

University of Groningen

Small regulatory RNAs

Seinen, Erwin

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2011

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Seinen, E. (2011). *Small regulatory RNAs: identification, classification and utilization*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 7

Nederlandse Samenvatting

Nederlandse samenvatting

Een belangrijk onderdeel binnen de (bio)wetenschap is onderzoek naar de functie van genen. Voorheen werd dat vooral gedaan door opzettelijk mutaties in genen te maken, waardoor uiteindelijk specifieke eiwitten fouten bevatten en niet goed werken. De consequenties van disfunctionerende eiwitten kunnen daarna bestudeerd worden in cellen of in modelorganismen. De geconstateerde gebreken correleren meestal goed met de aangetaste functie van het gemuteerde gen. Logisch gevolg is dat er sterke aanwijzingen ontstaan over de normale werking en functie van het eiwit die door het gen in kwestie wordt gecodeerd. Tegenwoordig wordt er echter veel vaker een nieuwere techniek gebruikt: RNA interference, of kortweg RNAi. Met de RNAi techniek wordt niet het DNA gemuteerd, maar wordt het RNA afgebroken. Omdat deze techniek centraal staat binnen dit proefschrift, zal ze hier eerst uitgelegd worden.

RNAi: een revolutionaire technologie

In vrijwel alle organismen bestaat een geconserveerde route die globaal bestaat uit 4 niveaus. Het begint met de informatie die ligt opgeslagen in het DNA van de celkern. Deze informatie is omsloten in genen en bevat de bouw instructies om eiwitten te maken. De in alle cellen aanwezige ribosomen lezen deze instructies af en maken het uiteindelijke eiwit. Dat doen ze echter niet direct vanaf het origineel (DNA), maar via de tussenvormen die **pre-mRNA** en **mRNA** worden genoemd. Het pre-mRNA is een exacte kopie van het gen waar nog laatste wijzigingen op kunnen worden gemaakt voordat het eiwit wordt gemaakt. Het gewijzigde RNA is het messenger RNA, of mRNA. De 4 niveaus kunnen samengevat worden in het volgende schema:

(1) DNA -> (2) -> pre-mRNA -> (3) mRNA -> (4) Eiwit.
--

In het verleden was vaak het eerste niveau 'DNA' het doelwit om een eiwit uit te schakelen, maar tegenwoordig wordt de RNAi techniek gebruikt. RNAi grijpt aan op de tussenvorm op de weg van genen naar eiwitten, namelijk het RNA. Waar voorheen genen werden gemuteerd op niveau (1), wordt met RNAi 'slechts' geïnterfereerd op niveau (3), zodat het eiwit op niveau (4) nooit wordt gemaakt. Deze manier van interfereren kan

theoretisch hetzelfde effect hebben als het uitschakelen van de aanmaak van het eiwit op niveau 1. Zonder handleiding kan er immers nooit een eiwit gebouwd worden. Het grootste voordeel van de RNAi techniek is dat deze heel gericht toegepast kan worden binnen cellen, maar juist ook in een volwassen modelorganisme. Dit in tegenstelling tot de vroegere technieken die mutaties op DNA niveau introduceerden. Om mutaties op DNA niveau te introduceren zijn meer stappen nodig en soms ook meerdere generaties van modelorganismen, terwijl RNAi op elk gewenst moment en heel gericht kan worden toegepast. Niet voor niets vindt RNAi daarom niet alleen steeds meer zijn weg in (fundamenteel) wetenschappelijk onderzoek, maar inmiddels ook in klinische toepassingen om bijvoorbeeld genen uit te schakelen die te maken hebben met de groei van kankergezwellen. De invloed van de RNAi techniek is dermate groot gebleken dat de ontdekkers van deze techniek, Fire en Mello, inmiddels de Nobelprijs hebben gekregen voor hun werk.

RNAi: hoe werkt het en wat zijn de nadelen?

Het mechanisme achter RNAi is relatief eenvoudig en begint met het binnenbrengen van een (synthetisch) dubbelstrengs RNAi molecuul in de cel. Deze dissocieert vervolgens in 2 enkelstrengs RNAs middels een actief proces. Een enkelstrengs RNA kan gemakkelijk met complementaire mRNA moleculen binden (niveau 3 van de vorige paragraaf) zodat het weer een dubbelstrengs RNA gaat vormen. Als dit gebeurt, dan wordt dit herkend door de cel als iets abnormaals. mRNA is namelijk enkelstrengs zodat het zonder belemmering afgelezen kan worden door de ribosomen (de eiwitfabriekjes die het mRNA als handleiding gebruiken om niveau 4 te bereiken). Een mRNA die nu (deels) dubbelstrengs is geworden, wordt actief afgebroken met als gevolg dat het eiwit nooit gevormd zal kunnen worden.

DNA en RNA moleculen bestaan uit bouwstenen, ook wel de ‘basen’ genoemd. Iedere succesvolle RNAi poging wordt uiteindelijk uitgevoerd met een sequentie met een lengte van +/- 21 basen. De oorspronkelijk aangeboden lengte van het RNAi molecuul maakt niet uit, als de fruitvlieg (*Drosophila melanogaster*) wordt gebruikt als modelorganisme. In dat geval worden meestal relatief lange RNAi moleculen gebruikt, de zogenaamde “dsRNAs” van +/- 350 basen lang. Een in de natuur voorkomend eiwit, genaamd DICER zal deze uiteindelijk alsnog gaan knippen in de kortere +/-

21-bp variant (de siRNAs, ofwel short interfering RNA) en al deze siRNAs kunnen actief bijdragen aan de RNAi reactie. Daar komt dan ook direct een probleem om de hoek kijken: de basen van DNA/RNA omvatten maar 4 varianten, dus hoe specifiek kan een siRNA van 'slechts' 21 basen zijn ten opzichte van het gehele genoom (de set van genen in de kern van een cel), dat in het geval van de fruitvlieg uit maar liefst 168 miljoen basen bestaat? Met andere woorden, hoe kunnen we er zeker van zijn dat de relatief korte sequentie van +/- 21 basen daadwerkelijk alleen op het bedoelde gen gaat aangrijpen en niet ook op een ander gen dat toevallig dezelfde sequentie heeft? Als men het aantal mogelijke combinaties uitrekent (4^{21}), dan blijkt dat aantal heel groot en is de kans klein dat een sequentie van +/- 21 bp van de siRNA toevallig ergens anders in het genoom ook voorkomt. Er is echter uit studies gebleken dat de 21 basen niet exact overeen hoeven te komen, omdat de cel het vaak toestaat dat er foutjes, de zogenaamde 'mismatches', in voorkomen. Juist door de tolerantie van deze mismatches wordt de specificiteit een heel stuk kleiner en is het niet ondenkbaar dat een enkel stuk siRNA op meerdere plekken van het genoom een hoge mate van similariteit kan vinden. Inderdaad blijkt in de praktijk dat er meerdere genen onbedoeld aangedaan kunnen zijn door een RNAi behandeling. Dit effect wordt ook wel het off-target effect genoemd. Dit fenomeen kan vervelende gevolgen hebben voor de wetenschap, want dit kan er voor zorgen dat er verkeerde conclusies getrokken worden. Maar een off-target effect kan ook ernstige gevolgen hebben als RNAi gebruikt wordt bij een klinische toepassing. In dit geval kan niet alleen het zieke gen uitgeschakeld worden maar ook nog ongewild andere genen, waardoor de situatie van de patiënt theoretisch juist kan verslechteren. Gezien het bovenstaande is het dus essentieel om off-target effecten te kunnen minimaliseren.

Voorkómen van de nadelen

De bioinformatica discipline heeft geprobeerd om software te maken die de kans op off-targets vermindert door meer gericht siRNAs te ontwerpen. De sequentie van een siRNA wordt dan met behulp van een computer vergeleken met alle voorkomende sequenties van de mRNAs (niveau 3) zoals deze door genen worden gemaakt. Met de uitkomst van die analyse kan bij voorbaat al redelijk ingeschat worden of een bepaalde siRNA specifiek zal zijn of wellicht off-targets kan gaan veroorzaken. Doordat dergelijke analyses voor organismen die veel genen bevatten behoorlijk veel computerkracht vergen, zijn geavanceerde algoritmes gemaakt om de

analyse te versnellen. Op deze manier kan de onderzoeker binnen redelijke tijd een antwoord krijgen op de vraag of een bepaalde siRNA specifiek is of juist niet. Op basis van de eerste bevindingen van de werking van RNAi, werd ook al snel besloten om grote delen van het genoom uit te sluiten voor dit soort analyses omdat die niet vatbaar zou zijn voor de techniek. Het gaat daarbij dan voornamelijk om DNA sequenties die tussen de genen inliggen en niet coderen voor eiwitten. Door het daadwerkelijk aantal sequenties te beperken, die daarom moesten worden geanalyseerd, kon het gehele berekeningsproces flink worden versneld.

Verdere optimalisaties konden worden verkregen door te proberen nog meer sequenties uit te sluiten. Om die reden werd gekeken of specifieke gebieden binnen de genen zelf onaantastbaar zouden zijn voor RNAi en wellicht ook uitgesloten konden worden voor analyse. Een gen op het DNA binnen een celkern bestaat uit 3 type gebieden: 1) UTR (dit gedeelte van het gen zit aan de uiteinden en wordt niet vertaald naar mRNA), 2) exonen (dit is het deel van het gen dat daadwerkelijk wordt vertaald naar het mRNA) en 3) de intronen (dit is het deel van het gen dat niet bijdraagt aan de sequentie van het corresponderende mRNA). Deze intronen worden tijdens de vertaling naar het RNA als het ware weggegooid omdat ze uit de premature versie van het RNA (het pre-mRNA) worden weggeknipt (dit gebeurt tijdens de hierboven genoemde overgang van niveau 2 naar 3). Vroeger noemde men deze intronen dan ook wel het 'junk-DNA', hoewel inmiddels bekend is dat deze intronen wel degelijk een functie hebben, maar daarover later meer. Er wordt in het algemeen aangenomen dat RNAi niet op niveau 2 (pre-mRNA), maar pas op niveau 3 (mRNA) aangrijpt. Deze aanname is gebaseerd op de lokalisatie van de hele RNAi machinerie en zal hieronder toegelicht worden. In een cel ligt het DNA opgeslagen binnen een compartiment (de celkern). Alles buiten de celkern wordt het cytoplasma genoemd; hierin zitten alle andere celorganellen (zoals de eerder genoemde 'eiwitfabriekjes' ribosomen). De vertaling van DNA en rijping naar mRNA vindt plaats binnen de celkern en daarna wordt het mRNA geëxporteerd naar het cytoplasma. In het cytoplasma wordt het mRNA afgelezen door de ribosomen en vervolgens ook het eiwit gemaakt. Onderzoek suggereerde dat de componenten van RNAi alleen in het cytoplasma aanwezig waren en in het cytoplasma wordt het mRNA afgebroken voordat het kan worden vertaald naar eiwitten via de ribosomen. Gebaseerd op de uitkomsten van dit onderzoek werd de conclusie getrokken dat RNAi alleen op niveau 3 kan aangrijpen (mRNA). Bioinformatici hebben gebruik gemaakt van deze

observatie. Zij hebben in hun analyses alleen de UTR en exonsequenties van genen meegenomen en al het overige uitgesloten. Door deze filtering hoeft er veel minder berekend te worden waardoor de analyses om potentiële off-targets in kaart te brengen veel sneller uitgevoerd konden worden. Door het digitaal inkorten van het genoom wordt dus een flinke tijds winst behaald op de analyses. De winst maakt het mogelijk om met een hoge snelheid sequenties te kunnen analyseren zodat deze computer programma's ook geschikt zijn voor online toepassingen op het internet.

Zijn de aannames correct?

Inmiddels zijn er steeds meer aanwijzingen dat de hele RNAi machinerie niet alleen in het cytoplasma, maar ook in de celkern aanwezig is. Dat kan drastische consequenties hebben voor bestaande analyses met betrekking tot de specificiteit van RNAi, aangezien tot op heden vooral alleen naar de mRNA sequenties is gekeken en niet naar de volledige pre-mRNA sequenties. Daarnaast zijn er mechanismen blootgelegd die verwant zijn aan RNAi, maar het DNA in de kern als doelwit hebben in plaats van het RNA. Een analyse is daarom pas werkelijk compleet als er rekening wordt gehouden met alle mogelijke sequenties waarop een off-target zich kan voordoen. Hoofdstuk 2 presenteert een nieuwe bioinformatica methode die het toch mogelijk maakt om genoom-breed te zoeken naar off-targets inclusief eventuele mismatches. Daarbij wordt gebruik gemaakt van een nieuw programma, genaamd RNAi-Select, om dit toch heel snel te kunnen uitvoeren en de benodigde tijd voor een enkele analyse daarmee te beperken tot iets meer dan een seconde. Door deze snelheid zijn on-line toepassingen en/of bulkanalyses op vele siRNAs of dsRNAs mogelijk en deze komen ook uitgebreid aan de orde in dit hoofdstuk.

Door gebruik te maken van deze nieuwe methode om off-targets op te sporen zijn we erachter gekomen dat het aantal potentiële off-targets voor sommige RNAi moleculen soms verrassend hoog is. Na dit vastgesteld te hebben rees de vraag of deze hoge aantallen potentiële off-targets ook consequenties kunnen hebben voor de technieken en controles die vandaag de dag gebruikt worden binnen het RNAi onderzoek. Hoofdstuk 3 gaat hier specifiek op in en onderzoekt een methode die onderzoekers momenteel gebruiken om off-targets te minimaliseren in het modelorganisme *Drosophila melanogaster* (fruitvlieg). Om aan te tonen dat een bepaald RNAi construct specifiek is, gebruiken deze onderzoekers twee

onafhankelijke unieke RNAi constructen die beide bedoelt zijn om hetzelfde gen uit te schakelen. De eenvoudige gedachtegang daarachter is dat als twee totaal verschillende RNAi's onafhankelijk en in aparte experimenten van elkaar hetzelfde gen uitschakelen en ook dezelfde resultaten vertonen in het onderzoek, dat dan deze resultaten louter en alleen veroorzaakt worden door het uitschakelen van het doelgen. Dit lijkt een redelijke veronderstelling, want intuïtief wordt er van uitgegaan dat de unieke onafhankelijke RNAi constructen, zoals dsRNAs, weliswaar hetzelfde gen zullen uitschakelen, maar dat hun eventuele off-targets totaal verschillend zijn. Hoewel deze aanname gevoelsmatig correct lijkt te zijn, was dit eigenlijk nog nooit op een wetenschappelijke rekenkundige manier aangetoond. Hoofdstuk 3 brengt daar verandering in en de analyses daarin laten zien dat deze aanname lang niet altijd waar blijkt te zijn. Sterker nog, eigenlijk alle genen binnen het *Drosophila* genoom blijken veel sequenties te hebben die potentieel tot overlappende off-targets kunnen leiden.

Deze uitkomst was verrassend, maar is statistisch gezien heel logisch en goed te vergelijken met de zogenaamde verjaardags-paradox. Deze paradox beschrijft dat er slechts 23 willekeurige mensen in één ruimte nodig zijn om de kans waarop 2 mensen op dezelfde dag jarig zijn 50% te laten zijn, terwijl je dit aantal mensen intuïtief veel groter zou schatten. Het grote verschil tussen het gevoelsmatige aantal en het werkelijk aantal komt voort uit de manier waarop men de vraagstelling benadert. De vraag is namelijk niet: "Hoeveel mensen moeten er in een ruimte geplaatst worden, totdat er iemand is gevonden die dezelfde verjaardag heeft als ik?", maar de vraag is: "Hoeveel willekeurige mensen met willekeurige verjaardagen moeten er in een ruimte geplaatst worden zodat de kans 50% is dat er twee bijzitten die op dezelfde dag jarig zijn?". Dus ieder willekeurig persoon in die ruimte mag met ieder willekeurig andere persoon een gemeenschappelijke verjaardag hebben en dit vergroot de kans vele malen. Hetzelfde is van toepassing op de vraag hoe veel verschillende sequenties er nodig zijn om 'toevallig' dezelfde off-target te vinden. We moeten namelijk niet alleen kijken of de 2 unieke dsRNAs die de onderzoeker wil gebruiken voor een RNAi experiment toevallig ergens exact dezelfde sequenties hebben (dit is in deze context niet relevant), maar we moeten ook kijken of de 2 unieke dsRNAs een gemeenschappelijke off-target hebben. Dit kan gebeuren wanneer een gemeenschappelijke off-target bestaat uit bijvoorbeeld ABCD, terwijl dsRNA 1 AB heeft en dsRNA2 CD. De 2 dsRNAs zijn weliswaar uniek, maar ze kunnen toch beide aangrijpen op hetzelfde off-target gen en

dat is nu juist wat de wetenschapper wil voorkómen als er gebruik gemaakt wordt van dsRNAs. Naast de uitgebreide analyses die vooral te maken hebben met bovenstaande vraagstelling, laat Hoofdstuk 3 ook een oplossing zien voor *Drosophila* onderzoekers met behulp van een on-line computerprogramma om veel gerichter dsRNA's te ontwerpen die een lage kans hebben op een gemeenschappelijke off-target. Dus door gebruik te maken van de beschreven methoden in dit hoofdstuk kunnen dsRNA's ontworpen worden met unieke off-target profielen die veel geschikter zijn om een gecontroleerd RNAi experiment uit te voeren.

Gecontroleerde RNAi: de praktijk

De effectiviteit van een gecontroleerd en beheerst RNAi experiment heeft zich bewezen in Hoofdstuk 4. In dit onderzoek werd niet de gehele vlieg, maar een cultuur van cellen afkomstig uit *Drosophila* embryo's gebruikt. Deze zogenaamde S2 cellen werden behandeld met RNAi constructen. Deze RNAi constructen hebben we ontworpen met het door ons gemaakte programma om zoveel mogelijk off-target effecten uit te sluiten. Met de ontworpen RNAi constructen werd een specifiek gen uitgeschakeld. Dat specifieke gen is erg interessant omdat bij patiënten, die aan een specifieke neurodegeneratieve ziekte (PKAN) lijden, ditzelfde gen ook is uitgeschakeld. Als we met RNAi het gen uitschakelen in cellen, kunnen we beter begrijpen waarom de patiënten ziek zijn. Eerst zal nu in iets meer detail de ziekte PKAN behandeld worden.

PKAN: een neurodegeneratieve ziekte

PKAN is een relatief zeldzame neuronale ziekte en wordt veroorzaakt door een mutatie in een gen. Dit gen wordt pantothenate kinase (PANK) genoemd en is essentieel voor een evolutionair zeer geconserveerde biochemische route. Deze route begint bij de verwerking van vitamine B5 en eindigt bij Coenzym A (CoA). Doordat deze biochemische route zo goed is geconserveerd binnen vrijwel alle organismen (van bacterie tot mens) is deze ziekte goed te bestuderen met behulp van de fruitvlieg. Met name door de eenvoud en snelheid waarmee de fruitvlieg gekweekt kan worden en de uitgebreide mogelijkheden om neuronale afwijkingen te induceren en te bestuderen is *Drosophila* een zeer geschikt modelorganisme. Naast studies in het hele organisme, zijn er ook *Drosophila* weefselkweek cellijnen waarin RNAi zeer effectief toegepast kan worden. We hebben eerst het PANK gen uitgeschakeld met behulp van RNAi, omdat het bestuderen van cellen

meestal eenvoudiger is dan het bestuderen van intacte organismen. Toen dit gelukt was, hebben we gekeken wat de consequenties hiervan zijn en vervolgens geprobeerd om de cellen met behulp van synthetische stofjes weer “beter” te maken. Een consequentie van het uitschakelen van het PANK gen is dat de cellen minder groeien en dat de CoA niveaus omlaag gaan. Nadat we het stofje pantethine toegevoegd hadden aan de cellen, bleek dat deze weer met de normale snelheid konden groeien en CoA niveaus werden hersteld. Ons onderzoek suggereert dat Pantethine ergens onderaan de CoA route kan instappen en dat op die manier onafhankelijk van het PANK gen, het CoA toch gemaakt kan worden. Ons onderzoek laat ook zien dat in de S2 cellijn pantethine beschermend werkt als het PANK gen defect is. Er bestaat een *Drosophila* model voor de ziekte PKAN en deze *Drosophila* mutante vliegen vertonen ernstige neurodegeneratie en hebben een zeer verkorte levensduur. Het pantethine werkt ook zeer beschermend tegen deze ziekteverschijnselen van het *Drosophila* PKAN model. In hoofdstuk 4 wordt dit onderzoek, dat gebaseerd is op een succesvol en gecontroleerd RNAi experiment en waarbij de tools worden gebruikt zoals ontworpen in hoofdstuk 2 en 3, uitvoerig beschreven. Er wordt ook bediscussieerd wat dit onderzoek zou kunnen betekenen voor patiënten die lijden aan PKAN.

miRNA's en hun verwantschap aan siRNAs

De natuur kent nog een ander fenomeen dat nauw verwant is aan RNAi: de microRNA's (miRNA's). RNAi concentreert zich rond 21-bp sequenties terwijl miRNAs op nog veel kortere sequenties werken van rond de 6 basen. Het cel-eigen (endogene) miRNA proces speelt een belangrijke rol bij de regulatie van genen. Het is mogelijk om met één enkele miRNA grote groepen genen tegelijk te reguleren. Hoe dit proces precies wordt aangestuurd is nog niet geheel bekend, maar waarschijnlijk worden meerdere miRNA's tegelijk ingezet om de genexpressies te dirigeren op een fijn niveau net zoals vele individuele muzieknoden een complex muziekstuk kunnen beschrijven. De vondst van miRNA's bracht meteen ook de eerdergenoemde term 'junk-DNA' tot wankelen: de miRNA's blijken namelijk vooral uit die stukken junk-DNA voort te komen en dus zijn deze stukken DNA geen 'junk' maar juist heel belangrijk. Hoewel het RNA afbreekproces door miRNA's en RNAi veel op elkaar lijken, kunnen ze onafhankelijk van elkaar voorkomen. Het ene proces kan namelijk chemisch of genetisch uitgeschakeld worden zonder dat het andere proces daar hinder

van ondervindt. Toch is er door de gemeenschappelijke component, namelijk het RNA, wel degelijk een overloop mogelijk tussen de beide processen. Helaas kunnen daardoor ook bij miRNAs off-targets voorkomen en dus moet ook daar rekening mee worden gehouden bij het bestuderen van de rol van miRNAs in de cel. Hoofdstuk 2 gaat daar verder op in en beschrijft middelen om naast de potentiële RNAi off-targets ook eventuele miRNA off-targets in ogenschouw te nemen. Het algoritme daarachter, het opzoeken van korte 6-bp sequenties, bleek ook zeer geschikt te zijn voor analyses in het humane genoom waar miRNA's in overvloed aanwezig zijn. Hoofdstuk 5 demonstreert dat aan de hand van een casus waarbij de betrokkenheid van miRNAs in Hodgkin's lymphoma (HL; witte bloed cel kanker) wordt geanalyseerd. Naast het feit dat gemuteerde genen de oorzaak kunnen zijn van kanker (de zogenaamde oncogenen), is het namelijk ook mogelijk dat niet het gen zelf gemuteerd is, maar dat de regulatie van een gen verstoord is. miRNA's kunnen daar de boosdoeners van zijn want er is aangetoond dat miRNAs ontregeld kunnen raken en daarmee ook de betrokken genen kunnen ontregelen. hoofdstuk 5 vergelijkt het miRNA profiel van gezonde cellen met het miRNA profiel van HL kankercellen. Er bleken inderdaad specifieke verschillen te zijn, maar alleen het aantonen van het verschil tussen de 2 cellijnen is niet voldoende bewijs om het kanker fenotype van de HL cellen te verklaren. Het door ons ontworpen RNAi-Select programma werd daarom ingezet en daaruit bleek dat de miRNA sequenties inderdaad terug te vinden zijn in de betrokken oncogenen in de HL cellijnen. Daardoor kon ook op sequentieniveau aangetoond worden dat die miRNAs waarschijnlijk betrokken zijn bij HL. Deze additionele bioinformatische analyse kon verder ondersteuning bieden bij de natte experimenten die het uiteindelijke onomstoten bewijs konden leveren dat de miRNA's waren betrokken bij het (ont)regelen van bepaalde oncogenen. Bovendien werd een algemene methode ontwikkeld om ook de betrokkenheid van andere miRNAs in cellijnen aan te tonen op een manier waarop dat nog niet eerder mogelijk was.

Conclusie

Dit proefschrift gaat met name over RNA sequenties en de daaraan gerelateerde eiwitregulatiemechanismen. Door de relatief korte sequenties waarmee deze mechanismen werken kan de specificiteit in het geding komen. De natuur kan dat zelf uitstekend oplossen door gebruik te maken van de zogenaamde 'spatiele' (ruimtelijk) en 'temporele' (in de tijd)

verschillen. Met andere woorden, een organisme kan een miRNA op een heel specifiek tijdstip activeren tijdens de ontwikkeling en dan ook nog eens alleen in bepaalde weefsels. Indien miRNAs echter op verkeerde tijdstippen en/of in 'vreemd' weefsel tot expressie komen, dan kan dit onnatuurlijke off-targets veroorzaken. De RNAi technologie is ook een onnatuurlijke situatie: er wordt geen rekening gehouden met tijd en/of ruimte waarin de lichaamsvreemde moleculen ingebracht worden in het levende systeem. We hebben aangetoond dat er een onvermijdelijke overlap bestaat met andere sequenties in het genoom en dat kan consequenties hebben voor het succes van de experimenten die met RNAi technologie zijn uitgevoerd. Indien hier wel degelijk rekening mee wordt gehouden zoals wij aannemelijk hebben gemaakt met het RNAi-Select programma, is de techniek echter nog krachtiger dan ooit en blijkt het heel goed mogelijk te zijn om met potentiële off-targets om te gaan. We hebben voor de werking van RNAi-Select een database gemaakt met uitgebreide informatie over het genoom van *Drosophila* met in die database alle mogelijke off-targets in kaart gebracht. Ook hebben we, met behulp van de gebruikte algoritmes, RNAi technieken geoptimaliseerd en mogelijke miRNA targets beter kunnen aanwijzen. Dit heeft weer geleid tot het verder oplossen van medische gerelateerde vragen. Na dit werk begrijpen we beter hoe een specifieke vorm van leukemie ontstaat en hebben we een mogelijke basis voor het ontwikkelen van een therapie van een zenuwziekte waarvoor tot op heden nog geen enkel medicijn beschikbaar is.