

## **STUDY OF TARGET-INDUCED microRNA DEGRADATION AND COMPETING ENDOGENOUS RNA MECHANISM BY CRISP/Cas9 MEDIATED DELETION OF HIGH AFFINITY TARGET SITES**

Francesco Ghini, Ines Simeone, Carmela Rubolino, Matteo J Marzi e Francesco Nicassio

Istituzione: Center for genomic science of IIT@SEMM, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT); Via Adamello 16, 20139, Milano.

I miRNA agiscono a livello post-trascrizionale modulando l'espressione di centinaia di geni simultaneamente e in questo modo definiscono l'identità e le proprietà cellulari. L'azione dei miRNA richiede l'interazione, basata su complementarità di sequenza, con i geni target, in regioni definite "elementi di responsività al miRNA" (MRE), causando la degradazione del target e/o l'inibizione della sintesi proteica. Questo progetto si focalizza sui meccanismi molecolari che coinvolgono l'interazione dei miRNA con i geni target e ne possono modulare la funzione in fisiologia e patologia. Recentemente si è iniziato a comprendere che l'interazione miRNA:target può avere effetti bidirezionali (in altri termini, anche i target possono influenzare l'attività dei miRNA). Questo può avvenire tramite almeno due meccanismi: la degradazione (indotta dall'espressione di particolari target) e la competizione (in cui un target in eccesso, detto ceRNA, sequestra il miRNA riducendone l'attività verso gli altri target). In uno studio precedente abbiamo osservato che i target endogeni ad alta affinità e concentrazione sono fortemente correlati ai miRNA più instabili. Per verificare sperimentalmente questa ipotesi abbiamo adattato una recente tecnologia di manipolazione genomica (CRISPR/Cas9) allo studio del legame miRNA:target. Nel dettaglio, la nostra strategia è finalizzata a rimuovere dal genoma la regione di responsività al miRNA in uno specifico target ("MRE-KO"), in modo da valutarne inequivocabilmente il ruolo nella regolazione della stabilità (degradazione) o attività (competizione) del miRNA corrispondente.

Combinando un approccio computazionale e l'analisi di dati di sequenziamento di miRNA e targets in un sistema cellulare modello, abbiamo selezionato una coppia miRNA:target di interesse e generato, tramite CRISPR/Cas9 dei cloni cellulari che portano una delezione bi-allelica del sito di legame al miRNA (cloni "MRE\_KO"). Tramite tecniche ad alta risoluzione (trascrittoma e mirnoma), abbiamo verificato che il miRNA si accumula maggiormente nei cloni MRE\_KO rispetto alle cellule parentali, poiché soggetto a minore degradazione. Inoltre anche l'attività del miRNA risulta incrementata nei cloni MRE\_KO, con una maggiore repressione degli altri target del miRNA.