

DISS. ETH Nr. 20981

**SYNTHESIS-ENABLED STRATEGIES
TO IDENTIFY
NEW MICRORNA BIOLOGY**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

BORIS GUENNEWIG

Diplom-Chemiker, University of Münster

born August 5th, 1982

in Emmerich am Rhein, Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Jonathan Hall
Prof. Dr. Cornelia Halin

2013

III. Summary

The PubMed database (www.ncbi.nlm.nih.gov) lists more than 20,000 publications, which feature the search term “microRNA”. Over the last years, these publications have increased annually, cumulating in 5796 in 2012 (as of 12/31/12). This is an average of 110 publications a week.

The progression of a new field is heavily dependent on the availability of biochemical tools. For example are the use of DNA vector constructs and the transfection of RNA or DNA routine techniques of enormous value to modern biology. In this work we describe “synthesis-enabled strategies”, which have been developed in order to improve plasmid construction (see Development of synthesis-enabled tools, p. 34) and microRNA (miRNA) overexpression (see Chemical synthesis of precursor miRNAs unveils dual targeting properties of miR-34a, p. 62) to advance knowledge of miRNA biogenesis and function.

A common method to demonstrate regulation of a particular gene by a miRNA is to use a fusion construct of luciferase open-reading frame conjugated to the 3' UTR of interest. Many such reporters are now commercially available, albeit in shortened forms, produced biochemically by PCR and cloning of UTR sequences from biological sources. Nucleotide modification of constructs is tedious but necessary in order to have sequence-mutated controls for putative miRNA binding. Such control sequences are produced by judicious usage of primer sequences (mutagenesis PCR), but it is a rather clumsy and limited process where it is desired to insert, remove, multiply and modify miRNA sites. In the first part of this work we present two synthetic approaches circumventing these problems. First, a strategy using a combined automated synthesis and ligation-mediated method, called “Chain Reaction Cloning” (CRC) and second, a streamlined PCR-mediated method termed “Short Constructs Approach” (SCA). These efficient, versatile and reliable protocols to easily construct reporters were required to functionally characterize miRNAs of interest (see Development of synthesis-enabled tools, p. 34).

Experiments conducted with miRNA mimics often result in subtle phenotypic changes and hence require careful controls. A commonly used type of control reagent in the antisense/RNAi field is the mismatched sequence. However it is difficult to use mismatch controls for miRNAs, because base permutation in the seed region can lead to generation of a new miRNA seed with its own associated target transcripts. In the second part of this work we report that incorporation of a single N^4,N^4 -dimethylcytidine into the seed region of miRNAs

can be used as a new class of negative miRNA control which: i) does not constitute a new seed sequence; ii) is accepted by the RISC; iii) causes a significant loss of binding affinity to target RNAs; iv) and is synthesized conveniently into oligoribonucleotides (see Introduction of mismatch controls into miRNA, p. 48).

In the main project of this thesis we developed the use of chemically synthesized pre-miRNAs (syn-pre-miRNAs) as a class of readily available pre-miRNA mimics. These are RNA hairpins with terminal 5' and 3' hydroxyl groups, identical in sequence to naturally occurring pre-miRNAs, or Drosha products. These molecules proved to be useful as biological tools to determine function of dual active miRNAs. We synthesized these hairpin structures as natural miRNA mimics and characterized their ability to inhibit mRNA translation from both guide and passenger strands (see Chemical synthesis of precursor miRNAs unveils dual targeting properties of miR-34a, p. 62).

We used these chemically synthesized pre-miRNAs to demonstrate with several examples how syn-pre-miRNAs can fully recapitulate the properties of pre-miRNAs, including their processing by DICER into simultaneously active 5p- and 3p-derived mature miRNAs. We use syn-pre-miRNAs to show that miR-34a uses its 5p and 3p miRNAs in two unrelated pathways: TGF- β signaling in HeLa cells, where *SIRT1* and *SP4* are suppressed by miR-34a-5p and -3p, respectively; and the lipopolysaccharide (LPS)-activation of primary human monocyte-derived macrophages where *NOTCH1* and *TNF α* are suppressed by miR-34a-5p and -3p, respectively. Our results add to growing evidence that the use of both arms of a miRNA may be a widely used mechanism. We further suggest that syn-pre-miRNAs are ideal tools to investigate these mechanisms (see Chemical synthesis of precursor miRNAs unveils dual targeting properties of miR-34a, p. 62).

We could show in the first project that *N*⁴-monomethylated cytidine in the seed of a miRNA is accepted by the RISC and that the protrusion of the methyl group into the major groove does not hinder silencing of complementary targets or *bona fide* miRNA target sites. These findings boded well for the introduction of other functionality into miRNAs as tools for biochemistry or chemical biology projects. Based on the proof of concept several collaborations were initiated with members of the Hall group. Two of which are described in the last part of this work: the functionalization of miRNAs for cross-linking experiments, and the incorporation of fluorescence dyes for cellular localization studies (see Structure-activity relations, p. 90).

IV. Zusammenfassung

Der Einsatz von DNA Plasmidkonstrukten und die Transfektion von DNA oder RNA sind Routinetechniken von enormen Wert in der modernen Biologie. Diese Arbeit beschreibt die durch „Synthese ermöglichten Strategien“, welche wir entwickelt haben, um microRNA (miRNA) Überexpression (siehe Chemical synthesis of precursor miRNAs unveils dual targeting properties of miR-34a, p. 62) und die Konstruktion von Plasmiden zu verbessern (siehe Development of synthesis-enabled tools, p. 34). Das Ziel: Fortschritte im Wissen der miRNA Biogenese und ihrer Funktionen zu erzielen. Ein übliches Verfahren um die Regulation eines bestimmten Gens durch eine miRNA zu zeigen, ist die Verwendung eines Fusion-Konstrukts aus Luciferase translatierender mRNA kombiniert mit einer zu untersuchenden untranslatierten Region. Einzelne Nukleotid-Modifikation dieser Konstrukte sind aufwendig zu generieren. Diese sind jedoch notwendig um sequenzspezifische Bindungsstellen einwandfrei zu identifizieren. Solche Kontrollmutationen können durch geschickte Nutzung von Primersequenzen (Mutagenese PCR) erzeugt werden. Dies ist jedoch ein wenig eleganter und eingeschränkt nutzbarer Prozess, wenn es darum geht Bindungsstellen zusätzlich einzufügen, zu entfernen, zu verdoppeln oder zu mutieren. Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt zwei synthetische Ansätze, die zur Umgehung dieser Probleme entwickelt wurden. Die erste Strategie kombiniert die Synthese von Oligonukleotiden mit dem Einsatz von hitzestabilen Ligasen, der sogenannten „Chain Reaction Cloning“ (CRC). Einen zweiten durch PCR ermöglichten Ansatz wird unter dem Namen „Short Constructs Approach“ beschrieben. Diese effizienten, zuverlässigen und vielseitig einsetzbaren Protokolle erwiesen sich als nützlich, um die funktionellen Eigenschaften bestimmter microRNAs zu charakterisieren.

Experimente, welche mit miRNA mimics durchgeführt werden, resultieren oft in subtilen phänotypischen Veränderungen und erfordern daher sorgfältige Kontrollen. Häufig verwendete Kontrollreagenzien im Antisense / RNAi Feld sind mutierte Sequenzen. Der Einsatz dieser Reagenzien ist jedoch fragwürdig, da die Mutation (der Austausch einer Base durch eine andere) in einer Bindungsstelle zu der Generierung einer neuen Bindungsstelle mit ihren eigenen Bindungspartnern führen kann. Um diese zu verhindern, wurde in dem zweiten Teil dieser Arbeit eine chemische Modifikation (N⁴,N⁴-Dimethylcytidine) in die Bindungsstelle eingebaut und somit eine neue Klasse von negativen Kontrollen etabliert. Diese negative Kontrollen haben folgende Eigenschaften i) sie generieren keine neue Bindungsstelle, ii) sie werden weiterhin als natürliche miRNA in ihren jeweiligen Funktionen erkannt, iii) sie

generieren den für negativ Kontrollen erwünschten Verlust an Bindungsaffinität und iv) sind anspruchslos in ihrer Synthese (siehe Introduction of mismatch controls into miRNA, p. 48).

In dem Hauptprojekt dieser Arbeit wurde die Verwendung von chemisch synthetisierten pre-miRNAs (syn-pre-miRNAs) als eine Klasse von leicht verfügbaren pre-miRNA mimics etabliert. Diese haarnadelförmigen RNAs sind identisch in ihrer Sequenz zu den natürlich vorkommenden pre-miRNAs. Die Moleküle erwiesen sich als hilfreiche biologische Werkzeuge um die Funktion von zweifach aktiven miRNAs zu bestimmen. Diese Moleküle wurden wie natürliche miRNAs mimics synthetisiert und ihr Potential, die mRNA Translation mit beiden Armen (5p und 3p) zu inhibieren, getestet. Es zeigte sich dabei, dass sie sich wie natürliche pre-miRNAs verhalten, einschließlich ihrer Prozessierung durch DICER in zwei aktive und reife miRNAs. Die syn-pre-miRNAs wurden verwendet, um zu zeigen, dass miR-34a beide seiner reifen Arme (5p und 3p) in zwei unabhängigen Zellregulierungen nutzt. Nämlich der TGF- β -Signalisierung in HeLa-Zellen, bei der *SIRT1* und *SP4* inhibiert wurden; und zusätzlich in den durch Lipopolysaccharid (LPS) aktivierten primären humanen Makrophagen (differenzierte Monozyten) in welchem *NOTCH1* und *TNF* von miR-34a durch jeweils den 5p und 3p Arm unterdrückt werden. Die erzielten Ergebnisse fügen ein weiteres Beispiel in die Reihe der bereits beschriebenen ein, dass die Verwendung beider Arme einer miRNA ein weit verbreiteter Mechanismus zu sein scheint. Dieser Mechanismus prädestiniert die hergestellte syn-pre-miRNAs als ideale Werkzeuge zur Erforschung dieser Wirkmechanismen (siehe Chemical synthesis of precursor miRNAs unveils dual targeting properties of miR-34a, p. 62).

In dem ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass chemisch modifizierte miRNAs weiterhin als natürliche miRNA in ihren jeweiligen Funktionen erkannt werden. Auch das Hineinragen dieser Modifikation in den Gegenstrang führte zu keiner Einschränkung - sowohl bei voll komplementären als bei natürlichen miRNA Interaktionen. Diese Erkenntnisse wurden genutzt, um zusätzliche chemische Modifikationen in die miRNAs einzubauen. Dies führte zu Projekten in welchen miRNAs als biochemische Werkzeuge eingesetzt oder zur Beantwortung von biologischen Fragestellungen genutzt wurden. Zwei dieser Projekt werden in dem letzten Teil dieser Arbeit beschrieben: Die Funktionalisierung von miRNAs für Vernetzungs Experimente und der Einbau von fluoreszierende Farbstoffe für Kollokalisierungs-Studien (siehe Structure-activity relations, p. 90).