

Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells.

Wesselhoeft R. Alexander et al.

Nature communications (2018) 9:2629

مهندسی RNA حلقوی به منظور ترجمه قوی و پایدار در سلول‌های یوکاریوتی

ارد قویمی و سعید امین زاده*

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرایند

چکیده

RNA پیک (mRNA) پتانسیل گسترده‌ای برای استفاده در سیستم‌های بیولوژیکی دارد. با این حال، یک محدودیت اساسی در استفاده از آن، نیمه عمر نسبتاً کوتاه آن در این سیستم‌ها است. در اینجا ما RNA حلقوی (circRNA) آگروژنی (با منشا خارجی) را توسعه دادیم تا مدت زمان بیان پروتئین از RNA بی با طول کامل را، افزایش دهیم. نخست، ما یک اینترون خود پیرایشگر (self-splicing intron) را طوری طراحی کردیم تا به وسیله یک طراحی منطقی (rationally designing) به کمک توالی‌های موجود که به نحو موثری اسپلایسینگ کمک می‌کنند، در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*)، دامنه گسترده‌ای از توالی‌های با طول تا 5kb را، حلقوی سازد. در ادامه ترجمه پروتئین کاربردی از این circRNAها را در سلول‌های یوکاریوتیک به حداکثر می‌رسانیم و در خواهیم یافت که circRNAهای مهندسی شده که به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (high performance liquid chromatography) تخلیص شده‌اند کیفیت بالای تولید پروتئین را از نظر مقدار پروتئین تولید شده و همچنین پایداری تولید پروتئین، فراهم می‌کنند. این یکی اولین مطالعاتی است که از circRNA آگروژن برای بیان قوی و پایدار پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی استفاده کرده است و نشان داده که circRNA، جایگزین مناسب (و امید بخشی) برای mRNAهای خطی می‌باشد.

کلیدواژگان: RNA حلقوی، ترجمه قوی و پایدار، سلول‌های یوکاریوتی

* مترجم مسئول، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

که عموماً از نیمه عمر کوتاه آسیب می‌بینند، فراهم سازد (۱۰ و ۱۱) و بنابراین حلقوی کردن mRNA ممکن است کارایی کلی mRNAهای برونزاد (آگروژن) را برای کاربردهای مختلف بهبود بخشد (۱۲).

تلاش‌های قبلی برای افزایش پایداری mRNA شامل استفاده از: مناطق غیرقابل ترجمه (UTR) مانند نواحی موجود در mRNA بتا گلوبین طبیعی، آنالوگ‌های کلاهک (cap) متیل گوانوزینه برای محافظت از mRNA در برابر تجزیه کلاهک توسط دکپینگ آنزیم‌ها، مدیفیکیشن یا اصلاح نوکلئوزیدها و بهینه سازی کدون می‌باشد. این استراتژی‌ها پیشرفت اندکی در پایداری RNA به همراه داشته‌اند (۱۰، ۱۳-۱۶) لذا رویکردهای جایگزین مثل حلقوی کردن RNA بر تثبیت پایداری آن مطلوب است. با این حال، حلقوی شدن کارآمد RNA طولی "رونویسی

اخیراً RNAهای حلقوی (circRNAها) اندوژن متعلق به سلول‌های یوکاریوتی به دلیل شیوع و دامنه گسترده عملکردهای بالقوه بیولوژیکی، توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند (۱). اکثر circRNAهایی که طبیعت یافت می‌شوند از طریق پیرایش برگشتی^۱ تولید می‌شوند (۲، ۳ و ۴) و به نظر می‌رسد به عنوان RNAهای غیررمزگذار عمل می‌کنند (۱، ۵، ۶). با این حال، نشان داده شده است که برخی از circRNAهای درونزاد دروزوفیلا و انسان رمز پروتئین هستند (۷ و ۸). circRNAهای درونزاد، علاوه بر داشتن توانایی بالقوه رمزگذاری پروتئین‌ها، فاقد انتهای آزاد مورد نیاز برای تخریب وابسته به آگزونوکلاز هستند. این امر circRNAها را در برابر مکانیسم‌های تجزیه RNA مقاوم می‌کند و در مقایسه با mRNAهای خطی هم‌تای آنها، عمر آن‌ها را طولانی‌تر می‌کند (۲ و ۹). به همین دلیل است که حلقوی شدن ممکن است پایداری mRNAهایی را

² Decapping Enzymes¹ Backsplicing

پیش شده^۷ مربوط به ژن تیمیدیلات سنتاز^۸ (Td) فاز T4 وارد کردیم (۲۱) (شکل ۱.a و داده های تکمیلی ۱).

RNA پیش ساز با رونویسی به روش run-off سنتز شد و سپس در حضور یونهای منیزیم و GTP برای شروع حلقوی سازی حرارت داده شد، این عمل همان طور که پیشتر برای حلقوی سازی RNAهای کوتاهتر استفاده شده بود، برای این واکنش نیز ضروری است (۲۱). با این حال با این روش موفق نشدیم محصولات پیرایش شده را به دست آوریم. ما حدس میزنیم این امر به علت مداخله نواحی طولانی بین جایگاههای پیرایش است، ممکن است این نواحی طولانی بینابینی توانایی جایگاههای پیرایش را در تعامل با یکدیگر کاهش داده و امکان تشکیل یک مجموعه پایدار را پایین آورد و در نتیجه باعث کاهش کارایی فرآیند پیرایش شود. در واقع، در حالت طبیعی ناحیه مداخله گر بین جایگاههای پیرایش ۳' و ۵' (ناحیه اینترونی طبیعی) از اینترونهای گروه I به طور متوسط ۳۰۰-۵۰۰ نوکلئوتید طول دارد (۲۲)، در حالی که ناحیه (بینابینی یا) مداخله گر فعلی در RNA مهندسی شده که ساختم، دو تا چهار برابر بیشتر طول دارد. بنابراین ما بازوهای هومولوگ^۹ به طول ۹ (ضعیف) و ۱۹ (قوی) نوکلئوتید طراحی کردیم که در ناحیه ناحیه ۳' و ۵' RNA پیش ساز مکمل بودند تا بتوانند جایگاههای پیرایش ۳' و ۵' را به هم نزدیک کنند (شکل ۱.b، اطلاعات تکمیلی ۱).

افزودن این بازوهای مکمل باعث افزایش کارایی فرآیند پیرایش از ۰ به ۱۶٪ برای بازوهای با هومولوژی ضعیف و ۴۸٪ برای بازوهای با هومولوژی قوی شد که با ناپدید شدن باند RNA پیش ساز ارزیابی می شود (شکل ۱.c). برای اطمینان از این که محصول اصلی پیرایش شده حلقوی شده است، ما واکنش اسپلایسینگ را با RNase R تیمار کردیم (شکل ۱.d، اطلاعات تکمیلی شکل ۱.a). محصول واکنش پیرایشی تیمار شده با RNase R در محل تقاطع جایگاه پیرایشی توالی یابی شده و اگزونهای متصل شده را نشان می دهد، همچنین واکنش پیرایشی تیمار شده با RNaseR به همراه RNase H هدایت شده، یک تک باند را تولید کرد که بر خلاف دو باند حاصل از هضم RNA پیش ساز خطی هضم شده با RNaseH به تنهایی بود (شکل

شده در شرایط *In vitro* (IVT)^۱، تخلیص circRNA، و بیان کافی پروتئین از circRNA موانع مهمی در این پروسه هستند که باید بر طرف شوند. در این مطالعه، ما یک رویکرد مهندسی برای تولید circRNAهای برونزاد ارائه کردیم تا بیان پروتئین در سلولهای یوکاریوتی به صورت قوی و پایدار صورت پذیرد.

نتایج

حلقوی سازی RNA طویل به کمک هومولوژی. سه استراتژی کلی برای حلقوی شدن RNA برونزاد وجود دارد: ۱. روش های شیمیایی با استفاده از بروماید سیانوژن یا یک عامل متراکم کننده، ۲. روش های آنزیمی مبتنی بر RNA و DNA لیگاز ها، و ۳. روش های ریبوزیماتیک با استفاده از خودپیرایشی اینترونها (۱۷-۱۹). یک روش ریبوزیماتیک که از اینترونهای کاتالیتیک گروه I پس و پیش شده^۲ استفاده می کند گزارش شده که بیشتر برای حلقوی سازی RNAهای طولانی مناسب است و فقط به افزودن GTP و Mg^{2+} به عنوان کوفاکتور نیاز دارد (۱۷). این استراتژی اسپلایسینگ پس و پیش شدن اینترون-اگزون (PIE^3) شامل احاطه شدن ترکیبی از بخشی از اگزون های دو طرف، توسط توالی نیمه های اینترون می باشد (به عبارتی در این استراتژی جایگاه اینترون و اگزون جابه جا می شود-مترجم) (۲۰). در شرایط آزمایشگاهی، این ساختارها متحمل دو واکنش ترنس استریفیکیشن می شوند که مشخصه اینترونهای کاتالیتیک گروه ۱ هستند؛ اما از آنجا که حالا اگزون ها (در مرکز دو اینترون) ادغام شده اند، با اتصال ۵' به ۳' به صورت حلقه، برش خورده و جدا می شوند (۱۷) (شکل ۱.a). ما با استفاده از این استراتژی به عنوان نقطه شروع برای ایجاد RNA حلقوی رمزگذار پروتئین، یک توالی ۱,۱ کیلوبازی شامل تمام طول IRES^۴ (جایگاه میانی یا درونی ورود ریبوزوم) یک ویروس انسفالومیوکارڈیت^۵ (EMCV)، یک پیام (یا توالی) گائسیا لوسیفراز^۶ (GLuc)، و دو ناحیه کوتاه مربوط به ۲ قطعه اگزون (قطعات اگزون ۱ و اگزون ۲) ساختار PIE را بین اینترونهای ۳' و ۵' از اینترونهای کاتالیتیک گروه I پس و

¹ In Vitro Transcribed

² Permuted در اینجا به جا به جا شدن جایگاه اینترون و اگزون اشاره دارد :

(مترجم)

³ Permuted Intron-Exon

⁴ Internal Ribosome Entry Site: جایگاه درونی ورود ریبوزوم

⁵ EncephaloMyoCarditis Virus

⁶ Gaussia luciferase

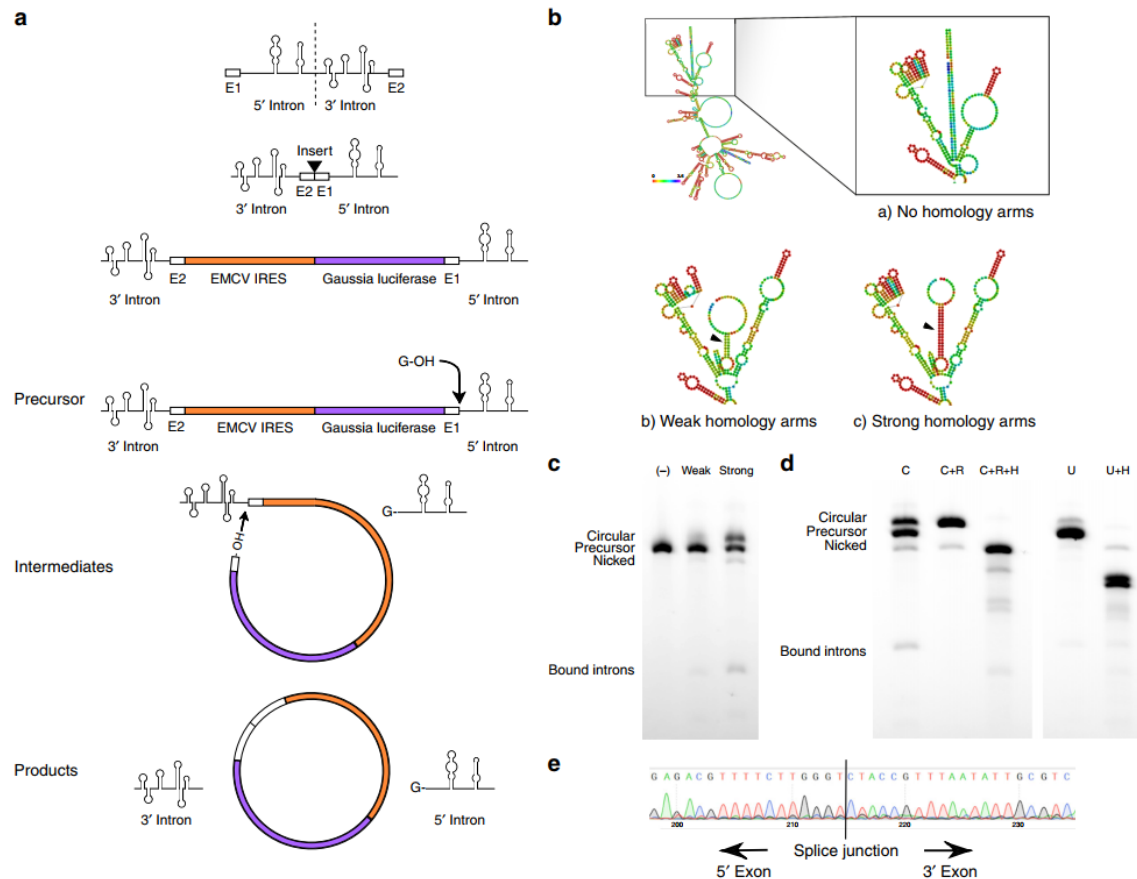
⁷ Permuted group I catalytic Pntron

⁸ Thymidylate Synthase

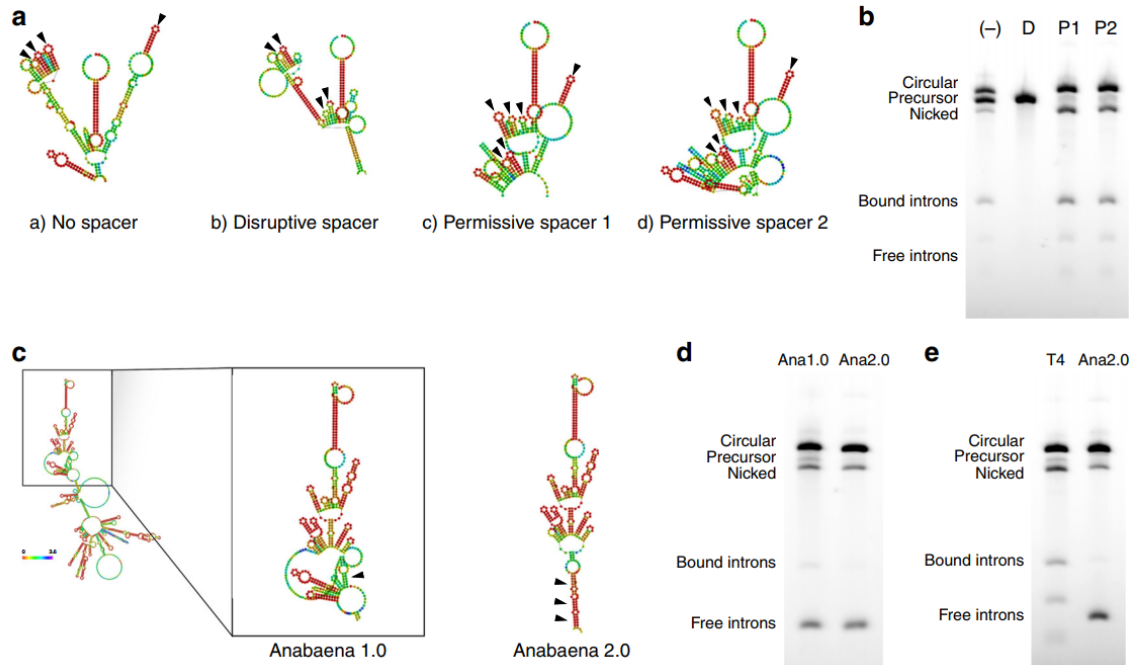
⁹ homology arms

مولکول های پیش ساز خطی، حلقه های شکسته (برش خورده)، حد واسط های پیرایشی و اینترون های جدا شده را فراهم می آورد.

د. e و اطلاعات تکمیلی شکل (a.1). این داده ها نشان می دهد که circRNAها محصول اصلی این واکنش های اسپلایسینگ هستند و اینکه الکتروفورز ژل آگارز امکان جداسازی ساده و مؤثر محصولات اسپلایسینگ حلقوی از



شکل ۱ - پیرایش اینترون-اگزون پس و پیش شده و افزودن بازوهای دارای هومولوژی. **a** شکل شماتیک طراحی ساختار permutated intron-PIE (exon و مکانیسم پیرایش. اینترون کاتالیتیک گروه I از ژن Td فاز T4 به گونه ای جدا شده است تا عناصر ساختاری ضروری برای تاب خوردگی ریبوزیم را حفظ کند. قطعه اگزون ۲ به بالادست قطعه اگزون ۱ متصل شده است، و یک ناحیه کدینگ به طول تقریبی ۱٫۱ کیلو باز بین تقاطع ۲ اگزون وارد می شود. طی فرآیند پیرایش، گروه هیدروکسیل از نوکلئوتید گوانوزین در یک واکنش ترنس استریفیکیشن در جایگاه پیرایش ۵' شرکت می کند. نیمه ۵' اینترون برش می خورد و گروه هیدروکسیل آزاد شده انتهای، در واکنش ترنس استریفیکیشن دوم در جایگاه پیرایش ۳' شرکت می کند. در نتیجه این امر، ناحیه دخولی به همراه اگزون ها حلقوی شده و اینترون ۳' حذف می شود. **b** پیش بینی شکل تا خوردگی RNA از ساختار ثانویه RNA پیش ساز برای طراحی بازوی هومولوگ. رنگ ها احتمال جفت شدن بازوها را نشان می دهند، رنگ قرمز احتمال بالاتر را نشان می دهد. بدون بازوهای همسانی، هیچ جفت شدگی بازی بین انتهای مولکول پیش ساز پیش بینی نمی شود. **c** ژل آگارز که اثر بازوهای هومولوژیک را بر پیرایش نشان می دهد. همان طور که نشان داده شده است، RNA حلقوی گویا با وزن مولکولی بالاتری نسبت به RNA پیش ساز حرکت می کند. (-): بدون هومولوژی. ضعیف: بازوهای هومولوگ ضعیف، ۹ نوکلئوتید. قوی: بازوهای هومولوگ قوی، ۱۹ نوکلئوتید. **d** ژل آگارز تایید کننده حلقوی شدن ساختار RNA C: پیش ساز (با بازو های همسان) که در معرض شرایط حلقوی شدن قرار گرفته است. C+R: لاین C که در معرض هضم با RNase R قرار گرفته است. C+R+H: لاین C+R که در معرض هضم با RNase H هدایت شده با الیگونوکلئوتید قرار گرفته است. U: RNA پیش ساز که در شرایط حلقوی شدن قرار نگرفته است. U+H: لاین U که با RNase H هدایت شده با الیگونوکلئوتید تیمار شده است. **e** خروجی توالی Sanger حاصل از RT-PCR نمونه گرفته شده از لاین C+R ان شده در شکل (d) در محل نقطه اتصال پیرایش (splice junction) به تصویر کشیده شده است.



شکل ۲ - طراحی فاصله‌گذار و پیرایش با استفاده از اینترون اتوکاتالیتیک آنابنا. **a** پیش بینی ساختار ثانویه RNA پیش‌ساز و نحوه تا خوردگی آن در پی طراحی فاصله‌گذار. ساختارهای ثانویه که به طور بالقوه در عملکرد ریبوزیم دخیل هستند توسط فلش‌های سیاه مشخص شده اند. **b** ژل آگارز که اثر فاصله‌گذارها را بر عملکرد پیرایش نشان می‌دهد. (-): بدون فاصله‌گذار. **D**: فاصله‌گذار مختل کننده. **P1**: فاصله‌گذار سازگار ۱. **P2**: فاصله‌گذار سازگار ۲. **c** پیش بینی تا خوردگی ساختار ثانویه RNA پیش‌ساز برای طراحی نواحی هومولوژی داخلی. عدم وجود هومولوژی قابل توجه داخلی (آنابنا ۱.۰) و ارائه هومولوژی داخلی (آنابنا ۲.۰) که با فلش‌های سیاه نشان داده شده است. حباب پیرایش به عنوان ناحیه ای بین بازوهای هومولوژی و مناطق هومولوژی داخلی که حاوی ریبوزیم پیرایشی است، نشان داده شده است. **d** ژل آگارز که اثر هومولوژی داخلی را روی پیرایش نشان می‌دهد. **e** ژل آگارز که واکنش پیرایش فاژ T4 بهینه شده را با واکنش پیرایشی آنابنا بهینه شده مقایسه می‌کند. نیمه اینترون‌های آنابنا طول تقریباً برابر دارند و در مقایسه با نیمه اینترون های فاژ T4 علی‌رغم بازوهای هومولوژی قوی تر، احتمالاً بعد از پیرایش، کمتر کنار هم می‌مانند.

پیرایش سر^۳ PIE و IRES، که پیش بینی می‌کردیم در پیرایش تداخل ایجاد کند، یک سری فاصله‌گذار طراحی کردیم (شکل ۲. a، داده های تکمیلی ۱). "فاصله‌گذارهای سازگار"^۳ برای حفظ ساختارهای ثانویه موجود در توالیهای اینترون طراحی شده اند که ممکن است برای فعالیت ریبوزیم مهم باشند، در حالی که "فاصله‌گذارهای مختل کننده"^۴ برای ایجاد اختلال در توالی در هر دو نیمه اینترون، خصوصاً نیمه ۵' طراحی شده اند. افزودن توالی‌های فاصله‌گذار سازگار طراحی شده باعث می‌شوند که کارایی پیرایش از ۴۶ تا ۸۷٪ (P1 و P2) افزایش یابد، در حالی که افزودن یک توالی فاصله‌گذار مختل کننده فرآیند پیرایش را کاملاً مختل می‌کند (شکل ۲. b). این ساختار

توالی‌های فاصله‌گذار^۱ کارایی حلقوی سازی را بهبود می‌بخشند. به منظور بهبود بیشتر کارایی تولید circRNA حاصل از خودپیرایشی RNA پیش‌ساز، عوامل دیگری را در نظر گرفتیم که ممکن است در حلقوی سازی موفقیت آمیز مؤثر باشند.

جایگاه پیرایش سر^۳ PIE مجاور IRES است و از آنجا که هر دو توالی دخولی ساختار بسیار سخت و با ثباتی دارند (انعطاف پذیری کمی دارند)، ما فرض کردیم که توالی درون IRES ممکن است، یا به صورت پروگزیمالی در سر^۳ و یا دیستالی در سر^۵، در تا خوردگی مربوط به عمل پیرایش ریبوزیم، تداخل ایجاد کند. برای اینکه اجازه دهیم این ساختارها به طور مستقل تا بخورند، بین جایگاه

³ Permissive spacers
⁴ disruptive spacer

¹ spacer
² Permuted Pntron-Exon

و فاقد ساختار سخت^۲ باشند. (۲) ساختار های ثانویه اینترون و IRES جدا باشند و بنابراین هر عنصر قادر به عملکرد و تاخوردگی مستقل از دیگری باشند و (۳) به منظور پیشروی یک جایگاه برای تشکیل حباب پیرایش شامل توالی های کناری اینترونی کاتالیتیک به وسیله مناطق دارای هومولوژی، دارای یک منطقه مکمل فاصله گذار - فاصله گذار باشند (شکل ۳.a، اطلاعات تکمیلی ۱). ما همچنین بازوهای هومولوگ در انتهای ۳' و ۵' مولکول پیش ساز RNA قرار دادیم. در ادامه بین این توالی ها، IRES یک ویروس EMCV، و همچنین نواحی رمزگذار ۵ پروتئین مختلف شامل گائسیا لوسیفراز (GLuc) (طول کل: ۱۲۸۹ نوکلئوتید)، فایرفلای لوسیفراز^۳ (۲۳۴۸ نوکلئوتید)، eGFP (۴۵۱ نوکلئوتید)، اریتروپویتین انسان (۱۳۱۳ نوکلئوتید) و اندونوکلاز Cas9 (۴۹۳۴ نوکلئوتید) را درج کردیم. ما قادر به حلقوی کردن هر در هر پنج توالی RNA بودیم (شکل ۳.b، اطلاعات تکمیلی ۱). راندمان حلقوی سازی با ساختار طراحی شده مرحله به مرحله ما (شکل ۲.e) مطلوب بود و دخول های مختلف بسیار تکرار پذیر بود، اما همچنان به اندازه قطعه دخولی وابسته بود، با RNA های طولانی حلقوی سازی کندی رخ می دهد (شکل تکمیلی ۳.a). علاوه بر این دریافتیم که circRNA های طویل در حضور یون های منیزیم بیشتر مستعد شکستگی و برش هستند، و در نتیجه انباشت circRNA شکسته در طی و پس از رونویسی آزمایشگاهی و هضم با RNase R رخ می دهد که این در نهایت باعث کاهش بازده کلی و خلوص نمونه تیمار شده RNase R می شود (شکل ۳.b، c، شکل تکمیلی ۳.a). با این وجود RNase R قادر به هضم کامل اینترون های مقاوم آنابنا نیست (شکل ۳.b، c، باند های پایینی) و یا گاه حلقه های نادری که تقریباً ۱۰۷٪ از واکنش های اسپیلیسینگ را شامل می شوند دیده می شوند (شکل ۳.b، باند های ضعیف).

circRNA اگزوزن به طور مؤثر ترجمه شده است. نشان داده شده است که circRNA درون زاد ممکن است مقادیر کمی از پروتئین را تولید کند (۷). به عنوان ابزاری برای ارزیابی توانایی تولید پروتئین از circRNA های مهندسی شده، محصولات پیرایشی هضم شده با RNase R هر

اصلاح شده، شامل بازوهای هومولوگ و فاصله گذارهای با طراحی منطقی، توانست RNA یی را به طول ۵ کیلوباز را حلقوی سازد (شکل اطلاعات تکمیلی ۱.b).

اینترون کاتالیزوری آنابنا^۱ انتخاب مناسب تری برای حلقوی سازی است. ما همچنین استفاده از جایگزینی گروه I اینترون کاتالیزوری مربوط به pre-tRNA Anabaena بررسی کردیم (۲۰). در اینجا همان روش های بهینه سازی را که برای افزایش کارایی واکنش پیرایش اینترون فاز T4 پس و پیش شده استفاده کردیم، به کار بردیم. جالب اینجاست که طی این بهینه سازی های متوجه شدیم که تغییر اینترون کاتالیزوری T4 به اینترون کاتالیزوری آنابنا ممکن است منجر به ضعیف شدن یک کشش کوتاه بر هومولوژی درونی بین IRES و انتهای ۳' ناحیه کدینگ، شود که این امر خود ممکن است به شکل گیری حباب پیرایش جدا شونده کمک کند (شکل ۲.c، شکل ۳.a). تقویت هومولوژی داخلی نهایی، با استفاده از اینترون پس و پیش شده کاتالیزوری Anabaena، بازده اسپیلیسینگ را از ۸۴ به ۹۵ درصد افزایش داد (شکل ۲.c، d، داده های تکمیلی ۱). ما همچنین دریافتیم که استفاده از اینترون کاتالیزوری Anabaena منجر به کاهش ۳۷٪ circRNA برش خورده در مقایسه با اینترون کاتالیزوری T4 می شود (شکل ۲.d، e). با توجه به افزایش کارایی پیرایش و بازده circRNA سالم، ثابت شد سیستم PIE آنابنا مهندسی شده نسبت به سیستم T4 PIE کارایی بهتری دارد (شکل ۲.e، شکل ۲.a، داده های تکمیلی).

توالی های اتوکاتالیتیک با نواحی رمزگذار سازگار هستند. هومولوژی داخلی بین اگزون ۲ و توالی کد کننده GLuc باعث شده سیستم PIE بهینه شده آنابنا با نواحی بینابینی غیر-GLuc مداخله کننده ناسازگار باشد. بر اساس درکمان از پارامترهایی که بر کارایی پیرایش اینترون های گروه ۱ کاتالیتیک پس و پیش شده اثر می گذارند و به منظور سازگاری ساختار circRNA با حلقوی شدن کارآمد طیف وسیعی از توالی های RNA بینابینی طویل، دوباره یک جفت توالی فاصله گذار جدید، طراحی کردیم. این توالی های فاصله گذار با سه اولویت مهندسی شدند: (۱) با توالی های پروگزیمال اینترون و IRES غیر هومولوگ بوده

² unstructured
³ Firefly luciferase

¹ Anabaena: سیانوباکتر رشته ای

های تکمیلی ۱، شکل تکمیلی شکل (a.۴) (۲۶). بر این اساس دریافتیم که IRES مربوط به کوکساکسی ویروس B3^۱ (CVB3) ۱٫۵ برابر کارا تر از IRES مربوط به EMCV متداول سازگار با سلولهای HEK293 است (شکل a.۴). از آنجا که ساختارهای ثانویه، و به ویژه ناحیه کدینگ که مستقیماً در ادامه IRES است، نزدیک به IRES هستند (پروگزیمالند)، پتانسیل ایجاد اختلال در تاخوردگی و شروع ترجمه IRES را دارند. در ادامه همچنین توالی های IRES ویروسی متتخی را در ساختار فایر فلای لوسیفراز آزمایش کردیم. در حالی که همچنان IRES CVB3 از همه انواع دیگر IRES برتر بود، کارایی چندین IRES دیگر، که مهمترین آنها IRES مربوط به پولیوویروس^۲ است، به طرز چشمگیری تغییر یافت (شکل a.۴). پس از این آزمایش، بررسی کردیم که آیا اضافه کردن یک توالی polyA داخلی یا یک فاصله گذار polyAC به عنوان کنترل به توالی IRES، که نشان داده بود توانایی بالاتر بردن تولید پروتئین را از سطح پیش زمینه از circRNA مهندسی شده دارد، می تواند بیان پروتئین را تغییر می دهد. ما دریافتیم که هر دو توالی، بیان را در تمام سازه ها بهبود بخشیده اند، احتمالاً این امر ناشی از جداسازی بیشتر با یک توالی غیر ساختاری، بین شروع توالی IRES و تقاطع جایگاه پیرایش اگزون-اگزون است، که پیش بینی می شود برای ایجاد یک ساختار پایدار کمک می کند (شکل b.۴، شکل تکمیلی b.۴). این فاصله مازاد ممکن است ممانعت فضایی اتصال عامل شروع به ساختارهای IRES را کاهش دهد. در مورد EMCV و IRESهای پولیوویروس، توالی های با فاصله گذار پلی A بیان بیشتری نسبت به آنهایی داشتند که با فاصله گذار پلی AC اصلاح شده بودند. این ممکن است نشان دهد که اجتماع پروتئین های متصل شونده پلی آدنیلالات می تواند راندمان IRES را افزایش دهد. پس از انتخاب مؤثرترین ساختار polyA یا polyAC برای هر IRES، ما اثر IRES را در انواع مختلف سلول ها از جمله آدنوکارسینوم دهانه رحم انسانی^۳ (HeLa)، سرطان ریه انسان^۴ (A549) و سلولهای بتای نامیرای پانکراسی موش^۵ (Min6) بررسی کردیم. ما دریافتیم که اثر IRES بسته به نوع سلول متفاوت است، اما IRES مربوط به CVB3 در همه انواع تست شده بهتر

ساختار را به سلول های کلیوی جنینی انسان (HEK293) انتقال دادیم. انتقال circRNA گائسیا لوسیفراز (GLuc) یا فایرفلای لوسیفراز، منجر به تولید بالای پروتئین عملکردی شد که توسط لومینسانس اندازه گیری می شود (شکل های ۳، D، F). به همین ترتیب، توانستیم اریتروپوئیتین انسانی حاصل از انتقال circRNA اریتروپوئیتین را در محیط کشت سلولی تشخیص دهیم، و همچنین توانستیم فلوتورسانس eGFP حاصل از انتقال circRNA مربوط به eGFP را نیز مشاهده کنیم (شکل ۳، e، g). کو-ترانسفکشن circRNA مربوط به Cas9 با sgRNA هدایت شده بر ضد GFP به سلولهای HEK293 بیان کننده GFP، منجر به کاهش فلوتورسانس در ۹۷٪ از سلولها در مقایسه با کنترلی که فقط sgRNA داشت، شد (شکل ۳، h، شکل تکمیلی ۳، d، e). از آنجا که هضم با RNase R در واکنشهای اسپلایسینگ همواره کامل نیست و RNA پیشساز شامل IRES عملکردی است، یک جهش حذف جایگاه پیرایش در ساختار GLuc را برای اندازه گیری سهم احتمالی ناخالصی ها در بیان پروتئین ایجاد کردیم. هنگامی که مقادیر مساوی از واکنش های پیرایش هضم شده به واسطه RNase-R ترانسفکت شدند، این جهش حذف جایگاه پیرایش یک سطح پروتئین به سختی قابل ردیابی رو تولید می کند (شکل تکمیلی ۳، b، c).

توالی IRES مربوط به CVB3 در ساختار circRNA عملکرد بهتری دارد. برای تثبیت circRNA اگزوزن به عنوان یک جایگزین قابل اعتماد برای فناوری mRNA خطی موجود، مطلوب است که بیان پروتئین به حداکثر برسد. ترجمه مستقل از Cap با واسطه IRES می تواند سطوح مختلفی از کارایی را بسته به بافت سلولی نشان دهد و معمولاً وقتی که mRNA خطی دو-سیسترونی باشد، کمتر از ترجمه وابسته به Cap کارایی دارد (۲۳). به طور مشابه، دم polyA باعث تقویت و بهبود بهره وری در شروع ترجمه در mRNA خطی از طریق پروتئین های اتصال پلی آدنیلالات می شود (۲۴، ۲۵). با این حال کارایی توالی های مختلف IRES و دخول دم polyA در ساختار circRNA تا کنون بررسی نشده است. ما IRES مربوط به EMCV را با توالی UTR^۵ چندین نسخه ویروسی، که به طور بالقوه یا قطعی، حاوی IRES های شناخته شده هستند، و همچنین چندین توالی IRES دیگر، جایگزین کردیم (داده

¹ Coxsackie Virus B3

² Poliovirus

³ Human cervical adenocarcinoma

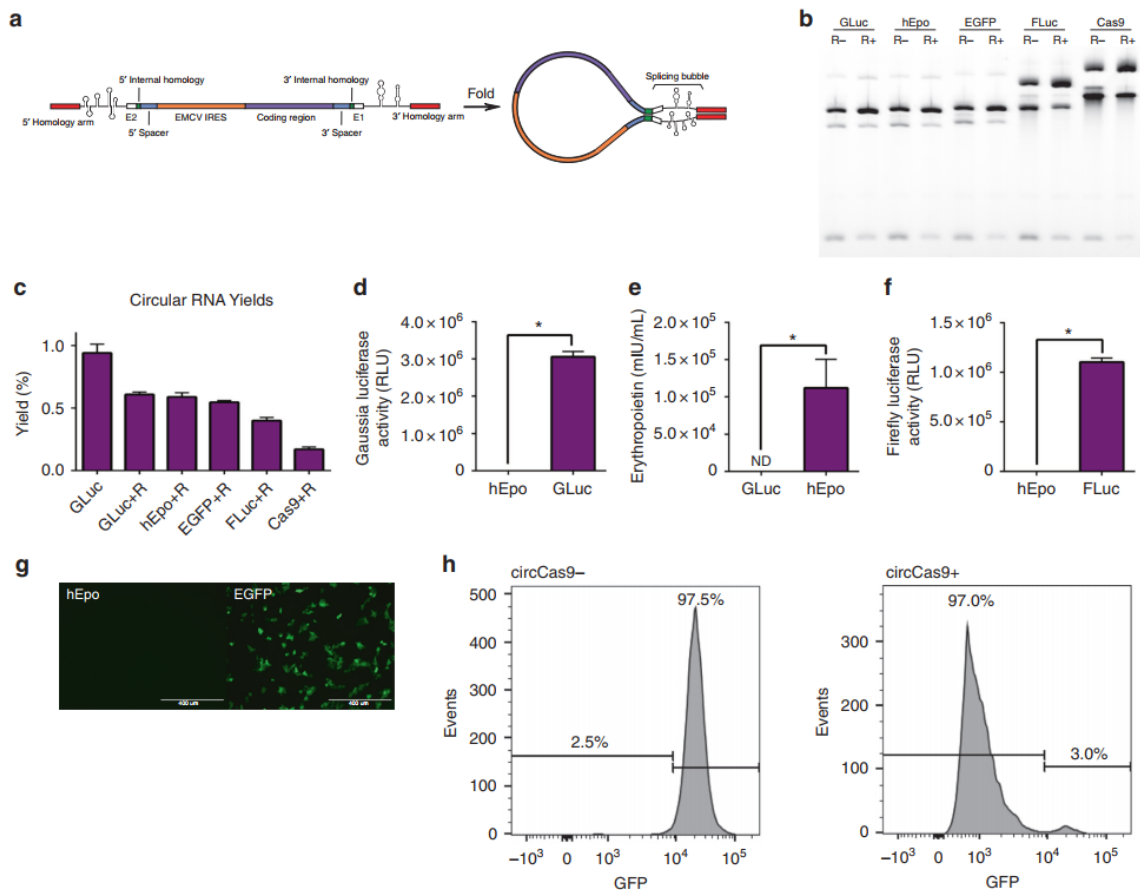
⁴ human lung carcinoma

⁵ immortalized mouse pancreatic beta cells

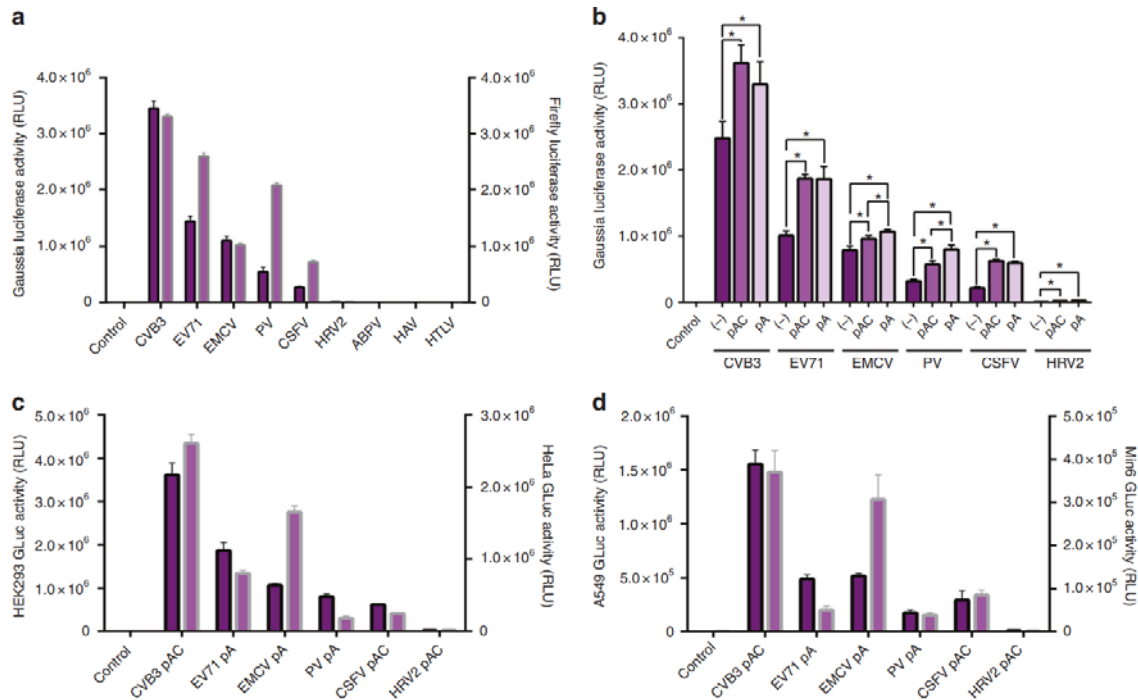
circRNA و جلوگیری از پاسخ ایمنی سلولی ذاتی است. نشان داده شده است که حذف dsRNA توسط HPLC، فعال سازی و پاسخ سیستم ایمنی بدن را از بین می برد و ترجمه IVT mRNA (In Vitro-Transcribed) اصلاح شده توسط نوکلئوزید خطی را بهبود می بخشد (۱۶).

بود (شکل ۴. c، d). حذف توالی های پروگزیمال یا دیستال نسبتاً کوتاه CVB3 IRES منجر به از دست رفتن چشمگیری بیان پروتئین می شود (شکل تکمیلی c.۴).

circRNA های حاصل از پیرایش می توانند با HPLC تخلیص شوند. خلوص circRNA حاصله یکی از عوامل ضروری دیگر برای به حداکثر رساندن تولید پروتئین از



شکل ۳ - بررسی تاثیر حلقوی شدن و ترجمه برای یک طیف از circRNA های کدکننده پروتئین تولید شده از RNA پیشساز مهندسی شده *de novo*. **a**. طرح نشان دهنده طراحی عناصر مهندسی شده RNA پیشساز خودپیرایش. **b** ژل آگارز پیشسازهای RNA شامل IRES یک ویروس انسفالومیوکاردیت (EMCV)، و همچنین نواحی کدینگ ۵ پروتئین مختلف شامل گانسیا لوسیفراز (GILuc) (طول کل: ۱۲۸۹ نوکلئوتید)، فایرفلای لوسیفراز (۲۳۴۸ نوکلئوتید)، eGFP (۴۵۱ نوکلئوتید)، اریتروپویتین انسان (۱۳۱۳ نوکلئوتید) و اندونوکلاز Cas9 (۴۹۳۴ نوکلئوتید) پس از حلقوی سازی و حلقوی سازی مجدد در فقدان RNase R (R-). circRNA ها با تخریب RNA های خطی به کمک تجزیه با RNase R (R+)، غنی می شوند. **c** بازده تقریبی circRNA ها حاصل از تیمار ۲۰ میکروگرم محصول پیرایش با RNase R، که توسط اسپکتروفتومتری ارزیابی شده است (۳ تکرار). **d** لومینسانس در سوپرناتانت سلول های HEK293 ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با circRNA کدکننده برای GLuc (۴ تکرار). **e** بیان اریتروپویتین انسانی در سوپرناتانت سلول های HEK293 ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی (تلقیح) با circRNA کدکننده hEpo که توسط ساندریج (فاز جامد) ELISA ارزیابی شده است (۴ تکرار). **f** لومینسانس در لیز سلول های HEK293 ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن (تلقیح) با CircRNA رمزگذار FLuc (۴ تکرار). **g** فلورسانس GFP در سلول های HEK293 ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن (تلقیح) با circRNA کدکننده EGFP (اسکیل بار: ۴۰۰ میکرومتر). **h** آنالیز FACS (دسته بندی سلول های فعال فلوروسنس) نشان دهنده کاهش GFP در سلول های HEK293-EF1a-GFP ۴ روز پس از ترا آلائی با sgGFP به تنهایی (circCas9-) و یا به همراه circRNA رمزگذار Cas9 (circCas9+). نشانگر ظاهر جمعیتی از سلول های GFP منفی است. (تمام داده های ارائه شده به عنوان میانگین + SD، * p < 0.05 (آزمون Welch))

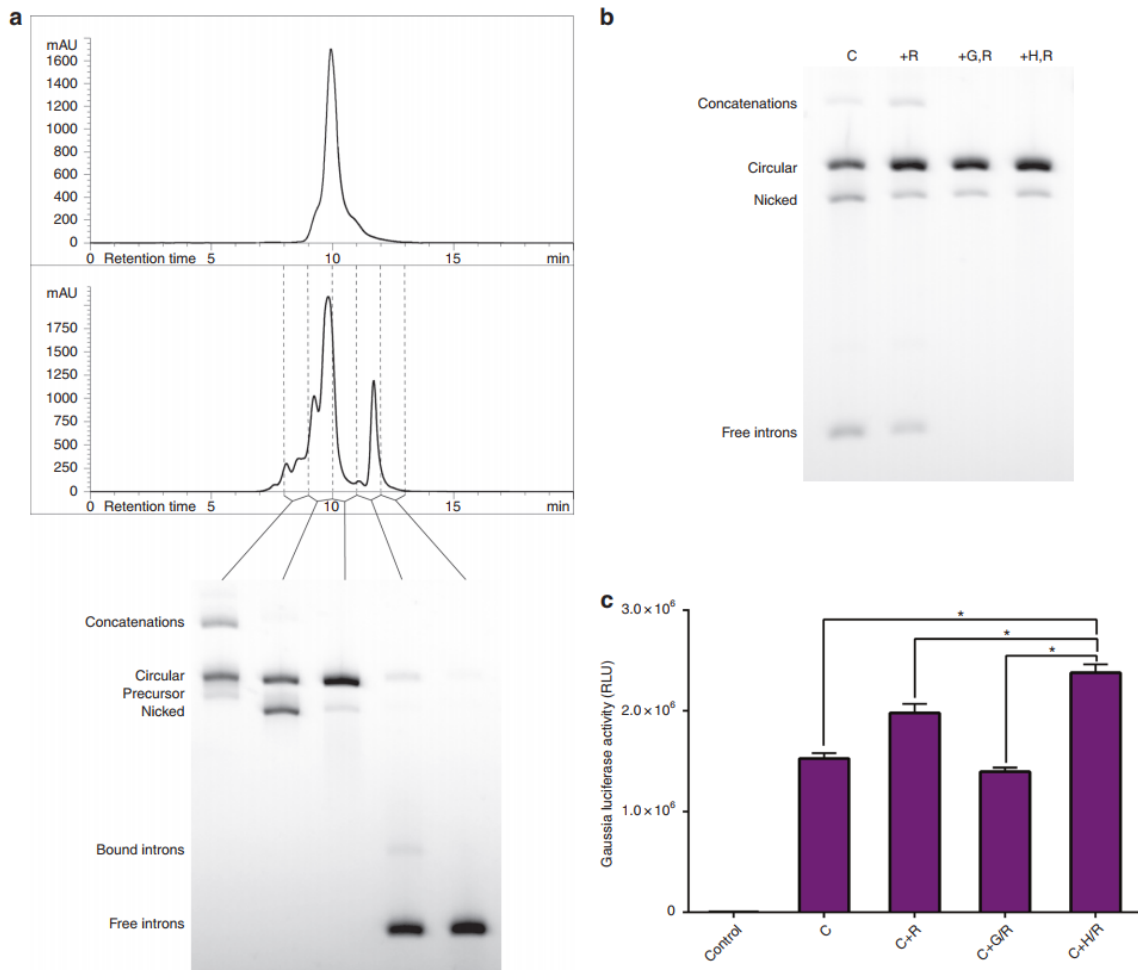


شکل ۴ - کارایی IRES در سلول ها و ساختارهای توالی های مختلف. **a** لومینسنس در سوپرناتانت سلول های HEK293 ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با *circRNA* حاوی پنبلی از توالی های ویروسی UTR IRES ۵' در ساختار های GLuc (ستون سمت چپ، بنفش تیره با حاشیه سیاه) و FLuc (ستون سمت راست، بنفش روشن با حاشیه خاکستری). **b** لومینسنس در سوپرناتانت سلول های HEK293 ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با *circRNA* حاوی یک توالی پلی (۳۰)A یا یک توالی فاصله گذار پلی (۳۰)AC اضافه شده که IRES را از محل (تقاطع) پیرایش جدا (یا دور) می کند. (-): بدون فاصله گذار. PAC: فاصله گذار ۳۰ نوکلئوتید شامل ادنوزین ها و سیتوزین ها. PA: فاصله گذار ۳۰ نوکلئوتیدی واجد آدنوزین ها. **c** لومینسنس سوپرناتانت سلول های HEK293 (ستون سمت چپ، بنفش تیره با حاشیه سیاه) و سلول های HeLa (ستون سمت راست، بنفش روشن با حاشیه خاکستری) ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با موثرترین *circRNA* IRES هایی که در (b) تعیین شده اند. **d** لومینسنس سوپرناتانت سلول های A549 (ستون سمت چپ، بنفش تیره با حاشیه سیاه) و سلول های Min6 (ستون سمت راست، بنفش روشن با حاشیه خاکستری) ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با موثرترین *circRNA* IRES هایی که در (b) تعیین شده اند (کلیه داده های ارائه شده به عنوان میانگین + SD، n = 4، p < 0.05 * آزمون t Welch).

دست یابیم (شکل ۵، a، b). در هر دو مورد، تخلیص را با استفاده از تیمار RNase R انجام دادیم تا بیشتر RNA بریده شده و شکسته را از بین ببریم. هنگامی که بیان پروتئین محصولات پیرایش هضم شده با RNase-R را که در آنها *circRNA* با استفاده از استخراج از ژل یا HPLC تخلیص شده مقایسه کردیم، فهمیدیم که تخلیص با استفاده از HPLC روشی بهتر نسبت به تخلیص با RNase R به تنهایی است (شکل ۵، b، c).

با این حال، هیچ روش دقیقی برای تخلیص *circRNA* ها از محصولات جانبی IVT و واکنش های حلقوی سازی که ممکن است شامل dsRNA ها و تری فسفات-RNA هایی باشند (درگیرکننده حسگرهای RNA و القای واکنش ایمنی سلولی)، گزارش نشده است (۱۶). با این حال در حالی که اجتناب کامل از *circRNA* شکسته^۱ به دلیل تجزیه خفیف در طی پردازش غیر قابل تحقق بود، توانستیم با استفاده از استخراج ژل برای مقادیر اندک و جداسازی بر حسب اندازه با HPLC برای مقادیر بیشتر محصولات پیرایش، به خلوص قابل ملاحظه ای (۹۰٪ حلقوی، ۱۰٪ شکسته)

^۱nicked

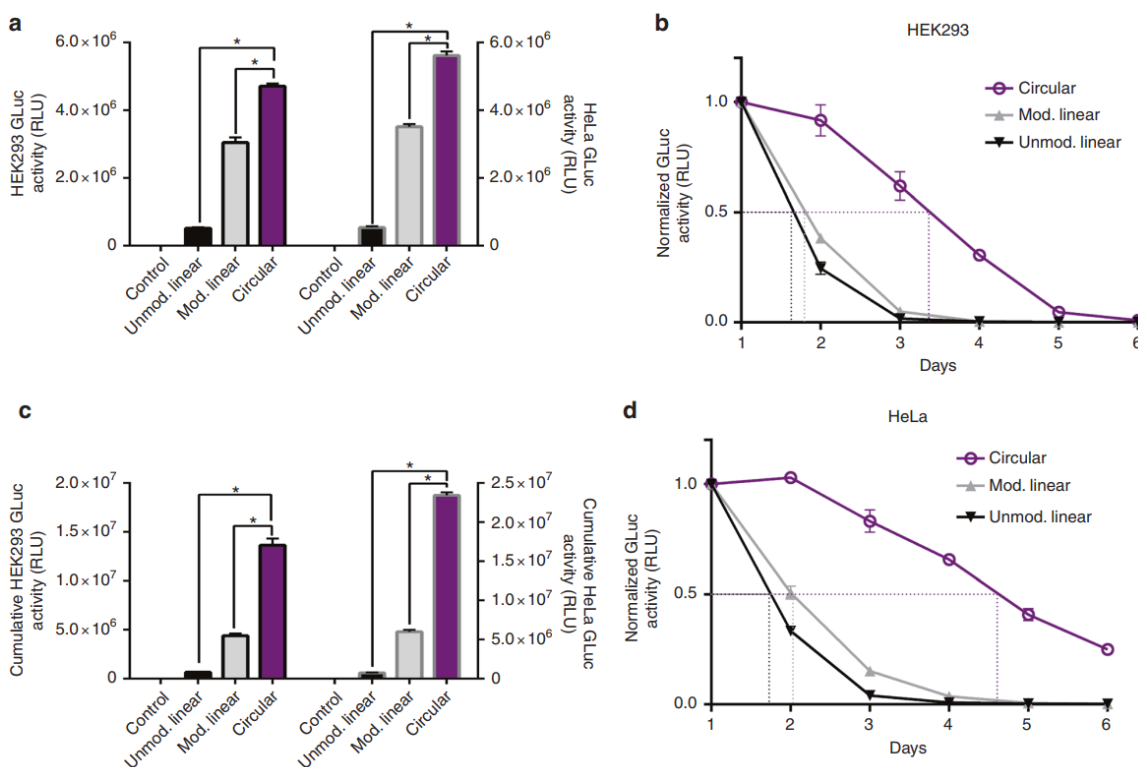


شکل ۵ - تخلیص circRNA حاصل از پیرایش با استفاده از HPLC. **a** کروماتوگرام HPLC از GLuc RNA خطی (بالا) و محصول پیرایش CVB3-GLuc-pAC (وسط). قطعات گردآوری شده ژل آگارز (پایین). **b** ژل آگارز CVB3-GLuc-pAC با روشهای مختلف تخلیص شد. C: واکنش پیرایش. +R: واکنش پیرایش تیمار شده با RNase R. +G,R: محصول واکنش پیرایش از ژل استخراج شده و سپس با RNase R تیمار شده. +H,R: محصول واکنش پیرایش با HPLC تخلیص شده و سپس با RNase R تیمار شده. **c** لومینسانس در سوپرناتانت سلولهای HEK293 ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با محصولات پیرایش CVB3-GLuc-pAC تخلیص شده با روشهایی که در شکل **b** اشاره شده است (داده های ارائه شده به عنوان میانگین + SD, $p < 0.05$ * (آزمون Welch t)).

mRNA خطی GLuc یک نوکلئوزید تجاری مدیفای شده (متعلق به کمپانی Trilink) (با نوکلئوزیدهای اصلاح شده سودو یوریدین و ۵-متیل سیتوزین) مقایسه کردیم. تولید پروتئین که توسط لومینسانس ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی مورد ارزیابی قرار گرفت نشان داد که circRNA معادل ۱۱,۲٪ پروتئین بیشتری نسبت به mRNA خطی اصلاح نشده در این زمان اولیه در سلولهای HEK293 تولید می کند (شکل ۶.a). جالب توجه است، circRNA همچنین ۵۴,۵٪ پروتئین بیشتر از mRNA اصلاح شده تجاری تولید

تولید پروتئین circRNA با mRNA خطی قابل رقابت است. تا کنون مشخص نبوده که آیا کارایی ترجمه سلولی circRNA برون زاد با mRNA خطی متناظر آن قابل مقایسه است، و آیا تولید پروتئین circRNA تفاوت هایی در پایداری دارد یا خیر. با استفاده از circRNA مهندسی شده تخلیص شده با HPLC، ثبات و عملکرد circRNA کد کننده گائسیا لوسیفراز (CVB3-GLuc-pAC) با مقادیر یکسان از mRNA خطی GLuc که کلا هک ۵' متیل گوانوزین و دم پلی A ۳' اصلاح نشده دارد و همچنین مقادیر یکسان از

می‌کند. این نشان می‌دهد که اصلاحات نوکلئوزید برای تولید پروتئین قوی از circRNA ضروری نیست. نتایج مشابهی در سلولهای HeLa (شکل ۶.a) و با استفاده از circRNA بهینه کد کننده برای پروتئین اریتروپویتین انسانی در مقایسه با mRNA خطی اصلاح شده با ۵- متوکسی یوریدین به دست آمد (شکل تکمیلی ۵. a، b). داده های لومینسانس گرد آوری شده طی ۶ روز نشان داد که تولید پروتئین از circRNA نسبت به mRNA خطی در سلولهای HEK293 بیشتر است، با circRNA نیمه عمر تولید پروتئین از ۸۰ ساعت است، در حالی که نیمه عمر تولید پروتئین از mRNA خطی اصلاح نشده و اصلاح شده به ترتیب تقریباً ۴۴ و ۴۹ ساعت بود (شکل ۶.d).



شکل ۶ - کارایی ترجمه از circRNA در مقایسه با mRNA خطی. **a** لومینسانس سوپرناتانت سلولهای HEK293 (چپ، خط بیرونی سیاه) و سلولهای HeLa (راست، خط بیرونی خاکستری) ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با circRNA CVB3-GLuc یا mRNA خطی ژن Gluc اصلاح شده یا اصلاح نشده (n = 4 HEK293, n = 3 HeLa). **b** لومینسانس سوپرناتانت سلولهای HEK293 از ۲۴ ساعت پس از ترا آلائی با circRNA کدکننده CVB3-GLuc-pAC یا mRNA خطی ژن Gluc - اصلاح شده با متوکسی یوریدین یا اصلاح نشده که تا مدت ۶ روز ادامه می‌یابد (۴ تکرار). **c** لومینسانس تجمعی نسبی بیش از ۶ روز توسط سلولهای HEK293 (چپ، خط بیرونی سیاه) و سلولهای HeLa (راست، خط بیرونی خاکستری) ترآلوده شده با circRNA کدکننده CVB3-GLuc-pAC یا mRNA خطی ژن Gluc اصلاح شده یا اصلاح نشده (n = 4 HEK293, n = 3 HeLa). **d** لومینسانس در سوپرناتانت سلولهای HeLa از ۲۴ ساعت پس از انتقال با circRNA رمزگذار CVB3-GLuc-pAC یا mRNA خطی ژن Gluc - اصلاح شده که به مدت ۶ روز ادامه می‌یابد (۳ تکرار). (کلیه داده های ارائه شده به عنوان میانگین + SD, * p < 0.05 (آزمون Welch t))

اصلاح شده) مورد استفاده در این مطالعه، تولید کند. این شواهد نشان می‌دهد که circRNA دارای پتانسیل مناسبی برای جاگزینی mRNA در بیان پایدار پروتئین است. با این حال، باید کار بیشتری انجام شود تا به طور کامل پتانسیل‌های استفاده از circRNA در کاربردهای درمانی و غیر درمانی از جمله بهینه سازی بیشتر ترجمه پروتئین از circRNA و یک مطالعه جامع در مورد کارایی ترجمه و پایداری circRNA در سایر انواع و بافتهای سلولی بررسی شود. برش و شکست circRNA های طولی مشاهده شده طی فرآیند تولید circRNA ها (شکل ۲. a تکمیلی) که احتمالاً توسط اتوهیدرولیز به واسطه منیزیم (۲۸)، انجام می‌شود، به طور قابل توجهی بازده پیرایش را کاهش می‌دهد و نقص دیگری است که نیاز به بهبود دارد. circRNA های طولی‌تر با توجه به اندازه‌شان فرصت بیشتری برای اتوهیدرولیز پیدا می‌کنند. این تخریب برای circRNA نسبت به RNA خطی مشهودتر است زیرا تنها یک برش در circRNA به صورت یک تک باند بر روی ژل آشکار می‌شود، در حالی که تک برش های RNA خطی به شکل اسمیر در طیف وسیعی از وزنه‌های مولکولی پخش می‌شود. این پدیده در شکل ۳. b، چاهک (FLUC, R-)، و همچنین چندین چاهک دیگر) قابل مشاهده است. دو باند اصلی در این چاهک وجود دارد، باند بالایی نشان دهنده circRNA دست نخورده است در حالی که باند اصلی پایین نشان دهنده circRNA برش خورده است. هیچ اسمیری اطراف باند circRNA دست نخورده دیده نمی‌شود، در حالی که اسمیر در اطراف باند circRNA برش خورده قابل مشاهده است. باند circRNA برش خورده نشان دهنده برش های منفردی است که در موقعیتهای تصادفی در یک circRNA برش نخورده اتفاق می‌افتد، در حالی که اسمیری که از آن باند منشا می‌یابد، نشان دهنده برش های اضافی است که در موقعیتهای تصادفی در circRNA خطی شده رخ می‌دهد؛ بنابراین این برش باعث شکل‌گیری محصولات با وزن های مولکولی مختلف می‌شود. انتظار نداریم که برش circRNA، چالشهایی فراتر از چالش های حفظ پایداری RNA خطی در محلول و در طول پردازش، ایجاد کند.

اخیراً نشان داده شده است که تراژائی سلول‌ها با circRNA برون زاد منجر به فعال شدن محصولات ژن ضد ویروسی

در اینجا نیز افزایش قابل ملاحظه تولید پروتئین توسط circRNA در طول عمر آن، در مقایسه با هر دو mRNA های خطی اصلاح نشده و اصلاح شده دیده می‌شود (شکل ۶. c). ما این بیان افزایش یافته یا با ثبات را حتی در یک پیش ساز circRNA کلاهدار و پلی آدینله شده، حاوی کلیه توالی‌های جانبی نیز مشاهده نکردیم (شکل تکمیلی ۶. a, b).

بحث

دستیابی به تولید پروتئین پایدار از mRNA برون زاد یک هدف دیرینه در بیوتکنولوژی mRNA است. تلاش های قبلی برای افزایش پایداری mRNA پیشرفت های اندکی داشته است (۱۰، ۱۳-۱۶). امکان سازگاری RNA حلقوی به منظور افزایش پایداری mRNA به علت کارایی پایین تولید circRNA ها، دشواری تخلیص circRNA ها و بیان ضعیف پروتئین توسط آن‌ها تا کنون نادیده گرفته شده است. در واقع، این ها موانعی هستند که باید پیش از ارزیابی کامل ثبات تولید پروتئین از circRNA به طور کامل برطرف شوند. پیش از این، سیستم مبتنی بر اینترون کاتالیتیک گروه ۱ پس و پیش شده برای حلقوی کردن طیف گسترده ای از توالی های RNA کوتاه در شرایط آزمایشگاهی استفاده شده است؛ گزارش شده است که کارایی حلقوی سازی در RNA های بین ۵۸ و ۱۲۴ نوکلئوتید به ۹۰٪ می‌رسد (۲۰، ۲۱). RNA های طولانی تر (حداکثر تا ۱،۵ کیلوباز) به تازگی با استفاده از همین روش حلقوی شده اند، اما بازده circRNA های مربوط به این ساختار ها گزارش نشده است (۲۷). سیستم مبتنی بر اینترون کاتالیتیک گروه ۱ پس و پیش شده مهندسی شده که در اینجا شرح داده شده، اجازه می‌دهد توالی هایی به طول حتی تا ۵ هزارباز حلقوی شوند، که به طور قابل توجهی طولی‌تر از توالی‌های قبلاً گزارش شده است. علاوه بر این، ما می توانستیم کارایی حلقوی سازی را، برای طیف وسیعی از نواحی رمزگذار دخولی با ترکیب توالی متنوع، تقریباً به ۱۰۰٪ برسانیم. همچنین نشان دادیم که circRNA بهینه سازی شده، قادر به تولید مقادیر زیادی پروتئین است و همچنین می‌تواند با استفاده از HPLC به طور موثری تخلیص شود. سرانجام، نشان دادیم که circRNA می تواند مقادیر بیشتری از پروتئین را مدت زمان طولانی‌تر نسبت به RNA های خطی (اصلاح نشده و

نواحی فاصله‌گذار، بازوهای هومولوگ و سایر تغییرات جزئی با استفاده از کیت جهش‌زایی هدفمند Q5 (Biolabs New England) ایجاد شدند. پرایمرهای استفاده شده در فایل جداگانه ای ارائه شده اند.

طراحی circRNA و تخلیص آن. ساختار RNA با استفاده از RNAfold پیش بینی شد (۱۸). mRNA خطی ژن Gluc اصلاح شده از Trilink Biotechnologies خریداری شد و شامل ناحیه کدینگ GLuc بهینه سازی شده، و یک منطقه اختصاصی مصنوعی 5' UnTranslated Region، و یک آلفا گلوبین 3' untranslated region، یک کپ، یک دم پلی A ۱۲۰ نوکلئوتیدی و جایگزینی کامل یوریدین و سیتوزین در کل mRNA با pseudouridine و ۵ متیل سیتوزین است. mRNA ژن hEpo اصلاح شده نیز از بیوتکنولوژی Trilink تهیه شد و از نظر ساختاری با mRNA Trilink Gluc یکسان بود، به جز اینکه با 5-methoxyuridine اصلاح شده و منطقه رمزگذار برای اریتروپویتین انسانی اصلاح شد. RNA خطی اصلاح نشده شامل یک ناحیه رمزگذار GLuc یا hEpo بود اما مناطق خاص ترجمه نشدنی (UTR) را شامل نمی‌شد. پیش سازهای mRNA خطی اصلاح نشده یا circRNA با رونویسی در شرایط *in vitro* از یک الگوی DNA پلاسمیدی خطی با استفاده از یک کیت سنتز RNA با بازده بالا T7 (Biolabs New England) ساخته شدند. پس از رونویسی در شرایط *in vitro*، واکنش دهنده‌ها به مدت ۲۰ دقیقه تحت تیمار DNase I (New England Biolabs) قرار گرفتند. پس از تیمار با DNase، mRNA خطی اصلاح نشده با استفاده از کیت کیلن آپ رونویسی MEGAclean (Ambion) با ستون تخلیص شد. سپس RNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C گرم شد و بلافاصله به مدت ۳ دقیقه روی یخ قرار گرفت و پس از آن RNA با استفاده از mRNA cap-2'-O methyltransferase (NEB) و آنزیم کیپینگ واکسینیا (NEB)، تحت دستورالعمل سازنده، کلاهدک گذاری شد. با استفاده از E. coli PolyA Polymerase (NEB) مطابق دستورالعمل سازنده، دم‌های پلی آدنوزین به رونوشت خطی اضافه شدند و mRNA کاملاً پردازش شده با ستون تخلیص شد. برای circRNA، پس از تیمار با DNase، GTP تا غلظت نهایی ۲ میلی مولار اضافه شد و سپس واکنش دهنده‌ها در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه گرم شدند. سپس RNA به روش ستونی تخلیص شد.

مانند OAS، PKR و RIG-I می‌شود و احتمالاً RIG-I مؤلفه اصلی مسئول پاسخ سلول در برابر circRNA است (۲۷). در ادامه ما مراتب آماده سازی circRNA خود را برای بررسی این که پاسخ سیتوکینی IFN- α و IL-6 در سلول‌های A549 نسبت به گروه کنترل ناترا آلوده مشاهده کردیم، اگرچه این پاسخ با پاسخ مربوط به mRNA های خطی اصلاح نشده قابل مقایسه بود (شکل تکمیلی شکل a۷). همچنین یک القاء ۳۰ برابری از IFN- β ۱ و یک القاء ۳ برابری از رونوشت های RIG-I پس از ترا آلائی سلول‌های HeLa با circRNA، در مقایسه با ترا آلائی مُک^۱ (شکل تکمیلی b.۷) انجام شد. مشاهده کردیم اثر القای ۳ برابری mRNA RIG-I به طور قابل توجهی کمتر از القاء ۵۰۰ برابری بود که توسط چن و همکاران در سلول های HeLa (۲۷) گزارش شده است و برای سرکوب ترجمه پروتئین و پایداری بیان پروتئین از circRNA در این محتوای سلولی کافی نبود (شکل d.۶). تفاوت‌های مشاهده شده در فعال سازی RIG-I را می توان به تفاوت در ساختار طراحی و روش‌های تخلیص circRNA نسبت داد. برای سرکوب بیشتر یک پاسخ ایمنی در مقابل circRNA، روش‌هایی مانند اصلاح نوکلئوزید به طور بالقوه می‌تواند در طراحی circRNA گنجانیده شود (۱۳، ۱۶). همچنین تجزیه و تحلیل بیشتری برای بررسی ایمنی زایی circRNA آگزوزن در زمینه کارکردهای بالقوه، مورد نیاز است.

سرانجام، نشان دادیم که در شرایط آزمایشگاهی، circRNA با استفاده از یک واکنشگر ترا آلائی لیپیدی کاتیونی به خوبی سلول‌های هدف منتقل می‌شود. با این حال، تحقیقات تکمیلی در مورد ابزار مناسب برای تحویل circRNA در شرایط *in vitro* و *in vivo* مورد نیاز است.

روش‌ها

کلونینگ و جهش‌زایی. توالی رمزگذار پروتئین، گروه I اینترون‌های خودپیرایشی و توالی‌های IRES به روش شیمیایی سنتز شدند (Integrated DNA Technologies) و در یک حامل پلاسمیدی خطی شده با PCR که حاوی توالی پروموتری T7 RNA پلیمراز است توسط روش گیبسون اسمبلی و با استفاده از کیت اسمبلی NEBuilder HiFi DNA (متعلق به شرکت New England Biolabs) کلون شده‌اند.

عبارت است ترانسفکشن بدون دی ان ای به منظور بررسی Mock transfection^۱ اثر بالقوه ترانسفکشن (مترجم)

جمع آوری شد. قطعات RNA حاصله با آمونوم استات ۵ مولار رسوب داده شدند، مجدد در آب حل شدند و سپس در بعضی موارد با RNase R همان طور که در بالا توضیح داده شد تیمار شدند.

آنالیز برش با RNase H. واکنش های پیرایشی circRNA با RNase R غنی می شوند و سپس با ستون، تخلیص می شوند و در ۶۵°C به مدت ۵ دقیقه با حضور یک پروب DNA (داده های تکمیلی ۱) در مقدار اضافی پنج برابر مولار، گرم می شوند و سپس در دمای اتاق aneal خواهند شد. واکنش دهنده ها با RNase H (Biolabs) در بافر واکنش ارائه شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار می شوند. RNA پس از هضم از ستون شسته می شود.

رونویسی معکوس و سنتز cDNA. برای توالی یابی مجاورت محل پیرایش، circRNA حاصل از واکنش های پیرایش با RNase R تغلیظ شده و سپس برای تخلیص با ستون در ۶۵°C به مدت ۵ دقیقه گرم شدند و به مدت ۳ دقیقه روی یخ سرد شدند تا ساختار ثانویه استاندارد را ایجاد کنند. واکنش رونویسی معکوس با Superscript IV (Invitrogen) انجام شد، همان طور که توسط سازنده با استفاده از یک پرایمر اختصاصی برای یک ناحیه داخلی circRNA توصیه شده است. محصول PCR برای توالی یابی با استفاده از Q5 پلیمرز (New England Biolabs) و یک جفت پرایمر پوشاننده اسپلایس جانکشن سنتز شد.

کشت بافت و ترا آلائی. سلول های HEK293، HEK293-GFP، HeLa و A549 (ATCC) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ در محیط کشت اصلاح شده Eagle Dulbecco (گلوکز ۴۵۰۰ میلی گرم در لیتر) با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco, hiFBS) غیرفعال شده با حرارت و پنی سیلین / استریتومایسین کشت داده شدند. سلول های HEK293 و HeLa برای مایکوپلازما منفی آزمایش شدند. به محیط Min6 (هدیه ای از گوردون C. وایر، مرکز دیابت Josos) علاوه بر این با ۵٪ hiFBS، 20 میلی مول HEPES (گیبکو) و محلول بتا-مراکاپتواتانول ۵۰ میکرومولار (BioRad) اضافه شد. سلول ها هر ۲-۳ روز پاساژ داده شدند. برای کلیه مجموعه های داده های circRNA ارائه شده در شکل ۲ به جز Cas9، 40-100 ng از محصولات پیرایش تیمار شده RNase R یا circRNA های تخلیص شده با HPLC به صورت معکوس به ۰۰۰،۱۰ سلول HEK293 /

در بعضی موارد، RNA خالص شده به صورت مجدد تحت شرایط حلقوی شدن قرار گرفت: RNA به مدت ۵ دقیقه تا ۷۰°C گرم شد و سپس بلافاصله به مدت ۳ دقیقه در یخ قرار گرفت و پس از آن GTP به غلظت نهایی ۲ میلی مولار به همراه بافر شامل منیزیم (50mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5; New England Biolabs) اضافه شد. در مرحله بعد RNA به مدت ۸ دقیقه تا ۵۵°C گرم شد و سپس با ستون تخلیص شد. برای تغلیظ CircRNA، 20 میکروگرم RNA در آب رقیق شد (۸۶ میکرولیتر نهایی) و سپس در ۶۵°C به مدت ۳ دقیقه گرم شد و در نهایت و به مدت ۳ دقیقه روی یخ سرد شد. ۲۰ واحد RNase R و ۱۰ میکرولیتر از بافر ۱۰ × RNase R (Epicenter) اضافه شد، و واکنش در ۳۷°C به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. ۱۰ واحد RNase R دیگر نیز در میانه واکنش اضافه شد. RNA هضم شده با RNase با ستون تخلیص جدا شد. RNA روی ژل های آگارز ۲٪ E-gel EX2 (Invitrogen) روی iBase E-gel (Invitrogen) با استفاده از برنامه E-gel EX 1-2 جدا و تفکیک شد. لدر (ssRNA (NEB) به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. ما با استفاده از دیگر سیستم های ژل آگارز قادر به جداسازی مناسب circRNA نبودیم. باندها با استفاده از transillumination نور آبی مشاهده شدند و با استفاده از ImageJ کمی شدند. تصاویر ژل آگارز پردازش نشده در شکل تکمیلی ۸ موجود است. تصاویر ژل آگارز پردازش نشده از جمله لدر های مربوط به ژل های شکل های ۱ و ۲، در شکل تکمیلی ۹ موجود است. برای استخراج ژل، باند های مربوط به circRNA از ژل خارج شدند و سپس با استفاده از کیت استخراج RNA ژل Zymoclean (Zymogen) استخراج شدند. برای کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، ۳۰ میکروگرم RNA در ۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه گرم شد و سپس به مدت ۳ دقیقه روی یخ قرار گرفت. RNA از طریق ستون جداسازی بر اساس اندازه ۴،۶× 300mm میلی متر با اندازه ذرات ۵ میکرومتر و اندازه منافذ ۲۰۰ (Sepax Technologies؛ تعداد قطعه: P-4630۲۱۵۹۸۰) بر روی HPLC سری ۱۱۰۰ Agilent در بافر RNase-free TE (۱۰ میلی متر تریس، ۱ میلی متر EDTA، pH: 6) با سرعت جریان ۰،۳ میلی لیتر در دقیقه ران شد. RNA با جذب اشعه ماوراء بنفش در ۲۶۰ نانومتر نوری تشخیص داده شد، اما بدون این که تحت تابش اشعه ماوراء بنفش قرار گیرد،

سازنده تشخیص داده شد به جز سوپرناتانت سلولی که ۲۴ ساعت بعد از ترا آلائتی استفاده شد و نمونه ها قبل از استفاده ۱: ۲۰۰ رقیق شدند. Interferon- α و interleukin 6 با روش ایمونوآسی Fireplex (Abcam) تشخیص داده شدند.

فلوسایتومتري. خاموشی GFP با واسطه CRISPR-Cas9 با فلوسیتومتري جریان ۹۶ ساعت پس از ترا آلائتی تشخیص داده شد. سلولهای کنترل HEK293-GFP و HEK293 در محیط اصلاح شده Dulbecco (۴۵۰۰ mg / L گلوکز) با ۱۰٪ سرم جنینی گاو و پنی سیلین / استرپتومایسین تریپسینه شدند و به حالت تعلیق درآمدند. سلولها سپس دو بار در بافر FACS (PBS، ۵٪ سرم جنینی گاو غیر فعال شده با گرما) شسته شدند و در بافر FACS حاوی Sytox Blue Dead Cell Stain (ترمو فیشر) طبق دستورالعمل های سازنده، یا بافر FACS به تنهایی برای GFP و کنترل های خالی دوباره تعلیق شدند. فلوئورسانس برای ۱۰۰۰۰۰ رویداد بر روی یک فلوسیتومتر جریان BD FACS Celesta (BD Biosciences) تشخیص داده شد. داده ها در Flowjo (Flowjo LLC) تجزیه و تحلیل شد.

رونویسی معکوس و qPCR. در مجموع ۵۰،۰۰۰ سلول HeLa با ۲۰۰ نانوگرم از GLuc circRNA یا mRNA خطی اصلاح شده به طور معکوس ترالوده شدند. سلولها شسته شدند و RNA پس از ترا آلائتی با استفاده از کیت RNeasy Mini Plus (Qiagen) طبق دستورالعمل های سازنده، ۲۴ ساعت بعد، برداشت و تخلیص شدند. سنتز cDNA رشته اول از RNA کل با کیت رونویسی معکوس cDNA با ظرفیت بالا با استفاده از هگزامرهای تصادفی انجام شد (ترمو فیشر علمی). پرایمرهای TaqMan اختصاصی ژن به عنوان Assay-on-Demand از (Thermo Fisher Scientific)، GAPDH (Hs99999905_m1)، IFN- β 1 (Hs01077958_s1) خریداری شدند. واکنش qPCR با استفاده از ابزار LightCycler 480 Probe Master (Roche) Mix (Roche) و ابزار انجام شد. برای هر نمونه، واکنش real-time PCR به صورت دوتایی انجام شد و میانگین مقادیر چرخه آستانه (Ct) به دست آمده برای محاسبات بیشتر با استفاده از روش مقایسه Ct مورد استفاده قرار گرفت. سطح بیان ژن با سطح بیان ژن هاوس کپینگ GAPDH نرمالایز شد.

100 میکرولیتر در هر چاهک از یک پلیت ۹۶ تایی با استفاده از لیپوفکتامین MessengerMax منتقل شدند. برای Cas9، 100 نانوگرم از sgRNA رونویسی شده در شرایط *in vitro*، به صورت معکوس به تنهایی، و همراه با ۱۵۰ نانوگرم محصول پیرایش Cas9 تیمار شده با RNase استفاده از MessengerMax به ۵۰،۰۰۰ سلول HEK293-GFP 500uL / در هر چاهک از یک پلیت ۲۴ چاهکی منتقل شد. برای کلیه مجموعه داده های RNA ارائه شده در شکل ۳، مقادیر مساوی از هر RNA (معادل ۴۰ تا ۸۰ نانوگرم بسته به طول RNA) به طور معکوس به ۱۰،۰۰۰ سلول HEK293 ، HeLa یا A549 / 100 UL در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شدند. برای آزمایشاتی که بیان پروتئین در نقاط زمانی مختلف مورد بررسی قرار گرفت، محیط ها در زمان های مشخص به طور کامل حذف و جایگزین شدند. سلولهای Min6 در پلیت های ۹۶ چاهکه بین ۶۰-۸۰٪ ترانسفکت شدند. اندازه نمونه ها بر اساس آزمایشات پایلوت برای تعیین واریانس سنجش و به حداقل رساندن مصرف واکنش دهنده ها به نحوی که بتواند تفاوت معنی دارو قابل تشخیصی ایجاد کند، انتخاب شدند.

آنالیز بیان پروتئین. برای سنجش لومینسانس، سلولها و محیطها ۲۴ ساعت پس از ترا آلائتی گردآوری شدند. برای تشخیص لومینسانس از لوسیفراز گائسیا، ۱۰-۲۰ میکرولیتر از محیط کشت بافت به یک پلیت صاف و سفید با دیوار صاف (کورنینگ) منتقل شد. ۲۵ میکرولیتر از معرف BioLux Gaussia Luciferase (New England Biolabs) شامل تثبیت کننده به هر نمونه اضافه شد و میزان لومینسانس بر روی یک میکروپلیت ریدر 200Pro Infinite (Tecan) پس از ۴۵ ثانیه اندازه گیری شد. برای تشخیص لومینسانس از Firefly لوسیفراز، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Bruc-Glo Luciferase (Promega) به هر چاهک اضافه شد، و مخلوط به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و مخلوط معرف لوسیفراز به یک صفحه صاف و کف دیواره سفید منتقل شده و همان طور که در بالا توضیح داده شد، لومینسانس اندازه گیری شد. فلوئورسانس GFP ۲۴ ساعت پس از ترا آلائتی شناسایی شد و تصاویر با استفاده از یک تصویرگر سلول EVOS FL (Invitrogen) گرفته شد. اریتروپویتین توسط ساندویچ فاز جامد ELISA (R&D Systems) اساساً مطابق دستورالعمل

$P < 0.05$. برای کلیه مطالعات، داده های ارائه شده نماینده یک آزمایش مستقل است.

محاسبات آماری. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از آزمون t زوج و بدون زوج Welch انجام شد، با فرض واریانس نابرابر. اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد که

منابع

- Barrett, S.P. & Salzman, J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* **143**, 1838-1847, (2016).
- Chen, L.-L. & Yang, L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA biology* **12**, 381-388, (2015).
- Jeck, W.R. & Sharpless, N.E. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nature biotechnology* **32**, 453-461, (2014).
- Wang, Y. & Wang, Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *Rna* **21**, 172-179, (2015).
- Hansen, T.B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**, 384-388, (2013).
- Li, Z. et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nature structural & molecular biology* **22**, 256, (2015).
- Legnini, I. et al. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. *Molecular cell* **66**, 22-37. e29, (2017).
- Pamudurti, N.R. et al. Translation of circRNAs. *Molecular cell* **66**, 9-21. e27, (2017).
- Enuka, Y. et al. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic acids research* **44**, 1370-1383, (2016).
- Kaczmarek, J.C., Kowalski, P.S. & Anderson, D.G. Advances in the delivery of RNA therapeutics: from concept to clinical reality. *Genome medicine* **9**, 60, (2017).
- Fink, M., Flekna, G., Ludwig, A., Heimbucher, T. & Czerny, T. Improved translation efficiency of injected mRNA during early embryonic development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 3370-3378, (2006).
- Ferizi, M. et al. Stability analysis of chemically modified mRNA using micropattern-based single-cell arrays. *Lab on a Chip* **15**, 3561-3571, (2015).
- Holtkamp, S. et al. Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009-4017, (2006).
- Kuhn, A. et al. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo. *Gene therapy* **17**, 961-971, (2010).
- Presnyak, V. et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* **160**, 1111-1124, (2015).
- Kariko, K., Muramatsu, H., Ludwig, J. & Weissman, D. Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic acids research* **39**, e142-e142, (2011).
- Petkovic, S. & Müller, S. RNA circularization strategies in vivo and in vitro. *Nucleic acids research* **43**, 2454-2465, (2015).
- Beaudry, D. & Perreault, J.-P. An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules. *Nucleic acids research* **23**, 3064, (1995).
- Micura, R. Cyclic Oligoribonucleotides (RNA) by Solid-Phase Synthesis. *Chemistry—A European Journal* **5**, 2077-2082, (1999).
- Puttaraju, M. & Been, M. Group I permuted intron-exon (PIE) sequences self-splice to produce circular exons. *Nucleic acids research* **20**, 5357-5364, (1992).
- Ford, E. & Ares, M. Synthesis of circular RNA in bacteria and yeast using RNA cyclase ribozymes derived from a group I intron of phage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 3117-3121, (1994).
- Vicens, Q., Paukstelis, P.J., Westhof, E., Lambowitz, A.M. & Cech, T.R. Toward predicting self-splicing and protein-facilitated splicing of group I introns. *Rna* **14**, 2013-2029, (2008).
- Borman, A.M., Le Mercier, P., Girard, M. & Kean, K.M. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic acids research* **25**, 925-932, (1997).
- Imataka, H., Gradi, A. & Sonenberg, N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly (A)-binding protein and functions in poly (A)-dependent translation. *The EMBO journal* **17**, 77489-480, (1998).
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.-N. & Sonenberg, N. Mammalian poly (A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & development* **19**, 104-113 (2005).
- Weingarten-Gabbay, S. et al. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. *Science* **351** (2016).
- Chen, Y.G. et al. Sensing self and foreign circular RNAs by intron identity. *Molecular cell* **67**, 228-238. e225 (2017).
- Li, Y. & Breaker, R.R. Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group. *Journal of the American Chemical Society* **121**, 5364-5372(1999).