valve, myocardial infarction and cardiac arrest [42–44]. Thus, it seems that the dysregulation of circulating miR-122, highlighted in our study, is not TAA tissue-associated directly but rather is determined by response to the TAA. Meanwhile, an altered expression of miR-483-3p was associated with endothelial cell response to vascular injury [45].

4.3. miRNA Target Analysis Reveals KLF4 As a Key Factor for the TAA Development in vivo

Using bioinformatics approach, we exposed 48 KEGG pathways enriched in genes targeted by differentially expressed miRNAs in TAA tissue cells. Functional categories annotated by KEGG displayed overlapping among target genes which were mainly associated with the immune response, cancer, and kinase activity processes. We emphasized "TGF- β signaling pathway" as individual pathways of highest importance which could be involved in TAA development (Supplementary Table S5). Indeed, about half of differentially expressed miRNAs have predicted targets in 17 genes involved in TGF- β pathway. These miRNAs could interfere with the signal transduction by affecting two principal groups of target genes - TGF- β ligands/receptors and regulatory SMADs (Figure 3C). Based on these findings, we hypothesized that the mis-expressed miRNAs could contribute significantly to critical changes in diseased aorta via alterations in components of TGF- β signaling pathway. It can lead to the functional dysregulation of the key downstream regulators, *KLF4* and/or *MyoCD*. On the other hand, the deregulated balance between TGF- β receptors, ligands and rSMADs might trigger alternative *MyoCD*-independent TGF- β signaling routes promoting further TAA development [46]. As shown in Figure 3, a group of TGF- β receptors/rSMADs-associated miRNAs was mis-regulated in TAA tissues. Previous reports revealed that deficiency of *SMAD4* and *TGFBR2* in VSMCs induced aortic dilation in TAA mice model indicating that the imbalance of TGF- β receptors and rSMADs could promote TAA progression [47,48]. On the other hand, the overexpression and over-activation of *SMAD2* was TGF- β signaling independent in TAA tissue samples suggesting a functional dissociation between the Smad2 activation and activity of the TGF- β receptors [47,49]. A signaling switch from canonical TGFBR1/Smad2-dependent to ALK1/Smad1/5/8 signaling was shown to activate genes related

to synthetic VSMC phenotype in mice model [50]. In addition, previous report indicated that the differentiation state of VSMCs is controlled by miR-26a via suppression of *TGF- β* signaling molecules [51] demonstrating a link between the dysregulated miRNA expression and aberrant *TGF- β* signaling during TAA development.

Herein we demonstrated a significant upregulation of *ALK1* mRNA expression in TAA tissue cells compared to non-TAA. The expression of *ALK1* positively correlated with the levels of miR-126-3p, miR-10a-5p and miR-148a-3p indicating a functional connection between these miRNAs and *TGF- β* signaling. A follow-up IHC analysis revealed no significant changes in *ALK1* protein level in TAA tissues. However, the discrepancy between mRNA and protein assessments could be related to insufficient sensitivity of the immunohistochemistry approach that hamper the quantification of the modest changes at the protein level. Nevertheless, the main advantage of IHC analysis compared to other methods evaluating total levels of gene expression is the feasibility to visualize precisely the protein localization in individual cells of tissue. Thereby, the number of cells strongly expressing *KLF4* factor in the nucleus was shown to be nearly three-fold higher in TAA tissues compared to non-TAA (27% vs. 10%). Meanwhile, myocardin expression level appeared to be similar, although the precise estimation of the nuclear protein is encumbered by rather high myocardin abundance in cytoplasm. Thus, our *in vivo* data indicate that upregulation of *KLF4* does not directly abrogate the myocardin expression but rather regulates VSMC phenotypic transition from more differentiated contractile to synthetic by competing with myocardin-*SRF* (serum response factor) complex for the contractile gene promoters [52]. Thus, *KLF4* is an important player in aortic aneurysm morphogenesis by regulating VSMC phenotypic switching [53]. We suggest that a marked reduction of miR-133a-3p *in vivo* could be associated with upregulated *KLF4* expression in one third of smooth muscle cells in the TAA tissues (Figure 3C). This supposition is supported by previous *in vitro* studies in rodent cell cultures [25,35] showing that VSMC phenotype switch could be regulated by miR-133a-3p via indirect repression of *KLF4*.

This study has some potential limitations: i) In order to thoroughly examine a homogenous etiological category of aneurysms, we have limited our investigation to the sporadic non-syndromic TAA cases. The samples of patients with severe atherosclerosis (calcified or ulcerating plaques), aortitis or phenotypic characteristics of the known genetic syndromes (Marfan, Ehlers Danlos, and other) were excluded, because these features can lead to skewed results. As a consequence of the abovementioned restrictions the total number of samples used in the analysis was limited. ii) Female sample size was small. A larger cohort of female specimens needs to be examined in the future to reliably corroborate sex-specific variances of miRNA signatures in TAA tissues. iii) We profiled miRNA from TAA and non-TAA samples which differed by age. However, the sequencing data was then validated by qRT-PCR performed on larger TAA and non-TAA groups of comparable age. iv) The control group included heart transplant donors, patients who underwent CABG and healthy volunteers. To diminish the impact of such diversity on the outcome of the study, a strict clinical testing was performed on the control group to confirm the normal measurements of ascending aorta.

5. Conclusions

Taken together, these observations point to a critical role of aberrant miRNAs expression in promoting TAA via imbalanced repression of *TGF- β* signaling pathway components and following deregulation of *KLF4* transcription axis *in vivo*. The miRNA-mediated gene expression regulatory networks elucidated herein in clinical samples have paved the ways to further *in vitro* studies of the miRNAs functions in controlling of VSMC phenotype switch. Moreover, co-expression analysis of selected miRNAs, *KLF4* and VSMC markers inside the cells should be performed in the future to extend our understanding of the miRNA-modulated gene activation shift during TAA development.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2077-0383/8/10/1609/s1>. Supplementary File 1. A detailed evaluation of differential miRNA-Seq data of each tissue sample assessed in the present study. Supplementary File 2. A detailed evaluation of differential miRNA-Seq data of each plasma sample assessed in the present study. Supplementary File 3. Dataset for miRNA target analysis. Supplementary Material. Supplementary methods, results, figures and tables.

Author Contributions: Conceptualization, S.G., V.S., G.V.; methodology, S.G., V.S., V.P., D.Z.; software, R.R.; validation, S.G. and V.S.; formal analysis, S.G. and V.S.; investigation, S.G., V.S., V.P., G.Z., Z.K., R.B.; data curation, S.G. and V.S.; writing—original draft preparation, V.S. and G.V.; writing—review and editing, V.L.; visualization, V.S. and V.P.; supervision, V.L. and G.V.; project administration, S.G., V.P., V.L. and G.V.; funding acquisition V.L. and G.V.

Funding: This research was funded by a grant (No. SEN-05/2016) from the Research Council of Lithuania.

Acknowledgments: We thank Dovydas Gecys for technical assistance in preparing patients' aorta tissue and blood plasma samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Kuzmik, G.A.; Sang, A.X.; Elefteriades, J.A. Natural history of thoracic aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **2012**, *56*, 565–571. [CrossRef] [PubMed]
2. Elefteriades, J.A.; Farkas, E.A. Thoracic Aortic Aneurysm Clinically Pertinent Controversies and Uncertainties. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, *55*, 841–857. [CrossRef] [PubMed]
3. Quintana, R.A.; Taylor, W.R. Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ. Res.* **2019**, *124*, 607–618. [CrossRef] [PubMed]
4. Olsson, C.; Thelin, S.; Ståhle, E.; Ekbom, A.; Granath, F. Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *Circulation* **2006**, *114*, 2611–2618. [CrossRef] [PubMed]
5. Von Allmen, R.S.; Anjum, A.; Powell, J.T. Incidence of Descending Aortic Pathology and Evaluation of the Impact of Thoracic Endovascular Aortic Repair: A Population-based Study in England and Wales from 1999 to 2010. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2013**, *45*, 154–159. [CrossRef]
6. Cheung, K.; Boodhwani, M.; Chan, K.L.; Beauchesne, L.; Dick, A.; Coutinho, T. Thoracic Aortic Aneurysm Growth: Role of Sex and Aneurysm Etiology. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, *6*, e003792. [CrossRef]
7. Nicolini, F.; Vezzani, A.; Corradi, F.; Gherli, R.; Benassi, F.; Manca, T.; Gherli, T. Gender differences in outcomes after aortic aneurysm surgery should foster further research to improve screening and prevention programmes. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2018**, *25*, 32–41. [CrossRef]
8. Owens, G.K. Regulation of Differentiation of Vascular Smooth-Muscle Cells. *Physiol. Rev.* **1995**, *75*, 487–517. [CrossRef]
9. Owens, G.K.; Kumar, M.S.; Wamhoff, B.R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 767–801. [CrossRef]
10. Wang, Z.G.; Wang, D.Z.; Pipes, G.C.T.; Olson, E.N. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7129–7134. [CrossRef]
11. Liu, Y.; Sinha, S.; McDonald, O.G.; Shang, Y.T.; Hoofnagle, M.H.; Owens, G.K. Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9719–9727. [CrossRef] [PubMed]
12. Tang, Y.F.; Yang, X.H.; Friesel, R.E.; Vary, C.P.H.; Liaw, L. Mechanisms of TGF-beta-Induced Differentiation in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Vasc. Res.* **2011**, *48*, 485–494. [CrossRef] [PubMed]
13. Chuang, J.C.; Jones, P.A. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr. Res.* **2007**, *61*, 24–29. [CrossRef] [PubMed]
14. Small, E.M.; Frost, R.J.A.; Olson, E.N. MicroRNAs Add a New Dimension to Cardiovascular Disease. *Circulation* **2010**, *121*, 1022–1032. [CrossRef]
15. Zhou, S.S.; Jin, J.P.; Wang, J.Q.; Zhang, Z.G.; Freedman, J.H.; Zheng, Y.; Cai, L. miRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 1073–1084. [CrossRef] [PubMed]
16. Song, Z.F.; Li, G.H. Role of Specific MicroRNAs in Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation and the Response to Injury. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2010**, *3*, 246–250. [CrossRef]

17. Merlet, E.; Atassi, F.; Motiani, R.K.; Mougenot, N.; Jacquet, A.; Nadaud, S.; Capiod, T.; Trebak, M.; Lompre, A.M.; Marchand, A. miR-424/322 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and neointimal formation in the rat. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *98*, 458–468. [CrossRef]
18. Dong, N.N.; Wang, W.; Tian, J.W.; Xie, Z.L.; Lv, B.; Dai, J.N.; Jiang, R.; Huang, D.; Fang, S.H.; Tian, J.T.; et al. MicroRNA-182 prevents vascular smooth muscle cell dedifferentiation via FGF9/PDGFR signaling. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 791–798. [CrossRef]
19. Jones, J.A.; Stroud, R.E.; O'Quinn, E.C.; Black, L.E.; Barth, J.L.; Eleferiades, J.A.; Bavaria, J.E.; Gorman, J.H.; Gorman, R.C.; Spinale, F.G.; et al. Selective MicroRNA Suppression in Human Thoracic Aneurysms Relationship of miR-29a to Aortic Size and Proteolytic Induction. *Circ-Cardiovasc. Genet.* **2011**, *4*, 605–613. [CrossRef]
20. Licholai, S.; Blaz, M.; Kapelak, B.; Sanak, M. Unbiased Profile of MicroRNA Expression in Ascending Aortic Aneurysm Tissue Appoints Molecular Pathways Contributing to the Pathology. *Ann. Thorac. Surg.* **2016**, *102*, 1245–1252. [CrossRef]
21. Boileau, A.; Lindsay, M.E.; Michel, J.B.; Devaux, Y. Epigenetics in Ascending Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *Aorta* **2018**, *6*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
22. Moushi, A.; Michailidou, K.; Soteriou, M.; Cariolou, M.; Bashiardes, E. MicroRNAs as possible biomarkers for screening of aortic aneurysms: A systematic review and validation study. *Biomarkers* **2018**, *23*, 253–264. [CrossRef] [PubMed]
23. Raffort, J.; Lareyre, F.; Clement, M.; Mallat, Z. Micro-RNAs in abdominal aortic aneurysms: Insights from animal models and relevance to human disease. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *110*, 165–177. [CrossRef]
24. Butkytė, S.; Čtupas, L.; Jakubauskienė, E.; Vilys, L.; Mocevicius, P.; Kanopka, A.; Vilkaitis, G. Splicing-dependent expression of microRNAs of mirtron origin in human digestive and excretory system cancer cells. *Clin. Epigenet.* **2016**, *8*, 33. [CrossRef] [PubMed]
25. Torella, D.; Iaconetti, C.; Catalucci, D.; Ellison Georgina, M.; Leone, A.; Waring Cheryl, D.; Bochicchio, A.; Vicinanza, C.; Aquila, I.; Curcio, A.; et al. MicroRNA-133 Controls Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch In Vitro and Vascular Remodeling In Vivo. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 880–893. [CrossRef] [PubMed]
26. Jonas, S.; Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 421. [CrossRef] [PubMed]
27. Huusko, T.; Salonurmi, T.; Taskinen, P.; Liinamaa, J.; Juvonen, T.; Paakko, P.; Savolainen, M.; Kakko, S. Elevated messenger RNA expression and plasma protein levels of osteopontin and matrix metalloproteinase types 2 and 9 in patients with ascending aortic aneurysms. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2013**, *145*, 1117–1123. [CrossRef]
28. Lesauskaite, V.; Tanganelli, P.; Sassi, C.; Neri, E.; Diciolla, F.; Ivanoviene, L.; Epistolato, M.C.; Lalinga, A.V.; Alessandrini, C.; Spina, D. Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: Morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Hum. Pathol.* **2001**, *32*, 1003–1011. [CrossRef]
29. Spin, J.M.; Li, D.Y.; Maegdefessel, L.; Tsao, P.S. Non-coding RNAs in aneurysmal aortopathy. *Vascul. Pharmacol.* **2018**, *114*, 110–121. [CrossRef]
30. Li, Y.H.; Maegdefessel, L. Non-coding RNA Contribution to Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysm Disease Development and Progression. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 429. [CrossRef]
31. Ruddy, J.M.; Jones, J.A.; Spinale, F.G.; Ikonomidis, J.S. Regional heterogeneity within the aorta: Relevance to aneurysm disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2008**, *136*, 1123–1130. [CrossRef] [PubMed]
32. Venkatesh, P.; Phillippi, J.; Chukkappalli, S.; Rivera-Kweh, M.; Velsko, I.; Gleason, T.; VanRyzin, P.; Aalaei-Andabili, S.H.; Ghanta, R.K.; Beaver, T.; et al. Aneurysm-Specific miR-221 and miR-146a Participates in Human Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 875. [CrossRef] [PubMed]
33. Zhang, Z.; Liang, K.; Zou, G.; Chen, X.; Shi, S.; Wang, G.; Zhang, K.; Li, K.; Zhai, S. Inhibition of miR-155 attenuates abdominal aortic aneurysm in mice by regulating macrophage-mediated inflammation. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*. [CrossRef] [PubMed]
34. Welten, S.M.J.; Goossens, E.A.C.; Quax, P.H.A.; Nossent, A.Y. The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *110*, 6–22. [CrossRef] [PubMed]
35. Deaton, R.A.; Gan, Q.; Owens, G.K. Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296*, H1027–H1037. [CrossRef] [PubMed]

36. Huang, H.R.; Xie, C.Q.; Sun, X.; Ritchie, R.P.; Zhang, J.F.; Chen, Y.E. miR-10a Contributes to Retinoid Acid-induced Smooth Muscle Cell Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 9383–9389. [CrossRef] [PubMed]
37. Sokolis, D.P.; Iliopoulos, D.C. Impaired mechanics and matrix metalloproteinases/inhibitors expression in female ascending thoracic aortic aneurysms. *J. Mech. Behav. Biomed.* **2014**, *34*, 154–164. [CrossRef]
38. Guay, C.; Regazzi, R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes Obes. Metab.* **2017**, *19*, 137–146. [CrossRef] [PubMed]
39. Hu, J.; Xu, Y.; Hao, J.; Wang, S.; Li, C.; Meng, S. MiR-122 in hepatic function and liver diseases. *Protein Cell* **2012**, *3*, 364–371. [CrossRef]
40. Bandiera, S.; Pfeffer, S.; Baumert, T.F.; Zeisel, M.B. miR-122—A key factor and therapeutic target in liver disease. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, 448–457. [CrossRef]
41. Olijhoek, J.K.; van der Graaf, Y.; Banga, J.-D.; Algra, A.; Rabelink, T.J.; Visseren, F.L. The Metabolic Syndrome is associated with advanced vascular damage in patients with coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease or abdominal aortic aneurysm. *Eur. Heart J.* **2004**, *25*, 342–348. [CrossRef] [PubMed]
42. D'Alessandra, Y.; Devanna, P.; Limana, F.; Straino, S.; Di Carlo, A.; Brambilla, P.G.; Rubino, M.; Carena, M.C.; Spazzafumo, L.; De Simone, M.; et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **2010**, *31*, 2765–2773. [CrossRef] [PubMed]
43. Devaux, Y.; Salgado-Somoza, A.; Dankiewicz, J.; Boileau, A.; Stammet, P.; Schritz, A.; Zhang, L.; Vausort, M.; Gilje, P.; Erlinge, D.; et al. Incremental Value of Circulating MiR-122-5p to Predict Outcome after Out of Hospital Cardiac Arrest. *Theranostics* **2017**, *7*, 2555–2564. [CrossRef] [PubMed]
44. Martínez-Micaelo, N.; Beltrán-Debón, R.; Baiges, I.; Faiges, M.; Alegret, J.M. Specific circulating microRNA signature of bicuspid aortic valve disease. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 76. [CrossRef] [PubMed]
45. Kraenkel, N.; Kuschnerus, K.; Briand, S.; Luescher, T.F.; Landmesser, U. miR-483 impairs endothelial homeostasis and response to vascular injury: Upregulation by high-glucose and in patients with type-2 diabetes. *Eur. Heart J.* **2013**, *34*, 762. [CrossRef]
46. Takeda, N.; Hara, H.; Fujiwara, T.; Kanaya, T.; Maemura, S.; Komuro, I. TGF- β Signaling-Related Genes and Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2125. [CrossRef]
47. Zhang, P.; Hou, S.Y.; Chen, J.C.; Zhang, J.S.; Lin, F.Y.; Ju, R.J.; Cheng, X.; Ma, X.W.; Song, Y.; Zhang, Y.Y.; et al. Smad4 Deficiency in Smooth Muscle Cells Initiates the Formation of Aortic Aneurysm. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 388–399. [CrossRef] [PubMed]
48. Li, W.; Li, Q.L.; Jiao, Y.; Qin, L.F.; Ali, R.; Zhou, J.; Ferruzzi, J.; Kim, R.W.; Geirsson, A.; Dietz, H.C.; et al. Tgfr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 755–767. [CrossRef]
49. Gomez, D.; Coyet, A.; Ollivier, V.; Jeunemaitre, X.; Jondeau, G.; Michel, J.B.; Vranckx, R. Epigenetic control of vascular smooth muscle cells in Marfan and non-Marfan thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc. Res.* **2011**, *89*, 446–456. [CrossRef]
50. Jones, J.A.; Barbour, J.R.; Stroud, R.E.; Bouges, S.; Stephens, S.L.; Spinale, F.G.; Ikonomidis, J.S. Altered Transforming Growth Factor-Beta Signaling in a Murine Model of Thoracic Aortic Aneurysm. *J. Vasc. Res.* **2008**, *45*, 457–468. [CrossRef]
51. Leeper, N.J.; Raiesdana, A.; Kojima, Y.; Chun, H.J.; Azuma, J.; Maegdefessel, L.; Kundu, R.K.; Quertermous, T.; Tsao, P.S.; Spin, J.M. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 1035–1043. [CrossRef] [PubMed]
52. Frisantiene, A.; Philippova, M.; Erne, P.; Resink, T.J. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cell. Signal.* **2018**, *52*, 48–64. [CrossRef] [PubMed]
53. Salmon, M.; Johnston, W.F.; Woo, A.; Pope, N.H.; Su, G.; Upchurch, G.R.; Owens, G.K.; Ailawadi, G. KLF4 Regulates Abdominal Aortic Aneurysm Morphology and Deletion Attenuates Aneurysm Formation. *Circulation* **2013**, *128*, S163–S174. [CrossRef] [PubMed]



Butkytė S, Čiupas L, Jakubauskienė E, Vilys L, Mocevicius P,
Kanopka A, and Vilkaitis G.

**Splicing-dependent expression of microRNAs of mirtron origin
in human digestive and excretory system cancer cells**

Clinical Epigenetics

2016, 8:33.

Copyright 2016 Springer Nature

Reproduced with permission

RESEARCH

Open Access



Splicing-dependent expression of microRNAs of mirtron origin in human digestive and excretory system cancer cells

Stasė Butkytė¹, Laurynas Čiupas¹, Eglė Jakubauskienė², Laurynas Vilys², Paulius Mocevičius³, Anydas Kanopka² and Giedrius Vilkaitis^{1*}

Abstract

Background: An abundant class of intronic microRNAs (miRNAs) undergoes atypical Drosha-independent biogenesis in which the spliceosome governs the excision of hairpin miRNA precursors, called mirtrons. Although nearly 500 splicing-dependent miRNA candidates have been recently predicted via bioinformatic analysis of human RNA-Seq datasets, only a few of them have been experimentally validated. The detailed mechanism of miRNA processing by the splicing machinery and the roles of mirtronic miRNAs in cancer are yet to be uncovered.

Methods: We experimentally examined whether biogenesis of certain miRNAs is under a splicing control by analyzing their expression levels in response to alterations in the 5'- and 3'-splice sites of a series of intron-containing minigenes carrying appropriate miRNAs. The expression levels of the miRNAs processed from mirtrons were determined by quantitative real-time PCR in five digestive tract (pancreas PANC-1, SU.86.86, T3M4, stomach KATOIII, colon HCT116) and two excretory system (kidney CaKi-1, 786-O) carcinoma cell lines as well as in pancreatic, stomach, and colorectal tumors. Transiently expressed SRSF1 and SRSF2 splicing factors were quantified by western blotting in the nuclear fractions of HCT116 cells.

Results: We found that biogenesis of the human hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p is splicing-dependent; therefore, these miRNAs can be assigned to the class of miRNAs processed by a non-canonical mirtron pathway. The expression analysis revealed a differential regulation of human mirtronic miRNAs in various cancer cell lines and tumors. In particular, hsa-miR-1229-3p is selectively upregulated in the pancreatic and stomach cancer cell lines derived from metastatic sites. Compared with the healthy controls, the expression of hsa-miR-1226-3p was significantly higher in stomach tumors but extensively downregulated in colorectal tumors. Furthermore, we provided evidence that overexpression of SRSF1 or SRSF2 can upregulate the processing of individual mirtronic miRNAs in HCT116 cells.

Conclusions: An interplay of different splicing factors, such as SRSF1 or SRSF2, may alter the levels of miRNAs of mirtron origin in a cell. Our findings underline the specific expression profiles of mirtronic miRNAs in colorectal, stomach, and pancreatic cancer.

Keywords: Mirtron, microRNA, miRNA, Post-transcriptional RNA processing, Splicing factor, Human cancer

* Correspondence: giedrius.vilkaitis@bti.vu.lt

¹Department of Biological DNA Modification, Institute of Biotechnology, Vilnius University, Vilnius, Lithuania

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Butkytė et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

All multi-exon human genes undergo constitutive and alternative splicing, a very precise process which is crucial for regulation of gene expression and generation of proteomic and functional diversity [1]. In the cell, RNA splicing takes place in the nucleus within a large macromolecular complex, the spliceosome, which consists of five small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) and over a few hundred auxiliary proteins [2]. Somatic mutations or dramatic alterations in the amount of splicing factors under pathologic conditions, particularly in human cancers, have been observed, thus resulting in abnormal expression of tumor suppressors or oncogenes [3–5]. Furthermore, various types of cancer have been linked to dysregulation of microRNAs (miRNAs), short non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression in mammals [6]. Although the majority of miRNA genes possess their own internal promoters that are regulated by different transcription and epigenetic factors, approximately one third of them are processed from introns of protein-coding or long non-coding RNAs genes [7]. That provides means for coupled regulation of miRNA maturation and mRNA splicing. However, the spatiotemporal control of miRNA expression by splicing factors has not been elucidated.

Canonical pri-miRNA is cleaved by Drosha/DGCR8 complex to form pre-miRNA hairpin, which is recognized by Exportin-5 and transferred to the cytoplasm. After processing by Dicer ribonuclease, the guide miRNA strand of mature miRNA/miRNA* duplex is incorporated into a RNA-induced silencing complex (RISC). An alternative pathway of miRNA biogenesis was lately described in eukaryotes [8, 9]. Short introns containing miRNAs, termed mirtrons, are spliced and debranched into pre-miRNA hairpin mimics that appear to bypass Drosha cleavage (Additional file 1: Figure S1). Debranched mirtrons enter the canonical miRNA pathway during nuclear export. Mirtrons were originally described in flies and worms [10, 11], but similar loci (i.e., short hairpin introns associated with small RNA reads extending to intronic termini) were later predicted in a range of plants and mammals, including humans [12–14]. Based on the nature of terminal overhangs, four distinct mirtron subtypes are recognized: conventional (hairpin without tails), 3'-tailed, 5'-tailed, and two-tailed [14].

Despite the fact that the first splicing-dependent human mirtrons were annotated in 2007 [15] and a large number of splicing-derived miRNAs have been predicted by bioinformatic analysis of deep sequencing data [12, 14], only two of them, hsa-miR-877-5p and hsa-miR-1226-3p, were experimentally proven to be directly affected by splicing [16, 17]. 478 mirtron candidates predicted by Wen et al. [14] could cover a significant part of the total human miRNA population (2588 mature miRNA entries according to miRBase release 21 [18]), but little is still known

about their impact on the expression of disease-related genes. It is currently shown that the mirtronic miRNA hsa-miR-1226-3p may function as an oncosuppressor by downregulating the mucin 1 oncoprotein and the hsa-miR-1226-3p level is decreased in breast cancer cells [19]. hsa-miR-1236-3p processed from a putative mirtron downregulates alpha fetoprotein, thus leading to the inhibition of the PI3K/Akt pathway in hepatoma cancer cell lines [20], and negatively regulates the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-3 during inflammatory lymphangiogenesis [21]. In addition, a miR-1236-3p antisense oligonucleotide inhibits the glioma tumor cell growth and proliferation [22]. Overexpression of hsa-miR-877-5p was observed in metastatic melanoma [23] and endometrial serous adenocarcinomas [24], but no biological function was determined. Yet, very little is known about the expression profiles of mirtron-derived miRNAs in tumors or cancer cells. There is a high possibility that the expression levels of splicing factors can not only affect alternative pre-mRNA splicing but cause changes in mirtronic miRNA expression as well.

In this study, we examined eight putative mirtrons and provided experimental evidence that human hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p could be assigned to the class of mirtronic miRNAs. Digestive and excretory system cancer cell lines, as well as digestive system tumors tissues, display varying expression profiles of the previously identified hsa-miR-1226-3p and the two newly validated mirtronic miRNAs. Finally, we found that overexpression of well-known splicing factors SRSF1 and SRSF2 increased the abundance of some mirtron-derived miRNAs in colorectal HCT116 cancer cells.

Results

Experimental validation of new splicing-dependent human mirtronic miRNAs

The vast majority of nearly 500 mirtron-derived miRNA candidates, except hsa-miR-887 and hsa-miR-1226-3p processed from conventional mirtrons, are still listed as experimentally unverified [14, 16, 17]. In order to expand the number of comprehensively validated miRNAs of mirtron origin, we examined eight putative human mirtrons ascribed to three different subtypes (Additional file 1: Figure S2). Putative human conventional mirtron-derived hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, hsa-miR-1236-3p, and hsa-miR-1238-3p [15] and 3'-tailed mirtron-derived hsa-miR-3940-5p and hsa-miR-6850-5p were identified in short 69–102 nucleotide introns, whereas hsa-miR-3064-5p and hsa-miR-6515-5p were processed from both long (1236 nt) and short (88 nt) 5'-tailed mirtrons [12]. To establish dependence of their biogenesis on mRNA splicing, we constructed plasmids harboring minigenes of two or one intron spanned by

three and two coding exons, respectively (Fig. 1a). Wild-type (WT) minigenes encompassed the natural introns while MUT variants of minigenes contained the intron, which hosted miRNA, with mutations affecting the G residues at 5' splice donor (GU changed to CU) and 3' splice acceptor (AG changed to AC) sites. A plasmid with the MG1226/DHX30 minigene containing the functionally

proven mirtronic hsa-miR-1226-3p [16] was used as a positive control. As shown in Fig. 1b, the introns are effectively excised in the majority of the analyzed mRNAs processed from plasmids with WT minigenes in colorectal carcinoma HCT116 cells. In contrast, mRNAs from the MUT variants retained the unspliced exon–intron–exon structure. No reverse transcription (RT)-PCR products

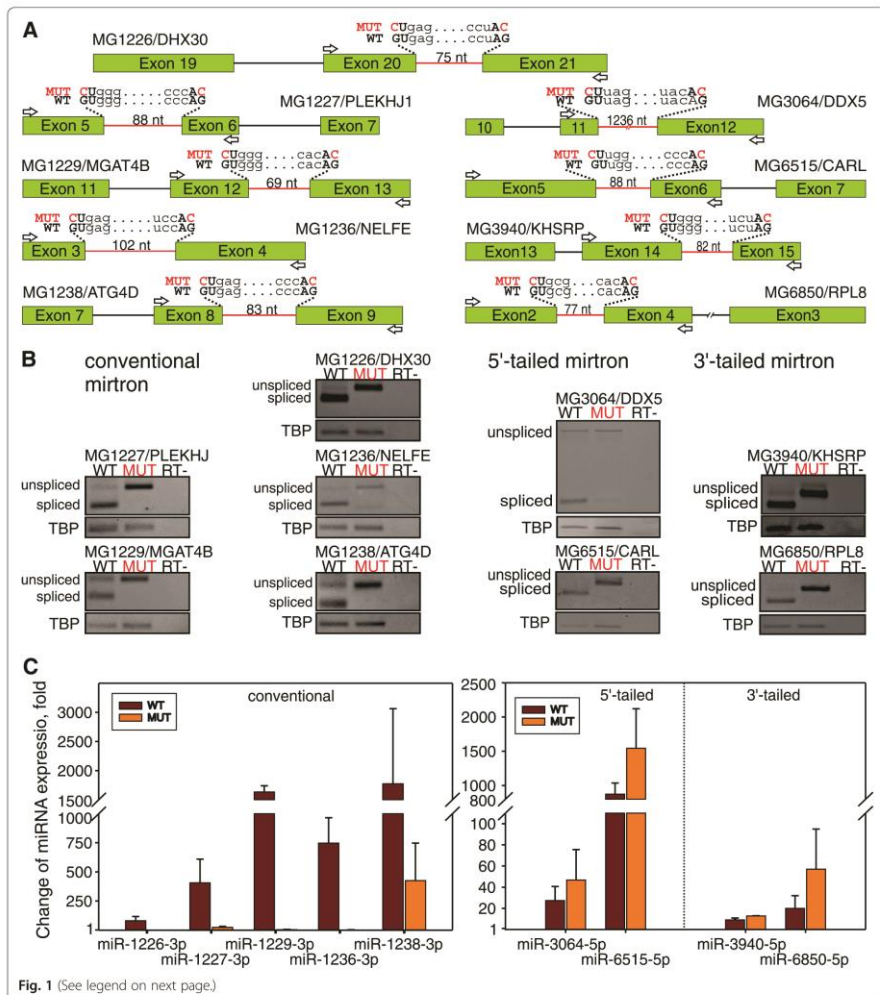


Fig. 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 1 Identification of splicing-dependent miRNAs processed from mirtrons. **a** Schematic representation of exon–intron structures of analyzed human minigenes. Boxes and lines indicate exons and introns, respectively, introns containing validated mirtronic miRNA hsa-miR-1226-3p or predicted miRNAs hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, hsa-miR-1236-3p, and hsa-miR-1238-3p processed from conventional; hsa-miR-3064-5p and hsa-miR-6515-5p from 5'-tailed; and hsa-miR-3940-5p and hsa-miR-6850-5p from 3'-tailed mirtrons are depicted as red lines. WT, wild-type sequences, and MUT, minigenes carrying the double mutant with GT to CT and AG to AC changes (affected nucleotides are marked in red), in 5'-donor and 3'-acceptor splice sites, respectively. **b** Splicing analysis of minigene transcripts in transfected HCT116 cells. The position of oligonucleotides used for RT-PCR analysis of miRNA transcripts produced by minigene constructs is indicated by white arrows in section a. Control reactions, RT, were performed without prior reverse transcription to exclude DNA contamination. Unspliced form indicates transcript retaining intronic intron; spliced, intron is excised. TBP — loading control. **c** miRNA expression in colorectal cancer HCT116 cell line transfected with native (WT) or splicing-deficient (MUT) minigenes was analyzed using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Expression level of RNU48 was used as endogenous reference for data normalization. The experiments were performed in at least three biological replicates. The error bars represent calculated values for standard deviation

were detected in the control samples obtained from cells transfected with an insert-less vector (data not shown) under similar reaction conditions, confirming that the majority of target mRNAs in cells were synthesized from the analyzed minigenes.

Simultaneous quantitation of individual miRNAs by real-time qPCR analysis revealed a 10–2000-fold enrichment of all tested intronic miRNAs when a plasmid with the WT minigene structure was transfected into the HCT116 cell line (Table 1 and Fig. 1c, brown bars). These results provide convincing evidence that the tested intronic regions generate specific miRNAs. A different outcome was observed for miRNA formation in cells transfected with the splicing-deficient MUT minigenes (Fig. 1c, orange bars). The expression levels of hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p dramatically decreased and comprised less than 5 % of the levels observed for the WT minigenes (Table 1). These results convincingly confirmed that the biogenesis of hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-

miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p is strictly splicing-dependent, thus the efficiency of the splicing machinery defines the quantity of these miRNAs. The hsa-miR-1238-3p expression level in the cell lines containing the intron excision-deficient MUT variant of minigene was more than 400-fold higher as compared to that in cells lacking the minigene. Different results were obtained with 5'- and 3'-tailed mirtrons, where disruption of the splicing sites did not inhibit the accumulation of hsa-miR-3064-5p, hsa-miR-6515-5p, hsa-miR-3940-5p, and hsa-miR-6850-5p (Fig. 1). Due to the observed splicing-independent maturation, these miRNAs cannot be considered *bona fide* mirtronic miRNAs.

Differential expression of miRNAs processed from conventional mirtrons in cancer cell lines

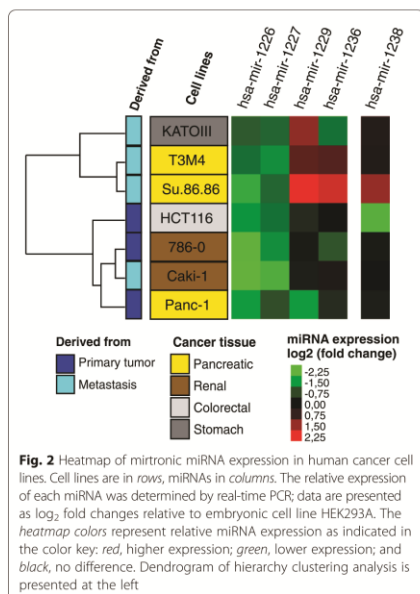
While a role of canonical Drosha/DGCR8-dependent miRNAs in human diseases is well recognized, there is much to be learned about the implications of mirtronic miRNAs in cancer development and their possible diagnostic potential. Carcinoma cell lines derived from various digestive system organs (pancreas PANC-1, SU.86.86, T3M4, stomach KATOIII, colon HCT116) or the excretory system (kidney CaKi-1, 786-O) were chosen to define whether the expression of the human mirtronic miRNAs hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p and canonical hsa-miR-1238-3p varies between the cancerous cells. The human embryonic kidney HEK 293A cells were used as a reference cell line to which the other cell lines were compared. The results are summarized in Fig. 2, Table 2, and Additional file 1: Figure S3.

The expression pattern of the tested mirtron-derived miRNAs revealed a unique miRNA signature of individual cancer cell lines (Fig. 2). The abundance of two of them, hsa-miR-1226-3p and hsa-miR-1227-3p, was reduced two- to five-fold in all cancer cell lines relative to the embryonic kidney HEK 293A cells. The highest downregulation was observed in the kidney carcinoma CaKi-1 and 786-O cells. In contrast, hsa-miR-1229-3p and hsa-miR-1236-3p showed significant variations

Table 1 Alterations of miRNA expression level in cells transfected with native (WT) or splicing-deficient (MUT) minigenes

MicroRNA	WT minigene line ^a	MUT minigene line ^a	MUT/WT, %
Hosted on conventional mirtron			
hsa-miR-1226-3p	81 ± 36	1.5 ± 0.3	1.9
hsa-miR-1227-3p	405 ± 204	24 ± 8	5.9
hsa-miR-1229-3p	1633 ± 106	4.1 ± 2.1	0.3
hsa-miR-1236-3p	747 ± 217	2.6 ± 0.5	0.3
hsa-miR-1238-3p	1772 ± 1289	425 ± 322	24
Hosted on 5'-tailed mirtron			
hsa-miR-3064-5p	27 ± 13	47 ± 29	173
hsa-miR-6515-5p	875 ± 162	1541 ± 576	176
Hosted on 3'-tailed mirtron			
hsa-miR-3940-5p	9.1 ± 1.7	13 ± 0.3	141
hsa-miR-6850-3p	20 ± 12	57 ± 38	286

^aFold change



among cancer cell lines and have a potential to be exploited for profiling specific cancer cell types. Correlations were found between the hsa-miR-1229-3p expression pattern and tissue origin — a steep increase in the mirtronic miRNA abundance was detected in three lines (SU.86.86, T3M4, and KATOIII) derived from metastatic sites as opposed to those derived from primary tumors. In particular, the PANC-1 cells (established from pancreatic carcinoma of ductal origin) showed a 14-fold reduction of this mirtronic miRNA as compared to the SU.86.86 cells

(derived from pancreatic ductal carcinoma metastatic site in the liver). Moreover, hierarchical clustering based on relative expression variations for mirtronic miRNAs identified the majority of the cell lines derived from metastatic sites as a unique group (Fig. 2). However, further studies are required to ascertain whether hsa-miR-1229-3p is selectively upregulated in metastatic tumor tissues.

The levels of canonical hsa-miR-1238-3p expression in the majority of cancer cells, with the exception of SU.86.86 and HCT116, were similar to embryonic HEK 293A cells.

Expression profiling of mirtronic miRNAs in pancreatic, colorectal, and stomach tumors

To further explore the impact of mirtronic miRNAs on human cancer development, we analyzed whether mirtron-derived miRNAs are differentially expressed in digestive system tumors (pancreatic, colorectal, and stomach) as compared to normal solid tissue samples of the same organ.

The tissue analysis results revealed that tumors of different organs have a characteristic signature of mirtronic miRNA expression (Fig. 3 and Table 3). We found that only one out of five tested miRNAs, hsa-miR-1226-3p, was significantly under-expressed in the colorectal tumor ($p < 0.001$). Conversely, the expression level of this miRNA was profoundly elevated in stomach cancer compared to that in non-tumor tissues ($p < 0.001$). Whereas steady levels of hsa-miR-1226-3p were detected in pancreatic cancer and healthy pancreatic tissues, two other mirtronic miRNAs, hsa-miR-1227-3p ($p = 0.028$) and hsa-miR-1236-3p ($p = 0.017$), were significantly downregulated in this tumor type. Thus, different expression profiles of mirtronic miRNAs were observed not only in cancerous cell lines but also in digestive organ tumors.

Effect of splicing factors SRSF1 and SRSF2 on biogenesis of mirtronic miRNAs

Despite a considerable progress in the study of biogenesis of mirtron-derived miRNAs, the factors responsible for

Table 2 Differential expression of mirtronic miRNAs in pancreas, kidney, colon, and stomach cancer cell lines

Organ	Cell line	miRNAs of mirtron origin				Non-mirtronic miRNA miR-1238-3p
		miR-1226-3p	miR-1227-3p	miR-1229-3p	miR-1236-3p	
Pancreas	PANC-1	-2.8 ± 1.8 ^a	-1.7 ± 0.3 ^a	-2.8 ± 0.9 ^a	-1.4 ± 0.2	-1.2 ± 0.6
	SU.86.86	-3.4 ± 0.9 ^a	-2.1 ± 0.4 ^a	+5.0 ± 2.7 ^b	+3.8 ± 0.6 ^b	+2.8 ± 0.9 ^b
	T3M4	-2.2 ± 0.4 ^a	-2.6 ± 0.4 ^a	+2.1 ± 0.3 ^b	+1.9 ± 0.4 ^b	+1.3 ± 0.2
Kidney	CaKi-1	-4.9 ± 2.1 ^a	-3.9 ± 1.6 ^a	-1.2 ± 0.6	+1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.8
	786-0	-4.6 ± 2.2 ^a	-2.6 ± 0.7 ^a	-1.1 ± 0.2	-1.8 ± 0.2 ^a	-1.1 ± 0.2
Colon	HCT116	-2.7 ± 0.8 ^a	-2.2 ± 0.8 ^a	-1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.7	-4.2 ± 0.3 ^a
Stomach	KATOIII	-1.9 ± 0.3 ^a	-2.0 ± 0.4 ^a	+2.7 ± 0.3 ^b	-2.2 ± 0.3 ^a	+1.3 ± 0.0

Fold changes higher than 1.5 were statistically significant ($p < 0.05$)

^aReduced expression compared to the non-cancerous HEK 293A cells

^bEnhanced expression

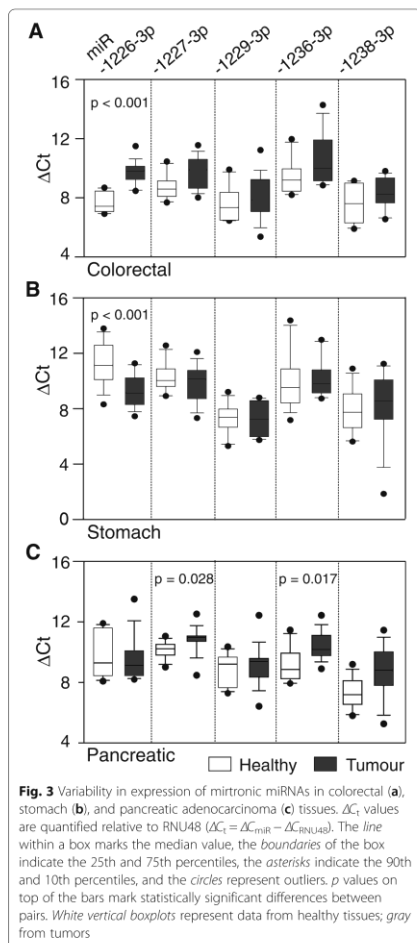


Fig. 3 Variability in expression of mirtronic miRNAs in colorectal (a), stomach (b), and pancreatic adenocarcinoma (c) tissues. ΔC_t values are quantified relative to RNU48 ($\Delta C_t = \Delta C_{t\text{miR}} - \Delta C_{t\text{RNU48}}$). The line within a box marks the median value, the boundaries of the box indicate the 25th and 75th percentiles, the asterisks indicate the 90th and 10th percentiles, and the circles represent outliers. *p* values on top of the bars mark statistically significant differences between pairs. White vertical boxplots represent data from healthy tissues; gray from tumors

mirtronic intron splicing are not known. Commonly, the efficiency of the macromolecular spliceosome complex is controlled by associated protein cofactors called splicing factors (SFs). However, it is not known whether the splicing proteins directly affect the biogenesis of mirtronic miRNAs in human cells. To evaluate the regulatory function of specific SF in maturation of mirtron-derived miRNAs, we overexpressed two essential sequence-specific SFs of serine-arginine-rich (SR) protein family, SRSF1 (also known as SF2/ASF) and the SRSF2 (also known as SC35), in human HCT116 cells and measured cellular levels of three splicing-dependent miRNAs, hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-1227-3p, and hsa-miR-1229-3p. These prototypical SR proteins play an important role in the regulation of both constitutive and alternative pre-mRNA splicing [25]. In addition, SRSF1 is also involved in pri-miRNA processing [26].

Western-blot analysis revealed a 3.2- and 1.6-fold increase in SRSF1 and SRSF2 protein yield in the nuclear extracts, respectively, after transfection of human HCT116 cells with the pSRSF1 or pSRSF2 constructs (Fig. 4a). Since the RNA splicing occurs within the nucleus, it is plausible that only biologically active intranuclear fractions of cellular SF were quantified in our experiments. Concomitant evaluation of the miRNA expression levels by RT-qPCR showed a statistically significant increase of hsa-miR-1229-3p but not hsa-miR-1226-3p or hsa-miR-1227-3p in response to SRSF1 overexpression (Fig. 4b, the diagram at the left, and Table 4). Whereas a significant upregulation of SRSF2-dependent expression was observed for hsa-miR-1227-3p ($p = 0.008$) and miR-1229-3p ($p = 0.008$), the hsa-miR-1226-3p did not exhibit statistically different ($p = 0.15$) expression levels between the HCT116 line and the line overexpressing the SRSF2 SF (Fig. 4b, the diagram at the right). A bioinformatic analysis of the splicing signals using the Human Splicing Finder online tool [27] identified putative consensus motifs typical for SRSF1 and SRSF2 in exons proximal to hsa-miR1227- and hsa-miR1229-containing introns, respectively (Additional file 1: Figure S3). These findings are in agreement with the observation that the overexpression of SRSF1 had the largest impact on the expression of hsa-miR-1229-3p, whereas SRSF2 on hsa-miR-1227-3p. SRSF1-specific and SRSF2-specific enhancers established nearby hsa-miR-1226-3p may point to the presence of a complex

Table 3 Expression of mirtronic miRNAs in colorectal, stomach, and pancreatic cancerous tissues compared to healthy tissues

Cancerous tissue	miRNAs of mirtron origin				Non-mirtronic miRNA
	miR-1226-3p	miR-1227-3p	miR-1229-3p	miR-1236-3p	miR-1238-3p
Colorectal	-	No change	No change	No change	No change
Stomach	+	No change	No change	No change	No change
Pancreatic	No change	-	No change	-	No change

Data were considered significant for $p < 0.05$

- reduced expression compared to the non-cancerous tissue, + increased expression

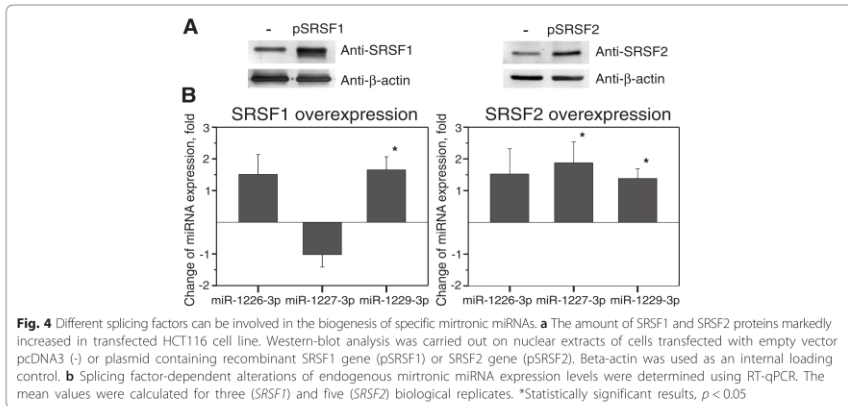


Fig. 4 Different splicing factors can be involved in the biogenesis of specific mirtronic miRNAs. **a** The amount of SRSF1 and SRSF2 proteins markedly increased in transfected HCT116 cell line. Western-blot analysis was carried out on nuclear extracts of cells transfected with empty vector pCDNA3 (-) or plasmid containing recombinant SRSF1 gene (pSRSF1) or SRSF2 gene (pSRSF2). Beta-actin was used as an internal loading control. **b** Splicing factor-dependent alterations of endogenous mirtronic miRNA expression levels were determined using RT-qPCR. The mean values were calculated for three (SRSF1) and five (SRSF2) biological replicates. *Statistically significant results, $p < 0.05$

regulatory element with overlapping enhancer and silencer functions causing uneven expression levels of this miRNA in different biological repeats and high p values.

Overall, our results lead to a conclusion that altered expression of a particular SF may affect the levels of mirtronic miRNAs in the cell.

Discussion

To date, nearly 500 human miRNA-containing mirtrons have been predicted by bioinformatic analysis of deep sequencing data [14]. Nevertheless, their dependence on splicing was experimentally validated only for two human miRNAs located in conventional mirtrons, hsa-miR-877-5p and hsa-miR-1226-3p [16, 17]. Moreover, there is no convincing evidence for the participation of splicing machinery in biogenesis of miRNAs processed from 5'-tailed mirtrons, the most abundant subtype accounting for 86 % of all predicted mirtrons [14]. Likewise, for 3'-tailed mirtronic miRNAs, the splicing dependency was determined only in *Drosophila* [28]. Therefore, direct experimental evidence is necessary to confirm assignment of miRNAs to the mirtron pathway. In the present study, we experimentally proved that hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p derived from conventional mirtrons are processed by the splicing machinery. Meanwhile,

splicing was not strictly required for the maturation of hsa-miR-1238-3p, previously annotated as mirtron-encoded miRNA [12, 15]. Indeed, Wen et al. recently reclassified the hsa-mir-1238 mirtron in miRBase based on more stringent bioinformatic criteria applied for mirtron evaluation [14]. Despite successful experimental validation of mirtronic miRNAs derived from conventional mirtrons, analysis of the annotated 5'-tailed mirtrons containing hsa-miR-3064-5p and hsa-miR-6515-5p or 3'-tailed mirtrons with hsa-miR-3940-5p and hsa-miR-6850-5p revealed no splicing requirement for the biogenesis of the intron-derived miRNAs. Thus, it is still an open question whether 5'- or 3'-tailed mirtrons actually exist in mammals. Overall, five out of nine tested human mirtrons generate miRNA irrespective of splicing. Similarly, several groups reported that only two of three [29] and two of four [16] predicted mirtronic miRNA candidates mature via a mirtron biogenesis pathway. These observations highlight the relevance of experimental validation of predicted mirtrons.

Mirtron-encoded miRNAs were predominantly found to occur in young, recently emerged genes [30]. Despite their relatively short evolution, the newly evolved miRNAs are incorporated into beneficial regulatory networks [31]. Babiarz et al. suggested that mirtronic miRNAs play

Table 4 Change of mirtronic miRNA expression levels in response to the overexpression of splicing factors

Overexpressed splicing factor	Change of mirtronic miRNA expression levels, folds (p value)		
	miR-1226	miR-1227	miR-1229
SRSF1 (3.2 ± 0.6-fold)	1.5 ± 0.6 ($p = 0.23$)	-1.1 ± 0.4 ($p = 0.47$)	1.7 ± 0.4 ^a ($p = 0.05$)
SRSF2 (1.6 ± 0.5-fold)	1.5 ± 0.8 ($p = 0.15$)	1.9 ± 0.7* ($p = 0.008$)	1.4 ± 0.3 ^a ($p = 0.008$)

A significance level of 0.05 was applied as a cutoff value
*Statistically significant results

important functional roles in post-mitotic neurons in the mammalian brain [32]; however, very little is known about their expression in cancerous cells. In this study, cell line-specific profiles of miRNAs processed from conventional mirtrons, hsa-miR-1226-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p, in seven various pancreatic, kidney, colorectal, and stomach cancer cell lines were identified (Table 2). The miRNA variability in cancer cell lines was determined by changes in abundance of two mirtronic miRNAs, hsa-miR-1229-3p and hsa-miR-1236-3p, while the expression levels of hsa-miR-1226-3p and hsa-miR-1227-3p declined in all tested cancer cell lines compared to those in HEK 293A. Remarkably, hsa-miR-1229-3p is upregulated in cell lines derived from metastatic sites and downregulated in primary tumor lines. However, further studies are required to assess whether miR-1229-3p is associated with the metastatic potential of human tumors.

To further increase the predictive value for clinical applications, we extended studies of these mirtronic miRNAs to a number of primary pancreatic, colorectal, stomach cancerous and healthy tissues (Fig. 3). We presume that analysis of non-paired cohorts of tumoral and non-tumoral samples allows a better estimation of miRNA expression changes, since healthy tissues are certainly not affected by cancerogenesis. Three mirtron-derived miRNAs showed organ-specific profiles in cancerous tissues of the digestive system. T3 stage pancreatic tumors exhibited a decline of the hsa-miR-1227-3p and hsa-miR-1236-3p expression. The levels of hsa-miR-1226-3p decreased in the T3 stage colorectal but conversely increased in the stomach cancer tissues. Remarkably, hsa-miR-1229-3p, which was upregulated in the metastatic site-derived cell lines, exhibited no expression change in the primary tumors. Previous studies demonstrated that cellular levels of hsa-miR-1226-3p and hsa-miR-1236-3p inversely correlate with cancerogenesis in breast and hepatoma cancer cells, respectively [20, 33]. Taken together, these results suggest that dysregulation of conventional mirtronic miRNAs could lead to the initiation and progression of specific human cancers. Moreover, the development of new medical applications can be based on artificial mirtron-mediated gene silencing platforms. As promising and affordable tools, they surpass conventional RNA interference (RNAi) approaches and allow to consolidate the high therapeutic potential of RNAi and protein-coding genes in specific cell types [34–36]. For example, hsa-miR-1226-3p processed from an artificial conventional mirtron effectively silences aberrant myotonic dystrophy protein kinase [35], mmu-miR-1224 leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2, and α -synuclein Parkinson disease-associated genes [36], while an artificial 3'-tailed mirtron knocks down the expression of the vascular endothelial growth factor A [34].

It is known from previous studies that canonical miRNA biogenesis and splicing mechanisms are directly coupled [37]. The binding of splicing regulatory proteins SRSF1 and hnRNP1 to the stem loop of pri-miR-7 and pri-miR-18a, respectively, appears to affect Drosha processing of primary miRNA transcripts [26, 33]. Similarly, KHSPR promotes the maturation of a subset of miRNA precursors, such as pre-let-7a, pre-mir-1, and pre-mir-15 [38]. Consequently, SFs regulate both splicing and canonical miRNA processing, but little is known about their function in the biogenesis of miRNAs hosted on mirtrons. It has been only observed in patients with myelodysplastic syndrome that SF3B1 and SRSF2 mutations are associated with a downregulated expression of miRNAs derived from the putative 5'-tailed mirtrons hsa-miR-3605-5p and hsa-miR-4728-5p, respectively [5].

Our results revealed that increased nuclear levels of SRSF1 in tested HCT116 cells significantly enhanced the hsa-miR-1229-3p expression, while upregulated SRSF2 increased the abundance of the mirtronic miRNAs hsa-miR-1227-3p and hsa-miR-1229-3p. To our knowledge, these data, for the first time, demonstrate that an individual SF can directly act as a positive regulator for particular species of mirtronic miRNAs.

To gain insight into the regulation of mirtronic miRNA by components of splicing machinery, we correlated the mirtronic miRNA levels with the expression profiles of five SFs in different human digestive and excretory system cell lines or pancreatic, colorectal, and stomach tissues. It should be noted that RNA (this paper) and proteins [39] were purified simultaneously from the same tissue or cell line samples. The experiments revealed a reduced expression of SRSF1 and SRSF2 in pancreatic, kidney, colorectal, and stomach cancer cell lines as well as in cancer tissues — SRSF2 was downregulated in stomach tumors, while SRSF1 was reduced in all types of tested tumors [39]. Accordingly, tumor-promoting roles of SRSF1 and SRSF2 have been reported in various cancer types [40, 41]. Still, reduced expression of SRSF1 and SRSF2 proteins in the cancer cells [39] weakly correlated with signature of mirtronic miRNA expression (Tables 2 and 3). For example, no obvious differences in abundance of hsa-miR-1229-3p were seen among samples collected from the pancreas, colon, or stomach, notwithstanding a ~14-fold under-expression of SRSF1 and a sevenfold of SRSF2 in the colorectal and stomach cancerous tissues. At a first glance, these results seem to contradict the finding that these SFs positively modulate the levels of mirtronic miRNAs under overexpression conditions in the model cell line HCT116 (Fig. 4). However, first, a dual role for SRSF1 as a splicing activator and repressor was proposed [42]. Second, the expression of other factors involved in the regulation of splicing, U2AF35, U2AF65,

and KHSRP, also significantly varied among cell lines and tumors [39]. In addition, the spliceosome mutations may affect the expression of miRNA genes [5]. Thus, biogenesis of mirtronic miRNAs could be regulated by different SFs or by a network of antagonistic and collaborative interactions of spliceosome components. In general, our data imply that a combination of multiple SFs may differently affect the biogenesis of mirtron-derived miRNAs, making it extremely difficult to predict particular effects of individual spliceosome components on the mirtron processing.

Conclusions

In this study, we experimentally validated three novel splicing-dependent miRNAs processed from mirtrons, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1236-3p. The expression analysis, for the first time, identified specific profiles of mirtronic miRNAs in cancerous cells and tumors suggesting their potential for exploiting as diagnostic tools. Finally, we demonstrated that the SRSF1 and SRSF2 SFs contribute to the biogenesis of mirtronic hsa-miR-1227-3p and hsa-miR-1229-3p.

Methods

Human cell cultures

HEK 293A (embryonic kidney), PANC-1 (pancreas/duct, epithelioid carcinoma), SU.86.86 (pancreas, ductal carcinoma; derived from a metastatic site: liver), T3M4 (pancreas, ductal carcinoma; metastasis), CaKi-1 (kidney, clear cell carcinoma, derived from a metastatic site: skin), 786-O (kidney, renal cell adenocarcinoma), HCT116 (colon, colorectal carcinoma), and KATOIII (stomach, gastric carcinoma; derived from a metastatic site: pleural effusion and supraclavicular and axillary lymph nodes and Douglas cul-de-sac) cells were cultured in the RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum and penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml).

Tumors and healthy tissues

Collection of surgically removed tumor and healthy tissue samples was described previously [39]. In total 29 healthy (8 pancreatic, 6 colorectal, 15 stomach) and 37 tumor (12 pancreatic, 12 colorectal, 13 stomach) tissues were used for the experiments. The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject, and the study conforms to The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Construction of plasmids

Minigene constructs of 1226/DHX30 (from exon 19 to exon 21; mirtronic intron 20), 1227/PLEKHJ1 (exons 5 to 7; mirtronic intron 5), 1229/MGAT4B (exons 11 to 13; mirtronic intron 12), 1236/NELFE (exons 3 to 4; mirtronic

intron 3), 1238/ATG4D (exons 7 to 9; mirtronic intron 8), 3064/DDX5 (exons 10 to 12, mirtronic intron 11), 3940/KHSRP (exons 13 to 15, mirtronic intron 14), 6515/CARL (exons 5 to 7, mirtronic intron 5), and 6850/RPL8 (exons 2 to 4, mirtronic intron 2) were amplified from human Jurkat cell genomic DNA (ThermoFisher Scientific) using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. PCR products were digested with BamHI and HindIII restriction endonucleases, except 3940/KHSRP, 6515/CARL (digested with HindIII and EcoRI), and 6850/RPL8 (EcoRI and NotI), and inserted into pcDNA3 plasmid. PCR introduced 5' and 3' splice site mutations by using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase with primers containing splicing site mutations (Additional file 2: Table S2). Amplification products were circularized using T4 DNA ligase (all enzymes were obtained from ThermoFisher Scientific). All final plasmid constructs were confirmed by Sanger sequencing.

The expression plasmids pSRSF1 and pSRSF2 were constructed by insertion of SRSF1 isoform 1 and SRSF2-coding DNA sequence into the pcDNA3 vector, respectively. Total RNA, extracted from HCT116 cells, was converted to complementary DNA (cDNA) using ReverT-Aid RT kit (ThermoFisher Scientific). The CDS of genes were PCR-amplified using primers containing HindIII and BamHI sites (Additional file 2: Table S1), digested with appropriate restriction enzymes and the resulting fragments ligated into pcDNA3. Clones were confirmed by DNA sequence analysis.

Transfection

HCT116 cells were cultured in RPMI 1640 media. Transient transfections were performed using Lipofectamine LTX transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For overexpression assay, HCT116 cells were seeded in 60-mm plates and allowed to grow for 24 h prior to transfection with pcDNA3-SRSF1, pcDNA3-SRSF2, pcDNA3-DHX30, pcDNA3-PLEKHJ1, pcDNA3-MGAT4B, pcDNA3-NELFE, pcDNA3-ATG4D, pcDNA3-DDX5, pcDNA3-KHSRP, pcDNA3-CARL, or pcDNA3-RPL8 constructs. A pcDNA3 vector was transfected to be used as a RT-qPCR reference. RNAs and proteins were isolated after 48 h. The experiments were independently repeated three times.

RNA isolation

RNA from cell lines was isolated using an RNeasy[®] RT reagent according to the manufacturer's instructions (Molecular Research Center). Native proteins for SF studies by Jakubauskienė et al. [39] and total RNA used for the miRNA analysis (present paper) from tumors and healthy tissues were purified from the same sample using mirVana[™] PARIS[™] kit (ThermoFisher Scientific).

according to the manufacturer's instructions. Fraction of short RNAs (<200 nt) was used for miRNA RT and qPCR experiments. The integrity of long RNAs (>200 nt) was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer or agarose (1 %) gel electrophoresis. To avoid DNA contamination before RT reaction, the RNA samples were treated with DNase I (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Real-time RT-PCR of miRNAs

Each 20 μ l of the RT reaction in the RT buffer contained 200 units of RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), 1 mM dNTP (ThermoFisher Scientific), 1 μ M RT primer mixture (Metabion), 16 units of RNase inhibitor RiboLock (ThermoFisher Scientific), and 200 ng of RNA. The mixture was incubated for 20 min at 25 °C and for 60 min at 37 °C and then heat-inactivated for 10 min at 70 °C. Real-time PCR was performed with SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) (35 cycles): initial denaturation for 10 min at 95 °C, followed by three cycles of amplification 15 s at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 30 s at 60 °C, then 32 cycles 10 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. Relative quantification of changes in the miRNA expression levels was performed using the comparative C_t (threshold cycle) method with normalization to the expression of endogenous control RNU48. Specific miRNA and RNU48 primers are provided in Additional file 2: Table S3. The RT primer mixture was composed of two primers: specific miRNA and RNU48. Quantitative PCR analysis was carried out on Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) equipment. Part of RT-PCR products were inserted into pUC19 plasmid, and constructs were confirmed by sequence analysis.

Detection of spliced and unspliced forms of mRNA

Spliced and unspliced DHX30, PLEKHJ1, MGAT4B, NELFE, ATG4D, DDX5, KHSRP, CARL, and RPL8 mRNA isoforms were detected by RT-PCR. cDNA synthesis was carried out using RevertAid Reverse Transcriptase and random hexamer primers according to the manufacturer's (ThermoFisher Scientific) instructions. PCR was carried out using TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Amplification products were separated on 1 % agarose gel. TBP was used as loading control. Sequences of primers specific for the outer exons of mirtronic introns are provided in Additional file 2: Table S4.

Protein preparation from cell cultures and western blotting

The nuclear fractions of proteins for western blotting were prepared from cell cultures using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Proteins were separated on a 10 % SDS–polyacrylamide gel and transferred onto the membrane. The membrane was incubated with appropriate primary antibody: anti-SRSF1 (Santa Cruz), anti-SRSF2 (Abcam), or anti- β -actin (Abcam), and washed and incubated with secondary antibody (Dako). The membrane was developed using TMB reagent (Sigma-Aldrich). All data were quantitated using MultiGauge software (Fujifilm). β -Actin expression was used for data normalization.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Sigma Plot software v. 11. Two-tailed unpaired Student's *t* test and Mann-Whitney rank sum test were used to compare the differences in distribution between experimental results. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Splicing-dependent and Drosha-independent biogenesis of mirtronic miRNAs. The spliceosome, a multi-component ribonucleoprotein complex, cuts out the introns from pre-miRNA transcripts and splices together the exons resulting in the maturation of messenger RNA. Lariat of the introns are debranched by lariat debranching enzyme. The produced structures fold into pre-miRNA hairpins that are exported to the cytoplasm. After the cleavage by Dicer, the guide miRNA strand of mature miRNA/miRNA* duplex is loaded into functional Ago complex. **Figure S2.** Schematic representation of human genes containing mirtronic miRNAs. Schemes represent protein-coding genes, harboring residue-verified mirtronic miRNA hsa-miR-1226-3p, putative conventional mirtronic miRNAs hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-1229-3p, and hsa-miR-1238-3p, mirtronic miRNAs, located in 5'-tailed mirtrons hsa-miR-3064-5p and hsa-miR-6515-5p and mirtronic miRNAs, located in 3'-tailed mirtrons hsa-miR-3940-5p and hsa-miR-6850-5p. Green boxes and lines indicate exons and introns of protein-coding genes, respectively. Purple boxes indicate 5' and 3' untranslated regions. Mirtrons containing previously mentioned mirtronic miRNAs are depicted as red lines. Full sequence of mirtrons (except of hsa-miR-3064) is written above each scheme, where sequence of more abundant miRNA of the hairpin is marked in red, less abundant in blue, and tail is marked in green. Dashes beneath the schemes show miRNAs positions in the genes. **Figure S3.** Expression of mirtronic miRNAs in cancer cell lines. miRNA expression normalized to RNU48 and compared to HEK 293A. The experiments were performed in at least three biological replicates. The error bars represent calculated values for standard deviation. Fold changes higher than 1.5 were statistically significant ($p < 0.05$). **Figure S4.** The position of splicing signals predicted by online bioinformatics tool Human Splicing Finder. SRSF1-specific targets are highlighted in yellow, SRSF2-specific in green. Sequence of mirtrons is written as italicized red text, exon sequence normal black text. (PDF 750 kb)

Additional file 2: Table S1. Primers for DHX30, PLEKHJ1, MGAT4B, NELFE, ATG4D, DDX5, KHSRP, CARL, and RPL8 gene amplification. **Table S2.** Primers used for 5' and 3' splicing site mutagenesis. **Table S3.** Specific miRNA and RNU48 primers for RT-qPCR. **Table S4.** Primers for spliced and unspliced gene form detection. (PDF 393 kb)

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SB executed the RNA experiments, analyzed and interpreted the data, and helped to draft the manuscript. LC contributed to the plasmid vector construction and performed the transfection experiments. EJ performed the immunoblotting experiments and analyzed the data. LV cloned the

SF genes. PM provided the tissues. AK and GV conceived, designed, and coordinated the experiments; helped in interpreting the data; and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Antanas Gulbinas for the helpful discussion and Alexandra Plotnikova and Saulius Klimašauskas for the critical comments on the manuscript. This work was funded by the Research Council of Lithuania grant LIG-10/2012.

Author details

¹Department of Biological DNA Modification, Institute of Biotechnology, Vilnius University, Vilnius, Lithuania. ²Department of Immunology and Cell Biology, Institute of Biotechnology, Vilnius University, Vilnius, Lithuania. ³Institute for Digestive Research, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania.

Received: 9 February 2016 Accepted: 18 March 2016

Published online: 25 March 2016

References

- Smith CW, Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci.* 2000;25:381–8.
- Chen HC, Cheng SC. Functional roles of protein splicing factors. *Biosci Rep.* 2012;32:345–59.
- David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev.* 2010;24:2343–64.
- Scott LM, Rebel VI. Acquired mutations that affect pre-mRNA splicing in hematologic malignancies and solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105:1540–9.
- Aslan D, Garde C, Nygaard MK, Helbo AS, Dimopoulos K, Hansen JW, Severinsen MT, Treppendahl MB, Sjo LD, Gronbaek K, Kristensen LS. Tumor suppressor microRNAs are downregulated in myelodysplastic syndrome with spliceosome mutations. *Oncotarget.* 2016. doi:10.18632/oncotarget.7127.
- Di Leva G, Croce CM. miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2013; 23:3–11.
- Davis BN, Hata A. Regulation of microRNA biogenesis: a miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal.* 2009;7:18.
- Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie.* 2011;93:1897–904.
- Curtis HJ, Sibley CR, Wood MJ. Mirtrons: an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3:617–32.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell.* 2007;130:89–100.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intrinsic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature.* 2007;448:83–6.
- Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.* 2012;22:1634–45.
- Meng Y, Shao C. Large-scale identification of mirtrons in *Arabidopsis* and rice. *PLoS One.* 2012;7:e31163.
- Wen J, Ladewig E, Shenker S, Mohammed J, Lai EC. Analysis of nearly one thousand mammalian mirtrons reveals novel features of Dicer substrates. *PLoS Comput Biol.* 2015;11:e100441.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell.* 2007;28:328–36.
- Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:4626–40.
- Sibley CR, Seow Y, Saayman S, Dijkstra KK, El Andaloussi S, Weinberg MS, Wood MJ. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:438–48.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D68–73.
- Jin C, Rajabi H, Kufe D. miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncogene and induces cell death. *Int J Oncol.* 2010;37:61–9.
- Gao R, Cai C, Gan J, Yang X, Shuang Z, Liu M, Li S, Tang H. miR-1236 down-regulates alpha-fetoprotein, thus causing PTEN accumulation, which inhibits the PI3K/Akt pathway and malignant phenotype in hepatoma cells. *Oncotarget.* 2015;6:6014–28.
- Jones D, Li Y, He Y, Xu Z, Chen H, Min W. Mirtron microRNA-1236 inhibits VEGFR-3 signaling during inflammatory lymphangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:633–42.
- Ding K, Zhang P, Li J, Duan C, Shen X. Human miR-1236 antisense ribonucleic acid and application thereof. Patent CN102140470; 2013.
- Qi M, Huang XY, Zhou L, Zhang JL. Identification of differentially expressed microRNAs in metastatic melanoma using next-generation sequencing technology. *International Journal of Molecular Medicine.* 2014;33:1117–21.
- Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, Nagase S, Ito K, Suzuki T, Sasano H, Yaegashi N. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci.* 2010;101:241–9.
- Shepard PJ, Hertel KJ. The SR protein family. *Genome Biol.* 2009;10:242.
- Wu H, Sun S, Tu K, Gao Y, Xie B, Krainer AR, Zhu J. A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing. *Mol Cell.* 2010;38:67–77.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalonde M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e67.
- Flynt AS, Greimann JC, Chung WJ, Lima CD, Lai EC. MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Mol Cell.* 2010;38:900–7.
- Schamberger A, Sarkadi B, Orban TI. Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner. *RNA Biol.* 2012;9:1177–85.
- Berezikov E, Liu N, Flynt AS, Hodges E, Rooks M, Hannon GJ, Lai EC. Evolutionary flux of canonical microRNAs and mirtrons in *Drosophila*. *Nat Genet.* 2010;42:6–9.
- Mohammed J, Flynt AS, Siepel A, Lai EC. The impact of age, biogenesis, and genomic clustering on *Drosophila* microRNA evolution. *RNA.* 2013;19:1295–308.
- Babiarz JE, Hsu R, Melton C, Thomas M, Ullian EM, Blelloch R. A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in Dgcr8 versus Dicer1 knockouts and small RNA sequencing. *RNA.* 2011;17:1489–501.
- Guil S, Caceres JF. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:591–6.
- Kock KH, Kong KW, Hoon S, Seow Y. Functional VEGFA knockdown with artificial 3'-tailed mirtrons defined by 5' splice site and branch point. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:6568–78.
- Seow Y, Sibley CR, Wood MJ. Artificial mirtron-mediated gene knockdown: functional DMPK silencing in mammalian cells. *RNA.* 2012;18:1328–37.
- Sibley CR, Seow Y, Curtis H, Weinberg MS, Wood MJ. Silencing of Parkinson's disease-associated genes with artificial mirtron mimics of miR-1224. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:9863–75.
- Mattioli C, Planigiani G, Pagani F. Cross talk between spliceosome and microprocessor defines the fate of pre-mRNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna.* 2014;5:647–58.
- Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, Gherzi R, Rosenfeld MG. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature.* 2009;459:1010–4.
- Jakubauskiene E, Peculienė I, Vilys L, Mocevičius P, Vilkaitis G, Kanopka A. Gastrointestinal tract tumors and cell lines possess differential splicing factor expression and tumor associated miRNA isoform formation profiles. *Cancer Biomark.* 2015;15:575–81.
- Goncalves V, Jordan P. Posttranscriptional regulation of splicing factor SRSF1 and its role in cancer cell biology. *Biomed Res Int.* 2015;2015:287048.
- Gout S, Brambilla E, Boudria A, Drissi R, Lantuejoul S, Gazzzeri S, Eymin B. Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS One.* 2012;7: e46539.
- Anczukow O, Akerman M, Cley A, Wu J, Shen C, Shiroe NH, Raimer A, Sun S, Jensen MA, Hua Y, et al. SRSF1-regulated alternative splicing in breast cancer. *Mol Cell.* 2015;60:105–17.

PADĖKA

Iš visos širdies dėkoju savo disertacijos vadovui prof. dr. Giedriui Vilkaičiui už pasiūlytą doktorantūros temą ir priėmimą į savo komandą. Dėkoju už visas eksperimentines bei mokslo žinias kuriomis dalinosi, už galimybę augti ir tobulėti. Už galimybę dalyvauti LMT projektuose, dirbti su pažangiausiomis technologijomis ir įgyti daug vertingos patirties ne tik eksperimentinėje dalyje, bet ir bendradarbiaujant su skirtingomis darbo grupėmis. Dėkoju už pasitikėjimą, už mano žinių vertinimą, už padėšinimą, už tai, kad kritinėse situacijose buvau išgirsta. Taip pat dėkoju už situacijas per kurias užaugo mano pasitikėjimas savimi ir ramesnis požiūris į darbo eigą. Didžiausias ačiū.

Dėkoju laboratorijos vedėjui prof. habil. dr. Sauliui Klimašauskui už galimybę dirbti vienoje geriausių Lietuvos laboratorijų.

Dėkoju dr. Vaidotui Stankevičiui už eksperimentinius patarimus, už pagalbą juos vykdant, už bendradarbiavimą. Taip pat ačiū už visą šilumą ir palaikymą darbo metu.

Ačiū studentams Laurynui Čiupui ir Ignui Maželiui, už pagalbą eksperimentuose ir ruošiant straipsnius. Už galimybę mokytis kaip būti gera vadove. Ir galimybę suprasti, kad vadovauti nėra taip paprasta.

Taip pat ačiū dr. Arvydo Kanopkos ir prof. habil. dr. Vaivos Lesauskaitės grupių nariams už bendradarbiavimą. Dėkoju „Thermo Fisher Scientific Baltics“ už galimybę naudotis Illumina Miseq sekoskaitos aparatu. Žanai Kapustinai – už visas pasidalintas žinias ir pagalbą vykdant visuminę sekoskaitą.

Ačiū visiems laboratorijos nariams, kurie mane palaikė.

Taip pat dėkoju Dainai Kremensienei, Renatai Bružaitėi, Aidai Vitkevičienei, Edvinui Ručinskui, Laurai Lukšaitėi, Vitalijai Butkytei ir Justinai Kazokaitei už buvimą šalia visose krizėse ir džiaugsmuose.

Ačiū Tėvams už tai, kad skatino ir padėjo siekti mokslo aukštumų. Kad suteikė pagrindą, nuo kurio galėjau kilti aukštyn.

Ir iš paties širdies giliausių gelmių sakau ačiū savo gyvenimo vyrui Alvydui ir doktorantūros metu gimusiam sūnui Žygimantui, kurie besąlygiškai visada buvo su manimi. Kurie yra didžiausi mano gyvenimo mokytojai. Kurie mane palaiko, tiki ir myli visada, nepaisant pasiekimų. Jūs man visada būsite patys brangiausi.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt,
www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.