

Diss. ETH No. 21107

# **Affinity-based Structural Studies of microRNA Precursors**

A dissertation submitted to the  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
M. REBHAN  
Eidg. dipl. Apotheker  
born 21. Januar 1976  
citizen of Boswil/AG - Schweiz

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. J. Hall, examiner  
Prof. Dr. G. Schneider, co-examiner

2013

## Summary

MicroRNAs (miRNAs) are a recently discovered class of short (~22 nt) non-coding RNA molecules that regulate gene expression. Upon binding to the 3'-untranslated region (UTR) of target messenger RNA (mRNA) they repress translation of the mRNA or induce their degradation and, accordingly, play important roles in health and many human diseases including cancer, (cardio)-metabolic disorders, and viral infections. The precursors of miRNAs—pri- and pre-miRNAs—have a characteristic secondary structure comprising a double stranded RNA stem and a single-stranded loop region, in total called “hairpin”. Recent investigations of pri- and pre-miRNAs with conserved terminal loop regions suggest a crucial role of these loop regions during the biogenesis of the mature miRNAs.

Ten years after the discovery of miRNAs, there are more than 2'200 human miRNAs identified (as of 20.11.2012) and there are more than 5'000 miRNA-disease associations from over 2'700 scientific publications. From these, miR-122 is of particular interest because of its role in hepatitis C viral replication and antagonists of its function are currently being tested in clinical trials.

Therefore direct targeting of non-coding (ncRNA) with antisense oligoribonucleotides (ASOs) has promise as a valuable alternative to the “classical” protein based drug discovery. However, rational design or identification of small-molecule drugs that selectively and safely interact with nucleic acids has to date been unsuccessful. My work begins with the hypothesis that the distinct secondary structure of pre-miRNAs might offer enhanced binding affinity and selectivity for very short complementary ASOs due to pre-organization. Short oligonucleotides would represent a major advance in targeting RNAs.

Surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) is an optical technique for the detection and quantification of molecular interactions without the need of labeling and in real-time. Since its first usage with organic monolayers about 30 years ago, SPR has become the method of choice for the characterization of macromolecular interactions involving peptides, proteins and nucleic acids.

As a part of a program in our lab to probe the accessibility of miRNA precursors (pre-miRNA) and particularly the conserved terminal loop regions of pre-miRNAs I developed an SPR-based binding assay for the identification of binding sites of pre-miRNAs for complementary oligoribonucleotides. I synthesized libraries of short (7–14 nt) fully complementary ASOs against stem-loop structured RNA oligoribonucleotides and tested them by SPR for their binding affinity to the hairpin captured to the surface of an SPR chip. With these systematic screens (“walkarounds”) I unambiguously identified the single stranded terminal loop region as preferred binding sites. Further investigations of these loop-binding oligoribonucleotides, named “LooptomiRs”, revealed a uniform preference for the 3'-end of the loop region. The results are presented in chapter 2.

Co-workers in our group developed protocols for the chemical modification of single nucleotides with the intention to selectively modify binding properties and enhance affinity for

their nucleic acid targets. In collaboration with them I tested a large set of modified “Loop-tomiRs” against the hairpin of pre-miR-122 for their ability to enhance the binding affinity towards structured target RNA molecules. The testing of this library revealed a  $\approx 20$ – $30$  fold increase in binding affinity of certain molecules which is presented in chapter 4. These molecules are currently under investigation in our laboratory in cellular assays.

RNase H is an enzyme (ribonuclease) which belongs to the most ancient protein folds identified. It is ubiquitously found in prokaryotes, eukaryotes and in viruses and cleaves RNA molecules in RNA/DNA duplexes. This property is exploited for the target degradation of RNA molecules by introducing complementary ASOs. In collaboration with Dr. med. F. Paun, a master student in pharmaceutical sciences who worked under my supervision, I established an enzymatic assay for the detection and identification (chapter 3) of RNase H-mediated cleavage products, which is presented in chapter 5.

Finally, I developed a novel method for the SPR-based measurement of extremely low dissociation rates,  $k_d$ , in the range of  $10^{-6} / 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ . This method, which we termed INSTED, was successfully tested with the determination of the dissociation rate of biotin-streptavidin and is presented in chapter 6.

# Zusammenfassung

MikroRNAs (miRNAs) sind kurze (~22 nt), nicht für Proteine kodierende RNA Moleküle, welche die Genexpression regulieren. Durch Bindung an die sogenannte "3'-untranslated region" (UTR, eine Sequenz ausserhalb des Proteincodes) von messenger RNA (mRNA) unterdrücken sie entweder die Translation der mRNA oder leiten deren Abbau ein. Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle sowohl im gesunden Organismus (z.B. bei der Zellproliferation oder Apoptose), als auch bei vielen Krankheiten, wie z.B. Krebs, Stoffwechselstörungen und auch viralen Infektionen. Die miRNA Vorläufer (pri- und pre-miRNAs) formen sich zu einer charakteristischen Sekundärstruktur, welche aus einem doppelsträngigen RNA Strang und einer einzelsträngigen Schleife besteht und "hairpin" (z.dt. "Haarnadel") genannt wird. Neuere Untersuchungen dieser Vorläufer, welche eine konservierte Primärsequenz der Schleife aufweisen, deuten darauf hin, daß diese Schleife eine wichtige Aufgabe während der Biogenese von reifen miRNAs einnimmt.

In den letzten 10 Jahren seit der Entdeckung der miRNA wurden über 2'200 menschliche miRNAs beschrieben (Stand 20.11.2012) und über 5'000 Beziehungen zwischen miRNAs und Krankheiten festgestellt. Wegen ihrer Schlüsselrolle bei der Replikation des Hepatitis C Virus (HCV) ist die mikroRNA-122 von besonderem Interesse und Inhibitoren dieser mikroRNA sind bereits in klinischen Studien.

Aus diesen Gründen erscheint der Angriff auf nichtkodierende RNA (ncRNA) mit komplementären Oligonukleotiden eine durchwegs valable Alternative zu den "klassischen" Methoden der Medikamentenentwicklung, welche auf Proteinen basiert, zu sein. Dies insbesondere, weil es bisher nicht möglich war, kleine Moleküle zu entwickeln, welche selektiv und ohne Schäden für die Gesundheit, mit Nukleinsäuren interagieren und diese so in ihrer Funktion beeinträchtigen. Meine Arbeit setzt an dieser Stelle an: Gestützt auf die Hypothese, dass die ausgeprägte Sekundärstruktur der pre-miRNA eine erhöhte Affinität gegenüber sehr kurzen komplementären Oligonukleotiden hat, begab ich mich auf die Suche nach solchen. Die erfolgreiche Inhibierung von pre-miRNAs mit sehr kurzen Oligonukleotiden brächte einen entscheidenden Fortschritt in der Entwicklung von neuen Medikamenten.

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) ist eine optische Messmethode zur Bestimmung und Quantifizierung von Molekülinteraktionen, welche in Echtzeit und ohne die Notwendigkeit einer Markierung durchgeführt werden kann. Seit ihrer Entwicklung vor etwa 30 Jahren wurde sie zu einer Standardmethode zur Charakterisierung der Bindung zwischen Makromolekülen, einschliesslich Proteinen, Peptiden und Nukleinsäuren.

Als Teil eines Programms zur Identifikation möglicher Bindungsstellen von miRNA Vorläufern (pre-miRNAs) im Allgemeinen und konservierter Schleifen im Speziellen habe ich einen auf SPR basierenden "assay" entwickelt, mit welchem die Bindungsstärke von kurzen Oligonukleotiden an diese Vorläufer gemessen werden kann. Dazu wurden Bibliotheken von kurzen (etwa 7–14 Nukleotide) komplementären Oligonukleotiden synthetisiert, welche gegen die Sekundärstruktur der pri-/pre-miRNA gerichtet sind. Diese Oligonukleotide wurden systematisch gegen die Vorläufer getestet, was eindeutig eine bevorzugte Bindungsstelle in

der einzelsträngigen Schleifenregion ergab. Weitere Untersuchungen dieser sogenannten "LooptomiRs" ergaben, daß das 3'-Ende der Schleife bevorzugt gebunden wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in Kapitel 2 dargelegt.

Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe haben Protokolle zur Modifizierung von Nukleotiden entwickelt, mit dem Ziel, die Bindungsstärke von kurzen Oligonukleotiden an ihre Ziel-RNA zu erhöhen. Eine Bibliothek der zuvor entdeckten Oligonukleotide mit einzelnen solcher modifizierten Nukleotiden wurde gegen die pre-miRNA-122 getestet. Dabei wurden Oligonukleotide entdeckt, welche eine um bis zu 30-fach erhöhte Affinität aufwiesen. Kapitel 4 beschreibt diese Ergebnisse.

RNase H ist eine Ribonuklease welche zu den ältesten Proteinen gezählt wird und in Prokaryoten, Eukaryoten und Viren exprimiert wird. Sie schneidet RNA, welche sich in RNA/DNA Duplexen befinden. Durch diese Eigenschaft kann man den Abbau von RNA durch eingebrachte komplementäre DNA induzieren. In Zusammenarbeit mit Dr. F. Paun, einem Masterstudenten, habe ich einen Enzymassay zur Identifikation von Abbauprodukten von RNase H implementiert, welcher erfolgreich mit DNA "LooptomiRs" getestet wurde. Die Ergebnisse werden in Kapitel 5 vorgestellt.

Die Quantifizierung von sehr kleinen Dissociationsgeschwindigkeiten in der Größenordnung von  $10^{-6} / 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  mittels SPR ist nur beschränkt möglich. Kapitel 6 zeigt die Ergebnisse einer von mir neu entwickelten Methode zur Bestimmung von sehr kleinen Dissociationsgeschwindigkeiten, welche erfolgreich am Beispiel der Dissociation des Biotin/Streptavidin-Komplexes angewendet wurde.