

Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
Zakład Biochemii Rybonukleoprotein

**Nowe spojrzenie na domenę helikazową ludzkiej  
rybonukleazy Dicer i jej aktywności biochemiczne,  
ze szczególnym uwzględnieniem aktywności  
wiązania RNA**

New insights into the helicase domain of human Dicer and its  
biochemical activities, with particular emphasis on the RNA  
binding activity

**mgr Kinga Ciechanowska**

promotor

dr hab. Anna Kurzyńska-Kokorniak

Poznań 2022



Rozprawa doktorska została wykonana w ramach uczestnictwa w projekcie *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”*, realizowanym wspólnie przez trzy jednostki:

- Politechnikę Poznańską,
- Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

w ramach Umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00-I011/16.

Projekt *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”* jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.



Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej finansowane były w ramach projektów:

Narodowego Centrum Nauki, Grant PRELUDIUM nr 2021/41/NZ2/03849

Narodowego Centrum Nauki, Grant SONATA BIS nr 2016/22/E/NZ1/00422

Dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy.

Składam serdeczne podziękowania

prof. ICHB PAN, dr hab. Annie Kurzyńskiej-Kokorniak za opiekę naukową, cenne wskazówki, życzliwość i okazane wsparcie,

a także:

mgr inż. Agnieszce Szczepańskiej,

mgr inż. Marcie Wojnickiej

za owocne dyskusje naukowe, okazaną pomoc i emocjonalne wsparcie.

dr hab. Annie Urbanowicz za poświęcony czas, udzielone wsparcie merytoryczne i miłą współpracę podczas wykonywania pomiarów BLI.

dr Kamilowi Szpotkowskiemu za pomoc w przeprowadzeniu pomiarów CD i wsparcie merytoryczne.

dr n. med. Pawłowi Wołkow za możliwość realizacji stażu, miłą współpracę i poświęcony czas podczas badania kompleksów RNA•białko metodą irCLIP.

dr Justynie Toton-Żurańskiej za poświęcony czas, miłą współpracę i wsparcie merytoryczne podczas badania kompleksów RNA•białko metodą irCLIP.

Szczególnie dziękuję Kamilowi oraz Rodzinie i Przyjaciołom za nieustanne wsparcie!

## Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	8
I. WSTĘP .....	12
1. Wprowadzenie .....	12
2. Rodzina RNaz III.....	13
3. Rodzina helikaz.....	15
3.1 Helikazy RNA DExD/H-box.....	17
3.2 Helikazy RIG-I .....	20
4. Rybonukleazy Dicer i proces biogenezy krótkich regulatorowych RNA.....	21
5. Budowa rybonukleaz Dicer oraz funkcje poszczególnych domen na przykładzie hDicer .....	23
5.1 Domena helikazowa .....	24
5.2 Domena DUF283 .....	28
5.3 Domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej .....	29
5.4 Domeny RNazy III .....	30
5.5 Domena dsRBD.....	32
6. Ewolucja i różnorodność rybonukleaz typu Dicer .....	34
7. Rola rybonukleaz typu Dicer poza procesem biogenezy miRNA i siRNA .....	38
II. CEL PRACY .....	40
III. MATERIAŁY I METODY.....	42
1. Materiały.....	42
1.1 Bufory i roztwory barwiące .....	42
1.2 Materiał biologiczny .....	46
1.3 Oligonukleotydy .....	47
1.4 Preparaty białkowe .....	48
1.5 Plazmidy .....	49
1.6 Żele agarozowe .....	49
1.7 Żele poliakrylamidowe (PAA) .....	49
1.8 Enzymy .....	50
1.9 Odczynniki i materiały wykorzystane podczas badań.....	51
2. Metody.....	55
2.1 Amplifikacja DNA.....	55
2.2 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych.....	56

2.3	Oczyszczanie produktów amplifikacji.....	57
2.4	Wprowadzanie DNA kodującego domenę HEL hDicer do wektora pMCSG7 .....	57
2.5	Transformacja komórek bakteryjnych metodą szoku cieplnego (ang. <i>heat shock</i> )	58
2.6	Izolacja plazmidowego DNA z pojedynczych kolonii bakteryjnych.....	58
2.7	Analiza ilościowa i jakościowa DNA .....	59
2.8	Produkcja preparatu białkowego w bakteryjnym systemie ekspresyjnym.....	59
2.9	Izolacja i oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa.....	60
2.10	Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących.....	60
2.11	Wymiana buforu i zagęszczanie białka.....	61
2.12	Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda.....	61
2.13	Znakowanie radioizotopowe końca 5' oligomerów RNA i DNA .....	61
2.14	Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących .....	62
2.15	Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych.....	63
2.16	Oczyszczanie kwasów nukleinowych w żelach PAA .....	63
2.17	Badanie oddziaływań kwas nukleinowy-białko metodą EMSA.....	64
2.18	Badanie aktywności opiekuńczej białek względem kwasów nukleinowych .....	65
2.19	Badanie aktywności rozplatania dupleksów kwasów nukleinowych.....	66
2.20	Badanie aktywności ATPazowej .....	67
2.21	Badanie aktywności RNazowej.....	68
2.22	Badanie oddziaływań kwas nukleinowy-białko z wykorzystaniem metody BLI .....	68
2.23	Badanie metodą spektroskopii dichroizmu kołowego (CD) .....	69
2.24	Badanie oddziaływań kwas nukleinowy-białko z wykorzystaniem metody irCLIP-seq .....	70
2.24.1	Fotozszywanie z wykorzystaniem światła UV (ang. UV crosslinking).....	70
2.24.2	Przygotowanie złoża magnetycznego oraz lizatu komórkowego .....	71
2.24.3	Defosforylacja końca 3' RNA i ligacja z adapterem wyznakowanym barwnikiem bliskiej podczerwieni.....	71
2.24.4	Rozdział kompleksów w żelu SDS-PAGE i ich transfer na membranę nintrocellulozową.....	72
2.24.5	Izolacja RNA z kompleksów RNA•białko .....	73
2.24.6	Odwrotna transkrypcja i cyrkularyzacja .....	73
2.24.7	Namnażanie cDNA metodą PCR.....	74
2.24.8	Oczyszczanie produktów PCR z żelu.....	76
2.24.9	Przygotowanie i normalizacja bibliotek do sekwencjonowania NGS.....	76
2.24.10	Sekwencjonowanie z zastosowaniem sekwenatora Illumina NextSeq550.	77

2.24.11	Analiza danych po sekwencjonowaniu NGS.....	78
IV.	WYNIKI .....	79
1.	Otrzymywanie domeny helikazowej hDicer.....	79
1.1	Otrzymanie konstruktów pMCSG7_HEL zawierających sekwencję kodującą domenę helikazową hDicer .....	79
1.2	Ekspresja sekwencji kodującej domenę helikazową w bakteryjnym systemie ekspresyjnym .....	83
1.3	Oczyszczanie domeny helikazowej hDicer .....	83
2.	Badanie aktywności biochemicznych domeny helikazowej hDicer .....	85
2.1	Aktywności ATPazy.....	85
2.2	Aktywność wiązania kwasów nukleinowych.....	87
2.2.1	Badanie aktywności wiązania kwasów nukleinowych z wykorzystaniem metody EMSA.....	88
2.2.2	Badanie aktywności wiązania kwasów nukleinowych z wykorzystaniem metody BLI .....	92
2.2.3	Poszerzona analiza oddziaływań HEL hDicer z jednoniciowymi RNA.....	97
2.3	Aktywność helikazowa – rozplatanie dwuniciowych struktur RNA i DNA .....	104
2.4	Aktywność wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych .....	105
3.	Analiza komórkowej sieci oddziaływań pomiędzy RNA i domeną helikazową hDicer – badania wstępne .....	107
3.1	Badanie aktywności RNazowej wariantu hDicer_ΔHEL .....	108
3.2	Izolacja kompleksów RNA•WT hDicer oraz RNA•hDicer_ΔHEL z ludzkich komórek typu HEK 293T NoDice .....	109
3.3	Wstępna analiza danych po sekwencjonowaniu NGS.....	111
3.4	Plany.....	117
V.	DYSKUSJA .....	119
VI.	PODSUMOWANIE.....	130
VII.	STRESZCZENIE.....	132
VIII.	ABSTRACT .....	134
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	136

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

SLO	(ang. <i>5-lipoxygenase</i> ) 5-lipooksygenaza
Å	Angstrom, $10^{-10}$ m = 0,1 nm
ADAR1	(ang. <i>adenosine deaminase acting on RNA 1</i> ) deaminaza adenozyiny działająca na RNA 1
Ago	(ang. <i>Argonaute proteins</i> ) białka z rodziny Argonaute
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
BLI	(ang. <i>Bio-layer Interferometry</i> ) interferometria biowarstwowa
BSA	(ang. <i>bovine serum albumin</i> ) surowicza albumina wołowa
CAF	ang. <i>CARPEL FACTORY gene</i>
CD	(ang. <i>circular dichroism spectroscopy</i> ) spektroskopia dichroizmu kołowego
C-koniec	koniec karboksylowy białka
Cryo-EM	(ang. <i>cryogenic Electron Microscopy</i> ) mikroskopia krio-elektronowa
DCL	(ang. <i>Dicer-like protein</i> ) białko typu Dicer
DExD/H-box	motyw strukturalny charakterystyczny dla RNA helikaz DExD/H-box
DGCR8	ang. <i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i>
DRB4	(ang. <i>dsRNA-binding protein 4</i> ) białko wiążące dsRNA 4
dsDNA	(ang. <i>double-stranded DNA</i> ) dwuniciowy DNA
dsRBD	(ang. <i>dsRNA binding domain</i> ) domena wiążąca dsRNA
dsRBP	(ang. <i>dsRNA binding protein</i> ) białko wiążące dsRNA
dsRNA	(ang. <i>double-stranded RNA</i> ) dwuniciowy RNA
DUF283	(ang. <i>domain of unknown function 283</i> ) domena o nieznannej funkcji 283
EMSA	(ang. <i>electrophoretic mobility shift assay</i> ) metoda różnicowej migracji w żelu poliakrylamidowym
FRET	(ang. <i>Resonance Energy Transfer</i> ) metodę rezonansowego transferu energii fluorescencji
GTP	guanozyno-5'-trifosforan
hDicer	(ang. <i>human Dicer</i> ) ludzka rybonukleaza Dicer
hDicer_ΔHEL	wariant hDicer z delecją domeny helikazowej



HEK 293	(ang. <i>Human Embryonic Kidney 293 Cell line</i> ) linia komórkowa ludzkich komórek embrionalnych nerki nr 293
HEL	domena helikazowa hDicer
HERNA	(ang. <i>helicase with RNase motif</i> ) helikaza z motywem RNazy
His <sub>6</sub> -tag	znacznik histydynowy 6xHis
HYL1	ang. <i>hyponastic leaves 1</i>
IES	(ang. <i>internal eliminated sequences</i> ) sekwencje eliminowane wewnątrznie
irCLIP	(ang. <i>infrared cross-linking immunoprecipitation</i> ) immunoprecypitacja sieciowania w podczerwieni
K <sub>d</sub>	(ang. <i>equilibrium dissociation constant</i> ) równowagowa stała dysocjacji
kDa	kilo Dalton
kpz	kilo par zasad
lncRNA	(ang. <i>long non-coding RNA</i> ) długie niekodujące RNA
Loqs	białka Loquacious
mA	mili ampery
MDL	ang. <i>Magnaporthe Dicer-like</i>
miRNA	(ang. <i>microRNA</i> ) mikro RNA
mRNA	(ang. <i>messenger RNA</i> ) informacyjny RNA
MSUD	(ang. <i>meiotic silencing by unpaired DNA</i> ) wyciszanie mejotyczne przez niesparowany DNA
NER	(ang. <i>nucleotide excision repair</i> ) szlak naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów
N-koniec	koniec aminowy białka
NLS	(ang. <i>nuclear localization signal</i> ) sygnał lokalizacji jądrowej
NMR	(ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> ) magnetyczny rezonans jądrowy
nt	nukleotyd
NTP	trifosforany nukleotydów
OB fold	(ang. <i>oligonucleotide/oligosaccharide binding fold</i> ) motyw wiążący oligonukleotydy/oligosacharydy

OD <sub>600</sub>	gęstość optyczna próbki mierzona przy długości fali 600 nm
PAA	poliakrylamid
PACT	(ang. <i>protein activator of protein kinase R</i> ) proteinowy aktywator kinazy proteinowej R
PPC	(ang. <i>Platform-PAZ-Connector helix cassette</i> ) kasetta obejmująca domeny: Platformę-PAZ-helisę łączącą
PPD	ang. <i>PAZ-Piwi domain</i>
pre-miRNA	(ang. <i>miRNA precursor</i> ) prekursor miRNA
pre-siRNA	(ang. <i>siRNA precursor</i> ) prekursor siRNA
pri-miRNA	(ang. <i>miRNA primary precursor</i> ) pierwotny prekursor miRNA
pz	par zasad
RdRp	(ang. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> ) polimeraza RNA zależna od matrycy RNA
RIG-I	motyw strukturalny charakterystyczny dla helikaz z rodziny RIG-I
RISC	(ang. <i>RNA-induced silencing complex</i> ) kompleks wyciszający indukowany przez RNA
RLR	(ang. <i>retinoic acid-inducible gene-I-like receptors</i> ) receptory RIG-I podobne
RNAi	(ang. <i>RNA interference</i> ) interferencja RNA
RNazy III	rybonukleazy należące do klasy III
rpm	(ang. <i>rotations per minute</i> ) obroty na minutę
rRNA	rybosomalny RNA
RT	(ang. <i>room temperature</i> ) temperatura pokojowa
scnRNA	ang. <i>scan RNA</i>
SDS	(ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i> ) siarczan dodecyłu sodu
SF 1-5	(ang. <i>Helicase Superfamily 1 – 5</i> ) nadrodzina helikaz 1-5
siRNA	(ang. <i>small interfering RNA</i> ) mały interferujący RNA
srRNA	(ang. <i>small regulatory RNA</i> ) krótki regulatorowy RNA
ssDNA	(ang. <i>single-stranded DNA</i> ) jednoniciowy DNA
ssRNA	(ang. <i>single-stranded RNA</i> ) jednoniciowy RNA
tasiRNA	ang. <i>trans-acting RNA</i>

TRBP	(ang. <i>TAR RNA-binding protein</i> )
UMI	ang. <i>Unique Molecular Identifiers</i>
UTR	(ang. <i>untranslated region</i> ) region niepodlegający translacji
V	wolty
W	waty
WT	(ang. <i>wild-type</i> ) białko typu dzikiego

## I. WSTĘP

### 1. Wprowadzenie

Przedłożona praca doktorska dotyczy ludzkiej rybonukleazy Dicer (hDicer). Pierwsze doniesienia literaturowe opisujące gen kodujący rybonukleazę Dicer pochodzą najprawdopodobniej z roku 1994, z zespołu prof. Brendy L. Bass [1]. Gen Dicer został wtedy opisany w kontekście przeszukiwania bibliotek cDNA, przygotowanych na podstawie materiału wyizolowanego z jajnika *Xenopus*, w celu znalezienia białek wiążących dwuniciowy RNA (dsRNA) [1]. Później, w 1999 roku, Provost i in. opublikowali pierwszą pracę dotyczącą hDicer [2]. Analiza przewidywanej sekwencji aminokwasowej nowo zidentyfikowanego białka wykazała wysoką homologię do hipotetycznej helikazy K12H4.8 z *Caenorhabditis elegans* oraz obecność motywu rybonukleazy III (RNazy III) i domeny wiążącej dsRNA (dsRBD) [2]. W 2000 roku, opublikowano szczegółowy opis genu *DICER1* człowieka [3], wówczas pod nazwą „*HERNA*” (helikaza z motywem RNazy), ponieważ produkt białkowy genu zawierał konserwatywne ewolucyjnie motywy charakterystyczne dla helikazy RNA zależnej od ATP, tj. motyw wiążący ATP i motyw DExD/H-box (Asp-Glu-X-Asp/His), oraz motywy wiążące RNA [3]. Wykazano, że ekspresja *HERNA* jest powszechna i specyficzna tkankowo [3]. Nazwa „Dicer” została po raz pierwszy wprowadzona do świata nauki w 2001 roku przez zespół Gregory’ego Hannona [4] i wywodzi się ze zdolności enzymu do cięcia (ang. *dice*) dsRNA na krótkie cząsteczki RNA o długości ok. 22 nukleotydów (nt). Z uwagi na fakt, że Dicer wykazywała specyficzność względem dsRNA, przypisano ją do rodziny endorybonukleaz III [4].

Odnośząc się do królestwa roślin, pierwsze doniesienie literaturowe dotyczące Dicer pochodzi z 1999 roku. Doniesienie to pochodzi z zespołu prof. Elliota Meyerowitza i dotyczy genu obecnego w *Arabidopsis thaliana*, nazwanego ówczynie *CARPEL FACTORY (CAF)*, odgrywającego główną rolę w powstawaniu merystemu kwiatowego [5]. Gen *CAF* kodował białko składające się z 1909 aminokwasów, zawierające domenę helikazy RNA z motywem DExH/DEAD-box na końcu aminowym (tzw. końcu N lub N-końcu) i domenę podobną do RNazy III oraz domenę wiążącą dsRNA na końcu karboksylowym (tzw. końcu C lub C-końcu) [5].

Ówczesny stan wiedzy pozwalał na stwierdzenie, że bardzo podobne białka o nieznanym funkcji są kodowane przez genomy grzybów i zwierząt, co wskazywało, że białka typu CAF mogą pełnić kluczowe funkcje w wielu organizmach eukariotycznych. Struktura białek CAF sugerowała, że mogą one działać jako enzymy hydrolizujące RNA [5]. W 2002 roku, Reinhart i in. zaobserwowali, że akumulacja roślinnego mikroRNA (miRNA) jest zależna od białka CAF [6]. Obecnie gen *CAF* znany jest jako *DICER-LIKE1 (DCL1)*, czyli gen, który koduje dobrze znaną endorybonukleazę DCL1 produkującą roślinne miRNA [7]. Identyfikacja trzech innych genów podobnych do genu *CAF* u *A. thaliana* doprowadziła do poznania dodatkowych członków rodziny białek typu Dicer: DCL2, DCL3 i DCL4 [8].

Zanim udało się doświadczalnie poznać funkcje rybonukleaz typu Dicer, z uwagi na obecność domen RNazy III oraz helikazowego motywu DExD/H-box, sugerowano, że enzymy te mogą być związane z hydrolizą i obróbką cząsteczek RNA. Kolejne rozdziały zostały poświęcone przybliżeniu budowy i funkcji enzymów należących do rodziny RNaz III i helikaz.

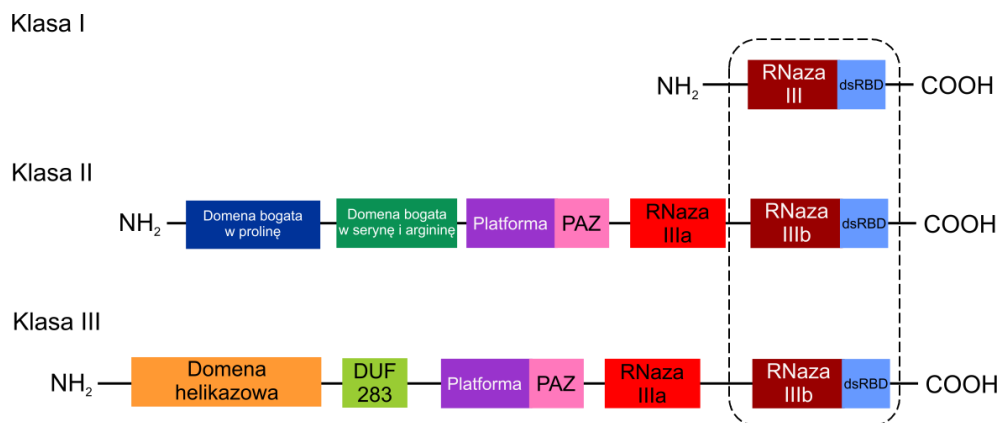
## 2. Rodzina RNaz III

RNazy klasy III specyficznie hydrolizują wiązania fosfodiesterowe znajdujące się w dwuniciowych rejonach RNA i generują produkty zawierające fosforan na końcu 5' oraz dwa niesparowane nukleotydy i grupę hydroksylową na końcu 3' [9]. Na podstawie organizacji domen i funkcji biologicznych, rodzinę RNaz III można podzielić na trzy klasy (**Rysunek 1**). Pierwsza klasa obejmuje bakteryjną RNazę III i drożdżową Rnt1, które zawierają tylko jedną domenę RNazy III i jedną domenę dsRBD. RNazy III z tej klasy muszą utworzyć homodimer w celu powstania funkcjonalnego centrum katalitycznego, w którym dochodzi do cięcia dsRNA, ponieważ każda z nici RNA cięta jest niezależnie przez jedną domenę RNazy III [10]. Bakteryjna RNaza III i drożdżowa Rnt1 są niezbędne w procesie dojrzewania prekursorów rybosomalnych RNA [11]. Ponadto Rnt1 uczestniczy w dojrzewaniu zarówno małych jądrowych RNA [12, 13], jak i małych jąderkowych RNA [14] oraz w dojrzewaniu [15] i kontroli jakości mRNA (ang. *messenger RNA*) [16].

Druga klasa RNazy III jest reprezentowana przez enzymy zawierające dwie domeny RNazy III (nazwane domenami IIIa i IIIb) i jedną domenę dsRBD w rejonie C-końcowym białka. Przykładem takiego enzymu jest rybonukleaza Drosha, która inicjuje proces docinania pierwotnego prekursora miRNA (pri-miRNA) w jądrze komórkowym. Produktami cięcia Drosha są 50-70 nt prekursor miRNA (pre-miRNA) o strukturze spinki do włosów [17]. Drosha jest również zaangażowana w dojrzewanie mRNA [18] i przypuszczalnie w dojrzewanie rybosomalnego RNA [19, 20].

Trzecia klasa RNazy III obejmuje enzymy typu Dicer. RNazy te składają się z dwóch domen RNazy III (IIIa i IIIb) i domeny dsRBD, występujących w rejonie C-końcowym białka, a także, zaczynając od końca N, zawierają: domenę helikazy, domenę DUF283 (ang. *Domain of Unknown Function*) i domenę PAZ (ang. *Piwi-Argonaute-Zwille*). Jednakże istnieje kilka przykładów Dicer, którym brakuje niektórych z wymienionych domen. Przykładowo, Dicer z *Giardia intestinalis* nie posiada domen: helikazy, DUF283 i dsRBD [9], białko DCL3 z *A. thaliana* nie posiada domeny DUF283 [21], DCL3 z *Chlamydomonas reinwardtii* nie posiada domeny PAZ [22]. Członkowie drugiej i trzeciej klasy RNazy III wykorzystują wewnątrzcząsteczkową dimeryzację swoich dwóch domen RNazy III w celu utworzenia funkcjonalnego centrum katalitycznego.

Mechanizm rozpoznawania i cięcia substratów przez ortologi RNazy III został najlepiej poznany w przypadku RNazy III z *E. coli* [10, 23]. W dimerze, każda domena RNazy III niezależnie katalizuje hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w jednej z nici dsRNA. W przypadku enzymów typu Dicer i substratów pre-miRNA, domena RNazy IIIa przecina ramię 3' pre-miRNA, podczas gdy domena RNazy IIIb przecina ramię 5' pre-miRNA [10].



**Rysunek 1. Schemat przedstawiający organizację domen w poszczególnych klasach w rodzinie RNaz III: klasa I – reprezentowana przez rybonukleazę III *E.coli*; klasa II – reprezentowana przez ludzką rybonukleazę Drosha; klasa III – reprezentowana przez ludzką rybonukleazę Dicer. Zaznaczono domeny stanowiące część wspólną dla wszystkich trzech klas RNaz III.**

### 3. Rodzina helikaz

Helikazy RNA i DNA są enzymami, które katalizują reakcję rozplatania struktur dwuniciowych występujących w kwasach nukleinowych, w sposób zależny od ATP [24]. Pierwszą odkrytą helikazą była helikaza z *E. coli* [25], doniesienia na temat tej helikazy pochodzą z 1976 roku. Helikazy są wysoce konserwatywne na poziomie strukturalnym, z uwagi na obecność charakterystycznych motywów u wszystkich przedstawicieli tej rodziny. Niemniej jednak, pełnione przez nie funkcje mogą być zróżnicowane, poczynając od rozplatania tysięcy par zasad (pz) DNA podczas replikacji [26], po destabilizację helis RNA o długości poniżej 10 pz podczas splicingu i biogenezy rybosomów [27], czy też translokację wzdłuż kwasów nukleinowych [28]. Wykazano także, że niektóre helikazy mogą wpływać na oddziaływania pomiędzy RNA i białkami poprzez rearanżacje strukturalne RNA, niezależne od rozplatania jego dwuniciowych rejonów; proces ten odbywa się w sposób zależny od ATP [29].

Gorbalenya i Koonin jako pierwsi podzielili helikazy na pięć grup, tzw. nadrodzin (od SF1 do SF5, ang. *Superfamily*, SF), w zależności od ich występowania i posiadania charakterystycznych na poziomie sekwencji aminokwasowej motywów strukturalnych [30]. Wszystkie helikazy posiadają motywy A i B Walkera odpowiadające za wiązanie i hydrolizę ATP [31]. Motyw A Walkera znany jest również jako „pętla Walkera” albo „pętla P” („P-pętla”) i odpowiada za wiązanie

fosforanów; motyw B Walkera znajduje za motywem A (licząc od N-końca białka), motyw ten odpowiada za hydrolizę ATP [31]. Motywy Walkera obecne są również w wielu białkach wiążących ATP lub GTP [31]. Do grupy SF1 i SF2 należy wiele helikaz DNA i RNA z archeonów, bakterii, eukariontów i wirusów. Helikazy te, dzięki obecności motywu DExD/H-box, rozplatają struktury dwuniciowe obecne w kwasach nukleinowych, niektóre w kierunku od końca 3' do końca 5', a inne od końca 5' do końca 3'. Ponadto do SF2 zaliczamy także helikazy, które dzięki obecności motywu RIG-I (motyw strukturalny charakterystyczny dla helikaz z rodziny RIG-I), posiadają zdolność translokacji wzdłuż kwasów nukleinowych. Grupa SF3 obejmuje małe domeny helikazowe (do ok. 100 reszt aminokwasowych) znajdujące się w białkach produkowanych przez wirusy typu DNA i RNA. Helikazy w obrębie tej rodziny mają tylko trzy konserwatywne motywy (w porównaniu do helikaz SF1 i SF2, które tych motywów mają osiem), w tym dwa klasyczne motywy wiążące ATP (Motywy A i B Walkera). Do grupy SF4 zaliczyć można helikazy podobne pod względem sekwencji aminokwasowej do helikazy DnaB z bakterii *E. coli*, która rozplata dwuniciowy DNA (dsDNA) tworząc widełki replikacyjne podczas replikacji bakteryjnego DNA [32]. Białka z nadrodziny SF4 występujące u bakterii i bakteriofagów charakteryzują się obecnością pięciu motywów strukturalnych i rozplatają dsDNA w kierunku od końca 5' do końca 3'. Do ostatniej grupy SF5, występującej u bakterii, należą helikazy o sekwencji aminokwasowej podobnej do sekwencji aminokwasowej podjednostki  $\beta$  ATPaz translokujących protony, która wchodzi w skład pompy protonowej. Przykładem takiej helikazy jest bakteryjny czynnik terminacji transkrypcji Rho [33].

Powszechna obecność helikaz u eukariontów, prokariotów i wirusów świadczy o ich fundamentalnym znaczeniu w procesach związanych z metabolizmem DNA i RNA. Zasadnicza aktywność helikaz polega na rozplataniu dupleksów kwasów nukleinowych oraz translokacji wzdłuż kwasów nukleinowych, a dysfunkcja tych enzymów u człowieka powiązana jest z wieloma chorobami genetycznymi, przykładem może być zespół Wernera charakteryzujący się przedwczesnym i przyspieszonym starzeniem oraz zespół Blooma związany ze zwiększoną predyspozycją do uszkodzeń chromosomów [34].



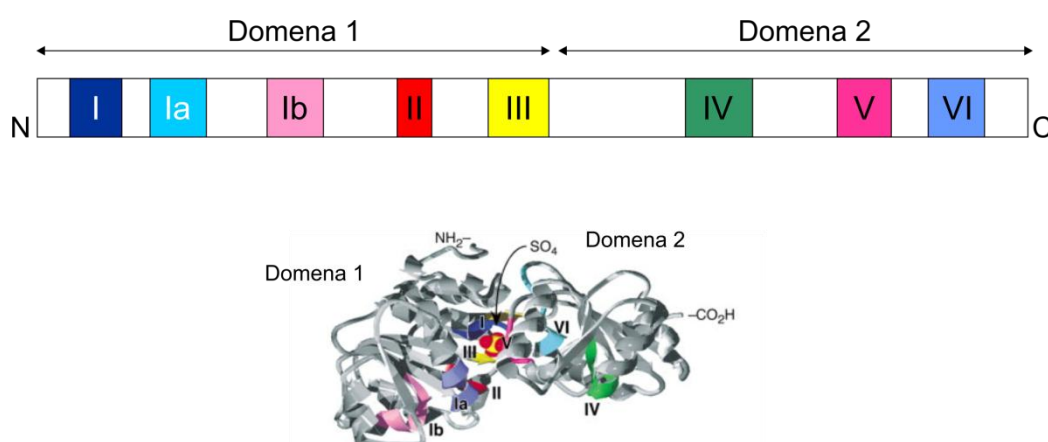
W obrębie domen helikazowych rybonukleaz Dicer oraz białek typu Dicer znajdują się dwa motywy strukturalne charakterystyczne dla helikaz z nadrodziny SF2: DExD/H-box oraz RIG-I [28]. Motyw DExD/H-box odpowiada za rozplatanie dupleksów kwasów nukleinowych, zaś motyw RIG-I za translokację wzdłuż kwasów nukleinowych, obie te aktywności są zależne od hydrolizy ATP [35, 36].

### 3.1 Helikazy RNA DExD/H-box

Rodzina helikaz RNA DExD/H-box należy do nadrodziny helikaz SF2 [37] i jest najliczniejszą grupą enzymów związanych z metabolizmem RNA; należą do niej enzymy mogące wpływać na strukturę RNA w sposób zależny od hydrolizy ATP [38]. Jest to wysoce konserwatywna nadrodzina występująca u wirusów, prokariotów oraz eukariotów, a helikazy zaliczane do tej rodziny posiadają osiem konserwatywnych motywów sekwencyjnych: I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, które zlokalizowane są w dwóch domenach (**Rysunek 2**). Motywy I, Ia, Ib, II i III znajdują się w domenie 1, natomiast motywy IV, V i VI w domenie 2. Nazwa rodziny pochodzi od motywu II, nazywanego DExD/H, gdzie D oznacza kwas asparaginowy, E to kwas glutaminowy, natomiast x oznacza dowolny aminokwas. Motywy I i II znane są również jako motywy Walkera A i B, posiadają one zdolność do wiązania i hydrolizy ATP [31]. Motyw I posiada strukturę pętli P, która stanowi kieszeń wiążącą ATP. Mutacje kluczowych aminokwasów w motywie I zmniejszają powinowactwo i szybkość hydrolizy ATP, znosząc w ten sposób aktywność ATPazową Motywu I [39, 40]. Reszty aminokwasowe obecne w Motywie II oddziałują z fosforanami  $\beta$  i  $\gamma$  ATP poprzez skoordynowany jon  $Mg^{2+}$  [41]. Mutacje w obrębie Motywu II zmniejszają lub całkowicie znoszą aktywność ATPazową, bez wpływu na wiązanie RNA [42]. Motyw III został opisany jako element strukturalny łączący aktywność ATPazy i helikazy. Mutacje w obrębie tego motywu powodują utratę aktywności rozplatania, jednakże mają tylko niewielki wpływ na wiązanie i hydrolizę ATP [42]. Pozostałe motywy występujące w obrębie domeny 1 białek DExD/H zostały jak dotąd słabo poznane, podobnie jak motyw IV znajdujący się w domenie 2. Motyw V stanowi część pętli łączących domeny 1 i 2, przypisuje mu się zdolność do wiązania RNA [24]. Motyw VI powiązany jest z aktywnością ATPazową oraz wiązaniem RNA

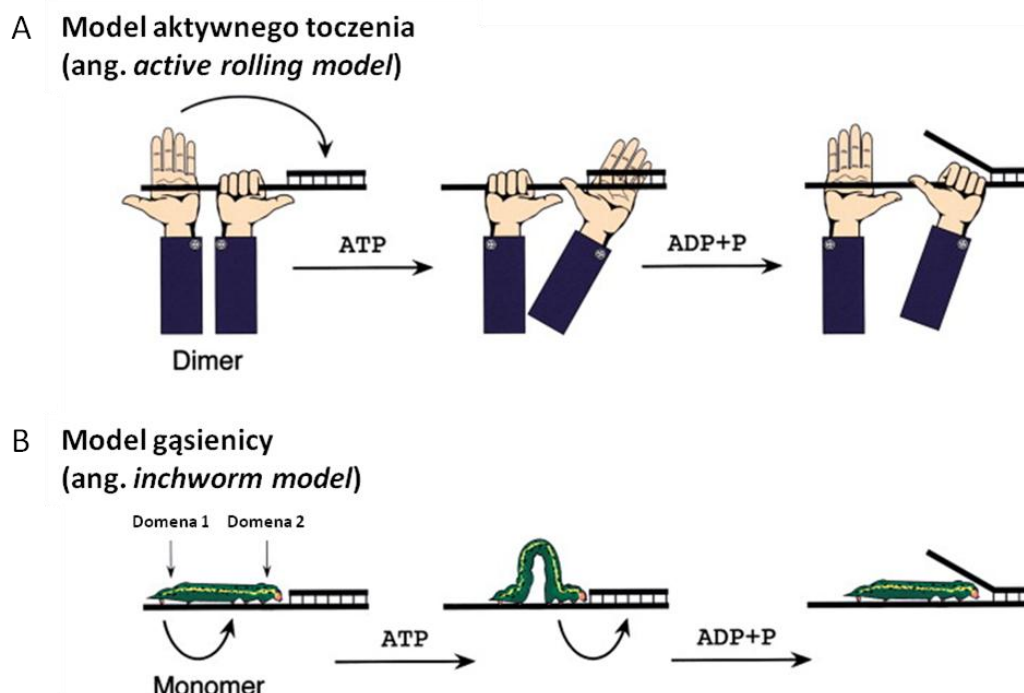
[43]; mutacje w obrębie tej domeny skutkują zniesieniem aktywności wiązania RNA i obniżeniem aktywności ATPazowej [42].

Podstawowa funkcja helikaz opiera się na rozplataniu dwuniciowych rejonów obecnych w kwasach nukleinowych, tj. zrywaniu wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi, któremu może towarzyszyć transllokacja wzdłuż cząsteczek kwasów nukleinowych, obie te aktywności odbywają się na koszt hydrolizy ATP. Przykładem procesów wymagających udziału helikaz RNA jest transkrypcja, translacja, synteza podjednostek rybosomów, składanie transkryptów, eksport RNA do cytoplazmy, degradacja RNA czy propagacja wirusowego RNA [24]. Podczas tych procesów helikazy RNA mogą wykazywać się wysoką specyficnością i prowadzić do rearanżacji tylko wybranych fragmentów RNA, np. poprzez rozplatanie rejonów o strukturze dwuniciowej. Helikazy RNA mogą także przeprowadzać procesywne rozplatanie długich cząsteczek dsRNA [37]. Helikazy RNA są przez to powiązane ze zmianami sieci oddziaływań, w których uczestniczą cząsteczki RNA, włączając w to interakcje RNA-RNA, RNA-DNA oraz RNA-białko. Uważa się, że helikazy RNA, z uwagi na pełnione w komórkach funkcje, mogą być rozpatrywane także jako białka opiekuńcze (ang. *RNA chaperones*), maturazy, białka rozplatające duplekisy kwasów nukleinowych, a nawet ATPazy [37]. Każda z tych aktywności zależy od zdolności helikaz do przejściowego wiązania substratów RNA oraz wiązania i hydrolizy NTP (trifosforanów nukleotydów), co umożliwia rearanżacje strukturalne w obrębie cząsteczek RNA.



**Rysunek 2. Schemat budowy helikaz DExD/H-box z podziałem na domeny i znajdujące się w nich motywy opracowany na podstawie Tanner i Linder (2001) [37]. Dolny panel przedstawia budowę strukturalną białka DEAD box z bakterii *Methanocaldococcus jannaschii* (MjDEAD) w kompleksie z cząsteczką ATP schematycznie pokazaną w postaci żółto-czerwonej cząsteczki.**

Do tej pory zaproponowano wiele modeli wyjaśniających sposób działania helikaz, do najpopularniejszych należą: model aktywnego toczenia (ang. *active rolling model*) oraz model gąsienicy (ang. *inchworm model*) (**Rysunek 3**) [44]. Oba modele zostały pierwotnie zaproponowane dla helikaz DNA, jednakże mają także zastosowanie dla helikaz RNA. Podstawowa różnica między zaproponowanymi modelami polega na tym, że model aktywnego toczenia zakłada dimeryzację białka, podczas gdy w modelu gąsienicy helikaza może działać w postaci monomeru. Zgodnie z modelem aktywnego toczenia, dimery helikazy znajdują się w dwóch różnych stanach konformacyjnych, jeden wykazuje powinowactwo do jednoniciowego RNA (ssRNA), a drugi charakteryzuje się wyższym powinowactwem do dsRNA. Stany konformacyjne zmieniają się na skutek wiązania i hydrolizy NTP. W ten sposób dimer helikaz porusza się wzdłuż RNA i rozplata jego rejony dwuniciowe. Model ten przypomina przesuwanie się dłoni po poziomym pręcie (**Rysunek 3 A**). W modelu gąsienicy, monomer helikazy podlega zmianom konformacyjnym zależnym od hydrolizy NTP, które prowadzą do zbliżenia się lub oddalenia od siebie dwóch motywów strukturalnych (subdomen). Model ten przypomina ruch gąsienicy poruszającej się po podłożu (**Rysunek 3 B**). W obu modelach rozplatanie dsRNA wymaga zmian konformacyjnych białka [37, 44].



**Rysunek 3. Modele wyjaśniające sposób działania helikaz na podstawie Tanner i Linder (2001) [37]. (A)** Model aktywnego toczenia wymaga dimeryzacji helikaz, przy czym każdy z monomerów ma inną konformację i powinowactwo do ssRNA i dsRNA. Konformacje zależą od wiązania i hydrolizy ATP. **(B)** W modelu gąsienicy, odległość między domeną 1 i 2 zmienia się w zależności od wiązania i hydrolizy ATP.

### 3.2 Helikazy RIG-I

Do rodziny helikaz RIG-I należą receptory typu RIG-I (ang. *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*, RLRs). RLRs jest rodziną cytoplazmatycznych receptorów, które rozpoznają egzogenny jedno- i dwuniciowy RNA wprowadzony do komórki podczas infekcji wirusowej. Do grupy RLRs zaliczamy RIG-I, MDA5 (ang. *melanoma differentiation-associated protein*) oraz LGP2 (ang. *laboratory of genetics and physiology 2*) [45]. Gen *DDX58* kodujący motyw RIG-I został zidentyfikowany w 1997 roku jako gen ulegający ekspresji w ostrej białaczce promielocytowej po terapii kwasem retinolowym [46]. Udział produktu tego genu w indukcji odpowiedzi przeciwwirusowej został zaobserwowany przez zespół Yoneyama i in. podczas przeszukiwania bibliotek cDNA pod kątem czynnika białkowego aktywującego ekspresję interferonu beta (IFN- $\beta$ ) [45].

Helikazy RIG-I należą do nadrodziny 2 helikaz (SF2). Typowa helikaza RIG-I zawiera na końcu C domenę represorową/regulatorową (RD), domenę wiążącą RNA,

domenę DExD/H-box o zależnej od ATP aktywności rozplatania dupleksów kwasów nukleinowych oraz dwie unikatowe N-końcowe domeny aktywacji i rekrutacji kaspaz CARD (ang. *caspase activation and recruitment domain*), które odpowiadają za przesyłanie sygnałów wewnątrzkomórkowych [45]. Helikazy RIG-I stanowią ważny element wrodzonej odpowiedzi na infekcje wirusowe. RIG-I rozpoznają i wiążą obecny w cytoplazmie wirusowy RNA, co prowadzi do uruchomienia kaskady sygnałów skutkującej aktywacją czynników transkrypcyjnych NF-κB (ang. *nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells*), syntezą cytokin prozapalnych, aktywacją IRF (ang. *interferon regulatory factors*) i indukcją syntezy interferonu typu I [47].

Motyw RIG-I obecny jest także w domenie helikazowej Dicer kręgowców, w tym hDicer, jednakże jak dotąd nie stwierdzono bezpośredniego zaangażowania RIG-I Dicer kręgowców w odpowiedź przeciwwirusową.

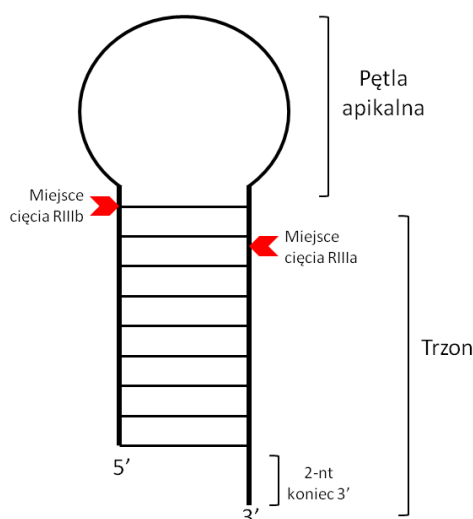
#### **4. Rybonukleazy Dicer i proces biogenezy krótkich regulatorowych RNA**

Rybonukleazy Dicer są znane głównie ze swojej kluczowej roli w biogenezie krótkich regulatorowych RNA (srRNA): miRNA oraz małych interferujących RNA (siRNA). Substratami dla Dicer są cząsteczki pre-miRNA oraz dsRNA. U człowieka większość srRNA stanowią cząsteczki miRNA, dlatego rozdział ten będzie poświęcony przede wszystkim biogenezie miRNA i roli Dicer w tym procesie.

Najczęściej biogeneza miRNA rozpoczyna się do syntezy pri-miRNA przez polimerazę II RNA. Transkrypty pri-miRNA posiadają jedną lub więcej struktur typu spinki do włosów, które są rozpoznawane i wycinane przez kompleks jądrowy złożony z rybonukleazy Drosha i dwóch białek wiążących RNA DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*). Kompleks ten nazwany został kompleksem mikroprocesora [48]. Produktem uwalnianym przez kompleks mikroprocesora są jednoniciowe RNA (ssRNA) przyjmujące struktury typu spinki do włosów, o długości ok. 60 nt, czyli cząsteczki pre-miRNA [49]. W strukturze II-rzędowej pre-miRNA można wyróżnić ramię 5', ramię 3' oraz pętlę apikalną, która łączy oba te ramiona

**(Rysunek 4).** Powstające pre-miRNA są następnie transportowane z jądra do cytoplazmy przez pory jądrowe z pomocą białka transportowego Eksportyny 5. W cytoplazmie, rybonukleaza Dicer rozpoznaje cząsteczki pre-miRNA i wycina z nich dupleksy zawierające funkcjonalne miRNA (dupleksy miRNA/miRNA\*, przy czym miRNA oznacza funkcjonalną cząsteczkę miRNA, natomiast miRNA\*, tzw. nić pasażerską, która zazwyczaj ulega degradacji). Tak powstałe dupleksy są następnie przekazywane do białek z rodziny Argonaute (Ago). Białka Ago są głównymi komponentami kompleksów efektorowych RISC (ang. *RNA induced silencing complex*), które uczestniczą w wyciszaniu ekspresji genów [50]. Aktywacja kompleksu RISC następuje poprzez usunięcie nici pasażerskiej z dupleksu miRNA/miRNA\*. Aktywny kompleks RISC wiąże się do rejonów mRNA zawierających sekwencje komplementarne wobec miRNA, najczęściej są to rejon 3'-UTR (ang. *untranslated region*). Zazwyczaj, w przypadku pełnej komplementarności między miRNA a mRNA dochodzi do zahamowania procesu translacji w wyniku rozcięcia nici mRNA przez białka Ago (głównie Ago2). Natomiast w przypadku niepełnej komplementarności, dochodzi do zablokowania procesu translacji [51]. W ten sposób cząsteczki miRNA regulują ekspresję wielu genów, w tym genów kodujących białka [52]. Szacuje się, że ponad 60% wszystkich ludzkich mRNA może być regulowanych przez miRNA [53].

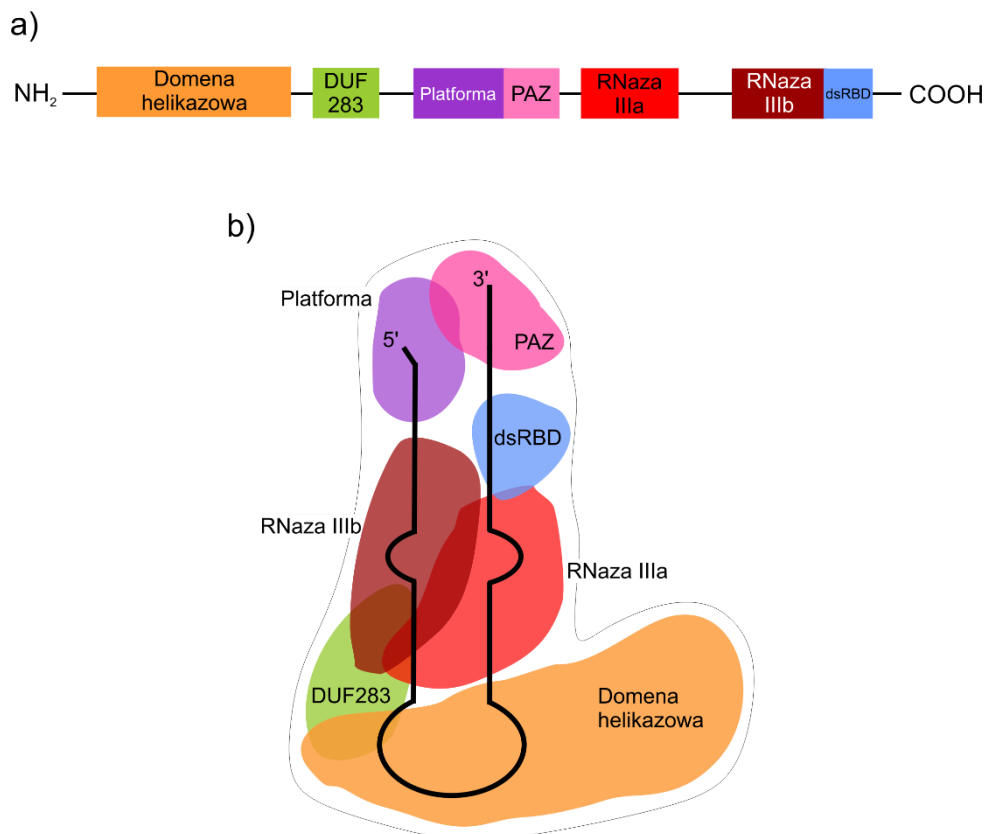
Rybonukleazy typu Dicer odpowiadają także za produkcję cząsteczek siRNA (ang. *small interfering RNA*). Cząsteczki te powstają z długich dsRNA pojawiających się w komórce. Obecne w komórce długie cząsteczki dsRNA mogą być pochodzenia endo- lub egzogenne, egzogenne dsRNA najczęściej dostają się do komórki podczas infekcji wirusowej.



**Rysunek 4. Schemat budowy cząsteczki pre-miRNA.** Czerwoną strzałką zaznaczono orientacyjne miejsca cięcia domen RNazy IIIa i IIIb Dicer.

## 5. Budowa rybonukleaz Dicer oraz funkcje poszczególnych domen na przykładzie hDicer

hDicer kodowana jest przez gen *DICER1* znajdujący się w chromosomie 14 (14q32.13) obejmujący rejon o długości około 72 kpz. *DICER1* uważany jest za gen metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping gene*) [54], chociaż jego produkt (mRNA), w porównaniu z innymi produktami mRNA genów metabolizmu podstawowego, ma niezwykle długi rejon 3'-UTR, który zbudowany jest z ponad 4 000 nt [54]. Produkt białkowy *DICER1* (białko hDicer) składa się z 1922 aminokwasów, jego masa w przybliżeniu wynosi 220 kDa. hDicer składa się kolejno, począwszy od końca aminowego, z domeny helikazowej (HEL), domeny DUF283, domen: Platformy, PAZ i helisy łączącej, które nazywane są kasetą PPC (ang. *Platform-PAZ-Connector helix cassette*); dwóch domen RNazy III (IIIa i IIIb) oraz domeny dsRBD [10]. Wymienione domeny wchodzi w skład większości białek Dicer. Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem technik mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM) wykazały, że struktura trzeciorzędowa hDicer, podobnie jak wielu rybonukleaz typu Dicer, przypomina literę L [55, 56]. W obrębie tej struktury można wyróżnić tzw. głowę, rdzeń i podstawę. Głowę stanowi kasetka PPC, domeny RNazy III znajdują się w rdzeniu, a domena helikazowa tworzy podstawę (**Rysunek 5 b**) [56].



Rysunek 5. Schemat budowy hDicer: a) ułożenie domen w strukturze I-rzędowej białka; b) ułożenie domen w strukturze III-rzędowej białka w obecności substratu pre-miRNA na podstawie *Liu i in.* [56].

## 5.1 Domena helikazowa

Domena helikazowa uważana jest za jedną z najbardziej konserwatywnych domen rybonukleaz typu Dicer [57] i zbudowana jest z trzech subdomen, w obrębie których możemy znaleźć motyw DExD/H-box oraz motyw RIG-I. Jak wspomniano wcześniej, obecność motywu DExD/H-box związana jest z funkcją rozplatania dupleksów kwasów nukleinowych, stanowi także miejsce wiązania i hydrolizy ATP. Motyw RIG-I odpowiada za translokację białka wzdłuż kwasów nukleinowych, aktywność ta jest także zależna od hydrolizy ATP [28]. Jednakże sama obecność motywów DExD/H-box i RIG-I nie gwarantuje posiadania przez białko aktywności rozplatania, czy też translokacji. Przykładowo, dla hDicer i innych ssaczych Dicer, mimo obecności motywów DExD/H-box oraz RIG-I w obrębie domeny helikazowej, nie zaobserwowano jak dotąd wspomnianych powyżej aktywności.



Obecność motywów DExD/H-box i RIG-I pozwoliła na zakwalifikowanie domeny helikazowej rybonukleaz typu Dicer do nadrodziny helikaz SF2 [35, 36, 58]. Domena helikazowa hDicer składa się z trzech subdomen nazywanych HEL1, HEL2i i HEL2 (określana również jako helikaza C) [57], które w strukturze trzeciorzędowej Dicer przyjmują postać trzech płatów (**Rysunek 6 b**) [56]. Subdomena HEL1 zawiera motyw DExD/H-box (charakterystyczny dla helikaz z rodziny DExD/H), subdomena HEL2i zawiera motyw RIG-I (charakterystyczny dla helikaz z rodziny RIG-I) [28, 59]. Subdomena HEL2i jest konserwatywna jedynie w obrębie rodziny RIG-I. Subdomeny te nie występują we wszystkich białkach typu Dicer zawierających domenę helikazową, przykładowo białko typu Dicer z grzyba *Magnaporthe oryzae* nie posiada subdomeny HEL2i [60].

Jak dotąd nie udało się ustalić, czy u kręgowców aktywność domen helikazowych Dicer jest zależna od ATP. W przypadku bezkręgowców, Dicer-1 z *Drosophila melanogaster*, odpowiedzialna za generowanie miRNA, zawiera zdegenerowaną (szczątkową) subdomenę HEL1 niezdolną do hydrolizy ATP [61], natomiast *Giardia* Dicer jest całkowicie pozbawiona domeny helikazowej [9]. Istnieje jednakże wiele przykładów domen helikazowych białek typu Dicer, które wymagają obecności ATP dla aktywności rozplatania czy też translokacji; helikazy takie występują m.in. w Dicer-2 *D. melanogaster* i Dicer *C. elegans* [62], drożdżowych Dicer [63], czy roślinnych białkach DCL [64-66].

Funkcjonalne subdomeny helikaz typu RIG-I, tj.: HEL1, HEL2i i HEL2, są obecne np. w owadach Dicer-2 i roślinnych białkach DCL. Wykazano, że w tych białkach domena helikazowa działa jak „czujnik” wirusowego RNA aktywujący odpowiedni szlak efektorowy RNAi (ang. *RNA interference*) uruchamiający cięcie wirusowych cząstek RNA [67]. U kręgowców oddzielne białko – helikaza RIG-I, służy jako receptor dla układu odpornościowego podczas obrony przed wirusowym RNA. Helikaza ta odgrywa ważną rolę w rozpoznawaniu i wiązaniu wirusowych RNA oraz sprzęganiu wiązania RNA z sygnalizacją przeciwwirusową [68]. Po rozpoznaniu wirusowego dsRNA, RIG-I aktywuje szlaki sygnałowe specyficznych czynników transkrypcyjnych, uruchamiając w ten sposób produkcję interferonu i aktywację wielu genów zaangażowanych w mobilizację układu odpornościowego [69].

Przypuszcza się, że Dicer kręgowców utraciły zdolność rozpoznawania wirusowych RNA przez ich domeny helikazowe z powodu rozwoju innych wewnątrzkomórkowych czujników wirusowego RNA, w tym właśnie helikaz RIG-I [70]. W konsekwencji, domeny helikazowe Dicer u kręgowców i bezkręgowców mogą pełnić różne funkcje.

Niedawne doniesienia literaturowe dotyczące badań nad skróconymi wariantami Dicer opisały rolę mysiej izoformy Dicer, powstającej w procesie alternatywnego składania pre-miRNA, w oocytach. Powstający wariant, pozbawiony subdomeny HEL2i w obrębie domeny helikazowej, był zdolny do cięcia dsRNA, celem czego była prawdopodobnie ochrona komórek macierzystych przed infekcją wirusową [71].

Wykazano, że u organizmów posiadających tylko jedną rybonukleazę Dicer (np. u ssaków i nicieni), domena helikazowa jest zaangażowana w rozróżnianie substratów typu pre-miRNA od substratów pre-siRNA (prekursorów siRNA) [72, 73], choć mechanizm rozróżniania tych substratów wydaje się być inny dla Dicer ssaków i Dicer nicieni. Z danych literaturowych wiadomo, że domena helikazowa hDicer, poprzez interakcję z pętlą apikalną pre-miRNA, odróżnia substraty pre-miRNA od pre-siRNA [74, 75]. Ponadto, hDicer przecina pre-miRNA znacznie wydajniej niż pre-siRNA, a różnicę w wydajności cięcia między tymi dwoma typami substratów przypisuje się obecności domeny helikazowej [72]. Wykazano także, że delecja domeny helikazowej zwiększa zdolność hDicer do cięcia pre-siRNA [76]. W odniesieniu do nicieni, wykazano, że mutacje obniżające poziom hydrolizy ATP w domenie helikazowej Dicer *C. elegans* powodują zmniejszenie ilości niektórych endogennych siRNA, jednocześnie nie wpływając na produkcję miRNA, jak również na produkcję egzogennych pre-siRNA [77]. Większość bezkręgowców posiada dwa oddzielne białka Dicer: Dicer-1 i Dicer-2, biorące udział w biogenezie dwóch różnych typów substratów, odpowiednio miRNA i siRNA [61, 78]. Dodatkowo wykazano, że Dicer bezkręgowców takich jak *S. pombe*, *C. elegans* i *D. melanogaster*, przecinają substraty pre-siRNA w różny sposób, w zależności od końców substratu: dsRNA z w pełni sparowanymi końcami cięty jest w sposób zależny od ATP, podczas gdy dsRNA posiadający dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' przecinany jest

niezależnie od ATP [57, 62]. Struktura cryo-EM Dicer-2 *D. melanogaster* w kompleksie z dsRNA o w pełni sparowanych końcach ujawniła, że substraty z takimi końcami wiązane są przez domenę helikazową [79], podczas gdy substraty posiadające dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3', kotwiczone są przez kasetę PPC Dicer [80].

W 2021 roku ukazał się artykuł obrazujący strukturę roślinnego białka DCL1 podczas wiązania i cięcia pre-miRNA [81]. Zespół prof. Feng porównał struktury DCL1 *A. thaliana*, Dicer-2 *D. melanogaster* oraz hDicer wraz z występującymi w nich domenami helikazowymi. Z porównania wynika, że domena helikazowa DCL1 podczas wiązania cząsteczki pre-miRNA oraz domena helikazowa Dicer-2 podczas wiązania dsRNA tworzą szeroką szczelinę, która umożliwi oddziaływanie białka z substratem. W przypadku hDicer, nie zaobserwowano tak szerokiej szczeliny w obrębie domeny helikazowej [81].

Domena helikazowa rybonukleaz Dicer może również służyć jako platforma wiążąca białka oddziałujące z dsRNA, np. białko TRBP (ang. *HIV-1 transactivating response RNA-binding protein*) lub PACT (ang. *protein activator of protein kinase R*) [52, 70]. Wykazano, że białka te wiązane są niezależnie od siebie, domena helikazowa wiąże albo białko TRBP, albo białko PACT [82]. hDicer w połączeniu z PACT preferencyjnie wiąże i tnie pre-miRNA. Dyskryminacja pre-miRNA i dsRNA jest mniej widoczna gdy Dicer jest w kompleksie z TRBP [83]. TRBP i PACT nie tylko wpływają na rozróżnianie substratów przez Dicer, ale także mogą wpływać na wybór miejsca cięcia, prowadząc do powstawania miRNA o różnej długości, tzw. izo-miRów [82, 84, 85]. Ponadto, TRBP działa jako „pomost” między białkami Dicer i Ago podczas składania kompleksu RISC i przypuszczalnie odgrywa rolę w selekcji funkcjonalnej nici w dupleksach miRNA/miRNA\* [72, 82, 86]. U innych gatunków, domeny helikazowe Dicer oddziałują z białkami typu dsRBP (ang. *dsRNA binding protein*), które przypominają ludzkie białka pomocnicze TRBP i PACT. Na przykład, u owadów, białka Loquacious (Loqs) i R2D2 oddziałują z białkami Dicer-1 i Dicer-2 *D. melanogaster* [70, 87-89].

## 5.2 Domena DUF283

Nazwa „DUF” (ang. *Domain of Unknown Function*) nadawana jest domenom białkowym, których funkcja nie została jeszcze poznana; po nazwie znajduje się numer przypisany do danej domeny. Domena DUF283 białek Dicer wykazuje duże podobieństwo strukturalne do domen wiążących dsRNA [90], które można znaleźć w białkach eukariotycznych, prokariotycznych i wirusowych [91]. Niestety rola domeny DUF283 białek typu Dicer w szlaku biogenezy srRNA nadal pozostaje niepoznana. Początkowo sugerowano, że DUF283 odgrywa znaczącą rolę w biogenezie miRNA, ponieważ warianty Dicer pozbawione domeny helikazowej i domeny DUF283 traciły zdolność do cięcia pre-miRNA [92]. Później wykazano, że delekcja samej domeny DUF283 zwiększa wydajność wiązania, ale zmniejsza wydajność cięcia dsRNA przez Dicer [72], natomiast nie ma wpływu na wiązanie i cięcie pre-miRNA [72]. Struktura DUF283 z DCL4 *A. thaliana* zbadana za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) ujawniła, że DUF283 przyjmuje motyw strukturalny  $\alpha\beta\beta\beta\alpha$  charakterystyczny dla domen wiążących dsRNA (dsRBD) [90]. Podobny motyw strukturalny był przewidywany [93], a następnie eksperymentalnie potwierdzony dla domeny DUF283 hDicer [56]. Niemniej jednak badania eksperymentalne ujawniły jedynie śladową aktywność wiązania dsRNA w przypadku domeny DUF283 z DCL4 *A. thaliana* [90] i nigdy nie wykazały takiej aktywności dla DUF283 z hDicer [94]. Co ciekawe, badania prowadzone w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN wykazały, że białko DUF283 hDicer może wiązać w warunkach *in vitro* jednoniciowe kwasy nukleinowe [94]. Ponadto wykazano, że DUF283 hDicer wspiera parowanie zasad sekwencji komplementarnych występujących w kwasach nukleinowych, tym samym pełniąc funkcję charakterystyczną dla białek opiekuńczych kwasów nukleinowych (tzw. *nucleic acid annealers*) [94]. Zauważono również, że hDicer, prawdopodobnie dzięki obecności domeny DUF283, może wspierać hybrydyzację między krótkimi RNA typu miRNA, czy siRNA, a sekwencją komplementarną obecną w dłuższej cząsteczce RNA, nawet gdy obie sekwencje komplementarne są uwięzione w stabilnych strukturach drugorzędowych [95, 96]. Przypuszcza się, że hDicer rozluźnia lokalne struktury

drugorzędowe poprzez przejściowe interakcje z jednoniciowymi regionami RNA [95].

Domena DUF283 jest często określana jako „domena dimeryzacji”, ponieważ zaobserwowano, że bierze ona udział w wiązaniu białek „partnerujących” Dicer. Wykazano, że domeny DUF283 z DCL1 i DCL4 *A. thaliana* wiążą białka, odpowiednio: HYL1 (ang. *hyponastic leaves 1*) i DRB4 (ang. *dsRNA-binding protein 4*) [90]. Ponadto, wiadomo, że domena DUF283 hDicer wiąże białko ADAR1 (ang. *adenosine deaminase acting on RNA 1*), co stymuluje wydajność cięcia pre-miRNA przez Dicer oraz wydajność przekazywania miRNA do białka Ago [97].

### 5.3 Domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej

Domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej w skrócie nazywane są kasetą PPC (**Rysunek 6 d**). Rejon ten odpowiada za rozpoznanie i kotwiczenie substratów hDicer [80] i zawiera dwie sąsiadujące kieszenie: kieszeń 3', zlokalizowaną w obrębie domeny PAZ, kotwiczącą dwa niesparowane nukleotydy obecne na końcu 3' substratu (pre-miRNA lub dsRNA) i kieszeń 5', współtworzoną przez domenę Platformy i PAZ, kotwiczącą grupę fosforanową występującą na końcu 5' substratu [80]. Obie kieszenie usytuowane są w bliskiej odległości, aby zapewnić jednoczesne dopasowanie odpowiednich końców substratu [98]. Pre-miRNA, w porównaniu z pre-siRNA, zwykle mają tylko częściowo sparowane końce 3' i 5', które stosunkowo łatwo ulegają rozplatanu [80]. W konsekwencji, końce substratów pre-miRNA mogą być łatwo kotwiczone w odpowiednich kieszeniach kasety PPC. Co ciekawe, kieszeń 5' jest wysoce konserwatywna wśród większości homologów Dicer biorących udział w biogenezie miRNA, lecz brakuje jej w Dicer niższych eukariontów, które nie posiadają szlaku miRNA, takich jak grzyby i *Giardia* [98]. Oprócz kieszeni wiążących substrat, domena PAZ posiada również pętlę, w obrębie której licznie występują aminokwasy zasadowe, dzięki czemu możliwa jest zmiana potencjału elektrostatycznego powierzchni wiążącej substrat. Tego typu zmiany mogą wpływać na wydajność wiązania RNA przez Dicer, a w konsekwencji na przekazywanie RNA innym kompleksom białkowym [9].

Domena PAZ (ang. *Piwi-Argonaute-Zwille*) enzymów typu Dicer wykazuje duże podobieństwo strukturalne do domen PAZ występujących w innych białkach zaangażowanych w proces dojrzewania srRNA oraz ścieżkę efektorową RNAi [99]. Domenę PAZ można znaleźć w dwóch rodzinach białek: rodzinie PPD (ang. *PAZ-Piwi Domain Proteins*) oraz rodzinie Dicer [100]. Dobrze znanymi białkami PPD są białka Argonaute. Badania strukturalne ujawniły, że domeny PAZ zawierają wariant motywu OB (ang. *Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding*), który często odpowiada za wiązanie jednoniciowych kwasów nukleinowych [101]. Struktura krystaliczna domeny PAZ z Ago2 *D. melanogaster* ujawniła, że domena ta odpowiedzialna jest za wiązanie końców 3' jednoniciowych RNA [102, 103]. Podobne dane otrzymano dla struktur krystalicznych domeny PAZ ludzkiego białka Ago1 związanego z dupleksem typu siRNA; wykazano, że domena ta kotwiczy w obrębie wysoce konserwatywnej kieszeni koniec dupleksu posiadający dwa niesparowane nukleotydy, tj. koniec 3' [104].

#### 5.4 Domeny RNazy III

Domeny RNazy III są domenami wysoce konserwatywnymi u bakterii i eukariontów, jednak u archeonów obserwuje się je sporadycznie [105]. Prosta RNaza III zawierająca pojedynczą domenę endonukleazową prawdopodobnie pojawiła się w pierwotnych komórkach bakteryjnych, a następnie przeszła do linii eukariotycznej, przykładowo jako endosymbiont [105]. Późniejsze pojawianie się dwóch domen RNazy III w obrębie jednego białka było prawdopodobnie spowodowane duplikacją genu kodującego RNazę III [106]. Następnie domeny te uległy zróżnicowaniu, dając początek domenom RNazy IIIa i IIIb. Domeny takie, jak wspomniano na początku, występują w drugiej i trzeciej podrodzinie RNaz III (**Rysunek 1**). Domeny RNazy IIIa i IIIb tworzą wewnątrzcząsteczkowy dimer i stanowią rdzeń katalityczny kanonicznych enzymów typu Dicer [10]. Domena RNazy III zawiera charakterystyczną sekwencję złożoną z ok. 10 aminokwasów, sekwencja ta nazywana jest motywem kluczowym RNazy III (ang. *RNAse III signature motif*). Motyw ten odpowiedzialny jest za wiązanie jonów metali dwuwartościowych (głównie  $Mg^{2+}$ ), które są ważne dla aktywności katalitycznej enzymu [9, 107, 108]. Opublikowane struktury krystaliczne dla *Giardia* Dicer oraz domeny RNazy IIIb

hDicer ukazały obecność w miejscu aktywnym dwóch dwuwartościowych jonów magnezu [9, 109]. Kationy magnezu można także zastąpić manganem, niklem lub kobaltem, co może wpływać na wydajność i wybór miejsc cięcia przez enzymy RNazy III [106]. Do rozpoznawania i wiązania substratów RNA nie jest wymagana obecność jonów metali dwuwartościowych [110, 111].

Analizy biochemiczne i strukturalne wykazały, że długość produkowanych cząsteczek miRNA i siRNA determinowana jest przez odległość, która dzieli domenę PAZ i domeny RNazy III [55, 56, 112]. Dodatkowo, orientacja przestrzenna domen Platformy i PAZ względem RNazy III wydaje się być istotna dla generowania produktów o określonej długości [113]. Domeny RNazy III znajdują się w ściśle określonej odległości od domeny PAZ, elementem strukturalnym determinującym tę odległość jest prawdopodobnie helisa  $\alpha$  obecna w domenie łączącej (ang. *Connector helix*) [114]. Wykorzystując wspomniane powyżej elementy, Dicer przeprowadza cięcie poszczególnych nici dupleksu RNA w odległości ok 20–23 nt, począwszy od końców 3' i 5' substratu.

Najprostsze białka typu Dicer, takie jak białka znajdujące się w pierwotniakach *Trypanosoma brucei*, zawierają dwie domeny RNazy III [115]. Podczas gdy drożdże *S. cerevisiae* nie posiadają Dicer oraz aktywnego szlaku RNAi, zaś inne drożdże *Saccharomyces castellii* i *Candida albicans* mają proste białka typu Dicer składające się tylko z jednej domeny RNazy III [116, 117]. Wspólną cechą tego typu białek jest także brak domeny PAZ.

*Giardia* Dicer, nazywana także minimalną Dicer, składa się jedynie z domeny PAZ i dwóch domen RNazy III (IIIa i IIIb), nie posiada natomiast pozostałych domen typowych dla Dicer wyższych eukariontów [9]. Dlatego też PAZ i domeny RNazy III uważane są za podstawowy, kanoniczny rdzeń funkcjonalny enzymów typu Dicer. Obecność domen RNazy III jest wymagana także do wiązania się Dicer z białkiem Ago podczas przekazywania produktu cięcia do kompleksu RISC [99, 118, 119]. Poprzez interakcję z domenami RNazy III, białka Ago mogą znaleźć się w pobliżu kompleksu Dicer-miRNA, lub Dicer-siRNA, i oddziaływać z nimi.

## 5.5 Domena dsRBD

Domena dsRBD jest małą konserwatywną domeną białkową występującą zarówno w organizmach eukariotycznych, prokariotycznych jak i w białkach wirusowych [120]. Przypuszcza się, że dsRBD były obecne nawet u ostatniego wspólnego przodka pierwszych organizmów wielokomórkowych [121]. Domena ta składa się z 65-70 aminokwasów tworzących strukturę  $\alpha\beta\beta\alpha$ , podobną do niekanonicznego motywu wiążącego dsRNA obecnego w domenie DUF283 (**Rysunek 6 f**) [122]. W odróżnieniu od domeny DUF283, obecność motywu  $\alpha\beta\beta\alpha$  nadaje domenie dsRBD zdolność do wiązania cząsteczek dsRNA [123]. Ten typ motywu białkowego uważany jest za mało elastyczny, z uwagi na fakt, że nie wykazuje istotnych zmian strukturalnych po związaniu dsRNA, chociaż przy braku obecności RNA, niewielka część motywu charakteryzuje się wysoką elastycznością [106].

Powszechnie uważa się, że wiązanie dsRBD z dsRNA jest zależne od kształtu, a nie bezpośrednio od sekwencji cząsteczki dsRNA. Niektóre białka zawierające dsRBD rozpoznają i wiążą substraty przyjmujące strukturę helisy dsRNA typu A, podczas gdy inne preferują struktury typu spinka do włosów w obrębie RNA [124-126]. Rozróżnianie dupleksów DNA i RNA odbywa się poprzez interakcję dsRBD z grupą 2'-OH rybozy.

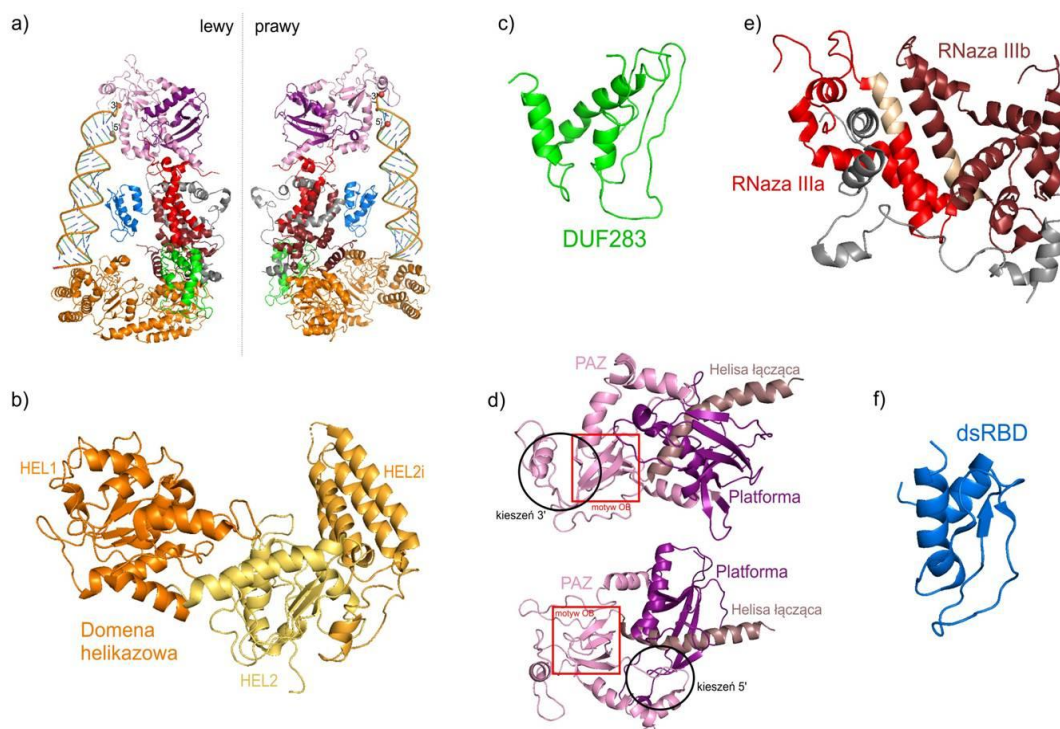
Domena dsRBD obecna na końcu C hDicer wykazuje wysokie powinowactwo do substratów hDicer (pre-miRNA i dsRNA), jednakże nie jest uważana za domenę niezbędną do wiązania tych substratów [127], a jedynie za domenę pomocniczą [74]. Zespół prof. Jennifer Doudny wykazał, że obecność tej domeny jest niezbędna do wiązania substratu, gdy hDicer nie posiada domeny PAZ [74].

Jak wspomniano wcześniej, RNaza III *E. coli* zawierająca tylko jedną domenę RNazy III i dsRBD, musi utworzyć homodimer w celu powstania funkcjonalnego enzymu. RNaza III *E. coli* generuje produkty o długości ok. 11 pz z substratu dsRNA [128]. Proponowany szlak katalityczny dla wszystkich enzymów RNazy III zakłada, że dsRBD odgrywa ważną funkcję poprzez wiązanie substratu dsRNA i przekazywanie go do centrum katalitycznego złożonego z dwóch domen RNazy III. W przypadku hDicer, rolę tę odgrywają domeny Platformy i PAZ. Po przecięciu obu nici substratu,



dsRBD przejmuje produkt i uwalnia go, przygotowując enzym do kolejnej rundy cięcia [70, 105]. Wykazano, że C-końcowy fragment Dicer, złożony z dwóch domen RNazy III i dsRBD, generuje produkt dsRNA o długości ok. 15 pz [74]. Dołączenie N-końcowych domen: HEL, DUF283 i PAZ do C-końcowego fragmentu hDicer przywracało generowanie produktów o długości 22 pz przez odtworzoną hDicer [74].

Ssacze Dicer znajdują się głównie w cytoplazmie, gdzie zaangażowane są w proces biogenezy miRNA, tj. cięcie pre-miRNA. W ostatnim czasie pojawia się jednak coraz więcej doniesień literaturowych odnoszących się do jądrowej lokalizacji tego białka [129, 130]. Możliwość zmiany lokalizacji hDicer przypisuje się obecności sygnału lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS) w postaci dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych zlokalizowanych na powierzchni dsRBD [120, 123]. W imporcie hDicer do jądra komórkowego, zależnym od sygnału NLS, uczestniczą białka transportowe: Importyna- $\beta$ , Importyna-7 i Importyna-8 [123]. Przypuszcza się jednak, że sygnał ten może być maskowany poprzez obecność innych domen hDicer, np. domeny helikazowej [123] lub przez cząsteczki RNA zasocjowane z hDicer [131].



**Rysunek 6. Struktury 3D hDicer (na podstawie struktury PDB 5ZAL) oraz struktury poszczególnych jej domen utworzone w programie PyMOL. (A)** hDicer w kompleksie z pre-let-7 (region pętli apikalnej nie jest widoczny), koniec 5' z grupą fosforanową oraz 3' z grupą hydroksylową zaznaczono kulkami; **(B)** domena helikazowa z uwzględnionymi subdomenami (zaznaczone kolorem żółtym i pomarańczowym); **(C)** domena DUF283 zaznaczona kolorem zielonym, **(D)** kaseta obejmująca domeny Platformy, PAZ i helisy łączącej w dwóch orientacjach; na górnym panelu zaznaczono kieszeń wiążącą 3', a na dolnym, kieszeń wiążącą 5'. Domena Platformy zaznaczona jest kolorem fioletowym, PAZ kolorem jasnorożowym, zaś helisa łącząca kolorem brązowym. Motyw OB w obrębie domeny PAZ oznaczono czerwonym kwadratem. **(E)** rdzeń katalityczny – domeny RNazy IIIa i IIIb oznaczone są odpowiednio kolorem czerwonym i ciemnoczerwonym; fragment łączący obie domeny oznaczono kolorem szarym, motyw charakterystyczny dla RNaz III oznaczono kolorem beżowym; **(F)** domena dsRBD oznaczona jest kolorem niebieskim. Na podstawie Ciechanowska *et al.* [179].

## 6. Ewolucja i różnorodność rybonukleaz typu Dicer

Badania ewolucyjne wskazują, że Dicer i jej homologi rozwinęły się tylko u eukariontów, a gen Dicer uległ duplikacji podczas pojawiania się pierwszych organizmów wielokomórkowych [78]. Następnie geny Dicer różnicowały się niezależnie w królestwach zwierząt, roślin i grzybów [78]. U zwierząt, w wyniku duplikacji genu kodującego Dicer, doszło do wykształcenia białek Dicer-1 i Dicer-2. Dicer-1 odpowiada za rozpoznawanie pre-miRNA i produkcję miRNA, podczas gdy Dicer-2 rozpoznaje i przecina dsRNA generując siRNA [61]. Jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek Dicer-2 w królestwie zwierząt jest owadzia Dicer-2,

której rola polega na rozpoznawaniu, a następnie przecinaniu wirusowych dsRNA, tym samym rybonukleaza Dicer-2 odgrywa ważną rolę w odpowiedzi na infekcje wirusowe u owadów [52, 132]. Gen Dicer-2 został utracony przez kręgowce, które rozwinęły złożone układy odpornościowe [78]. Ponadto, gen Dicer został utracony przez niektóre pierwotniaki i grzyby, np. organizm modelowy *S. cerevisiae* i inne blisko spokrewnione drożdże [133, 134]. W królestwie roślin, w wyniku duplikacji genu, rozwinęły się co najmniej cztery geny kodujące enzymy typu Dicer [78]. Roślinne Dicer, nazywane białkami DCL, tworzą rodzinę białek, których czas dywersyfikacji przypada na pojawienie się mchów (*Physcomitrella patens*) [135]. DCL1 bierze udział w produkcji miRNA, zwykle o długości 21 nt, a jej substratami są pierwotne transkrypty zawierające struktury typu spinki do włosów, podczas gdy DCL2, DCL3 i DCL4 biorą udział w produkcji siRNA [136]. DCL2 wytwarza 22 nt siRNA, które mogą wyciszać transgeny w odpowiedzi roślin na infekcje wirusowe i, podobnie jak owadzi homolog Dicer-2, jest częścią systemu obrony przeciwwirusowej [137, 138]. DCL3 generuje 24 nt siRNA, które uczestniczą w modyfikacjach chromatyny, wpływając tym samym na jej strukturę [139]. DCL4 odpowiada za tworzenie siRNA działających w układzie trans (tasiRNA) [140], a także bierze udział w odpowiedzi przeciwwirusowej [137]. Niektóre rośliny posiadają więcej niż cztery geny kodujące białka DCL; przykładowo w *Medicago truncatula* zidentyfikowano sześć genów białek DCL: DCL1, DCL2, DCL3, DCL4 i dwa homologi DCL2, w tym wariant kodujący skróconą wersję białka DCL2 [64]. Białka DCL są wszechobecne w królestwie roślin; geny kodujące białka DCL1-4 ulegają zróżnicowanej ekspresji w tkankach roślinnych, w zależności m.in. od stadiów rozwojowych i odpowiedzi na stres [135].

U grzyba *Neurospora crassa* zidentyfikowano dwa procesy związane z wyciszeniem ekspresji genów: (i) „*quelling*”, tj. odwracalną inaktywację ekspresji genów przez transformację komórek grzyba powtarzającymi się sekwencjami homologicznymi, która występuje podczas wegetatywnej fazy wzrostu i (ii) wyciszenie mejotyczne przez niesparowany DNA (ang. *meiotic silencing by unpaired DNA*, MSUD) [141]. W każdym z tych procesów uczestniczą inne białka, co wskazuje, że grzyby mogły wykształcić dwie niezależne ścieżki wyciszenia ekspresji genów.

U *N. crassa* stwierdzono obecność dwóch białek podobnych do Dicer, DCL-2 i SMS-3 (DCL-1), które są zaangażowane w szlak wyciszania ekspresji genów poprzez tzw. „quelling”. U *Magnaporthe oryzae*, grzyba blisko spokrewnionego z *N. crassa*, zidentyfikowano dwa geny *DCL: MDL-1 i MDL-2* (ang. *Magnaporthe Dicer-like-1 and -2*) [60]. Obecność białek charakterystycznych dla wyciszania ekspresji genów, takich jak Dicer, wykazano także u *Aspergillus nidulans* i *Schizosaccharomyces pombe* [60, 142-145], a biogenezę siRNA wykryto u *A. nidulans*, *M. oryzae*, *Mucor circinelloides*, *N. crassa* i *S. pombe* [134, 144-147]. Poszukiwania białek potencjalnie związanych z wyciszaniem ekspresji genów w publicznych bazach danych genomów grzybów doprowadziły do identyfikacji białek RdRp (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*), PPD i typu Dicer w różnych grzybach należących do *Ascomycota* (workowce), *Basidiomycota* (podstawczaki) i *Zygomycota* (sprzężniaki), ale nie powiodły się w podzbiorze workowców: *S. cerevisiae*, *Candida guilliermondii* i *Candida lusitanae* oraz podstawczaków: *Ustilago maydis*, *Candida albicans* i *Candida tropicalis* [141]. Co ciekawe, *Cryptococcus neoformans* posiada unikalne białka typu Dicer, w których brakuje helikazy z motywem DEAD/H-box, czyli sygnatury typowej dla białek typu Dicer. Białko Dicer pozbawione helikazy (dcl1p) zostało również znalezione w *Tetrahymena*. Wykazano, że odgrywa ono kluczową rolę w procesie związanym z wyciszaniem genów z wykorzystaniem tzw. sekwencji eliminowanych wewnętrznie (ang. *internal eliminated sequences, IES*), poprzez generowanie małych RNA podobnych do siRNA, zwanych „scan RNA” (scnRNA), z długich dsRNA [148].

Warto również wspomnieć o białkach typu Dicer występujących w algach. *Chlamydomonas reinhardtii* to jednokomórkowa zielona alga, która posiada złożony system wyciszania ekspresji genów, obejmujący trzy białka DCL (DCL1-3) i trzy białka Argonaute (Ago 1-3) [149, 150]. System wyciszania ekspresji genów z wykorzystaniem miRNA w algach różni się od analogicznego systemu roślin lądowych i przypomina mechanizm wyciszania genów występujący u zwierząt. Wiadomo, że białko DCL3 *C. reinhardtii* jest odpowiedzialne za generowanie większości miRNA, chociaż nie posiada domeny PAZ [22]. Inną unikatową cechą białka DCL3 jest bogata w prolinę domena, która jest zlokalizowana po stronie N-końcowej domen RNazy III. Podobna domena występuje w rybonukleazach Drosha,

które także nie posiadają domeny PAZ [22, 151]. Biorąc pod uwagę wyżej wymienione cechy strukturalne, możliwe że DCL3 z *C. reinhardtii* pełni zarówno funkcję rybonukleazy Drosha, jak i Dicer, stanowiąc ogniwo pośrednie między roślinną i zwierzęcą ścieżką biogenezy miRNA [22]. DCL2, podobnie jak DCL3, odpowiada za biogenezę miRNA oraz za generowanie siRNA, jednakże DCL2 nie jest w stanie całkowicie zastąpić DCL3, w przypadku jego braku [22]. Opublikowane dane na temat białka DCL1 z *Chlamydomonas* wskazują, że jest ono zaangażowane w potranskrypcyjne wyciszanie retrotranspozonów, takich jak TOC1 (transpozon obecny w genomie *C. reinhardtii* w liczbie 10-40 kopii) [150]. Co ciekawe, wykazano, że w przypadku braku DCL1, jego niedobory nie są kompensowane przez obecność DCL2 i DCL3 [150].

Roślinne i zwierzęce ścieżki biogenezy miRNA są różne [152, 153]. Szlak biogenezy miRNA u alg różni się również od szlaku biogenezy miRNA roślin wyższych; istnieją dwa prawdopodobne scenariusze mogące wyjaśnić te różnice. Pierwszy z nich zakłada, że szlaki biogenezy miRNA zwierząt, roślin wyższych i alg ewoluowały niezależnie od siebie. Drugi scenariusz zakłada, że zwierzęcy szlak biogenezy miRNA wyewoluował wcześniej i utrzymał się w niższych liniach roślin, w tym zielonych algach, chociaż nie został zachowany w linii roślin wyższych. Drugi scenariusz jest bardziej prawdopodobny, ponieważ szlak biogenezy miRNA u *C. reinhardtii* charakteryzuje się obecnością białka DCL3 podobnego do Drosha (tj. obecność domeny bogatej w prolinę i brak domeny PAZ), które występuje u zwierząt [22].

Chociaż badania ewolucyjne wskazują, że rybonukleaza Dicer jest nieobecna w bakteriach i archeonach, domena helikazy Dicer wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej do jej prokariotycznych ortologów: archeonowych białek Hef, które należą do nadrodziny SF2 [35, 58], natomiast domeny RNazy III Dicer są bardzo podobne do bakteryjnej RNazy III [36]. Połączenie domen helikazy SF2 i RNazy III w jednym białku jest uważane za sygnaturę charakterystyczną dla organizmów eukariotycznych i przypuszczalnie było jednym z krytycznych, wczesnych zdarzeń prowadzących do wykształcenia systemu interferencji RNA u eukariontów [36].

## 7. Rola rybonukleaz typu Dicer poza procesem biogenezy miRNA i siRNA

Jak wspomniano wcześniej, rybonukleazy Dicer kojarzone są głównie z procesem biogenezy miRNA i siRNA, jednakże w ostatnim czasie pojawia się coraz więcej doniesień literaturowych opisujących możliwość udziału rybonukleaz Dicer w procesach niepowiązanych ze wspomnianymi ścieżkami. Między innymi, można znaleźć liczne prace opisujące funkcje Dicer związane z jej lokalizacją jądrową.

W organizmach takich jak muchy, rośliny i drożdże, jądrowa rybonukleaza Dicer bierze udział w tworzeniu heterochromatyny [154]. W komórkach *C. elegans* Dicer-1 została zidentyfikowana jako białko uczestniczące w przebudowie chromatyny w odpowiedzi na promieniowanie UV [155]. W ostatnim czasie wykazano także, że w mysich komórkach rozrodczych Dicer jest niezbędna do prawidłowej spermatogenezy, ponieważ podczas tego procesu kontroluje obwodową ekspresję heterochromatyny [130].

Jądrowa Dicer prawdopodobnie jest również zaangażowana w niezależny od transkrypcji, globalny-genomowy szlak naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów (ang. *nucleotide excision repair*, NER), w którym to pośredniczy w rekrutacji kompleksów metylotransferazy histonowej do miejsca uszkodzenia DNA [156]. W ten sposób Dicer przypuszczalnie ułatwia dekondensację chromatyny, co w konsekwencji umożliwia czynnikom naprawczym dostęp do uszkodzonych miejsc [155].

Rybonukleaza Dicer z *C. elegans* jest także bezpośrednio zaangażowana w proces apoptozy [157]. Apoptoza to naturalny proces zaprogramowanej śmierci komórki w organizmach wielokomórkowych. Jedną z cech charakterystycznych apoptozy jest fragmentacja chromosomalnego DNA prowadząca do nieodwracalnej śmierci komórki. Sam proces może być regulowany przez miRNA produkowane przez Dicer [124]. Jednakże u nicieni *C. elegans* kaspazy indukowane apoptozą mogą przecinać Dicer w obrębie domeny RNazy IIIa, co skutkuje uwolnieniem C-końcowego fragmentu Dicer. Taka skrócona forma Dicer nie działa jak RNaza III,

wykazuje ona natomiast aktywność charakterystyczną dla DNaz, inicjując fragmentację chromosomalnego DNA w jądrze [157]. Jak dotąd, takiej aktywności DNazowej nie stwierdzono dla Dicer kręgowców; jednak wykazano, że w ludzkich astrocytach apoptoza indukowana hipoksją jest związana ze spadkiem poziomu hDicer poprzez aktywację kaspazy-1 [158].

Dicer może pełnić funkcje niepowiązane z jej aktywnością nukleazową. Interesującym aspektem jest udział Dicer w „pasywnym” wiązaniu komórkowych RNA, czyli wiązaniu, któremu nie towarzyszy proces cięcia substratu [159]. Badania *in cellulo* oraz *in vivo* prowadzone w zespole prof. Rajewsky’ego wykazały, że hDicer oraz Dicer-1 z *C. elegans* mogą oddziaływać, m.in. z mRNA oraz długimi niekodującymi RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA) w sposób „pasywny”. Badacze zasugerowali, że pasywne wiązanie może prowadzić do sekwestracji enzymu, a tym samym do obniżenia poziomu komórkowych miRNA, a w konsekwencji do zmian w poziomie ekspresji genów [159]. Co ciekawe, zaproponowano, że pasywny sposób wiązania substratów odbywa się za pomocą domeny helikazowej Dicer, a nie kasety PPC, jak ma to miejsce w przypadku wiązania substratu pre-miRNA. Znaczenie pasywnego wiązania komórkowych RNA przez Dicer nie zostało jednak w pełni wyjaśnione.

## II. CEL PRACY

Z doniesień literaturowych wiadomo, że domena helikazowa hDicer odpowiada za odróżnianie substratów pre-miRNA od dsRNA, przypuszczalnie poprzez oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA. Warianty hDicer pozbawione domeny helikazowej, w porównaniu do kompletnej hDicer, wydajniej wiążą długie dsRNA i wydajniej tną je na fragmenty o długości ok. 22 pz. Interesującym aspektem jest udział hDicer w „pasywnym” wiązaniu komórkowych RNA, czyli wiązaniu, któremu nie towarzyszy proces cięcia substratu. Przypuszczalnie kluczową rolę w pasywnym wiązaniu komórkowych RNA odgrywa domena helikazowa hDicer. Szczegółowa charakterystyka aktywności biochemicznych, w tym specyficzności substratowej, domeny helikazowej hDicer nie została jednak przeprowadzona. Celem badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej było poszerzenie stanu wiedzy na temat domeny helikazowej hDicer, w szczególności określenie jakie aktywności biochemiczne prezentuje domena helikazowa hDicer oraz jakiego rodzaju kwasy nukleinowe mogą stanowić substraty dla domeny helikazowej hDicer, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in cellulo*.

Osiągnięcie tego celu wymagało realizacji następujących zadań:

- w przypadku badań *in vitro*:
  - i) stworzenia konstruktów genetycznych kodujących domenę helikazową hDicer;
  - ii) otrzymania preparatu domeny helikazowej hDicer (HEL hDicer);
  - iii) zbadania aktywności biochemicznych otrzymanego preparatu HEL hDicer, w tym:
    - a) potwierdzenie aktywności hydrolizy ATP przez HEL hDicer,
    - b) zbadania aktywności wiązania substratów typu RNA i DNA, zarówno jedno-, jak i dwuniciowych,
    - c) zbadania aktywności rozplatania dwuniciowych RNA i DNA,
    - d) zbadania aktywności wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acid annealing activity*);
- w przypadku badań *in cellulo*:



- iv) izolacji powstających w komórkach kompleksów RNA•hDicer oraz RNA•hDicer\_ΔHEL (wariant delecyjny hDicer pozbawiony domeny helikazowej);
- v) identyfikacji pul RNA wiązanych przez hDicer oraz wariant delecyjny hDicer\_ΔHEL;
- vi) analizy otrzymanych zbiorów sekwencji (badania wstępne).

### III. MATERIAŁY I METODY

#### 1. Materiały

##### 1.1 Bufory i roztwory barwiące

###### Bufor 10xTBE

890 mM Tris

890 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

20 mM EDTA

###### Bufor TBS

20 mM Tris, pH 7,6

150 mM NaCl

###### Bufor do badania oddziaływań RNA z białkiem (Dicer)

50 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

###### Bufor do badania aktywności opiekuńczej (bufor TT)

50 mM NaCl

20 mM Tris-HCl, pH 8,0

0,05% Triton X-100

###### Bufor do cięcia RNA

50 mM NaCl

2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

20 mM Tris-HCl, pH 7,5

Bufor obciążający I (stosowany do elektroforezy w natywnym żelu poliakrylamidowym) (LB I, ang. *loading buffer I*)

0,05% błękit bromofenolowy  
0,05% ksylencyjanol  
w 50% wodnym roztworze glicerolu

Bufor obciążający II (stosowany do elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym) (LB II, ang. *loading buffer II*)

0,05% błękit bromofenolowy  
0,05% ksylencyjanol  
w 10 M wodnym roztworze mocznika

Bufor Podstawowy do oczyszczania białka otrzymanego w bakteryjnym systemie ekspresyjnym (bufor BP)

50 mM HEPES, pH 7,5  
500 mM NaCl  
5% glicerol  
0,01% Triton X-100

Bufor białkowy hDicer ΔHEL

20 mM Tris, pH 7,5  
50 mM NaCl  
10% glicerol  
0,25% Triton X-100

Bufor do lizy komórek bakteryjnych

1x Bufor Podstawowy  
0,02 M imidazol  
10% Cell Lytic B Lysis Reagent (Sigma)

1 tabletka inhibitora proteaz, cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail  
(Roche)  
1% lizozym

Bufor do pomiarów CD

0,01 M HEPES pH 8,0  
0,3 M NaF

Bufor do elektroforezy SDS-PAGE 10x

10 mM Tris  
384 mM glicyna  
0,2% SDS

Bufor obciążający SB stosowany do elektroforezy SDS-PAGE (bufor SB)

250 mM Tris-HCl, pH 6,8  
20% v/v β-merkaptotanol  
8% SDS  
0,15% błękit bromofenolowy  
40% glicerol

Bufor do lizy (irCLIP)

50 mM Tris-HCl, pH 7,4  
100 mM NaCl  
1% Igepal CA-630  
0,1% SDS  
0,5% deoksycholenu sodu

Bufor "High-salt" (irCLIP)

50 mM Tris-HCl, pH 7,4  
50 mM NaCl

1 mM EDTA  
1% Igepal CA-630  
0,1% SDS  
0,5% deoksycholenu sodu

Bufor "PNK wash" (irCLIP)

20 mM Tris-HCl, pH 7,4  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,2% Tween-20

Bufor 5x PNK pH 6,5 (irCLIP)

350 mM Tris-HCl, pH 6,5  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM ditiotreitol

4x Bufor do ligacji (irCLIP)

200 mM Tris-HCl, pH 7,4  
40 mM MgCl<sub>2</sub>  
4M ditiotreitol

Bufor "PK+SDS" (irCLIP)

10 mM Tris-HCl, pH 7,4  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0,2% SDS

Bufor NT2 (irCLIP)

50 mM Tris-HCl, pH 7,4  
150 mM NaCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,0005% Igepal CA-630

Bufor "High stringency" (irCLIP)

15 mM Tris-HCl, pH 7,4  
120 mM NaCl  
25 mM KCl  
5 mM EDTA  
1% Triton X-100  
0,001% SDS  
1% deoksycholenu sodu

Bufor "Crush-soak" (irCLIP)

500 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0,05% SDS

Bufor TE

100 mM Tris-HCl, pH 7,5  
10 mM EDTA

## 1.2 Materiał biologiczny

W badaniach wykorzystano bakteryjne komórki kompetentne *Escherichia coli* Subcloning Efficiency™ DH5α oraz komórki One Shot™ BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen). Ponadto użyto linię komórkową HEK 293T NoDice (4-25) otrzymaną dzięki uprzejmości prof. Bryana Cullena z Centrum Medycznego Uniwersytetu Duke'a w Karolinie Północnej w USA [160]. Jako kontrolę w eksperymentach irCLIP wykorzystano także linię komórkową HEK 293T.

### 1.3 Oligonukleotydy

W badaniach wykorzystano jednoniciowe RNA i DNA zakupione w firmach Genomed S. A. i Future Synthesis Sp. z o.o. oraz zsyntetyzowane w zespole prof. dr hab. Ryszarda Kierzka z Zakładu Chemii i Biologii Strukturalnej Kwasów Nukleinowych ICHB PAN. Sekwencje wszystkich oligomerów przedstawiono w **Tabeli 1**. Startery z indeksami do NGS wykorzystywane w irCLIP-seq przedstawiono w **Tabeli 2**.

**Tabela 1. Oligonukleotydy wykorzystane w badaniach.**

Nazwa	Sekwencja 5' -> 3'	Długość
R10	GAAUCUUAACGC	12 nt
R20	UCGAAGUAUCCGCGUACGUG	21 nt
R30 sense	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGGUCA	32 nt
R30 blunt	UGACCAGAACAUGCAAUGCAACUACAAUGCAC	32 nt
R30 over	ACCAGAACAUGCAAUGCAACUACAAUGCACAU	32 nt
R40	GGGAGAAUCAUAAGUAGCCUCCCCCAUGUUAACAGUUAGCC	42 nt
R50	GGGAGAAUCAUAAGUAGCGCAGUGAGUCGUUGUGCUGCCCAUGUU AACAGUUAGCC	56 nt
D10	GAATCTTAACGC	12 nt
D20	TCGAAGTATTCCGCGTACGTG	21 nt
21Dan	ACTGCTAGAGATTTTCCACAT	21 nt
21Dan com	ATGTGGAAAATCTCTAGCAGT	21 nt
D30 sense	GTGCATTGTAGTTGCATTGCATGTTCTGGTCA	32 nt
D30 blunt	ACCAGAACATGCAATGCAACTACAATGCACAT	32 nt
D30 over	TGACCAGAACATGCAATGCAACTACAATGCAC	32 nt
D40	GGGAGAATCATAAGTAGCCTCCCCCATGTTAACAGTTAGCC	42 nt
D50	GGGAGAATCATAAGTAGCGCAGTGAGTCGTTGTGCTGCCCATGTT AACAGTTAGCC	56 nt
pcR21	CGUACGCGGAAUACUUCGAAA	21 nt
mcR21	GCGUAAGCGGAAUAAUUCGAU	21 nt
pre-mir-21	AGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUGAAUCUCAUGGCAACACCA GUCGAUGGGCUGU	58 nt
pre-mir-33a	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGGUGGUACCCAUGCAAUG UUUCCACAGUGCAUC	60 nt

pre-mir-16-1	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUUAAGAUUCUAAAAUUAUCUCCA GUAUUAACUGUGCUGCUGAA	65 nt
HEL_F_LIC	TACTTCCAATCCAATGCCATGAAAAGCCCTGCTTTGCAACCC	42 nt
HEL_R_LIC	TTATCCACTTCCAATGTTATCGTGACCATCGTCAGGC	38 nt
t7_fwd	TAATACGACTCACTATAGGG	20 nt
t7_rev	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	20 nt
P3	TATCAGACTGTCGTGCCG	18 nt
P3 tall	GCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT	29 nt

Tabela 2. Startery z indeksami do NGS wykorzystane w irCLIP-seq.

Nazwa_##	Sekwencja indeksu	Przypisany wariant białka
irCLIP_ddRT_1	NNNN, ACACC_0, WWW	WT hDicer (3)
irCLIP_ddRT_9	NNNN, TGACC_0, WWW	hDicer_ΔHEL (1)
irCLIP_ddRT_10	NNNN, TAGTC_0, WWW	hDicer_ΔHEL (2)
irCLIP_ddRT_11	NNNN, TCAGT_0, WWW	hDicer_ΔHEL (3)
irCLIP_ddRT_12	NNNN, TCCAC_0, WWW	WT hDicer (1)
irCLIP_ddRT_13	NNNN, CCGGA_0, WWW	WT hDicer (2)
irCLIP_ddRT_14	NNNN, AGGCA_0, WWW	kontrola HEK 293T (IgG)
irCLIP_ddRT_22	NNNN, GCTCT_0, WWW	kontrola HEK 293T (1)
irCLIP_ddRT_25	NNNN, CTGAT_0, WWW	kontrola HEK 293T (IgG)
irCLIP_ddRT_43	NNNN, AGTTA_0, WWW	kontrola HEK 293T (3)
irCLIP_ddRT_44	NNNN, CTGTA_0, WWW	kontrola HEK 293T (2)
irCLIP_ddRT_45	NNNN, TATGA_0, WWW	kontrola HEK 293T NoDice (IgG)
irCLIP_ddRT_46	NNNN, GTAGA_0, WWW	kontrola HEK 293T NoDice (3)
irCLIP_ddRT_47	NNNN, ATCCA_0, WWW	Kontrola HEK 293T NoDice (2)
irCLIP_ddRT_48	NNNN, TCACA_0, WWW	Kontrola HEK 293T NoDice (1)
irCLIP_ddRT_51	NNNN, TGGCT_0, WWW	hDicer_ΔHEL (IgG)

## - numer indeksu do NGS

(1-3) numery powtórzeń biologicznych

(IgG) kontrola izolacji IgG

#### 1.4 Preparaty białkowe

W badaniach wykorzystano preparat domeny helikazowej hDicer (HEL hDicer) otrzymany w bakteryjnym systemie ekspresyjnym *E.coli* OneShot™ BL21 Star™ oraz preparat WT hDicer i rekombinowane białko z delecją domeny helikazowej hDicer



(hDicer\_ΔHEL) otrzymane w ludzkich komórkach HEK 293T NoDice (4-25) – linia komórkowa typu Dicer „knock out”, bez endogennej Dicer. Preparat WT hDicer został otrzymany przez mgr inż. Martę Wojnicką (Zakład Biochemii Rybonukleoprotein, ICHB PAN). Preparat hDicer\_ΔHEL został otrzymany przez mgr inż. Agnieszkę Szczepańską (Zakład Biochemii Rybonukleoprotein, ICHB PAN).

## 1.5 Plazmidy

W badaniach wykorzystano wektor ekspresyjny pMCSG7 otrzymany dzięki uprzejmości Pracowni Inżynierii Białek ICHB PAN oraz plazmid kodujący wariant hDicer\_ΔHEL pcDNA3.1-FLAG-Dicer-delHelicC, który został zakupiony w Addgene (#51366) [92].

## 1.6 Żele agarozowe

### 1% żel agarozowy:

1 g agarozy (Syngen)

100 ml 1xTBE

### 0,7% żel agarozowy (do izolacji DNA z żelu):

0,35 g agarozy o niskiej temperaturze topnienia (Biotools)

50 ml 1xTBE

## 1.7 Żele poliakrylamidowe (PAA)

### Żele analityczne do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących

15% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1xTBE.

Katalizatory polimeryzacji: 450 μl 10% nadsiarczanu amonu, 30 μl TEMEDu na 80 ml żelu.

### Żele preparatywne do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących

8% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1xTBE.  
Katalizatory polimeryzacji: 200  $\mu$ l 10% nadsiarczanu amonu, 30 $\mu$ l TEMEDu na 50 ml żelu.

15% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 7 M mocznik w buforze 1xTBE.  
Katalizatory polimeryzacji: 200  $\mu$ l 10% nadsiarczanu amonu, 30 $\mu$ l TEMEDu na 50 ml żelu.

#### Żele analityczne do badania oddziaływań RNA-białko w warunkach natywnych

5% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 5% glicerol w buforze 1xTBE.  
Katalizatory polimeryzacji: 200  $\mu$ l 10% nadsiarczanu amonu, 30 $\mu$ l TEMEDu na 50 ml żelu.

10% akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid w stosunku 29:1, 5% glicerol w buforze 1xTBE.  
Katalizatory polimeryzacji: 200  $\mu$ l 10% nadsiarczanu amonu, 30 $\mu$ l TEMEDu na 50 ml żelu.

#### Żele do elektroforezy białek SDS-PAGE

10% żel rozdzielający: 10% PAA, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS

5% żel zagęszczający: 5% PAA, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS

Katalizatory polimeryzacji: 0,1% nadsiarczanu amonu, 2,8  $\mu$ l TEMEDu na 7 ml żelu.

## **1.8 Enzymy**

*Gotaq*<sup>®</sup> DNA Polymerase (Promega)

*SspI* (New England BioLabs)

*Herculase II fusion DNA Polymerase* (Agilent)

*T4 DNA Polymerase* (New England BioLabs)

*RNase I* (Thermo Fisher Scientific)

*Turbo™ DNase* (Invitrogen)

*T4 Polynucleotide Kinase (PNK)* (New England BioLabs)

*T4 RNA Ligase 1* (New England BioLabs)

*Proteinase K* (Thermo Fisher Scientific)

*SuperScript IV Reverse Transcriptase* (Invitrogen)

*RNase H* (New England BioLabs)

*RNase A* (Ambion)

*CircLigasell* (Epicentre)

*Phusion HF Master Mix* (Thermo Fisher Scientific)

*WT hDicer* – preparat otrzymany w komórkach HEK 293T NoDice (4-25) przez mgr inż. Martę Wojnicką z Zakładu Biochemii Rybonukleoprotein ICHB PAN

*hDicer\_ΔHEL* - preparat otrzymany w komórkach HEK 293T NoDice (4-25) przez mgr inż. Agnieszkę Szczepańską z Zakładu Biochemii Rybonukleoprotein ICHB PAN

## 1.9 Odczynniki i materiały wykorzystane podczas badań

$\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (Hartman Analytic GmbH)

*3xFLAG Peptide* (Sigma)

4-12% żel *NuPAGE Bis-Tris* (Invitrogen)

6% żel *TBE Novex™* (Invitrogen)

pre-adenylowany adapter L3-IR-App

Agar (BioShop)

Agarozą (Syngen)

Agaroza o niskiej temperaturze topnienia (Biotools)

Akrylamid/*N,N'*-bisakrylamid, 29:1 (Serva)

Albumina wołowa, BSA (Promega)

Alkohol etylowy 96% (Chempur)

Alkohol izoamylowy (Chempur)

Ampicylina (BioShop)

*Anti-Dicer Antibody sc-136979* (Santa Cruz Biotechnology)

*ANTI-FLAG<sup>®</sup>M2 Affinity Gel* (Merck)

Betaina (Sigma-Aldrich)

Biblioteka genomu bakteriofaga Phix

Bibuła Whatmana (VWR)

*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio Rad)

Bufor 5x PNK pH 6,5 (New England BioLabs)

Bufor HT1 (Illumina)

Bufor SSIV (Invitrogen)

*Cell Lytic B* (Sigma-Aldrich)

*CircLigase II Kit* (Epicentre)

*Chipy High Sensitivity D1000 ScreenTape<sup>®</sup> System* (Agilent)

Chlorek magnezu, MgCl<sub>2</sub> (BioShop)

Chlorek potasu, KCl (BioShop)

Chlorek sodu, NaCl (BioShop)

Chloroform (Warchem)

*Coomassie Bradford Assay* (Promega)

*cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche)

Deoksycholan sodu (Sigma)

*DharmaFECT kb DNA Transfection Reagent* (Dharmacon)

DMEM (Gibco)

DMSO (Sigma)

dNTP mix (New England Biolabs)

DTT (BioShop)

EDTA (BioShop)

Ekstrakt drożdżowy (BioShop)

FBS (Gibco)

Fenol (Warchem)

Glicerol (BioShop)

Glicyna (BioShop)

*GlycoBlue™* (Invitrogen)

HEPES (BioShop)

High Output Flow Cell (Illumina)

Igepal CA-630 (Sigma)

Imidazol (Roth)

IPTG (Blirt)

Klische rentgenowskie RTG-B (Primax)

Kwas chlorowodorowy, HCl (Chempur)

Lizozym (BioShop)

Membrana nitrocelulozowa (Cytiva)

Metanol (Chempur)

*mini Quick Spin Oligo Columns* (Roche)

Mocznik,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (BioShop)

N, N, N', N'-tetrametyloetyloendiamina, TEMED (Sigma)

Nadsiarczan amonu, APS (BioShop)

*Ni Sepharose® High Performance* (GE Healthcare)

*Normal Mouse IgG, sc-2025* (Santa Cruz Biotechnology)

*NuPAGE™ LDS Sample Buffer* (Invitrogen)

*NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer* (Invitrogen)

*NuPAGE™ Transfer Buffer* (Invitrogen)

Octan sodu (Warchem)

*PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Fisher Scientific)

*PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific)

PBS (EURx)

PBS pH 7,4 (Gibco)

PEG400 (Sigma)

Penicylina (Gibco)

Pepton (BioShop)

*Perfect Plus™ 1 kb DNA Ladder* (EURx)

*Perfect™ Tricolor Protein Ladder* (EURx)

Pirogronian sodu (Gibco)

*RNasin* (Promega)

Probówki *Phase Lock Gel Heavy* (VWR)

SDS (BioShop)

Streptomycyna (Gibco)

*SYBR GREEN I* (Sigma)

*Syngen Gel ME Mini Kit* (Syngen)

Tergitol® NP-40 (Sigma)

Tris (BioShop)

Triton X-100 (BioShop)

Tween-20 (Thermo Fisher Scientific)

*UltraPure Water* (Sigma)

Woda wolna od RNaz (EURx)

Wodorotlenek sodu, NaOH (Chamipur)

Złoże magnetyczne *Dynabeads™ Protein G* (Thermo Fisher Scientific)

Złoże *MyOne C1 SA-dynabeads* (Thermo Fisher Scientific)

*Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research)

## **2. Metody**

### **2.1 Amplifikacja DNA**

Reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) wykorzystano do amplifikacji fragmentu sekwencji DNA hDicer oraz w celu identyfikacji tzw. „pozytywnych” kolonii bakteryjnych, zawierających zrekombinowany plazmid (tzw. PCR kolonijny). Matryce do kolonijnego PCR stanowiły pojedyncze kolonie bakteryjne

zawieszono w 5  $\mu\text{l}$  sterylnej wody i inkubowane przez 10 minut w temperaturze 98°C. Składowe reakcji przedstawiono w **Tabeli 3**, warunki jej przebiegu opisano w **Tabeli 4**.

**Tabela 3. Wykaz składników mieszanin reakcyjnych PCR.**

Matrycą w PCR była sekwencja DNA hDicer; w PCR kolonijnym matryca została przygotowana z pojedynczej kolonii bakteryjnej pobranej z szalki hodowlanej.

PCR		PCR kolonijny	
5x Herculase II buffer	10 $\mu\text{l}$	5x Green GoTaq buffer	4 $\mu\text{l}$
dNTPs (25 mM)	0,5 $\mu\text{l}$	dNTPs (10mM)	0,4 $\mu\text{l}$
startery F i R (10 $\mu\text{M}$ )	1,25 $\mu\text{l}$	startery F i R (5 $\mu\text{M}$ )	3,2 $\mu\text{l}$
matryca 200 ng	1 $\mu\text{l}$	matryca	5 $\mu\text{l}$
Herculase II fusion	1 $\mu\text{l}$	GoTaq polymerase	0,1 $\mu\text{l}$
DMSO (3%)	1,5 $\mu\text{l}$	-	-
H <sub>2</sub> O	do 50 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O	do 20 $\mu\text{l}$

**Tabela 4. Wykaz temperatur, czasu trwania i liczby cykli w PCR.**

PCR			PCR kolonijny		
T [°C]	Czas	Liczba cykli	T [°C]	Czas	Liczba cykli
95	2'	1	95	2'	1
95	20''	30	95	1'	30
G (62 - 68)	20''		51	30''	
72	56''		72	90''	
72	3'	1	72	5'	1
4	-	-	4	-	-

' - minuta; '' - sekunda

## 2.2 Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach agarozowych

Produkty PCR oraz kolonijnego PCR poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym z wykorzystaniem aparatu do poziomej elektroforezy w żelach agarozowych. W celu późniejszej wizualizacji kwasów nukleinowych, do żelu agarozowego przed polimeryzacją dodano 1  $\mu\text{l}$  GelView (Novazym). Początkowo rozdzielanie prowadzono przy napięciu 50V, aż do momentu wejścia prób w żel,



następnie napięcie podwyższano do 85V. Wynik rozdziału elektroforetycznego udokumentowano na zdjęciach wykonanych przy użyciu aparatu UVITEC Alliance Q9 Advanced.

### 2.3 Oczyszczanie produktów amplifikacji

Produkty PCR po rozdziale w 0,7% żelu agarozowym wycinano z żelu i oczyszczano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu *Gel ME Mini Kit* (Syngen), zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu.

### 2.4 Wprowadzanie DNA kodującego domenę HEL hDicer do wektora pMCSG7

Do wprowadzenia DNA kodującego domenę HEL hDicer, uzyskanego w wyniku PCR (Rozdział: Metody 2.1 – 2.3) do wektora pMCSG7 wykorzystano system klonowania niezależnego od ligacji - LIC (ang. *Ligation Independent Cloning*). Wektor i insert zostały przygotowane zgodnie z opisem umieszczonym poniżej.

Przygotowanie wektora: linearyzacja przez cięcie enzymem *SspI* przez 15 minut w 37°C (skład mieszaniny reakcyjnej na 50 µl: 1 µg wektora, 1x NEBuffer *SspI*, 1 µl *SspI* 5 000 U/ml, woda do 50 µl) i inkubacja z polimerazą T4 w obecności dGTP przez 40 minut w 22°C (zgodnie z opisem zamieszczonym w **Tabeli 5**).

Przygotowanie insertu: cięcie enzymem *SspI* przez 15 minut w 37°C (skład mieszaniny reakcyjnej na 50 µl: 1 µg DNA, 1x NEBuffer *SspI*, 1 µl *SspI* 5 000 U/ml, woda do 50 µl) i inkubacja z polimerazą T4 w obecności dCTP przez 20 minut w 75°C (zgodnie z opisem zamieszczonym w **Tabeli 5**).

**Tabela 5. Składowe reakcji klonowania z wykorzystaniem systemu LIC.**

\*dGTP stosuje się dla wektora, a dCTP dla insertu

10x NEB Buffer 2	1,5 µl
dGTP lub dCTP* (10 mM)	0,75 µl
DTT (100 mM)	0,6 µl
10x BSA	1,5 µl
Polimeraza T4 NEB (3 U/µl)	0,15 µl
H <sub>2</sub> O	do 15 µl
Insert (300 ng)	3,2 µl
Wektor (300 ng)	3,9 µl

Następnie, przeprowadzono hybrydyzację wektora z insertem. W tym celu mieszaninę reakcyjną zawierającą wektor i insert w stosunku 1:1 inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej (RT, ang. *room temperature*), a następnie dodano 5 µl EDTA (25 mM) i inkubowano kolejne 5 minut w RT.

## 2.5 Transformacja komórek bakteryjnych metodą szoku cieplnego (ang. *heat shock*)

Do 50 µl zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* (szczep DH5α lub OneShot™ BL21 Star™ – Thermo Fisher Scientific) dodano 10 ng plazmidowego DNA (wektora pMCSG7 z wklonowaną sekwencją kodującą domenę HEL hDicer) w objętości 2 µl, całość inkubowano 20 minut w lodzie. Następnie zawiesinę inkubowano przez 45 sekund w 42°C, po czym umieszczono w lodzie. Do transformowanych komórek dodano 250 µl sterylnej, ogrzanej do 37°C pożywki SOC i wytrząsano (225 rpm) przez 1 godzinę w 37°C. Po transformacji bakterie wysiano na stałe podłoże LB zawierające antybiotyk selekcyjny (ampicylina 100 µg/ml). Szalki inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

## 2.6 Izolacja plazmidowego DNA z pojedynczych kolonii bakteryjnych

Płynną pożywkę LB z ampicyliną (100 µg/ml) w objętości 5 ml zaszczerpiono pojedynczą kolonią bakteryjną pobraną z podłoża stałego LB (kolonie bakteryjne

otrzymano zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale: Metody 2.5). Hodowlę płynną prowadzono przez noc w 37°C z wytrząsaniem (225 rpm). Następnie, uzyskaną zawiesinę wirowano przez 25 minut w 4°C przy 5 000 rpm. Supernatant usunięto, a osad wykorzystano do izolacji plazmidowego DNA za pomocą zestawu *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research). Podczas izolacji wykorzystano odczynniki załączone do zestawu i postępowano zgodnie z protokołem opracowanym przez producenta.

## 2.7 Analiza ilościowa i jakościowa DNA

Stężenie plazmidowego DNA (otrzymanego zgodnie z opisem w rozdziale: Metody 2.6) oraz jego czystość analizowano za pomocą spektrofotometru NanoDrop®1000. Oczyszczony plazmidowy DNA (wektor pMCSG7 zawierający sekwencję kodującą domenę HEL hDicer) o znanym stężeniu (50 ng/μl) wraz z odpowiednimi starterami (t7\_fwd i P3, oba o stężeniu 5 μM) przekazano do sekwencjonowania metodą Sanger. Usługa została wykonana przez firmę Genomed S.A. W celu analizy otrzymanych sekwencji wykorzystano program DNADynamo DNA Sequence Analysis Software.

## 2.8 Produkcja preparatu białkowego w bakteryjnym systemie ekspresyjnym

Z podłoża stałego zawierającego kolonie bakterii *E. coli* OneShot™ BL21 Star™ po transformacji plazmidem z wprowadzoną sekwencją DNA domeny helikazowej (plazmid przygotowany zgodnie z opisem zawartym w rozdziale: Metody 2.6), pobrano jedną kolonię i zawieszono w 5 ml płynnej pożywki LB z ampicyliną (100 μg/ml). Hodowlę prowadzono przez noc (12–16 h) w 37°C z wytrząsaniem (250 rpm). Kolejnego dnia zwiększono skalę hodowli do 1:20, tj. do każdego 2,5 ml hodowli nocnej dodano 47,5 ml świeżej płynnej pożywki LB z ampicyliną i ponownie hodowano przez noc w 37°C z wytrząsaniem (250 rpm). Następnego dnia rano zwiększono skalę hodowli do 1:100, tj. do kolby z 495 ml świeżej płynnej pożywki LB z ampicyliną dodano 5 ml hodowli nocnej i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (250 rpm). Co godzinę sprawdzano w jakiej fazie wzrostu znajdują się bakterie poprzez pomiar gęstości optycznej pobranej próbki hodowli przy długości fali 600 nm (OD<sub>600</sub>)

z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop®1000. Hodowlę prowadzono do momentu uzyskania przez bakterie logarytmicznej fazy wzrostu, tj. do momentu osiągnięcia wartości  $OD_{600}$  ok. 0,8. Po osiągnięciu logarytmicznej fazy wzrostu, hodowlę umieszczano w lodzie przez 30 minut, a następnie indukowano ekspresję genu polimerazy T7 dodając IPTG do stężenia końcowego 0,4 mM. Ekspresję prowadzono przez 18 h w 18°C z wytrząsaniem (225 rpm). Kolejnego dnia hodowlę wirowano przez 20 minut w 4°C przy 5 000 rpm, supernatant usunięto, a osad zamrożono w -70°C.

## 2.9 Izolacja i oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa

Uzyskany osad bakteryjny (Rozdział: Metody 2.8) rozpuszczono w 40 ml buforu lizującego i inkubowano w lodzie przez 30 minut. Zawiesinę sonikowano przez 20 minut w 4°C (2 sekundy; 9,9 sekundy przerwy; amplituda 80%), a następnie wirowano przez 30 minut w 4°C przy 11 000 rpm. Po wirowaniu zebrano supernatant zawierający frakcję białek rozpuszczalnych.

W międzyczasie przygotowano kolumnę chromatograficzną do oczyszczania białka metodą chromatografii powinowactwa. W tym celu, w kolumnie umieszczono 5 ml złoża niklowego *Ni Sepharose® High Performance* (Cytiva), następnie upakowane złożo równoważono 5V (1V odpowiada jednej objętości złoża, tj. 5ml) 0,5 M roztworu imidazolu w buforze podstawowym 1x (BP 1x), a następnie 10V 0,02 M imidazolu w BP 1x. Po zrównoważeniu, na kolumnę nałożono supernatant zawierający frakcję białek rozpuszczalnych. Następnie złożo przepłukiwano 10V kolejno: 0,02 M; 0,05 M; 0,1 M roztworami imidazolu w BP 1x; i 5V kolejno: 0,2 M; 0,3 M; 0,5 M i 1 M roztworami imidazolu w BP 1x. Przemycanie kolumny roztworami było wspomagane pompą perystaltyczną Masterflex® L/S®. Zebrane frakcje poddano analizie metodą elektroforezy SDS-PAGE.

## 2.10 Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących

Otrzymywane w rozdziale: Metody 2.9, frakcje poddawano analizie metodą elektroforezy w 10% denaturującym żelu PAA (SDS-PAGE). Do 15 µl próby dodawano 5 µl buforu SB. Mieszaninę denaturowano 5 minut w 95°C, a następnie inkubowano

2 minuty w lodzie. Całość наносzono na żel. Początkowo rozdzielanie przeprowadzono przy napięciu 80 V (do momentu wejścia prób w żel rozdzielający), następnie napięcie zwiększono do 190 V. Po zakończeniu rozdzielania, żel wygotowano trzykrotnie w wodzie destylowanej w celu częściowego pozbycia się SDS. Produkty rozdzielania barwiono w roztworze *PageBlue™ Protein Staining Solution* (Thermo Fisher Scientific). Efekt barwienia wizualizowano za pomocą aparatu UVITEC Alliance Q9 Advanced.

### **2.11 Wymiana buforu i zagęszczanie białka**

Na podstawie wyniku analizy frakcji rozdzielanych metodą elektroforezy SDS-PAGE (Rozdział: Metody 2.10), do analiz aktywności wybierano frakcje zawierające białko o pożądanym stopniu homogenności (>95%). W celu wymiany buforu na bufor BP 1x bez imidazolu oraz zagęszczenia otrzymanego preparatu białkowego wykorzystano filtry *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filters* (Merck) o punkcie odcięcia MWCO 10 kDa. Procedurę wymiany buforu przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

### **2.12 Oznaczanie stężenia białka metodą Bradforda**

Przygotowano rozcieńczenia BSA: 1 µg/µl; 0,75 µg/µl; 0,5 µg/µl; 0,25 µg/µl; 0,1 µg/µl w objętości 50 µl, w buforze BP 1x. Do wszystkich prób przygotowanych w objętości 50 µl, tj. rozcieńczeń BSA, kontroli bez białka oraz badanych prób z białkiem o nieznanym stężeniu, dodano 2,5 ml odczynnika Bradforda 1x. Następnie próby inkubowano w ciemności przez 5 minut. Absorbancję prób mierzono przy długości fali λ595 nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop®1000. Na podstawie uzyskanych wyników dla znanych stężeń BSA wyznaczono krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenia białka i na tej podstawie wyznaczono stężenie badanego preparatu białkowego.

### **2.13 Znakowanie radioizotopowe końca 5' oligomerów RNA i DNA**

1 µl wybranego oligomeru RNA lub DNA o stężeniu 10 pmoli/µl dodano do 6 µl wody wolnej od nukleaz RNase-free water (EURx). Cząsteczki denaturowano 3 minuty w 90°C, a następnie inkubowano przez 2 minuty w lodzie. Do prób dodano po 1µl:

buforu A do kinazy T4 10x, kinazy polinukleotydowej T4 (10 U/ $\mu$ l), [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP. Mieszaninę inkubowano przez 15 minut w 37°C, a następnie dodano 20  $\mu$ l wody wolnej od RNaz. Całość denaturowano 3 minuty w 90°C i inkubowano 2 minuty w lodzie. Próby zawierające oligomery o długości powyżej 20 nt oczyszczano na kolumnach *mini Quick Spin Oligo Columns* (Roche), według protokołu dostarczonego przez producenta. Próby zawierające oligonukleotydy o długości poniżej 20 nt były rozdzielane elektroforetycznie, następnie z żelu wycinano i eluowano produkty o pożądanej długości (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.16). Po oczyszczeniu, wyznakowane oligonukleotydy były rozcieńczane do otrzymania sygnału ok. 10 000 cpm/ $\mu$ l, co odpowiada stężeniu ok. 100 nM. Pomiar sygnału izotopowego (natężenia prądu jonowego) odbywał się z wykorzystaniem licznika scyntylicyjnego Beckman.

#### **2.14 Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących**

Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących prowadzono w żelach poliakrylamidowych zawierających 7 M mocznik. W tym celu wykorzystywano 8% lub 15% żele PAA o wymiarach 19x18,5 cm lub 39x33 cm. Składy żeli opisano w rozdziale: Materiały 1.7. Analizowane preparaty przed nałożeniem na żel obciążano roztworem 10 M mocznika w stosunku objętościowym 1:1, roztwór zawierał także barwniki: Bromophenol blue (0,01%) i Xylene cyanol (0,01%). Próby denaturowano przez 3 minuty w 95°C, a następnie umieszczano w lodzie na 2 minuty. Rozdział prowadzono w buforze 1x TBE. Przed nałożeniem prób, żel poddawano pre-elektroforezie w warunkach: 450 V, 10 mA, 25 W, przez 30 minut, dla mniejszych żeli (19x18,5 cm) oraz 1500 V, 10 mA, 50 W, przez 30 minut dla większych żeli (39x33 cm). Elektroforezę prowadzono w następujących warunkach: 450 V, 40 mA, 25 W, przez 1,5 h, dla mniejszych żeli oraz 1500 V, 40 mA, 50 W, przez 2 h, dla większych żeli. Rozdzielone w żelu, znakowane radioizotopowo oligonukleotydy wizualizowano z wykorzystaniem skanera Fujifilm FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer lub skanera Amersham™ Typhoon™ (Cytiva), a analizę uzyskanych wyników wykonano z wykorzystaniem oprogramowania MultiGauge 3.0 (Fujifilm).

### **2.15 Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych w warunkach natywnych**

Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych oraz kompleksów kwas nukleinowy•białko w warunkach natywnych prowadzono w 5% i 10% żelach PAA o wymiarach 19x18,5 cm. Składy żeli opisano w rozdziale: Materiały 1.7. Analizowane preparaty przed nałożeniem na żel obciążano roztworem 50% glicerolu w stosunku objętościowym 5:1 z dodatkiem barwników Bromophenol blue (0,01%) i Xylene cyanol (0,01%). Rozdział prowadzono w buforze 1x TBE. Przed nałożeniem prób, żel poddawano pre-elektroforezie w warunkach: 120-180 V, 10 mA, 25 W, przez 30 minut. Elektroforezę prowadzono w warunkach: 120-180 V, 40 mA, 25 W, przez 3-8 h, w zależności od analizowanego preparatu. Rozdzielone w żelu, znakowane radioizotopowo oligonukleotydy (lub ich kompleksy z białkiem) wizualizowano z wykorzystaniem skanera Fujifilm FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer lub skanera Amersham™ Typhoon™ (Cytiva), a analizę uzyskanych wyników wykonano z wykorzystaniem oprogramowania MultiGauge 3.0 (Fujifilm).

### **2.16 Oczyszczanie kwasów nukleinowych w żelach PAA**

Kwasy nukleinowe o długościach poniżej 20 nt oraz cząsteczki pre-miRNA po znakowaniu radioizotopowym (Rozdział: Metody 2.13) poddawano elektroforezie w 8% żelu PAA, w warunkach denaturujących (Rozdział: Metody 2.14). Po rozdziale, cząsteczki znakowane radioizotopowo wizualizowano na kliszach rentgenowskich i wycinano z żelu przy użyciu skalpela. Wycięte fragmenty żelu, zawierające pożądane cząsteczki kwasów nukleinowych, umieszczano w probówce typu Eppendorf, rozdrabniano, dodawano 200-300 µl 0,3 M octanu sodu (pH 5,5) i inkubowano w 4°C przez noc z wytrząsaniem 500 rpm. Następnie próby wirowano (14 000 rpm, 4°C, 1 minuta), po wirowaniu supernatant przenoszono do nowej probówki. Obecne w supernatancie sole kwasów nukleinowych strącano poprzez dodanie 600-900 µl 96% zimnego etanolu (-20°C) i wymrażanie przez noc w -20°C. Kolejnego dnia preparat wirowano 30 minut przy 14 000 rpm w 4°C, po usunięciu supernatantu, osad przemywano 200 µl 70% zimnego etanolu (-20°C). Próby ponownie wirowano 30 minut przy 14 000 rpm w 4°C. Po usunięciu etanolu, osad suszono i rozpuszczono w wodzie wolnej od RNaz. Wyznakowane oligonukleotydy były rozcieńczane do

otrzymania sygnału ok. 10 000 cpm/ $\mu$ l. Pomiar sygnału izotopowego (natężenia prądu jonowego) odbywał się z wykorzystaniem licznika scyntylicyjnego Beckman.

## 2.17 Badanie oddziaływań kwas nukleinowy-białko metodą EMSA

Do badania oddziaływań białek z kwasami nukleinowymi wykorzystano metodę różnicowej migracji w żelach poliakrylamidowych (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA). Standardową reakcję prowadzono w objętości 40  $\mu$ l. Wyznakowany radioizotopowo oligomer (10 000 cpm/ $\mu$ l) przed dodaniem do mieszaniny reakcyjnej poddawano denaturacji przez 3 minuty w 90°C, a następnie umieszczano w lodzie na 2 minuty. Następnie oligomery inkubowano z białkiem, w buforze do badania oddziaływań RNA/DNA z białkiem (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5). Stężenie białka w mieszaninie reakcyjnej wynosiło odpowiednio: 2,97; 5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu$ M. W celu stwierdzenia, czy obecność ATP wpływa na aktywność wiązania kwasów nukleinowych przez białko HEL hDicer, przeprowadzono także serię reakcji z dodatkiem ATP do stężenia końcowego 1 mM. W przypadku substratów RNA, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 0,5  $\mu$ l inhibitora RNaz (EURx). Skład mieszaniny reakcyjnej podano w **Tabeli 6**.

**Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej do badania oddziaływań pomiędzy RNA/DNA a białkiem.**

Składnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
Bufor Dicer	5x	1x
RNA/DNA	10 000 cpm/ $\mu$ l	10 000 cpm (ok. 2,5 nM)
HEL hDicer	9 $\mu$ g/ $\mu$ l (125 pmol/ $\mu$ l)	2,97 - 95 $\mu$ M
ATP	10 mM	1 mM

Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 15 minut w RT. Po zakończeniu inkubacji, mieszaniny reakcyjne rozdzielano metodą elektroforezy w 5% żelu PAA, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.15.

Do badania oddziaływań kwas nukleinowy•białko wykorzystano także cząsteczki dwuniciowe, które wcześniej przygotowano poprzez hybrydyzację komplementarnych nici (z czego jedna była wyznakowana radioizotopowo) zgodnie ze schematem: 1  $\mu$ l NaCl (100 mM), 10 000 cpm RNA/DNA znakowanego



radioizotopem oraz 1  $\mu\text{l}$  nici komplementarnej RNA/DNA (300 fmoli). Mieszaninę denaturowano przez 3 minuty w  $90^{\circ}\text{C}$ , a następnie powoli schładzano ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ ) do  $10^{\circ}\text{C}$ . Tak przygotowany dwuniciowy oligomer rozdzielano w 15% żelu PAA, w celu otrzymania czystego, dwuniciowego substratu. Po rozdziale, cząsteczki znakowane radioizotopowo wizualizowano na kliszach rentgenowskich i wycinano z żelu przy użyciu skalpela. Wycięte fragmenty żelu, zawierające pożądane cząsteczki kwasów nukleinowych, umieszczano w probówce typu Eppendorf, rozdrabniano, dodawano 200-300  $\mu\text{l}$  0,3 M octanu sodu (pH 5,5) i inkubowano w  $4^{\circ}\text{C}$  przez noc z wytrząsaniem 500 rpm. Następnie próby wirowano (14 000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 1 minuta), po wirowaniu supernatant przenoszono do nowej probówki. Obecne w supernatancie sole kwasów nukleinowych strącano poprzez dodanie 600-900  $\mu\text{l}$  96% zimnego etanolu ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) i inkubację przez noc w  $-20^{\circ}\text{C}$ . Kolejnego dnia preparat wirowano 30 minut przy 14 000 rpm w  $4^{\circ}\text{C}$ , po usunięciu supernatantu, osad przemywano 200  $\mu\text{l}$  70% zimnego etanolu ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Próby ponownie wirowano 30 minut przy 14 000 rpm w  $4^{\circ}\text{C}$ . Po usunięciu etanolu, osad suszono i rozpuszczono w wodzie wolnej od RNaz. Wyznakowane oligonukleotydy były rozcieńczane do otrzymania sygnału ok. 10 000 cpm/ $\mu\text{l}$ . Pomiar sygnału izotopowego (natężenia prądu jonowego) odbywał się z wykorzystaniem licznika scyntylicyjnego Beckman. Przygotowany w ten sposób dwuniciowy substrat poddawano reakcji j.w.

### **2.18 Badanie aktywności opiekuńczej białek względem kwasów nukleinowych**

Standardową reakcję prowadzono w objętości 15  $\mu\text{l}$ . Wyznakowany radioizotopowo oligomer (10 000 cpm/ $\mu\text{l}$ ) oraz komplementarny do niego oligomer dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor TT (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6) oraz białko HEL hDicer. Stężenie białka w mieszaninie reakcyjnej wynosiło odpowiednio: 0,58; 1,16; 2,32; 4,63; 9,27; 18,53  $\mu\text{M}$ . W przypadku substratów RNA, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 0,5  $\mu\text{l}$  inhibitora RNaz (EURx). Po zmieszaniu wszystkich składowych reakcji, próby inkubowano przez 15 minut w RT. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w **Tabeli 7**.

Dodatkowo, przeprowadzono badanie aktywności opiekuńczej HEL hDicer o stężeniu 4,63  $\mu\text{M}$  w czasie. W tym celu przygotowano mieszaninę reakcyjną zgodnie z **Tabelą 7**, a następnie inkubowano w RT przez: 0, 15, 30, 60, 90 i 120 minut.

W celu stwierdzenia, czy obecność ATP wpływa na badaną aktywność, przeprowadzono także serię reakcji z dodatkiem ATP do stężenia końcowego 1 mM.

**Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności opiekuńczej białek.**

Składnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
Bufor TT	10x	1x
HEL hDicer	4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (55,6 pmol / $\mu\text{l}$ )	0,58 – 18,53 $\mu\text{M}$
<sup>32</sup> P RNA/DNA	10 000 cpm/ $\mu\text{l}$	10 000 cpm (ok. 6,7 nM)
komplementarny RNA/DNA	300 nM	20 nM
ATP	10 mM	1 mM

Po skończonej inkubacji, dodano 5  $\mu\text{l}$  4% roztworu SDS. Następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielano metodą elektroforezy w 10% żelu PAA, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.15.

## 2.19 Badanie aktywności rozplątania dupleksów kwasów nukleinowych

Standardową reakcję prowadzono w objętości 15  $\mu\text{l}$ . Wyznakowany radioizotopowo dwuniciowy oligomer (10 000 cpm) (przygotowany zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale: Metody 2.17) dodawano do mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor TT (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6) oraz białko HEL hDicer. Stężenie białka w mieszaninie reakcyjnej wynosiło odpowiednio: 0,58; 1,16; 2,32; 4,63; 9,27; 18,53  $\mu\text{M}$ . W przypadku substratów RNA, do mieszaniny reakcyjnej dodawano 0,5  $\mu\text{l}$  inhibitora RNaz (EURx). Po zmieszaniu wszystkich składowych reakcji, próby inkubowano przez 15 minut w 37°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w **Tabeli 8**.

W celu stwierdzenia, czy obecność ATP wpływa na badaną aktywność, przeprowadzono także serię reakcji z dodatkiem ATP do stężenia końcowego 1 mM.

**Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności rozplatania dupleksów kwasów nukleinowych.**

Składnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
Bufor TT	10x	1x
HEL hDicer	4 µg/µl (55,6 pmol/µl)	0,58 – 18,53 µM
<sup>32</sup> P dsRNA/dsDNA	10 000 cpm/µl	10 000 cpm (ok. 6,7 nM)
ATP	10 mM	1 mM

Po skończonej inkubacji, dodano 5 µl 4% roztworu SDS. Następnie mieszaniny reakcyjne rozdzielano metodą elektroforezy w 10% żelu PAA, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.15.

## 2.20 Badanie aktywności ATPazowej

Reakcję prowadzono w objętości 10 µl. W mieszaninie reakcyjnej umieszczono [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP (ok. 10 000 cpm, C<sub>k</sub> 200 nM), bufor do badania oddziaływań RNA/DNA z białkiem (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) oraz białko HEL hDicer (wg. Tabeli 9) lub WT hDicer (C<sub>k</sub> 2 nM) lub hDicer\_ΔHEL (C<sub>k</sub> 2 nM) oraz MgCl<sub>2</sub> (C<sub>k</sub> 2,5 mM). Po zmieszaniu wszystkich składowych reakcji, próby inkubowano przez 30 minut w 37°C. Skład reakcji podano w **Tabeli 9**.

**Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności ATPazowej.**

Składnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
Bufor Dicer	5x	1x
Białko	4 µg/µl (55,6 pmol/µl)	0,0625 - 2 nM
ATP [ $\gamma$ <sup>32</sup> P]	10 000 cpm/µl	200 nM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM

Po skończonej inkubacji mieszaniny reakcyjne rozdzielano metodą elektroforezy w 10% żelu PAA, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.15 lub w 15% żelu PAA, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.14.

## 2.21 Badanie aktywności RNazowej

Reakcję prowadzono w objętości 10  $\mu$ l. W mieszaninie reakcyjnej umieszczono: (10 000 cpm,  $C_k$  ok. 10 nM) cząsteczki pre-miRNA lub dwuniciowej cząsteczki RNA, przygotowanej zgodnie z opisem umieszczonym w rozdziale: Metody 2.17, bufor do badania oddziaływań RNA/DNA z białkiem (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5) oraz białko hDicer\_ $\Delta$ HEL ( $C_k$  1,25 - 10 nM) lub WT hDicer ( $C_k$  10 nM) oraz MgCl<sub>2</sub> ( $C_k$  2,5 mM). Przygotowano także reakcję kontrolną z dodatkiem EDTA (25 mM), który chelatuje jony magnezu. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 0,5  $\mu$ l inhibitora RNaz (EURx). Po zmieszaniu wszystkich składowych reakcji, próby inkubowano przez 30 minut w 37°C. Skład reakcji podano w **Tabeli 10**.

**Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do badania aktywności RNazowej.**

Składnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
Bufor Dicer	5x	1x
Białko	100 nM	1,25 - 10 nM
RNA	10 000 cpm/ $\mu$ l	10 000 cpm (ok. 10 nM)
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM

Po skończonej inkubacji do mieszanin reakcyjnych dodawano mocznik (10 M) w stosunku objętościowym 1:1 i próby denaturowano 3 minuty w 95°C, po czym umieszczano w lodzie na 2 minuty. Mieszaniny reakcyjne rozdzielano w 15% denaturującym żelu PAA, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.14.

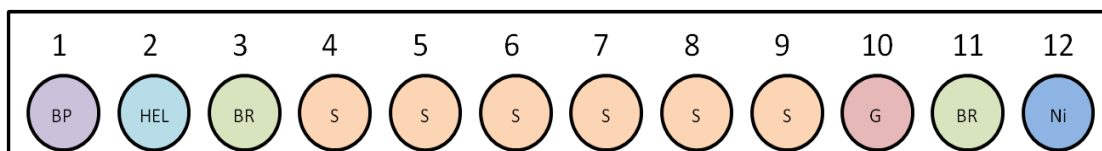
## 2.22 Badanie oddziaływań kwas nukleinowy-białko z wykorzystaniem metody

### BLI

W analizie wykorzystano:

- (i) bufor podstawowy (BP),
- (ii) bufor do badania oddziaływań RNA z białkiem (Dicer),
- (iii) preparat białkowy HEL hDicer (1  $\mu$ M),
- (iv) ligandy RNA i DNA (100 – 3,125  $\mu$ M),
- (v) glicynę (100 mM),
- (vi) NiSO<sub>4</sub> (100 mM).

200  $\mu$ l poszczególnych składowych reakcji (wymienionych wyżej) umieszczano w dołkach na czarnej płaskodennej płytce 96-dołkowej wg. schematu pokazanego na **Rysunku 7**.



**Rysunek 7. Schemat pokazujący rozmieszczenie mieszanin reakcyjnych na płytce 96-dołkowej w metodzie BLI.** **BP** – bufor podstawowy, **HEL** – białko HEL hDicer, **BR** – bufor do badania oddziaływań RNA z białkiem (Dicer), **S** – rozcieńczenia ligandów RNA/DNA lub bufor do badania oddziaływań RNA z białkiem (Dicer) w przypadku ścieżki kontrolnej, **G** – glicyna, **Ni** – NiSO<sub>4</sub>.

Do pomiarów wykorzystano aparat Octet K2 System (Forte Bio). Pomiar prowadzono przy następujących parametrach: (i) typ sensora Ni-NTA, (ii) temperatura: 23°C, (iii) prędkość wytrząsania: 1 000 rpm. Etapy pomiarów wraz z czasami przedstawiono w **Tabeli 11**.

**Tabela 11. Etapy pomiarów metodą BLI wraz z czasami trwania.**

Etap	Czas (sekundy)
Linia bazowa (Baseline)	60
Asocjacja (Association)	20
Dysocjacja (Dissociation)	20
Ładowanie białka (Loading)	1800
Regeneracja (Regeneration)	30
Zanurzenie (Dip)	60

Analizę danych przeprowadzono w programie Data Analysis 11.1 (Forte Bio). Eksperymenty oraz analizę danych wykonano we współpracy z dr hab. Anną Urbanowicz, kierownikiem Pracowni Inżynierii Białek, ICHB PAN.

### 2.23 Badanie metodą spektroskopii dichroizmu kołowego (CD)

Widma dichroizmu kołowego (CD) zebrano na spektrometrze J-815 CD (JASCO) wyposażonym w uchwyt termostatyczny Peltiera. Roztwór białka HEL hDicer (C<sub>k</sub> 28

$\mu\text{M}$ ) oraz kompleks RNA•HEL hDicer (w stosunku molowym 1:1) w buforze zawierającym 10 mM HEPES (pH 8,0) oraz 300 mM NaF, analizowano w kuwecie kwarcowej 0.1 cm (Hellma 100-QS). Każde widmo CD zostało wygenerowane na podstawie 9 skanów, z szybkością skanowania  $50 \text{ nm}/\text{min}^{-1}$ , z rozdzielczością 1 nm. Dane zbierano w zakresie 210-300 nm, w zakresie temperatur od  $5^\circ\text{C}$  do  $90^\circ\text{C}$ . Wszystkie operacje na widmach wykonano w programie Jasco Spectra Manager. Eksperymenty oraz analizę danych wykonano we współpracy z dr Kamilem Szpotkowskim z Zakładu Biochemii Rybonukleoprotein ICHB PAN.

## **2.24 Badanie oddziaływań kwas nukleinowy-białko z wykorzystaniem metody irCLIP-seq**

Badania oddziaływania HEL hDicer z cząsteczkami RNA w oparciu o metodę irCLIP, zostały przeprowadzone podczas trzymiesięcznego stażu w Ośrodku Genomiki Medycznej OMICRON Wydziału Lekarskiego UJ CM w Krakowie, we współpracy z zespołem dr n. med. Pawła Wołkowa.

### **2.24.1 Fotozszywanie z wykorzystaniem światła UV (ang. *UV crosslinking*)**

Przygotowanie prób do badania oddziaływań RNA-HEL hDicer z wykorzystaniem metody irCLIP-seq (ang. *infrared cross-linking immunoprecipitation combined with NGS-sequencing*) [161] rozpoczęto od zebrania komórek: (i) HEK 293T (kontrola referencyjne) i (ii) HEK 293T NoDice (4-25) transfekowanych plazmidem kodującym białko hDicer\_ΔHEL oraz WT hDicer, po 72h od momentu transfekcji. Komórki, po odciążeniu pożywki, zostały zawieszono w 6 ml zimnego PBS (EURx). Następnie, komórki naświetlano światłem UV o długości fali 254 nm przy użyciu aparatu UV Stratalinker 2400 (Stratagene). Po naświetleniu, komórki odklejono od płytki za pomocą głaszczki, a mieszaninę komórek i PBSu rozporcjowano po 2 ml do 3 probówek typu Eppendorf (1 powtórzenie biologiczne). Zawiesinę komórek wirowano w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  przez 3 minuty przy 2 045 rpm, następnie usunięto supernatant. Osad komórkowy zamrożono z wykorzystaniem suchego lodu i przechowywano w  $-80^\circ\text{C}$ . Łącznie przygotowano dla każdej z prób trzy powtórzenia biologiczne i jedno powtórzenie służące kontroli specyficzności izolacji kompleksów RNA•białko (kontrola IgG).

### 2.24.2 Przygotowanie złoża magnetycznego oraz lizatu komórkowego

Złoże magnetyczne *Dynabeads™ Protein G* (Thermo Fisher Scientific) w objętości 100 µl na próbę, przemywano 2x 900 µl buforu do lizy (Rozdział: Materiały 1.1). Po przepłukaniu, złoże zawieszono w 100 µl buforu do lizy i dodano 4 µg odpowiedniego dla danego białka przeciwciała. W przypadku, hDicer i wariantu hDicer\_ΔHEL wykorzystano przeciwciała specyficzne wobec końca C białka hDicer (Anti-Dicer Antibody sc-136979, Santa Cruz Biotechnology). W przypadku kontroli izolacji specyficznych kompleksów RNA•białko (kontrola IgG), wykorzystano złoże magnetyczne opłaszczone przeciwciałami anti-IgG (Normal Mouse IgG, sc-2025, Santa Cruz Biotechnology). Następnie złoże inkubowano w RT przez 60 minut na rotatorze wertykalnym firmy Biosan. Przed dodaniem lizatu do złoża, złoże przepłukano 3x 900 µl buforu do lizy z użyciem magnetycznego statywu.

Przygotowanie lizatu rozpoczęto od rozpuszczenia osadów komórkowych w 1 ml buforu do lizy z inhibitorem proteaz (Roche). Po przeniesieniu prób do nowych probówek typu Eppendorf, osady poddano sonikacji w 10 cyklach w 4°C (30 sekund; 30 sekund przerwy). Stężenie lizatu sprawdzono wykorzystując zestaw *Coomassie Bradford Assay* (Promega), pomiar wykonano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta na 96-dołkowej płytce, na urządzeniu GloMax®-Multi Detection System, w odniesieniu do próby referencyjnej, zawierającej BSA. 1 ml lizatu o stężeniu ok. 0,56 µg/µl poddano trawieniu RNazą I oraz DNazą przez 3 minuty w 37°C z wytrząsaniem 1 100 rpm. Po trawieniu, lizat umieszczono w lodzie na 3 minuty, a następnie wirowano przez 10 minut w 4°C przy 15 000 rpm.

Supernatant zawierający pożądane kompleksy RNA•białko, powstały po wirowaniu, zabrano i dodano do złoża, a następnie inkubowano przez noc w 4°C na rotatorze.

### 2.24.3 Defosforylacja końca 3' RNA i ligacja z adapterem wyznakowanym barwnikiem bliskiej podczerwieni

Po całkowitej inkubacji, próby umieszczono w statywie magnetycznym i usunięto z nich supernatant. Następnie, złoże przepłukano dwukrotnie 900 µl buforu „High-salt” (podczas drugiego płukania złoże inkubowano z wcześniej wspomnianym

buforem przez minutę w 4°C). Kolejnym krokiem było przepłukanie złoża 1x 900 µl buforu „PNK wash”. Po usunięciu buforu, w celu defosforylacji końca 3' RNA związanego z białkiem hDicer\_ΔHEL lub WT hDicer, złoże zawieszono w 20 µl mieszaniny zawierającej: bufor 1x PNK pH 6,5; 0,5 µl RNasin; 0,5 µl polimerazy PNK (NEB); 15 µL UltraPure Water. Użycie polimerazy PNK umożliwiło defosforylację końca 3' RNA tworzącego kompleksy RNA•białko. Zawiesinę inkubowano 20 minut w 37°C z wytrząsaniem 1 100 rpm. Po inkubacji, złoże przepłukano 1x 900 µl buforem „PNK wash”, a następnie 1x buforem „High-salt” i ponownie 1x 900 µl buforem „PNK wash”. Po przepłukaniu, złoże zawieszono w 100 µl buforu „PNK wash” i przeniesiono do nowej probówki typu Eppendorf. Złoże ponownie przepłukano 1x 900 µl buforu „PNK wash” i inkubowano w 4°C na rotatorze przez 10 minut. Następnie próby krótko zwirowano i usunięto supernatant. Złoże zawieszono w 20 µl mieszaniny ligacyjnej zawierającej: 1x bufor do ligacji; 0,5 µl RNasin; 1 µl ligazy RNA; 4 µl PEG400; 2 µl adaptera L3-IR-App (1 µM); 7,5 µL UltraPure Water. Ligacja adaptera, posiadającego barwnik bliskiej podczerwieni, z zdefosforylowanym wcześniej RNA (w kompleksie RNA•białko) odbywała się przez noc w 16°C z wytrząsaniem 1 100 rpm.

#### **2.24.4 Rozdział kompleksów w żelu SDS-PAGE i ich transfer na membranę nintrocellulozową**

Po całonocnej inkubacji, złoże przepłukano 1x 900 µl buforem „PNK wash”, następnie 1x 900 µl buforem „High-salt”, po czym, złoże inkubowano na rotatorze przez 1 minutę w 4°C. Złoże ponownie przepłukano 2x 900 µl buforu „PNK wash”, następnie zawieszono w 20 µl buforu 1x *NuPAGE™ LDS Sample Buffer* (Invitrogen) i inkubowano 5 minut w 70°C z wytrząsaniem 1 100 rpm, w celu uwolnienia kompleksów ze złoża magnetycznego. Po inkubacji, próby umieszczono w statywie magnetycznym, w celu oddzielenia supernatantu, zawierającego uwolnione kompleksy RNA•białko od złoża. Następnie, pobrano 19 µl supernatantu i nałożono na żel 4-12% *NuPAGE Bis-Tris* (Invitrogen). Wzorcem wielkości był marker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-250 kDa* (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezę prowadzono w buforze 1x *NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer* (Invitrogen) przy 180V przez 65 minut.



Przygotowaną wcześniej membranę nitrocelulozową (8 cm x 7 cm), bibułę Whatmana (8 cm x 8 cm) oraz gąbki namoczono w buforze do transferu *NuPAGE™ Transfer Buffer* (Invitrogen) z dodatkiem 10% metanolu. Po skończonej elektroforezie, żel wyjęto i odcięto fragment zawierający kieszonki. Złożono tzw. „kanapkę” do elektrotransferu mokrego, zgodnie z kolejnością od anody: gąbka, 2x bibuła Whatmana, żel, membrana nitrocelulozowa, 2x bibuła Whatmana, gąbka. Transfer prowadzono przez 2 h przy 30 V. Po transferze, membranę przepłukano roztworem PBS i zabezpieczono folią typu stretch. Kompleksy RNA•białko obecne na membranie wizualizowano z wykorzystaniem aparatu Odyssey Li-COR CLx Imager przy długości wiązki lasera 700 oraz 800 nm.

#### **2.24.5 Izolacja RNA z kompleksów RNA•białko**

Kolejnym etapem było wycięcie z membrany specyficznych kompleksów RNA•białko i umieszczenie wyciętych fragmentów w probówkach typu Eppendorf. Do fragmentów membrany dodano 200 µl roztworu proteiny K (10 µl) i buforu „PK+SDS” (190 µl). Mieszaninę inkubowano 1,5h w 50°C z wytrząsaniem 1 100 rpm. Po inkubacji, do mieszaniny dodano 200 µl roztworu fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy i zmieszano. Mieszaninę przeniesiono do 2 ml probówek *Phase Lock Gel Heavy* (VWR) i inkubowano 5 minut w 30°C z wytrząsaniem 1 100 rpm. Następnie próbki wirowano 5 minut w RT przy 13 000 rpm, w celu rozdzielenia faz. Do górnej fazy dodano 800 µl chloroformu i zmieszano poprzez kilkukrotne odwracanie probówki. Całość wirowano przez 5 minut w RT przy 13 000 rpm. Górną wodną warstwę przeniesiono do nowej probówki typu Eppendorf, dodano 21 µl glycoblu Master Mix (1 µl glycoblu, 20 µl 5M chlorku sodu) i wymieszano przez pipetowanie. Do mieszaniny dodano 1 ml 96% etanolu. RNA precypitowano przez noc w -20°C.

#### **2.24.6 Odwrotna transkrypcja i cyrkularyzacja**

Po wyjęciu prób z -20°C, całość wirowano w temperaturze 4°C przy 15 000 rpm przez 45 minut. Supernatant usunięto, a osad przemyto 900 µl 80% etanolu. Następnie próby zwirowano przez 35 minut przy 15 000 rpm w 4°C. Po usunięciu supernatantu, osad suszono przez 2 minuty w RT. Osad, zawierający RNA, rozpuszczono w 6 µl UltraPure Water i przeniesiono do probówki typu PCR. Do probówki dodano: 1 µl

startera irCLIP\_ddRT\_## (1 pmol/ $\mu$ l) (## - wybrany numer indeksu do sekwencjonowania NGS, **Tabela 2**) i 0,5  $\mu$ l mieszaniny dNTP (10 mM), 1x bufor SSIV (Invitrogen), 0,5  $\mu$ l 0,1M DTT, 0,25  $\mu$ l RNasin, 0,25  $\mu$ l odwrotnej transkryptazy Superscript IV. Próby umieszczono w termocyklerze i ustawiono program: 5 minut 25°C; 5 minut 50°C; 5 minut 55°C; 4°C. Po skończonej inkubacji, do mieszaniny dodano: 0,5  $\mu$ l RNazy H (NEB) i 0,5  $\mu$ l RNazy A (Ambion). Próby inkubowano 15 minut w 37°C. W tym czasie przygotowano złoże MyOne C1 SA-dynabeads (Thermo Fisher Scientific) przez przepłukanie 2x 100  $\mu$ l buforem NT2 (Rozdział: Materiały 1.1). Złoże wykorzystano w celu oczyszczenia produktów odwrotnej transkrypcji przed cyrkularyzacją cDNA. Na każdą próbę wykorzystano 80  $\mu$ l złoża zawieszonego w buforze NT2. Po dodaniu cDNA do złoża, próby inkubowano na rotatorze wertykalnym przez 45 minut w RT. Następnie usunięto supernatant i przepłukano złoże 2x 100  $\mu$ l buforem „High stringency”, 3x 100  $\mu$ l PBS (pH 7,4, Gibco).

Po usunięciu supernatantu, złoże MyOne C1 SA-dynabeads zawierające cDNA, zawieszono w 12,75  $\mu$ l roztworu do elucji cDNA (1  $\mu$ l 1  $\mu$ M P3 tall, 0,75  $\mu$ l 50mM MnCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ l betainy, 8  $\mu$ l UltraPure Water). Próby umieszczono w termocyklerze i nastawiono program: 3 minuty 95°C; 95  $\rightarrow$  60°C (spadek temperatury 0,1°C/sekundę); 5 minut 60°C. Następnie, do prób dodano 2,25  $\mu$ l roztworu do ligacji: bufor 1x CirLigase II (Epicentre), 0,75  $\mu$ l CirLigase II (Epicentre) i inkubowano 2h w 60°C, a następnie schłodzono do 4°C. Po ligacji, próby ze złożem inkubowano 3 minuty w 95°C, następnie umieszczono w statywie magnetycznym i zbierano cDNA (ok. 15  $\mu$ l). W celu odzyskania resztek cDNA, do złoża dodano 185  $\mu$ l buforu TE i inkubowano przez 5 minut w 80°C. Po inkubacji, 185  $\mu$ l buforu TE pobrano z złoża i dodano do pobranego wcześniej cDNA. Następnie do mieszaniny zawierającej cDNA dodano 200  $\mu$ l buforu TE oraz 40,75  $\mu$ l roztworu glycoblu (0,75  $\mu$ l glycoblu, 40  $\mu$ l 3M octanu sodu pH 5,5) oraz 1 ml 100% etanolu. cDNA precypitowano przez noc w -20°C.

#### **2.24.7 Namnażanie cDNA metodą PCR**

Po całkowitej precypitacji, próby wirowano 30 minut przy 15 000 rpm w 4°C. Po usunięciu supernatantu, do osadu dodano 0,5 ml 80% etanolu. Następnie, ponownie

wirowano 30 minut przy 15 000 rpm w 4°C. Po usunięciu supernatantu, osad suszono 3 minuty w RT i rozpuszczono w 15 µl UltraPure Water (Sigma). Następnie, przygotowano mieszaniny reakcyjne, zgodnie z **Tabelą 12**. Przed właściwą reakcją PCR, wykonano optymalizację liczby cykli (21, 24, 27 i 30), w celu wybrania ilości cykli, która pozwoli na uzyskanie homogennego produktu. Ostatecznie w PCR zastosowano 25 cykli.

Warunki przebiegu reakcji zamieszczono w **Tabeli 13**.

**Tabela 12. Wykaz składników mieszanin reakcyjnych PCR.**

PCR optymalizacyjny		PCR preparatywny	
cDNA	1 µl	cDNA	1 µl
mix starterów (10µM)	0,5 µl	mix starterów (10µM)	0,5 µl
P5Solexa/P3Solexa		P5Solexa/P3Solexa	
Phusion HF Master mix	10 µl	Phusion HF Master mix	10 µl
UltraPure Water	8,5 µl	UltraPure Water	8,5 µl

**Tabela 13. Wykaz temperatur, czasu trwania i liczby cykli w PCR.**

PCR optymalizacyjny			PCR preparatywny		
T [°C]	Czas	Liczba cykli	T [°C]	Czas	Liczba cykli
98	40''	1	98	40''	1
98	20''	15-30	95	20''	25
65	30''		65	30''	
72	45''		72	45''	
72	3'	1	72	3'	1
25	-	-	25	-	-

' - minuta; '' - sekunda

Produkty PCR poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 6% żelu *TBE Novex™* (Invitrogen) z wykorzystaniem aparatu do pionowej elektroforezy w żelach poliakrylamidowych. Rozdział prowadzono przy napięciu 185 V przez 25 minut. Po rozdzielaniu, żel barwiono w buforze zawierającym *SYBR GREEN I* (Sigma) przez 5 minut i udokumentowano na urządzeniu Gel Dox XR Imaging System (Bio Rad).

### 2.24.8 Oczyszczanie produktów PCR z żelu

Oczyszczanie produktów PCR z żelu rozpoczęto od wycięcia z żelu prążków DNA odpowiadających długości 145-400 pz. Fragmenty żelu umieszczono w probówkach typu Eppendorf z odręcznie zrobionymi dziurkami na wieczku i wirowano 1 minutę przy 13 000 rpm w 4°C, w celu rozdrobnienia fragmentów żelu. Po wirowaniu, do rozdrobnionego żelu dodano 500 µl buforu „Crush-soak” i inkubowano 2 h w 65°C z wytrząsaniem 1 000 rpm. Po zakończonej inkubacji, supernatant przeniesiono do próbki typu Eppendorf z kolumną *Costar SpinX* (Sigma) i wirowano 1 minutę przy 13 000 rpm w RT w celu pozbycia się resztek żelu. Następnie, przesącz przeniesiono do nowej próbki typu Eppendorf i dodano 51 µl roztworu glycoblu (1 µl glycoblu, 50 µl 3 M octanu sodu, pH 5,5) oraz 1 ml 96% etanolu. Próby precypitowano przez noc w -20°C. Po całkowitej precypitacji próby wirowano przez 30 minut przy 15 000 rpm w 4°C. Po usunięciu supernatantu, do osadu dodano 900 µl 80% etanolu i wirowano 30 minut przy 15 000 rpm w 4°C, a osad pozostawiono na 3 minuty w RT do wysuszenia. Po wysuszeniu, osad rozpuszczono w 15 µl UltraPure Water.

### 2.24.9 Przygotowanie i normalizacja bibliotek do sekwencjonowania NGS

W celu przygotowania biblioteki cDNA do sekwencjonowania NGS, wykonano analizę TapeStation (Agilent), która umożliwia ocenę rozkładu fragmentów oraz jakość biblioteki cDNA. W tym celu wykorzystano rozdział elektroforetyczny z zastosowaniem chipów *High Sensitivity D100 Screen Tape® Sytem* (Agilent) oraz aparat Agilent 2200 TapeStation System (Agilent). Próby oraz marker wielkości przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta. Pomiarowi poddawano 2 µl nierozcieńczonego cDNA z biblioteki.

Po określeniu stężenia bibliotek cDNA za pomocą spektrofotometru NanoDrop®1000 oraz sprawdzeniu rozkładu długości fragmentów w bibliotekach cDNA, biblioteki łączono ze sobą w jednej próbce typu Eppendorf do stężenia końcowego 0,05 ng/µl każdej z bibliotek. Z każdej biblioteki kontroli IgG dodano po 2 µl do biblioteki końcowej. Następnie, ponownie wykonano pomiar stężenia biblioteki cDNA na spektrofotometrze NanoDrop®1000. Na podstawie wyliczonego stężenia, obliczono

średnie stężenie biblioteki, które wynosiło 0,315 ng/μl. Na końcu wyznaczano stężenie biblioteki, zgodnie ze wzorem:

$$\frac{\text{stężenie próbki } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}{660 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) \times \text{średnia długość produktów cDNA w bibliotece (pz)}} \times 10^6$$

$$= \text{stężenie biblioteki (nM)}$$

Stężenie przygotowanej biblioteki cDNA wynosiło ok. 3 nM.

Przygotowanie biblioteki zostało wykonane we współpracy z dr Justyną Totoń-Żurańską z Ośrodka Genomiki Medycznej OMICRON (Wydział Lekarski UJ w Krakowie).

#### **2.24.10 Sekwencjonowanie z zastosowaniem sekwenatora Illumina NextSeq550**

Bibliotekę przygotowaną zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale: Metody 2.24.9, rozcieńczono wodą wolną od DNaz i RNaz do końcowego stężenia 2 nM. Kolejnym krokiem była denaturacja biblioteki, w tym celu bibliotekę mieszano z jedną objętością 0,2 M NaOH (10 μl) i wirowano 1 minutę przy 1 500 rpm, a następnie inkubowano przez 5 minut w RT. Po zakończonej inkubacji, do próby dodano 10 μl 200 mM Tris-HCl (pH 7,0) i wirowano 1 minutę przy 1 500 rpm. Po zwirowaniu, bibliotekę rozcieńczano do stężenia końcowego 20 pM, poprzez dodanie 970 μl buforu HT1 (Illumina) i ponownie wirowano 1 minutę przy 1 500 rpm.

Sekwencjonowanie bibliotek wykonano na płytce *High Output Flow Cell* (Illumina). Finalne stężenie biblioteki na płytce wynosiło 1,8 pM. W tym celu, mieszano 90 μl biblioteki cDNA (20 pM) z 10 μl (10 nM) biblioteki genomu bakteriofaga Phix, który stanowi kontrolę wewnętrzną sekwencjonowania oraz 1,2 ml buforu HT1. Tak przygotowane rozcieńczenie (1,3 ml) nakładano na kartridż z odczynnikami do sekwencjonowania. Sekwencjonowanie wykonano na sekwenatorze Illumina NextSeq550 z wykorzystaniem odczynników pozwalających na uzyskanie odczytów 1x75 pz.

Sekwencjonowanie NGS wykonano we współpracy z dr Michałem Sewerynem i mgr Marcinem Słomką z Pracowni Biobank (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki).

#### **2.24.11 Analiza danych po sekwencjonowaniu NGS**

Dane uzyskane po sekwencjonowaniu NGS bibliotek irCLIP zostały poddane analizie i obróbce przy współpracy z bioinformatykami, dr Michałem Sewerynem (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki) oraz mgr. Ziemowitem Radogostowiczem. Pierwszym etapem było uporządkowanie uzyskanych danych w oparciu o zastosowane adaptory (zawierające unikalne sekwencje identyfikujące, tzw. UMI, ang. *Unique Molecular Identifiers*) oraz jakość uzyskanych odczytów (tzw. „quality control”). W tym celu zastosowano program Cutadapt, który służy do kontroli jakości odczytów uzyskiwanych po NGS, wraz z możliwością usunięcia adapterów, starterów oraz ogonów poli(A). Kolejny etap obejmował wstępne mapowanie uzyskanych odczytów z wykorzystaniem programu Bowtie2, który umożliwia przyrównanie sekwencji odczytów do sekwencji referencyjnej (referencja *hg38*). Następnie, dane poddano mapowaniu w programie STAR. W celu identyfikacji barkodów i dopasowania odczytów do konkretnych badanych próbek zastosowano narzędzia bioinformatyczne UMI-tools, niezbędne do analizy sekwencji UMI. Do identyfikacji miejsc crosslinku, czyli sekwencji RNA wiązanych przez białko, wykorzystano narzędzie BEDTools. Następnym etapem było tzw. „wywoływanie pików” (ang. *peak calling*), które stosowane jest do identyfikacji obszarów w genomie, które zostały wzbogacone o odczyty otrzymane w wyniku NGS (w tym przypadku: obszary zawierające sekwencje wiązane przez białko). W tym celu wykorzystano narzędzie iCount. Dla pozyskanych danych przeprowadzono także kontrolę jakości sekwencjonowania (program FastQC), kontrolę kompleksowości bibliotek (program Preseq) oraz kontrolę dystrybucji danych (program RSeQC). Ostatnim etapem była różnicowa analiza ekspresji genów w programie DESeq2.

## IV. WYNIKI

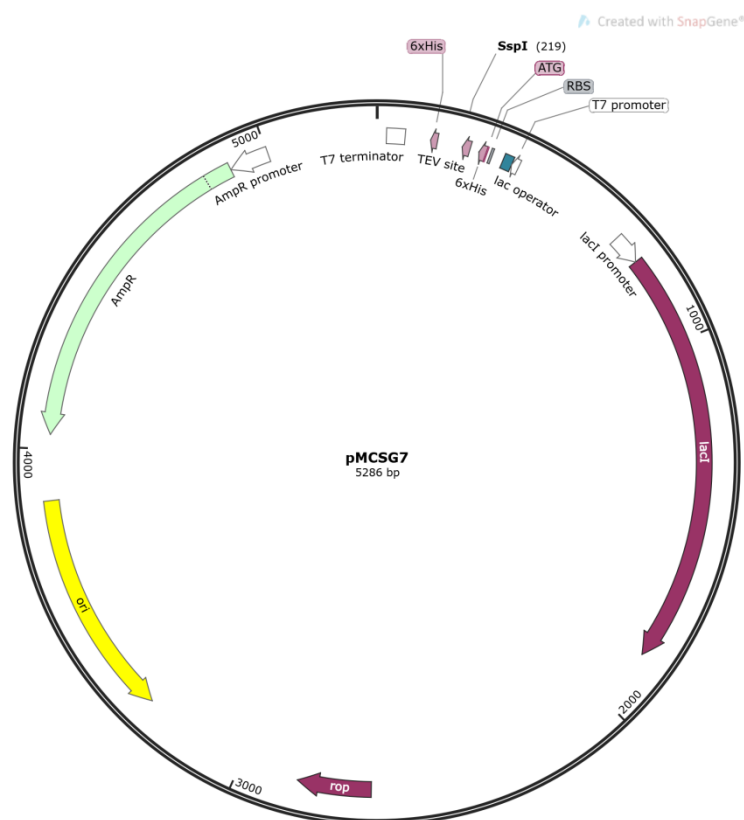
### 1. Otrzymywanie domeny helikazowej hDicer

W celu otrzymania preparatu domeny helikazowej hDicer wykorzystano bakteryjny system ekspresyjny *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ (Thermo Fisher Scientific). Komórki *E. coli* One Shot™ BL21 Star™ transformowane były wektorem ekspresyjnym pMCSG7 zawierającym sekwencję kodującą domenę helikazową hDicer.

#### 1.1 Otrzymanie konstruktów pMCSG7\_HEL zawierających sekwencję kodującą domenę helikazową hDicer

W celu otrzymania plazmidu ekspresyjnego zawierającego sekwencję kodującą domenę helikazową hDicer wykorzystano metodę LIC (ang. *Ligation Independent Cloning*, klonowanie niezależne od ligacji). Metoda LIC została wybrana z uwagi na brak konieczności stosowania enzymów restrykcyjnych i ligazy do wprowadzenia sekwencji kodującej białko do wektora ekspresyjnego, co znacząco upraszcza procedurę klonowania. Do przygotowania konstruktów genetycznych wykorzystano odpowiedni dla metody LIC wektor, pMCSG7 [162]. Wektor ten posiada sekwencję znacznika heksa-histydynowego (His<sub>6</sub>-tag). Znacznik ten, po ekspresji sekwencji kodującej białko, znajduje się na N-końcu białka i umożliwia jego późniejsze oczyszczenie metodą chromatografii powinowactwa. W wektorze znajduje się także gen kodujący polimerazę RNA bakteriofaga T7, który znajduje się pod kontrolą promotora operonu laktozowego. Dzięki obecności operonu laktozowego, ekspresja polimerazy T7 może być indukowana poprzez dodanie IPTG do pożywki LB podczas hodowli komórek bakteryjnych [163]. Plazmid posiada także gen oporności na ampicylinę, oraz sekwencję rozpoznawaną przez endonukleazę SspI, która wykorzystywana jest do linearyzacji plazmidu (**Rysunek 8**).

DNA kodujący sekwencję aminokwasową domeny helikazowej hDicer (rejon 1-624 aa sekwencji hDicer) uzyskano z wykorzystaniem metody PCR (Rozdział: Metody 2.1; Tabela 2.). Matrycą w reakcji PCR był plazmid zawierający pełną sekwencję cDNA hDicer (PubMed, NM\_030621) (GeneCopoeia). Startery użyte w reakcji amplifikacji posiadały dodatkowo sekwencje wykorzystywane w klonowaniu metodą LIC, tj. 18 nt sekwencję TACTTCCAATCCAATGCC, dodaną do startera HEL\_F\_LIC oraz 19 nt sekwencję TTATCCACTTCCAATGTTA, dodaną do startera HEL\_R\_LIC (Rozdział: Materiały 1.3, Tabela 1). Dodawane w reakcji amplifikacji sekwencje są komplementarne do odpowiednich sekwencji obecnych w wektorze pMCSG7.

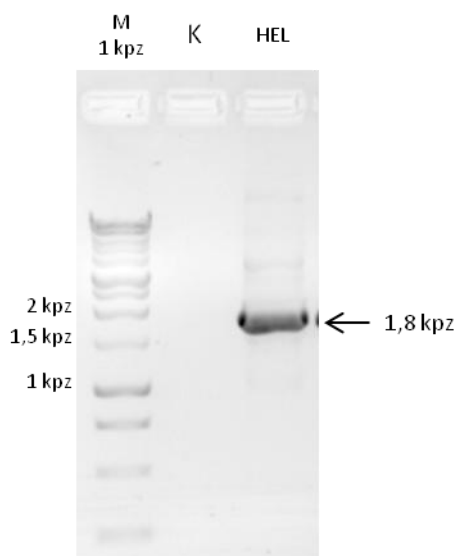


**Rysunek 8. Mapa wektora ekspresyjnego pMCSG7.** Na mapie zaznaczono sekwencję His<sub>6</sub>-tag, miejsce cięcia przez enzym SspI, promotor wirusowej polimerazy T7, operon laktozowy, a także gen kodujący oporność na ampicylinę. Mapę wygenerowano w programie SnapGene®.

Produkty reakcji PCR rozdzielano w żelu agarozowym (Rozdział: Metody 2.2), **Rysunek 9**, a następnie wyizolowano produkt o długości 1 800 pz, przypuszczalnie zawierający sekwencję DNA kodującą domenę helikazową hDicer (Rozdział: Metody 2.3), zgodnie z procedurą opisaną w protokole dołączonym do zestawu *Gel ME Mini*



Kit (Syngen). Stężenie oczyszczonego produktu (insertu, nazwanego cDNA HEL) wynosiło: 92,6 ng/μl.

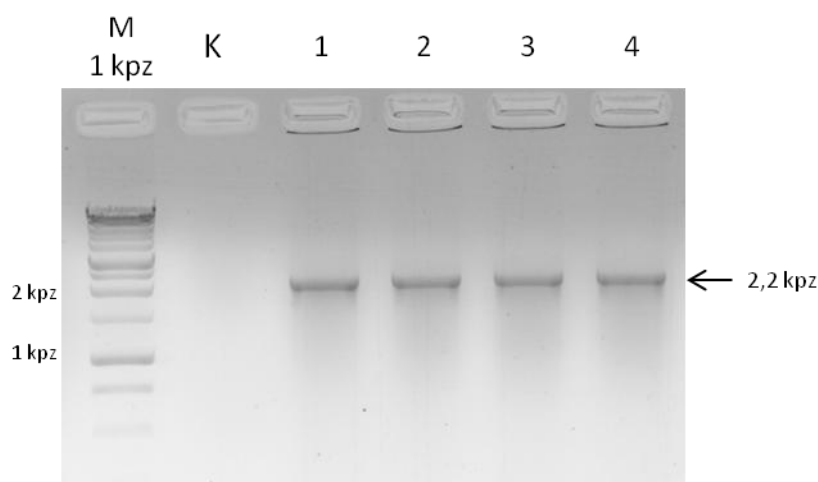


**Rysunek 9. Zdjęcie przedstawiające rozdzielanie elektroforetyczne produktów PCR.** Rozdział prowadzono w 1% żelu agarozowym. W kieszonkach umieszczono: M – 7 μl markera; K – 5 μl reakcji kontrolnej bez matrycy; HEL – 5 μl produktu PCR; strzałką zaznaczono otrzymany produkt.

Równolegle przygotowano wektor pMCSG7 do reakcji LIC (Rozdział: Metody 2.4), wykorzystując enzym restrykcyjny *SspI*. Stężenie oczyszczonego, zliniowanego wektora wynosiło: 76 ng/μl.

Insert cDNA HEL (300 ng) oraz wektor pMCSG7 (300 ng) inkubowano z polimerazą T4 oraz odpowiednio: (i) dCTP, w przypadku cDNA HEL lub (ii) dGTP, w przypadku wektora, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.4. Aktywność egzonukleazowa (3' → 5') polimerazy T4 prowadzi do hydrolizy wiązań fosfodiesterowych, aż do napotkanej reszty C (w przypadku insertu) oraz G (w przypadku wektora), dzięki czemu powstają 15 nt komplementarne jednoniciowe końce 5'. Tak przygotowany wektor i insert zmieszano w proporcji molowej 1:1 i inkubowano 5 minut w RT. W kolejnym kroku, produkt reakcji LIC został wprowadzony do komórek bakteryjnych *E. coli* DH5α, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.5. Selekcja komórek bakteryjnych posiadających pożądany plazmid, po wysianiu na szalkę ze stałym podłożem LB wzbogaconym ampicyliną, była możliwa dzięki obecności w wektorze pMCSG7 sekwencji zapewniającej oporność na ampicylinę - genu *ampR*, którego

produkt katalizuje hydrolizę pierścienia  $\beta$ -laktamowego ampicyliny. Chcąc potwierdzić obecność insertu w wektorze pMCSG7, pobrano pojedyncze kolonie bakteryjne i przeprowadzono reakcję amplifikacji, tzw. „PCR kolonijny” (Rozdział: Metody 2.1); w reakcji tej użyto starterów t7fwd oraz t7rvd (Rozdział: Materiały 1.3, Tabela 1). Rozdział produktów kolonijnego PCR przedstawiono na **Rysunku 10**.



**Rysunek 10. Rozdział elektroforetyczny produktów kolonijnego PCR.** Produkty rozdzielono w 1% żelu agarozowym. W kieszonkach umieszczono: M – 7  $\mu$ l markera *Perfect Plus™ 1 kb DNA Ladder* (EurX); K - 5  $\mu$ l reakcji kontrolnej bez matrycy; 1-4 – numery porządkowe kolonii wybrane z szalki, które posłużyły jako matryca do reakcji; strzałką zaznaczono otrzymany produkt.

Z wytypowanych, na podstawie kolonijnego PCR, kolonii bakteryjnych wyizolowano plazmidowy DNA (Rozdział: Metody 2.6). W celu sprawdzenia zgodności wprowadzonej sekwencji z sekwencją domeny HEL hDicer oraz prawidłowej orientacji i zachowania ramki odczytu pozwalającej na uzyskanie produktu w postaci domeny helikazowej hDicer, przeprowadzono reakcje sekwencjonowania metodą Sangera z wykorzystaniem wyizolowanych plazmidowych DNA, jako matryc. Otrzymane wyniki potwierdziły całkowitą zgodność sekwencji wprowadzonej do wektora z sekwencją domeny HEL hDicer. Potwierdzono także, że sekwencja insertu znajduje się w ramce odczytu zgodnej z kodonem start AUG.

## 1.2 Ekspresja sekwencji kodującej domenę helikazową w bakteryjnym systemie ekspresyjnym

W celu otrzymania preparatu białkowego domeny helikazowej hDicer komórki bakteryjne *E. coli* szczep ekspresyjny OneShot™ BL21 Star™ transformowano konstruktem pMCSG7\_HEL, metodą szoku cieplnego (Rozdział: Metody 2.5). Hodowlę prowadzono zgodnie z metodą opisaną w rozdziale: Metody 2.8. Przykładowe wartości OD<sub>600</sub> uzyskiwane dla pomiarów w czasie: 2h, 3h i 3,5h po rozpoczęciu hodowli przedstawiono w **Tabeli 14**.

Po osiągnięciu wartości OD<sub>600</sub> ok. 0,8, hodowlę inkubowano w lodzie przez 30 minut, a następnie indukowano ekspresję poprzez dodanie analogu laktozy, IPTG do stężenia końcowego 0,4 mM. Hodowlę następnie inkubowano przez 18 h w 18°C z wytrząsaniem 225 rpm. Po tym czasie pożywkę wraz z bakteriami wirowano w ultrawirówce Avanti J-26 XPI przez 10 minut w 4°C przy 7 000 rpm. Osady zawierające komórki bakteryjne zbierano i przechowywano w -70°C.

**Tabela 14. Wartości OD<sub>600</sub> uzyskane podczas hodowli *E. coli* przed zaindukowaniem ekspresji.**

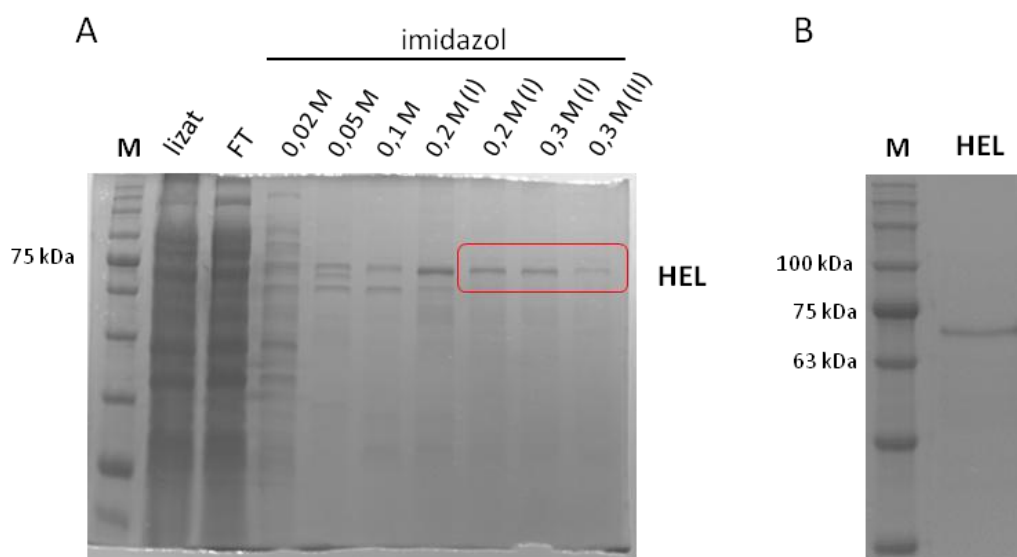
czas	wartości OD <sub>600</sub>			
2h	0,15	0,16	0,2	0,22
3h	0,43	0,46	0,6	0,68
3,5	0,77	0,79	0,87	0,89

## 1.3 Oczyszczanie domeny helikazowej hDicer

Dzięki obecności znacznika His<sub>6</sub>-tag domenę helikazową oczyszczano wykorzystując metodę chromatografii powinowactwa. W celu otrzymania supernatantu zawierającego frakcję białek rozpuszczalnych, otrzymane osady bakteryjne poddano lizie, a następnie wirowano, zgodnie z opisem zawartym w rozdziale: Metody 2.9. Supernatant nakładano na wcześniej przygotowaną kolumnę chromatograficzną ze złożem niklowym Ni Sepharose® High Performance (Cytiva) (Rozdział: Metody 2.9). Do wymywania frakcji wykorzystano bufor podstawowy 1x (50 mM HEPES, pH 7,5,

500 mM NaCl, 5% glicerol, 0,01% Triton X-100) wzbogacony o imidazol o stężeniach, odpowiednio: 0,02 M; 0,05 M; 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M; 0,5 M oraz 1M, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.9. Wymywane z kolumny frakcje analizowano metodą elektroforezy SDS-PAGE w 10% denaturującym żelu PAA (**Rysunek 11 A**). Zgodnie z wynikami przedstawionymi na **Rysunku 11 A**, frakcje zawierające HEL hDicer o pożądanym stopniu czystości (homogenność 95%<) zostały otrzymane po przemyciu złoża roztworem imidazolu o stężeniu 0,2-0,3 M.

Frakcje zawierające HEL hDicer o pożądanym stopniu homogenności zostały poddane procedurze zagęszczania i wymianie buforu, na bufor do przechowywania BP 1x (Rozdział: Materiały 1.1). Tak uzyskany preparat HEL hDicer przechowywano w 4°C. Stężenie uzyskane dla preparatu HEL hDicer wynosiło 4-9 µg/µl. Reakcje wiązania przeprowadzono z wykorzystaniem preparatu 9 µg/µl, w pozostałych eksperymentach wykorzystano preparat 4 µg/µl. Reprezentatywną próbkę preparatu HEL hDicer przedstawiono na **Rysunku 11 B**.



**Rysunek 11. Zdjęcie przedstawiające rozdzielanie elektroforetyczne frakcji zebranych po oczyszczeniu HEL hDicer metodą chromatografii powinowactwa (A) oraz preparat HEL hDicer po oczyszczeniu i zagęszczeniu (B).** (A) W kieszonkach umieszczono: M – 5 µl markera *Perfect™ Tricolor Protein Ladder* (EURx); lizat – supernatant po lizie i wirowaniu (15 µl); FT – frakcja zebrana po przepuszczeniu lizatu przez złożo (15 µl); frakcje uzyskane po nałożeniu na kolumnę roztworów imidazolu o wzrastającym stężeniu (15 µl). Czerwoną ramką zaznaczono frakcje wybrane do dalszych analiz. (B) M – 5 µl markera *Perfect™ Tricolor Protein Ladder* (EURx); HEL – 5 µl preparatu HEL.

## 2. Badanie aktywności biochemicznych domeny helikazowej hDicer

W 2009 roku na Uniwersytecie w Hamburgu ukazała się rozprawa doktorska pt. „*Functional Investigation of the ATPase/Helicase Domain of Human Dicer*” autorstwa Ikenna R. Obi [A], której opiekunem naukowym był prof. Uli Hahn z Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej w Hamburgu. Autor pracy w swoich badaniach wykorzystał preparat domeny helikazowej hDicer wyprodukowany w bakteryjnym systemie ekspresyjnym (*E. coli*) i wykazał, że domena helikazowa hDicer posiada aktywność hydrolizy ATP, wiąże cząsteczki RNA o długości 21 nt i 70 nt oraz wspiera proces parowania sekwencji komplementarnych występujących w 21 nt substratach RNA. Dane zawarte w doktoracie I.R. Obi nie ukazały się jednak nigdy w postaci publikacji naukowej. Z uwagi na fakt, że jak dotąd nie przeprowadzono szczegółowej charakterystyki aktywności biochemicznych domeny helikazowej hDicer, w tym aktywności wiązania w odniesieniu do różnych typów substratów RNA i DNA, w ramach prowadzonych prac postanowiono zbadać: (i) aktywność wiązania kwasów nukleinowych: RNA oraz DNA, zarówno jedno- jak i dwuniciowych, a także (ii) aktywność rozplatania dwuniciowych RNA oraz DNA, iii) aktywność wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acid annealing activity*).

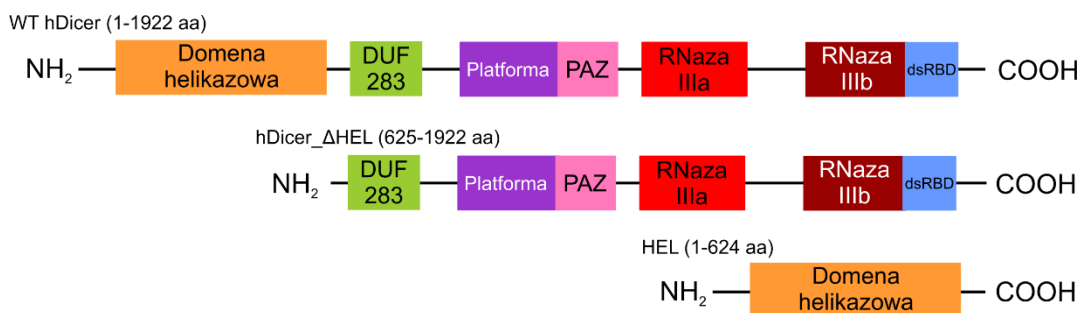
### 2.1 Aktywności ATPazy

Jak wspomniano wcześniej, domena helikazowa hDicer posiada motyw A Walkera, który jest odpowiedzialny za wiązanie i hydrolizę ATP [28]. W celu sprawdzenia czy otrzymany preparat HEL hDicer posiada aktywność wiązania ATP zastosowano metodę różnicowej migracji w żelach poliakrylamidowych (EMSA). W reakcjach wykorzystano substrat [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP ( $C_k$  200 nM) i HEL hDicer ( $C_k$  2 nM) (Rozdział: Metody 2.20). Wyniki reakcji wiązania ujawniły, że preparat HEL hDicer wiąże ATP (**Rysunek 13 A**).

Następnie sprawdzono, czy HEL hDicer posiada aktywność hydrolizy ATP. Reakcję prowadzono w obecności substratu [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP ( $C_k$  200 nM) oraz preparatu HEL hDicer o stężeniach od 0,0625 do 2 nM, a jej produkty rozdzielano w 15% denaturującym

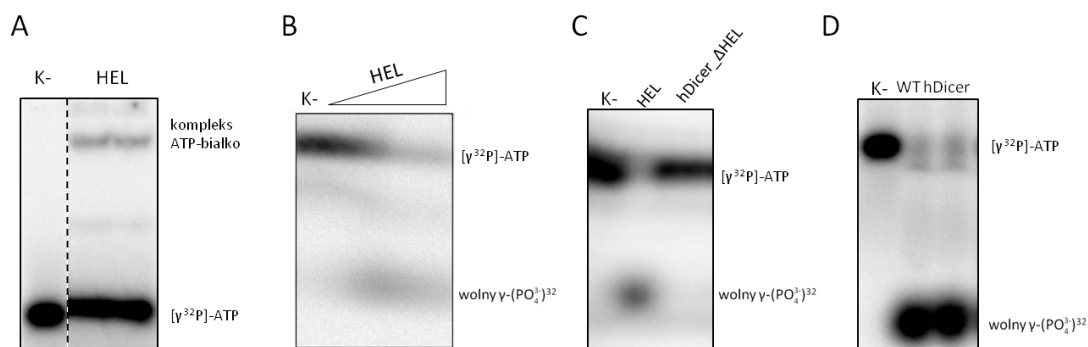
żelu PAA (Rozdział: Metody 2.14). Zaobserwowano, że HEL hDicer wykazuje aktywność ATPazową, w sposób zależny od stężenia białka (**Rysunek 13 B**).

Jak dotąd, w literaturze nie pojawiły się jednoznaczne informacje na temat zdolności do hydrolizy ATP przez hDicer. W celu sprawdzenia, czy hDicer przeprowadza proces hydrolizy ATP, a jeśli tak, to czy za tę aktywność odpowiedzialna jest domena helikazowa hDicer, prowadzono reakcje, w których użyto  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  ( $C_k$  200 nM), preparat WT hDicer ( $C_k$  2 nM) oraz wariant delecyjny hDicer nieposiadający domeny helikazowej (hDicer\_ΔHEL) ( $C_k$  2 nM), zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale: Metody 2.20. Wariant hDicer\_ΔHEL jest pozbawionym domeny helikazowej (delecja rejonu od 1 do 624 aa WT hDicer) wariantem hDicer (**Rysunek 12**). Wspomniane preparaty hDicer zostały otrzymane w ludzkich liniach komórkowych HEK 293T NoDice (4-25): preparat typu wild-type hDicer (WT hDicer), przez mgr inż. Martę Wojnicką oraz preparat hDicer\_ΔHEL, przez mgr inż. Agnieszkę Szczepańską (Rozdział: Materiały 1.4). Kontrolą pozytywną w prowadzonych reakcjach był uzyskany preparat HEL hDicer. Mieszaniny reakcyjne rozdzielano w 10% natywnym żelu PAA (Rozdział: Metody 2.15). Uzyskane wyniki wykazały, że WT hDicer wydajnie przeprowadza proces hydrolizy ATP (**Rysunek 13 D**), aktywności takiej nie posiada natomiast hDicer\_ΔHEL (**Rysunek 13 C**).



**Rysunek 12.** Schemat przedstawiający wykorzystywane w badaniach warianty hDicer: WT hDicer, hDicer\_ΔHEL oraz HEL hDicer.

Podsumowując, zgromadzone dane wykazały, że preparat HEL hDicer otrzymany w bakteryjnym systemie ekspresyjnym posiada aktywność wiązania i hydrolizy ATP. Co ważne, przeprowadzone doświadczenia po raz pierwszy ujawniły zdolność hydrolizy ATP przez WT hDicer. Biorąc pod uwagę fakt, że aktywności hydrolizy ATP nie odnotowano dla wariantu hDicer\_ΔHEL, przypuszczalnie zaobserwowana aktywność ATPazowa hDicer wynika z obecności domeny helikazowej.



**Rysunek 13. Wynik analizy reakcji wiązania i hydrolizy ATP przez HEL hDicer oraz WT hDicer.** Jako substrat wykorzystano  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  ( $C_k$  200 nM), który inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem białka: HEL, WT hDicer lub hDicer\_ΔHEL. **(A)** Wiązanie ATP przez preparat HEL hDicer, zastosowano elektroforezę w 10% natywnym żelu PAA. Wykorzystano białko HEL hDicer o  $C_k$  2 nM. Preparat naniesiono na żel w dwóch powtórzeniach. **(B)** Hydroliza ATP przez preparat HEL hDicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 nM), elektroforezę w 15% denaturującym żelu PAA. Trójkątem oznaczono wzrastające stężenia HEL. **(C)** Aktywność ATPazowa dla HEL hDicer ( $C_k$  2 nM) oraz hDicer\_ΔHEL ( $C_k$  2 nM), zastosowano elektroforezę w 15% denaturującym żelu PAA. **(D)** Aktywność ATPazową dla WT hDicer ( $C_k$  2 nM); elektroforezę prowadzono w 10% natywnym żelu PAA. Preparat naniesiono na żel w dwóch powtórzeniach. Na zdjęciach zaznaczono substrat przed hydrolizą  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  oraz produkt hydrolizy (wolny  $\gamma\text{-(PO}_4^{3-})^{32}$ ).

## 2.2 Aktywność wiązania kwasów nukleinowych

Jak wspomniano wcześniej, obecnie wiadomo, że domena helikazowa hDicer odpowiada za rozróżnianie substratów pre-miRNA od pre-siRNA, poprzez oddziaływanie z pętlą apikalną cząsteczek pre-miRNA [74, 75]. Dodatkowo, pojawiły się doniesienia na temat udziału domeny helikazowej hDicer w pasywnym wiązaniu cząsteczek RNA, takich jak mRNA czy lncRNA [159]. Wiadomo również, że domena helikazowa białek typu Dicer, np. Dicer-2 *D. melanogaster*, może wiązać cząsteczki dsRNA posiadające w pełni sparowane końce [79]. W celu poszerzenia wiedzy na temat substratów, które mogą być wiązane przez domenę helikazową hDicer przeprowadzono badania aktywności wiązania kwasów nukleinowych przez HEL

hDicer z wykorzystaniem metody EMSA oraz substratów: jednoniciowych cząsteczek RNA i DNA o długościach 10-60 nt, pre-miRNA oraz dwuniciowych RNA i DNA posiadających w pełni sparowane końce lub dwa niesparowane nukleotydy na końcach 3' dupleksu. Dodatkowo, do badania aktywności wiązania przez HEL hDicer wykorzystano metodę BLI (ang. *Bio-layer Interferometry*).

### 2.2.1 Badanie aktywności wiązania kwasów nukleinowych z wykorzystaniem metody EMSA

Początkowo do badania aktywności wiązania kwasów nukleinowych przez HEL hDicer wykorzystano metodę EMSA (Rozdział: Metody 2.17). Metoda z powodzeniem stosowana jest do badania oddziaływań pomiędzy białkami i kwasami nukleinowymi oraz wyznaczania równowagowej stałej dysocjacji ( $K_d$ ) kompleksów kwas nukleinowy•białko. Dodatkową zaletą tej metody jest możliwość jakościowej oceny substratów i powstających produktów. W reakcjach zastosowano: (i) jednoniciowe substraty RNA i DNA, odpowiednio: R10/D10 (14 nt), R20/D20 (21 nt), R30/D30 (32 nt), R40/D40 (42 nt), R50/D50 (56 nt); (ii) cząsteczki pre-miRNA charakteryzujące się różnym stopniem sparowania zasad, zarówno w obrębie trzonu, jak i pętli apikalnej (**Rysunek 15**) oraz (iii) dwuniciowe cząsteczki RNA i DNA o długości 32 nt posiadające w pełni sparowane końce (dsRNA/dsDNA\_blunt) lub dwa niesparowane nukleotydy na końcach 3' dupleksu (dsRNA/dsDNA\_over). Wszystkie substraty wykorzystywane w badaniach były znakowane na końcach 5' z użyciem [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP (Rozdział: Metody 2.13). W reakcjach zastosowano 10 000 cpm ( $C_k$  ok. 2,5 nM) substratu oraz preparat HEL hDicer o stężeniach: 2,97; 5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu$ M. Każdy eksperyment został powtórzony co najmniej trzykrotnie. Dodatkowo, sprawdzano zależność aktywności wiązania przez HEL hDicer od obecności ATP, poprzez inkubację substratów z białkiem w obecności 1 mM ATP, lub jego braku w buforze reakcyjnym. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pokazały, że HEL hDicer wiąże jednoniciowe cząsteczki RNA oraz DNA o długości 20 nt i dłuższe substraty (**Rysunek 14**), nie zaobserwowano natomiast wiązania krótszych cząsteczek jednoniciowych, tj. R10 i D10. Nie zaobserwowano zależności wiązania kwasów nukleinowych przez HEL hDicer od obecności ATP (dane niepokazane). W przypadku substratów RNA (**Rysunek 14 A**), wyraźne kompleksy zaobserwowano jedynie dla cząsteczek R20



i R30. Dłuższe substraty RNA (R40 oraz R50) nie tworzyły wyraźnych kompleksów z HEL hDicer. Co ciekawe, w przypadku cząsteczek R40 i R50 zaobserwowano zależny od stężenia HEL hDicer ubytek głównej formy substratu (konformer migrujący wolniej) i przyrost (dla R40) lub pojawianie się (dla R50) form migrujących szybciej w natywnym żelu PAA. W przypadku substratów DNA (>20 nt) zaobserwowano powstawanie wyraźnych kompleksów DNA•HEL hDicer, przy czym wydajność powstawania kompleksów wzrastała wraz z długością substratu (**Rysunek 14 B**).

Biorąc pod uwagę fakt, że dla krótszych substratów DNA (< 40 nt) oraz substratów RNA nie zaobserwowano całkowitego związania substratu z HEL hDicer, przeprowadzono kolejne reakcje wiązania, w których zastosowano wyższe stężenia białka. Niestety, w przypadku wyższych stężeń HEL hDicer (> 125  $\mu\text{M}$ ) nie zaobserwowano powstawania kompleksów kwas nukleinowy•białko, z wykorzystaniem metody EMSA. Przy stężeniu HEL hDicer ok. 165  $\mu\text{M}$ , białko się wytrącało (obserwowano pojawianie się białych strąków w preparacie HEL hDicer), bądź powstające kompleksy agregowały i pozostawały w kieszonkach żelu.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, równowagowe stałe dysocjacji ( $K_d$ ) wyznaczono jedynie dla układów: D40•HEL hDicer oraz D50•HEL hDicer.  $K_d$  wyznaczono wykorzystując analizę densytometryczną wykonaną w programie Multi Gauge (Fujifilm).  $K_d$  wyliczono zgodnie ze wzorem [164]:

$$f = \frac{A \times P_0}{(P_0 + K_d)}$$

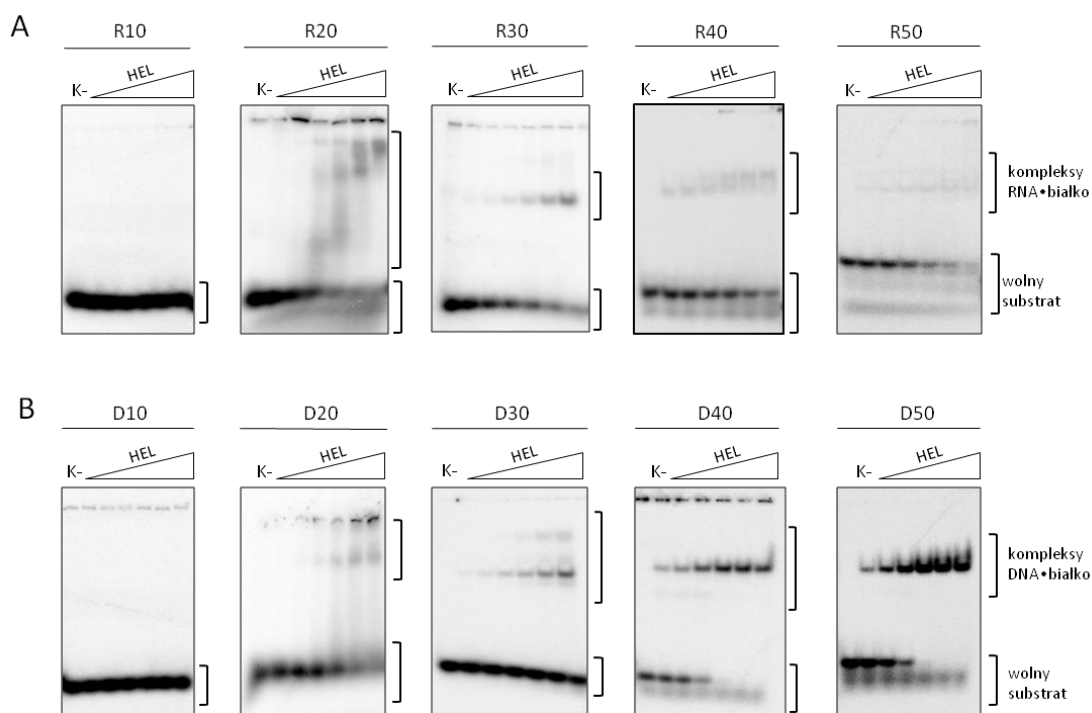
f – frakcja związanego substratu

$P_0$  – stężenie molowe białka dla danej próby ( $\mu\text{M}$ )

A – maksymalne wiązanie RNA (%)

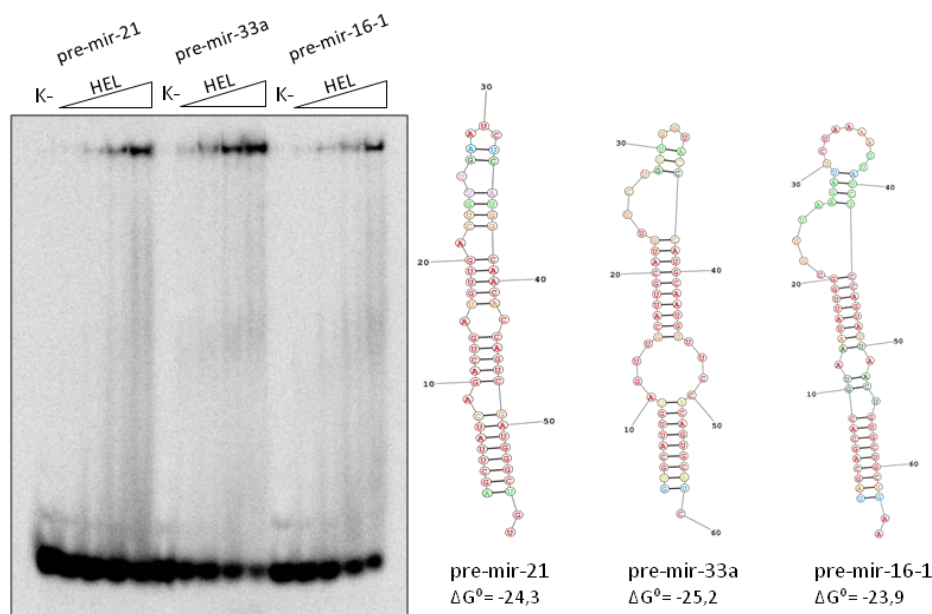
$K_d$  wyliczono dla wartości  $f = 0,5$ , czyli dla układu, gdzie połowa substratu była związana z białkiem.  $P_0$  - stanowiło stężenie białka, dla którego osiągnięto 50% wiązania substratu. Dla parametru A, przyjęto 95% dla kompleksu D40•HEL hDicer i 92% dla kompleksu D50•HEL hDicer.

Wartości  $K_d$  wyniosły odpowiednio: 8,55  $\mu\text{M}$ , dla D40•HEL hDicer oraz 7,36  $\mu\text{M}$ , dla D50•HEL hDicer.



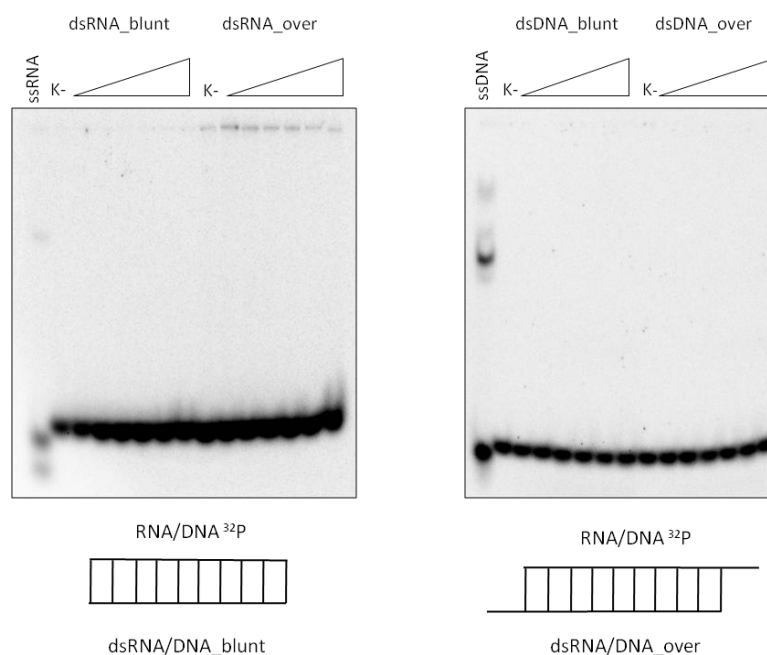
**Rysunek 14. Oddziaływanie jednoniciowych RNA i DNA z preparatem HEL hDicer.** Do badania aktywności wiązania wykorzystano (A) jednoniciowe cząsteczki RNA: R10, R20, R30, R40, R50; oraz (B) jednoniciowe cząsteczki DNA: D10, D20, D30, D40, D50. Wyznakowane radioizotopowo ssRNA i ssDNA inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem HEL hDicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 2,97; 5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu\text{M}$ ). Trójkątami oznaczono wzrastające stężenia HEL hDicer. Rozdział prowadzono w 5% żelu PAA.

Następnie badano aktywność wiązania kanonicznych substratów hDicer przez HEL hDicer. W tym celu zastosowano cząsteczki pre-miRNA charakteryzujące się różnym stopniem sparowania zasad, zarówno w obrębie trzonu, jak i pętli apikalnej (**Rysunek 15**): pre-mir-21, pre-mir-33a, pre-mir-16-1. Reakcje prowadzono zgodnie z opisem zawartym w rozdziale: Metody 2.17 (**Rysunek 15**). W przypadku substratów pre-miRNA, niezależnie od ich struktury, nie obserwowano powstawania wyraźnych kompleksów RNA•białko (**Rysunek 15**), zaobserwowano jedynie rozmyty sygnał, pochodzący przypuszczalnie od szeregu kompleksów pre-miRNA•HEL hDicer. Nie zaobserwowano zależności powstawania kompleksów od obecności ATP (dane niepokazane). Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, nie udało się wyznaczyć stałych dysocjacji dla układów pre-miRNA•HEL hDicer.



**Rysunek 15. Oddziaływanie HEL hDicer z pre-miRNA.** Wynik analizy reakcji wiązania pre-miRNA przez HEL hDicer. Wyznakowane radioizotopowo pre-miRNA: pre-mir-21, pre-mir-33a oraz pre-mir-16-1, inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem HEL hDicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 2,97; 5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu\text{M}$ ). Trójkątami oznaczono wzrastające stężenia HEL hDicer. Rozdział prowadzono w 5% żelu PAA. Przewidywania struktur cząsteczek pre-miRNA wykonano w programie RNAstructure (Mathews Lab).

W kolejnym kroku badano wiązanie dwuniciowych RNA i DNA przez HEL hDicer. W badaniach wykorzystano substraty: (i) w pełni sparowany dupleks RNA o długości 32 pz (dsRNA\_blunt), (ii) dupleks RNA o długości 30 pz posiadający dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (dsRNA\_over), (iii) w pełni sparowany dupleks DNA o długości 32 pz (dsDNA\_blunt) oraz (iv) dupleks DNA o długości 30 pz posiadający dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (dsDNA\_over). Reakcje prowadzono zgodnie z opisem zawartym w rozdziale: Metody 2.17. W przypadku wszystkich zastosowanych dwuniciowych substratów: dsRNA\_blunt, dsRNA\_over, dsDNA\_blunt, dsDNA\_over, nie zaobserwowano powstawania kompleksów kwas nukleinowy•HEL hDicer (**Rysunek 16**). Nie zaobserwowano wpływu ATP na powstawanie kompleksów kwas nukleinowy•HEL hDicer (dane niepokazane).



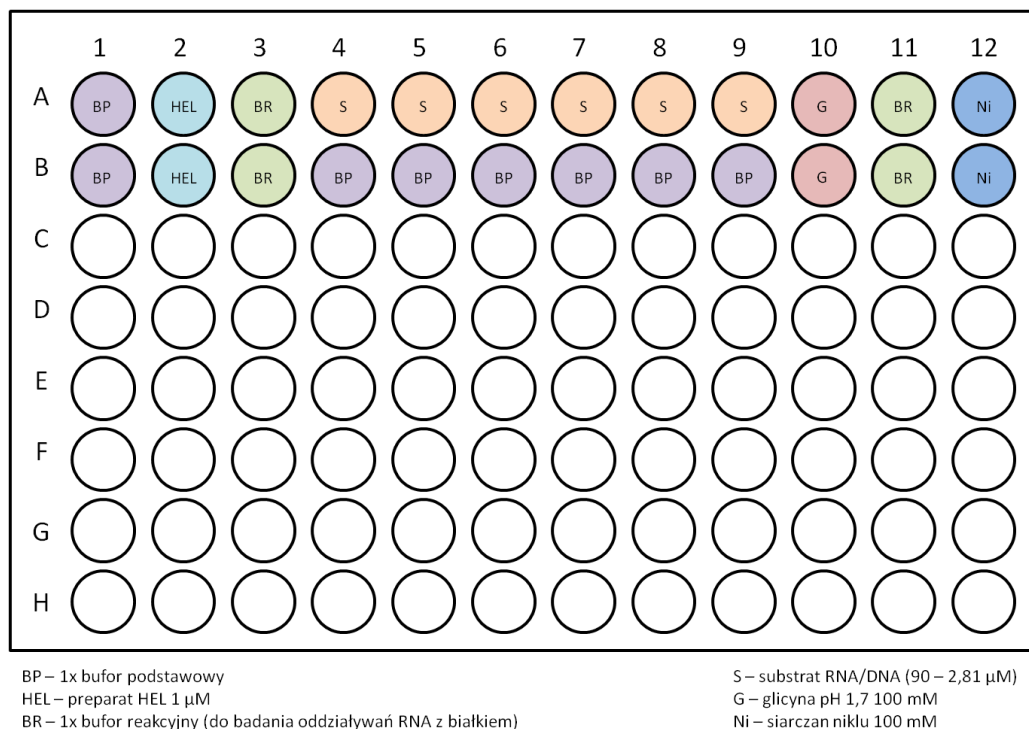
**Rysunek 16. Oddziaływanie HEL hDicer z dwuniciowymi RNA i DNA.** Wynik analizy reakcji wiązania dsRNA i dsDNA przez HEL hDicer. Wyznakowane radioizotopowo dupлексы: dsRNA\_blunt, dsRNA\_over, dsDNA\_blunt oraz dsDNA\_over, inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem HEL hDicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 2,97; 5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu\text{M}$ ). Jako kontrolę wykorzystano ssRNA/ssDNA, które także inkubowano w buforze reakcyjnym z dodatkiem HEL hDicer ( $C_k$  95  $\mu\text{M}$ ). Trójkątami oznaczono wzrastające stężenia HEL hDicer. Rozdział prowadzono w 5% żelu PAA.

### 2.2.2 Badanie aktywności wiązania kwasów nukleinowych z wykorzystaniem metody BLI

Z uwagi na trudność z wyznaczeniem równowagowej stałej dysocjacji ( $K_d$ ) dla kompleksów RNA•HEL hDicer oraz (<40 nt) DNA•HEL hDicer na podstawie wyników uzyskanych metodą EMSA, podjęto próbę wyznaczenia wartości  $K_d$  metodą BLI (Rozdział: Metody 2.21). Interferometria biowarstwowa (ang. *Bio-layer Interferometry*, BLI) jest optyczną metodą służącą do badania interakcji między cząsteczkami w czasie rzeczywistym, bez konieczności ich znakowania fluorescencyjnego czy radioizotopowego [165]. Technologia ta wykorzystuje biosensory specyficzne wobec badanego substratu lub białka, np. zawierające jony  $\text{Ni}^{2+}$  dla białek posiadających znacznik  $\text{His}_6$ -tag. BLI ma zastosowanie w ilościowym określaniu siły wiązania, mierzeniu interakcji białek, określaniu wartości stałych szybkości asocjacji i dysocjacji, a także równowagowej stałej dysocjacji  $K_d$ . Założono, iż jedną z przyczyn niepowodzenia w wyznaczeniu wartości  $K_d$  metodą EMSA,

w szczególności w przypadku substratów RNA, mógł być problem ze stabilnością kompleksów RNA•HEL hDicer w trakcie przeprowadzanej analizy. Jak wspomniano powyżej, metoda BLI, w przeciwieństwie do metody EMSA, umożliwia badanie oddziaływań międzycząsteczkowych w czasie rzeczywistym.

Podczas badania oddziaływań metodą BLI pomiary prowadzono z wykorzystaniem czarnej płytki 96-dołkowej posiadającej okrągłe studzienki o płaskim dnie. Płytkę przygotowano wg. schematu przedstawionego na **Rysunku 17**. W pomiarach wykorzystano substraty opisane w rozdziale: Wyniki 2.2.1, dla których zaobserwowano kompleksy z HEL hDicer podczas pomiarów metodą EMSA, tj. cząsteczki: R20, R30, R40, R50 oraz D20, D30, D40, D50 (o stężeniach: 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100  $\mu$ M), a także preparat HEL hDicer o stężeniu 1  $\mu$ M. Początkowo, białko HEL hDicer posiadające znacznik His<sub>6</sub>-tag, immobilizowano na biosensorze opłaszczonym jonami Ni<sup>2+</sup> przez 1 800 s. (ang. *Loading*). Pomiar prowadzono na aparacie Octet K2 System (Forte Bio), zgodnie z zadaniem protokołem: asocjacja 20 s. (ang. *Association*), dysocjacja 20 s. (ang. *Dissociation*), regeneracja 30 s. (ang. *Regeneration*), przed każdym pojedynczym pomiarem sensor opłukiwano w buforze podstawowym 1x (50 mM HEPES, pH 7,5 500 mM NaCl; 5% glicerol; 0,01% Triton X-100) przez 60 s. (ang. *Baseline*) oraz po regeneracji zanurzano w roztworze siarczanu niklu w celu ponownego opłaszczenia sensora jonami Ni<sup>2+</sup> przez 60 s. (ang. *Dip*) (Rozdział: Metody 2.22). Każdy pomiar dla danego substratu został powtórzony trzykrotnie. Wykresy przedstawiające wyniki pomiaru oddziaływań dla cząsteczek RNA lub DNA i białka HEL hDicer przedstawiono na **Rysunku 18**.



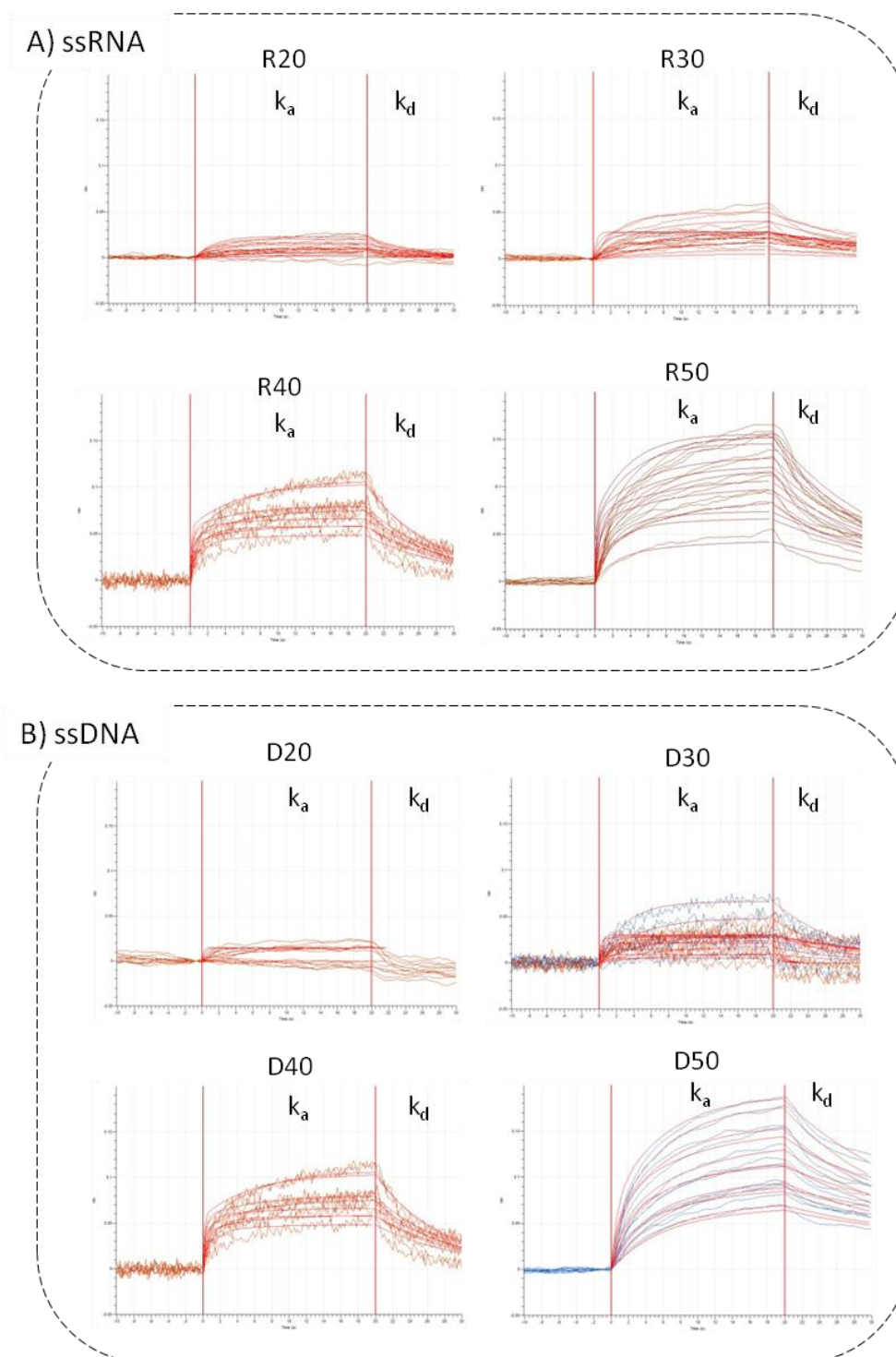
**Rysunek 17. Schemat przedstawiający ułożenie próbek na płycie 96-dołkowej do pomiarów oddziaływania kwas nukleinowy-HEL metodą BLI.**

W przypadku cząsteczek RNA: R20, R30 oraz R40, sygnał pochodzący od potencjalnych kompleksów RNA•HEL hDicer okazał się zbyt słaby, aby wyznaczyć równowagową stałą dysocjacji ( $K_d$ ). Udało się jedynie wyznaczyć  $K_d$  dla kompleksu R50•HEL hDicer, wartość stałej  $K_d$  dla tego kompleksu wyniosła 23  $\mu\text{M}$  (**Rysunek 18 A**). Podobnie, jak w przypadku analiz przeprowadzonych z wykorzystaniem metody EMSA, najsilniejsze oddziaływanie odnotowano dla jednoniciowych cząsteczek DNA: D40 oraz D50; wartość równowagowej stałej dysocjacji ( $K_d$ ) dla kompleksu D40•HEL hDicer wyniosła 22  $\mu\text{M}$ , natomiast dla kompleksu D50•HEL hDicer, 21  $\mu\text{M}$ . Dla cząsteczek D20 i D30 sygnał okazał się za słaby do wyznaczenia równowagowej stałej dysocjacji (**Rysunek 18 B**).

Biorąc pod uwagę kształt krzywych uzyskanych podczas pomiarów dla: R20, R30, R40 oraz D20 i D30, obrazujący asocjację i dysocjację kompleksów w czasie (**Rysunek 18**), przypuszczalnie w mieszaninach reakcyjnych powstawało kilka kompleksów kwas nukleinowy•HEL hDicer lub, po podaniu HEL hDicer, dochodziło do zmian strukturalnych w obrębie substratów (pojawienie się heterogennych ligandów).

Przypuszczenia te są zgodne z wynikami uzyskanymi dla badań prowadzonych metodą EMSA (**Rysunek 14**). W przypadku R20, R30, R40 oraz D20 i D30 zaobserwowano pojawienie się kilku produktów reakcji; dodatkowo, w przypadku R20 obserwowano pojawienie się formy substratu migrującej szybciej w natywnym żelu PAA, niż forma przypuszczalnie liniowa, migrująca wolniej (**Rysunek 14**). Podobny wynik zaobserwowano dla R40 i R50, jednakże w przypadku tych dwóch cząsteczek, po podaniu HEL hDicer, ubytkowi głównej formy substratu, nie towarzyszył wzrost wydajności tworzenia kompleksów RNA•HEL hDicer (**Rysunek 14**).

Podsumowując, badania aktywności wiązania kwasów nukleinowych przez HEL hDicer z wykorzystaniem metody EMSA oraz BLI, pozwoliły na wyznaczenie równowagowych stałych dysocjacji  $K_d$  jedynie dla kompleksów R50•HEL hDicer, D40•HEL hDicer oraz D50•HEL hDicer.

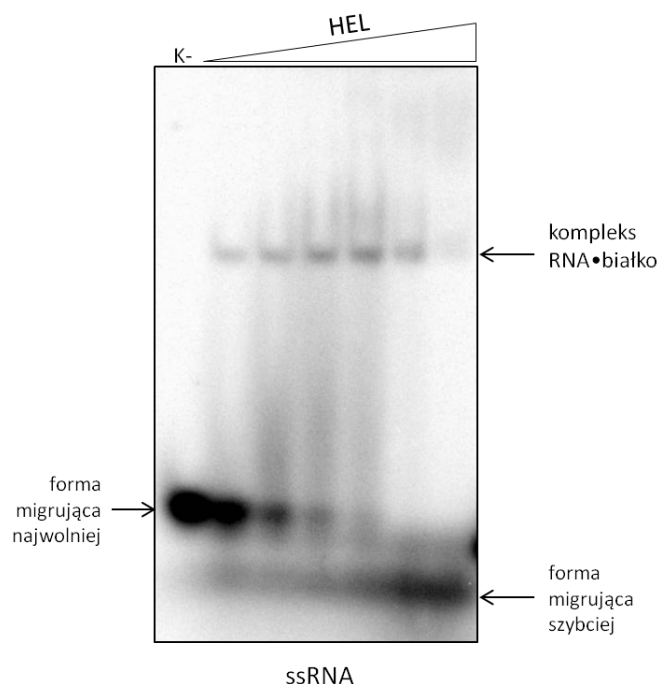


**Rysunek 18. Wykresy obrazujące oddziaływanie HEL hDicer z jednoniciowymi substratami RNA (A) i DNA (B).** Wykresy zostały wygenerowane przez program Data Analysis 11.1 (Forte Bio), na podstawie pomiarów prowadzonych w czasie rzeczywistym metodą interferometrii biowarstwowej (BLI). Zaznaczono obszary obrazujące asocjację ( $k_a$ ) i dysocjację ( $k_d$ ) kompleksów w czasie.



### 2.2.3 Poszerzona analiza oddziaływań HEL hDicer z jednoniciowymi RNA

Biorąc pod uwagę zgromadzone dane dotyczące oddziaływań pomiędzy jednoniciowymi RNA i HEL hDicer, zaprezentowane na **Rysunku 14 A i 19** (uzyskane metodą EMSA) oraz na **Rysunku 18** (uzyskane metodą BLI), postawiono hipotezę, że domena helikazowa hDicer może indukować zmiany strukturalne w obrębie jednoniciowych RNA lub prowadzić do pęknięcia takich substratów. W celu sprawdzenia tej hipotezy przeprowadzono dodatkowe eksperymenty umożliwiające jakościową analizę substratu inkubowanego z białkiem: (i) za pomocą rozdziału elektroforetycznego wyznakowanego radioizotopowo substratu w denaturującym oraz natywnym żelu PAA oraz (ii) z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego. Badania przeprowadzono dla substratu R40.



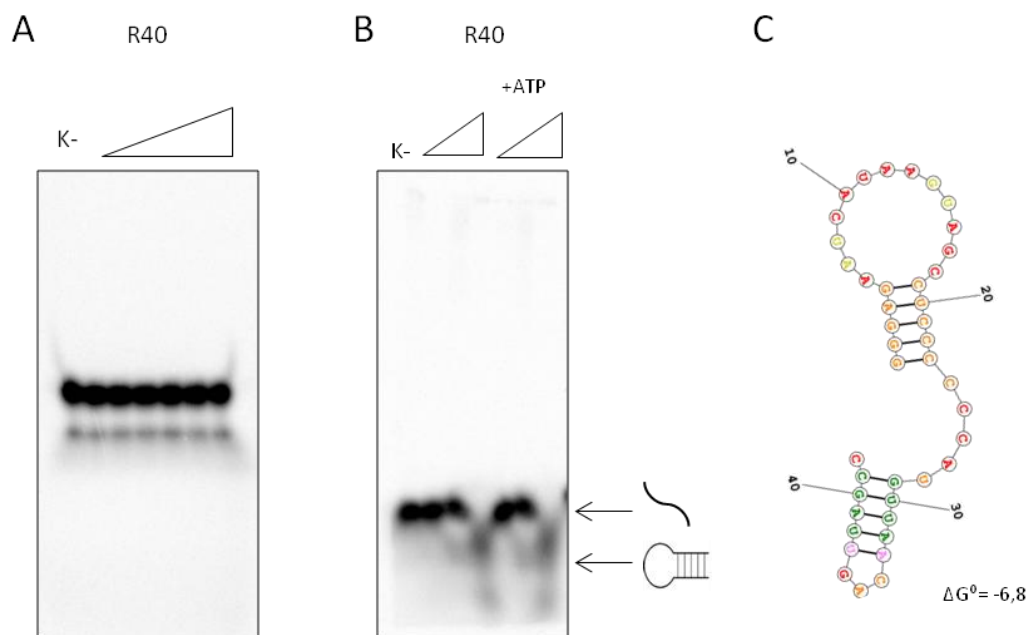
**Rysunek 19. Oddziaływanie jednoniciowego RNA z preparatem HEL hDicer.** Wyznakowany radioizotopowo ssRNA inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem HEL hDicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 2,97; 5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu$ M). Trójkątem oznaczono wzrastające stężenia HEL. Rozdział prowadzono w 5% żelu PAA.

### A. Analiza jakościowa RNA z wykorzystaniem elektroforezy w żelach poliakrylamidowych

Początkowo zbadano, czy użyte substraty, na przykładzie cząsteczki R40, zachowują swoją integralność podczas inkubacji z preparatem HEL hDicer. W tym celu znakowaną [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP cząsteczkę R40 ( $C_k$  2,5 nM) inkubowano 30 minut w RT w samym buforze reakcyjnym lub w buforze z dodatkiem HEL hDicer, przy czym kolejne mieszaniny reakcyjne zawierały HEL hDicer w stężeniach: 2,97; 5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu$ M, zgodnie z eksperymentem, którego wyniki przedstawiono na **Rysunku 14**. Inkubacje prowadzone były bez dodatku oraz z dodatkiem ATP ( $C_k$  1 mM). Po inkubacji, do mieszanin reakcyjnych dodano 10 M roztwór mocznika, w stosunku objętościowym 1:1. Próby denaturowano 3 minuty w 95°C, umieszczano w lodzie na 2 minuty, a następnie rozdzielano w 8% żelu PAA, a następnie wizualizowano przy użyciu skanera Amersham™ Typhoon™ (Cytiva). Analiza z wykorzystaniem rozdziału elektroforetycznego w warunkach denaturujących wykazała, że cząsteczka R40 zachowuje swoją integralność, tj. nie ulega rozpadowi, nawet przy najwyższym stężeniu HEL hDicer ( $C_k$  95  $\mu$ M) (**Rysunek 20 A**). Na integralność substratu nie ma także wpływu dodatek ATP (dane niepokazane).

W kolejnym kroku, do mieszanin reakcyjnych zawierających znakowaną [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP cząsteczkę R40 ( $C_k$  2,5 nM), bufor reakcyjny z dodatkiem HEL hDicer o stężeniach 5,94; 23,75; 95  $\mu$ M lub bez dodatku białka, po skończonej inkubacji (30 minut w RT) dodawano SDS do stężenia końcowego 1%. SDS jest detergentem i powoduje denaturację białek, zatem w mieszaninach reakcyjnych zawierających SDS nie zachowują się kompleksy kwas nukleinowy•białko. SDS nie denaturuje jednak kwasów nukleinowych, a jego dodatek umożliwia obserwację różnych form (konformerów) przyjmowanych przez kwas nukleinowy w wyniku jego oddziaływania z białkiem, po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji. Mieszaniny reakcyjne zawierające 1% SDS rozdzielano w 5% natywnym żelu PAA, a następnie wizualizowano przy użyciu skanera Amersham™ Typhoon™ (Cytiva) (**Rys. 20 B**). Analiza uzyskanych wyników ujawniła, iż przy najwyższym użytym stężeniu białka (95  $\mu$ M) pojawiły się produkty migrujące szybciej niż produkty odpowiadające przypuszczalnie liniowej formie R40. Zgodnie z wynikami przewidywań struktury dla

R40, wygenerowanymi w programie RNA Structure (Mathews Lab), cząsteczka R40 może przyjmować strukturę zawierającą dwie spinki (**Rys. 20 C**). Uzyskane wyniki wspierają zatem hipotezę, że domena helikazowa hDicer może indukować zmiany strukturalne w obrębie jednoniciowych RNA, a proces ten jest niezależny od ATP.



**Rysunek 20.** Efekt oddziaływania preparatu HEL hDicer z ssRNA o długości 42 nt: (A) w warunkach denaturujących z dodatkiem 10 M mocznika; (B) w warunkach natywnych z dodatkiem 1% SDS. K- oznacza kontrolę reakcji wiązania pozbawioną białka. Trójkątami zaznaczono wzrastające stężenia białka HEL (A: 2,97 ;5,94; 11,86; 23,75; 47,5; 95  $\mu$ M), (B: 5,94; 23,75; 95  $\mu$ M). Rozdział prowadzono w: (A) 8% denaturującym żelu PAA; (B) 5% natywnym żelu PAA. (C) Przewidywana struktura cząsteczki R40 wykonana w programie RNAstructure (Mathews Lab).

## B. Analiza zmian strukturalnych w obrębie RNA z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego

W celu zbadania, czy HEL hDicer indukuje zmiany strukturalne w obrębie substratów RNA, zastosowano także metodę spektroskopii dichroizmu kołowego (CD). Spektroskopia dichroizmu kołowego jest doskonałą metodą umożliwiającą śledzenie zmian strukturalnych w biomolekułach. Ze względu na to, że charakterystyczne pasma białek i kwasów nukleinowych w widmie CD są rozdzielone, metoda ta umożliwia niezależną analizę strukturalną zarówno białek, jak i kwasów nukleinowych. Zazwyczaj w widmie CD obserwuje się kilka maksimów, które są

charakterystyczne dla odpowiednich struktur drugorzędowych w białku i kwasie nukleinowym. Podczas analizy jakościowej z wykorzystaniem CD wykorzystano cząsteczkę R40 (28  $\mu$ M), którą inkubowano w buforze (10 mM HEPES pH 8.0, 300 mM NaF) bez dodatku białka, z HEL hDicer ( $C_k$  28  $\mu$ M) oraz z HEL hDicer ( $C_k$  28 $\mu$ M) i ATP ( $C_k$  1 mM) (Rozdział: Metody 2.23).

Na **Rysunku 21 A**, przedstawiono porównanie kształtu widm CD badanych układów: (i) HEL hDicer, (ii) HEL hDicer z R40 oraz (iii) HEL hDicer z R40 oraz ATP w temperaturze 15°C, w zakresie od 210 do 350 nm. W przypadku białka HEL hDicer, widoczny jest wzrost intensywności pasma przy 222 nm, w całym zakresie badanych temperatur, tj. od 5°C do 90°C (**Rysunek 21 B**). Widoczne są również dwie nieciągłości: (i) przy ok. 30°C oraz (ii) przy 60°C. Nieciągłości te wynikają ze zmian strukturalnych zachodzących w białku podczas wzrostu temperatury. Są to wartości temperatur przemian fazowych. Na podstawie analizy maksimum przy 222 nm wykonanej dla powstałego kompleksu R40•HEL hDicer, zauważono, że obserwowane nieciągłości są przesunięte w kierunku wyższych temperatur i wynoszą odpowiednio: 52°C i 74°C (**Rysunek 21 C**). Świadczy to o wiązaniu R40 przez HEL hDicer i dodatkowo, o stabilizacji struktury białka po związaniu R40. W przypadku kompleksu R40•HEL hDicer powstałym w buforze zawierającym ATP, zaobserwowano podobne wartości temperatur przemian fazowych do wartości temperatur zaobserwowanych dla kompleksu R40•HEL hDicer (**Rysunek 21 D**).

Na **Rysunku 21 E-G** przedstawiono zależności temperaturowe intensywności pików przy 270 nm dla cząsteczki R40, samej (**Rysunek 21 E**) oraz w kompleksie z HEL hDicer (**Rysunek 21 F**) i w kompleksie z HEL hDicer w obecności ATP w buforze (**Rysunek 21 G**). W przypadku RNA analizowano maksimum dodatnie, którego intensywność zmniejsza się, wraz ze zmniejszaniem zawartości struktury drugorzędowej. W przypadku R40, wraz ze wzrostem temperatury zaobserwowano zmniejszanie intensywności pików przy 270 nm. Dwie nieciągłości obserwowane są w temperaturach 35°C i 75°C. W przypadku kompleksu R40•HEL hDicer, nie jest obserwowana, lub jest bardzo słabo widoczna nieciągłość w pobliżu 35°C. Natomiast nieciągłość w wysokich temperaturach (75°C) jest przesunięta w kierunku niższych temperatur, a różnica temperatur przemian fazowych pomiędzy samą cząsteczką R40, a kompleksem

R40•HEL hDicer wynosi 15°C. Obserwowane zanikanie przemian fazowych oraz obniżenie ich temperatur dowodzi silnego oddziaływania RNA z HEL hDicer.

W **Tabeli 15** przedstawiono porównanie danych termodynamicznych eksperymentalnych i teoretycznych dla R40, kompleksu R40•HEL hDicer oraz kompleksu R40•HEL hDicer z dodatkiem ATP. Na podstawie analizy parametrów termodynamicznych, stwierdzono że entropia i entalpia dla układu R40•HEL hDicer zmniejszyła się o ok. 12%, w stosunku do odpowiednich wartości dla samej cząsteczki R40. Dowodzi to zmian struktury RNA pod wpływem oddziaływania z HEL hDicer.

**Tabela 15. Porównanie parametrów termodynamicznych teoretycznych i eksperymentalnych dla R40, kompleksu R40•HEL hDicer oraz kompleksu R40•hDicer w obecności ATP [166].**

	Masa molekularna RNA [Da]	Zawartość GC [%]	$T_{m\text{basic}}$ [°C]	$T_{m\text{salt}}$ [°C]	$T_{m\text{exp.}}$ [°C]	$R\ln K$ [cal/(°Kmol)]	$\Delta G$ [kcal/mol]	$\Delta G_{\text{exp.}}$ [kcal/mol]	$\Delta H$ [kcal/mol]	$\Delta H_{\text{exp.}}$ [kcal/mol]	$\Delta S$ [cal/(°Kmol)]	$\Delta S_{\text{exp.}}$ [cal/(°Kmol)]
R40	12741	50	69,4	79,9	35/75	33,404	58,6	56,7	347,5	336,03	915,5	885,28
R40•HEL hDicer	12741	50	69,4	79,9	60	33,404	58,6	50,2	347,5	297,81	915,5	784,58
R40•HEL hDicer + ATP	12741	50	69,4	79,9	60	33,404	58,6	50,1	347,5	298,21	915,5	786,21

$T_{m\text{basic}}$  – teoretyczna temperatura topnienia bez dodatku buforu

$T_{m\text{salt}}$  – teoretyczna temperatura topnienia w buforze zawierającym sól

$T_{m\text{exp.}}$  – temperatura topnienia wyznaczona eksperymentalnie

$R\ln K$  – iloczyn: R - stałej gazowej (ok. 8,31 [J\* $\text{mol}^{-1}$ \*K $^{-1}$ ]) i logarytmu naturalnego z K - stałej równowagi [mol/L]

$\Delta G$  – teoretyczna entalpia swobodna reakcji

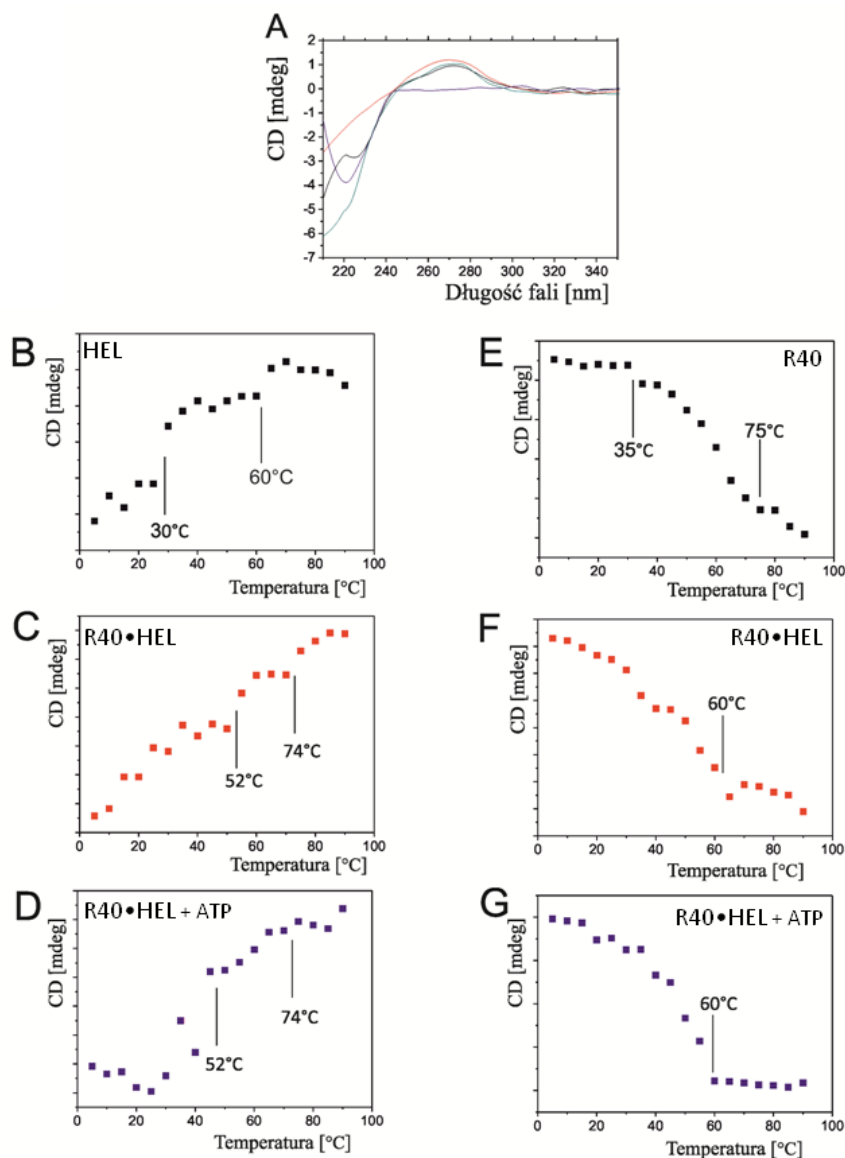
$\Delta G_{\text{exp.}}$  – entalpia swobodna reakcji wyznaczona eksperymentalnie

$\Delta H$  – teoretyczna entalpia reakcji

$\Delta H_{\text{exp.}}$  – entalpia reakcji wyznaczona eksperymentalnie

$\Delta S$  – teoretyczna entropia reakcji

$\Delta S_{\text{exp.}}$  – entropia reakcji wyznaczona eksperymentalnie



**Rysunek 21. Analiza zmian strukturalnych w obrębie białka i RNA z wykorzystaniem spektroskopii dichroizmu kołowego dla R40, HEL hDicer, kompleksu R40•HEL hDicer oraz kompleksu R40•HEL hDicer z ATP. (A) Przykładowe widma badanych układów (czerwony – R40, fioletowy – HEL hDicer, czarny – kompleks R40•HEL hDicer, zielony – kompleks R40•HEL hDicer +ATP), (B, C, D) temperaturowa zależność intensywności piku przy 222 nm, informująca o zmianach zachodzących w białku, (B – HEL hDicer, C - kompleks R40•HEL hDicer, D –kompleks R40•HEL hDicer +ATP), strzałkami zaznaczono temperatury przemian fazowych. (E, F, G) temperaturowa zależność intensywności piku przy 270 nm, informująca o zmianach strukturalnych zachodzących w cząsteczce RNA. (E – R40, F - kompleks R40•HEL hDicer, G - kompleks R40•HEL hDicer +ATP).**

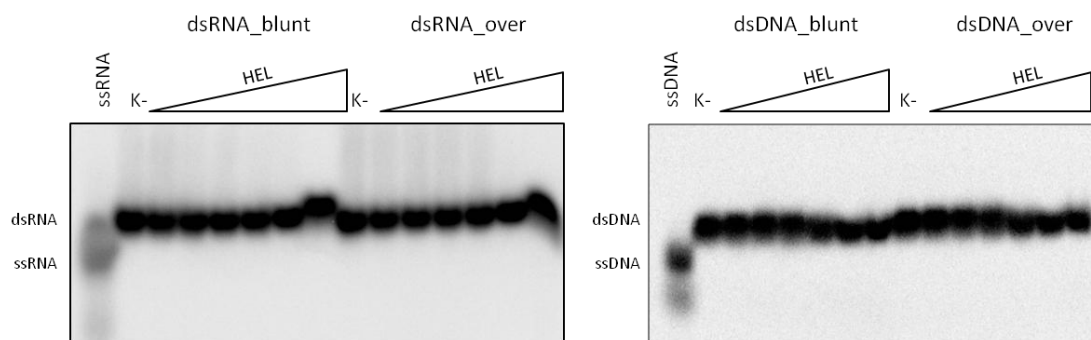
### 2.3 Aktywność helikazowa – rozplatanie dwuniciowych struktur RNA i DNA

Z uwagi na obecność w domenie helikazowej hDicer w pełni zachowanego motywu DExD/H-box, domena ta mogłaby potencjalnie posiadać aktywność rozplatania dwuniciowych struktur w cząsteczkach RNA i DNA [28]. Jednakże jak dotąd nie udało się zaobserwować aktywności rozplatania u domeny helikazowej hDicer.

W celu sprawdzenia czy otrzymany preparat HEL hDicer posiada aktywność rozplatania dupleksów RNA i DNA wykorzystano substraty: (i) w pełni sparowany dupleks o długości 32 pz (dsRNA\_blunt), (ii) dupleks RNA o długości 30 pz posiadający dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (dsDNA\_over), (iii) w pełni sparowany dupleks DNA o długości 32 pz (dsDNA\_blunt) oraz (iv) dupleks DNA o długości 30 pz posiadający dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (dsDNA\_over). W dupleksach jedna z nici była wyznakowana na końcu 5' z użyciem [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (Rozdział: Metody 2.13). W reakcjach zastosowano 10 000 cpm ( $C_k$  6,7 nM) dwuniciowego substratu oraz preparat HEL hDicer o stężeniach od 0,58  $\mu\text{M}$  do 18,53  $\mu\text{M}$  (Rozdział: Metody 2.19). Przeprowadzono dwie serie reakcji: (i) z dodatkiem ATP ( $C_k$  1 mM) i (ii) bez dodatku ATP. Reakcje były zatrzymywane poprzez dodanie buforu zawierającego 1% SDS. Każdy eksperyment został powtórzony co najmniej trzykrotnie. Mieszaniny reakcyjne rozdzielano w 10% natywnym żelu PAA (Rozdział: Metody 2.15).

W przypadku wszystkich zastosowanych dwuniciowych substratów: dsRNA\_blunt, dsRNA\_over, dsDNA\_blunt oraz dsDNA\_over, nie zaobserwowano aktywności rozplatania dwuniciowych struktur RNA i DNA dla preparatu HEL hDicer (**Rysunek 22**). Na wynik reakcji nie miał także wpływu dodatek ATP, bądź jego brak (dane niepokazane).





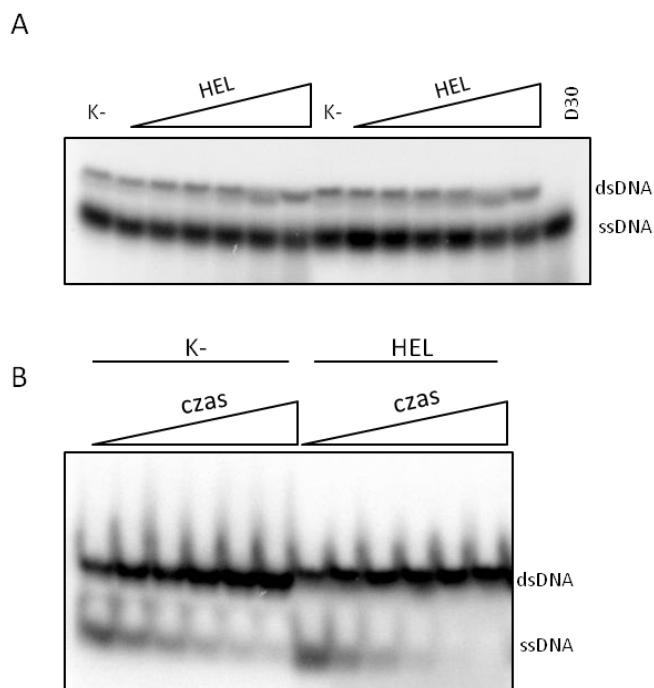
**Rysunek 22. Rozplatanie dupleksów kwasów nukleinowych przez HEL hDicer.** Wynik analizy reakcji rozplatania dupleksów RNA i DNA przez HEL hDicer. Wyznakowane radioizotopowo dupлексы: dsRNA\_blunt, dsRNA\_over, dsDNA\_blunt, dsDNA\_over, inkubowano w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem HEL hDicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 0,58; 1,16; 2,32; 4,63; 9,27; 18,53  $\mu\text{M}$ ). Trójkątami oznaczono wzrastające stężenia HEL hDicer. Rozdział prowadzono w 10% żelu PAA. Do badania rozplatania wykorzystano substraty dsRNA i dsDNA o długościach 32 pz, posiadające: w pełni sparowane końce (blunt) lub dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (over).

## 2.4 Aktywność wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych

Wyniki poprzednich badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii Rybonukleoprotein ICHB PAN wykazały, że domena DUF283 wspiera hybrydyzację komplementarnych cząsteczek kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acids annealing activity*) [94, 95]. Badania opisane w rozprawie doktorskiej Ikenna R. Obi wykazały, że domena helikazowa hDicer może także wykazywać aktywność wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych [A]. W celu sprawdzenia, czy otrzymany preparat HEL posiada aktywność wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych wykorzystano pary komplementarnych względem siebie jednoniciowych cząsteczek RNA, bądź DNA, o długości 32 nt, które po hybrydyzacji mogą tworzyć dupлексы z w pełni sparowanymi końcami (blunt) lub dupлексы zawierające dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' (over). W reakcjach zastosowano 10 000 cpm ( $C_k$  ok. 6,7 nM) substratu znakowanego radioizotopowo oraz komplementarnego oligomeru ( $C_k$  ok. 20 nM) oraz preparat HEL hDicer o stężeniach od 0,58  $\mu\text{M}$  do 18,53  $\mu\text{M}$  (Rozdział: Metody 2.18). Przeprowadzono dwie serie reakcji: (i) z dodatkiem ATP ( $C_k$  1 mM) i (ii) bez dodatku

ATP. Reakcje były zatrzymywane poprzez dodanie buforu zawierającego 1% SDS. Każdy eksperyment został powtórzony co najmniej trzykrotnie. Mieszanki reakcyjne rozdzielano w 10% natywnym żelu PAA (Rozdział: Metody 2.15). W przypadku wszystkich zastosowanych układów nie zaobserwowano, aby HEL hDicer wspierała parowanie sekwencji komplementarnych cząsteczek. Na wynik reakcji nie miał także wpływu dodatek ATP, bądź jego brak (dane niepokazane). Poglądowo, na **Rysunku 23** przedstawiono wyniki dla reakcji z udziałem komplementarnych DNA.

Biorąc pod uwagę wyniki badań I.R. Obi, wskazujące, iż domena helikazowa hDicer posiada aktywność wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych [A], przeprowadzono kolejne serie reakcji. Mając na względzie możliwość indukowania zmian strukturalnych w substratach RNA przez HEL hDicer, w badaniach wykorzystano parę komplementarnych DNA o długości 32 nt, które mogą utworzyć duplekisy w pełni sparowane (blunt) lub z dwoma niesparowanymi nukleotydami na końcach 3' (over). Zastosowano także różny czas inkubacji (0, 15, 30, 60, 90 i 120 minut) substratów z HEL hDicer ( $C_k$  4,65  $\mu$ M) (**Rysunek 23 B**). Reakcje rozdzielano w 10% natywnym żelu PAA i skanowano z wykorzystaniem skanera Fujifilm FLA-5100 Fluorescent Image Analyzer lub skanera Amersham™ Typhoon™ (Cytiva). Na podstawie analizy densytometrycznej przeprowadzonej w programie Multi Gauge (Fujifilm), oszacowano, że obecność HEL hDicer powodowała przyrost dwuniciowej formy produktu średnio o ok. 5%, w stosunku do reakcji kontrolnej, bez HEL hDicer (**Rysunek 23 B**). Uzyskane wyniki pokazały, że w zastosowanym układzie reakcyjnym, HEL hDicer w niewielkim stopniu wspierała parowanie sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych.



**Rysunek 23. Wspieranie parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych przez HEL hDicer.** Wynik analizy reakcji annealingu komplementarnych DNA przez HEL hDicer z wykorzystaniem: **(A)** różnych stężeń HEL hDicer lub **(B)** różnych czasów inkubacji. Wyznakowaną radioizotopowo cząsteczkę D30 ( $C_k$  6,7 nM) inkubowano z komplementarną cząsteczką D30\_blunt ( $C_k$  20 nM) lub D30\_over ( $C_k$  20 nM) w samym buforze reakcyjnym (K-) lub z dodatkiem HEL hDicer. Trójkątami oznaczono wzrastające stężenia HEL hDicer (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 0,58; 1,16; 2,32; 4,63; 9,27; 18,53  $\mu$ M) **(A)** lub wzrost czasu inkubacji prób (0, 15, 30, 60, 90 i 120 minut) **(B)**. Rozdział prowadzono w 10% żelu PAA.

### 3. Analiza komórkowej sieci oddziaływań pomiędzy RNA i domeną helikazową hDicer – badania wstępne

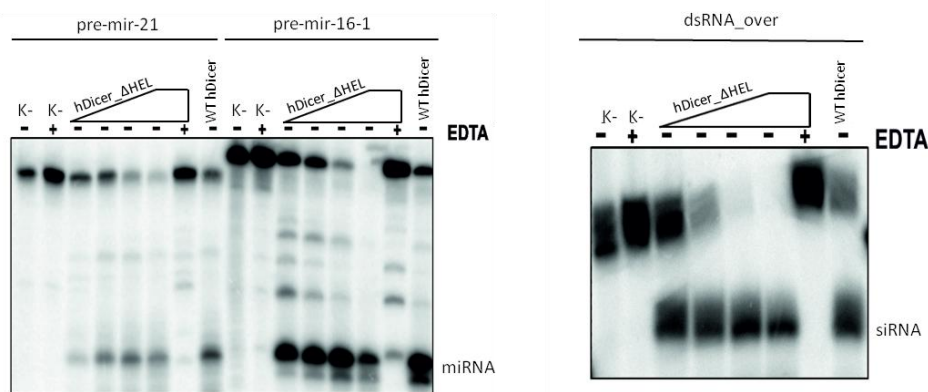
Badania prowadzone przez grupę prof. N. Rajewsky'ego wykazały, że hDicer może oddziaływać w komórce z wieloma typami cząsteczek RNA [159]. W celu zbadania znaczenia domeny helikazowej dla wiązania komórkowych RNA przez hDicer zastosowano metodę irCLIP (ang. *infrared cross-linking immunoprecipitation*), połączoną z sekwencjonowaniem nowej generacji (ang. *Next-Generation Sequencing*, NGS). W badaniach wykorzystano trzy linie komórkowe: (i) komórki HEK 293T NoDice (4-25) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą hDicer\_ΔHEL oraz jako kontrole (ii) komórki HEK 293T NoDice (4-25) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą WT hDicer (tzw. „rescue control”) i (iii) komórki HEK 293T z endogenną WT hDicer (linia typu dzikiego). Strategia irCLIP jest obecnie

uznawana za jedną z najczulszych i najbardziej specyficznych technik typu CLIP (ang. *cross-linking immunoprecipitation*) [167]. Metody tego typu polegają na tworzeniu wiązań kowalencyjnych pomiędzy białkami a cząsteczkami kwasu nukleinowego w komórkach przy użyciu promieniowania UV, a następnie „wyławianiu” pożądanych kompleksów RNA•białko za pomocą specyficznych wobec danego białka przeciwciał. W metodzie irCLIP do wizualizacji wyizolowanych kompleksów RNA•białko stosuje się barwnik *infrared* (bliskiej podczerwieni), który jest bardziej czuły od radioizotopu stosowanego w innych wersjach metody CLIP. Obecnie irCLIP to najbardziej rekomendowana metoda do badania oddziaływań pomiędzy białkami a kwasami nukleinowymi, pozwalająca poznać motywy sekwencyjne w obrębie RNA, które są wiązane przez białko.

### 3.1 Badanie aktywności RNazowej wariantu hDicer\_ΔHEL

Badania komórkowej sieci oddziaływań pomiędzy RNA i domeną helikazową hDicer poprzedzone zostały analizą aktywności cięcia wybranych substratów RNA (aktywność RNazowa) przez wariant hDicer\_ΔHEL.

W tym celu wykorzystano kanoniczne substraty hDicer: cząsteczkę pre-miRNA-21 oraz pre-miRNA-16-1, a także dwuniciowy substrat RNA posiadający dwa niesparowane nukleotydy na końcach 3' dupleksu (dsRNA\_over) ( $C_k$  10 nM) oraz hDicer\_ΔHEL ( $C_k$  1,25 - 10 nM). Jako kontrolę wykorzystano białko WT hDicer ( $C_k$  10 nM). Reakcję cięcia prowadzono w 10  $\mu$ l, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Metody 2.21. Produkty rozdzielano w 15% denaturującym żelu PAA. Uzyskane wyniki ujawniły, że otrzymany preparat hDicer\_ΔHEL jest aktywny i mimo delecji domeny helikazowej posiada aktywność RNazową względem pre-miRNA i dsRNA (**Rysunek 24**). Aktywność ta była wyższa, w porównaniu do aktywności RNazowej WT hDicer. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami otrzymanymi przez grupę prof. J. Doudny dla cięcia substratów pre-hlet-7 i dsRNA o długości 35 pz przez jeden z wariantów delecyjnych hDicer, pozbawiony domeny helikazowej [72]. Jak ustalono wcześniej (Rozdział: Wyniki 2.1), wariant hDicer\_ΔHEL nie posiada aktywności ATPazowej (**Rysunek 13 B**).



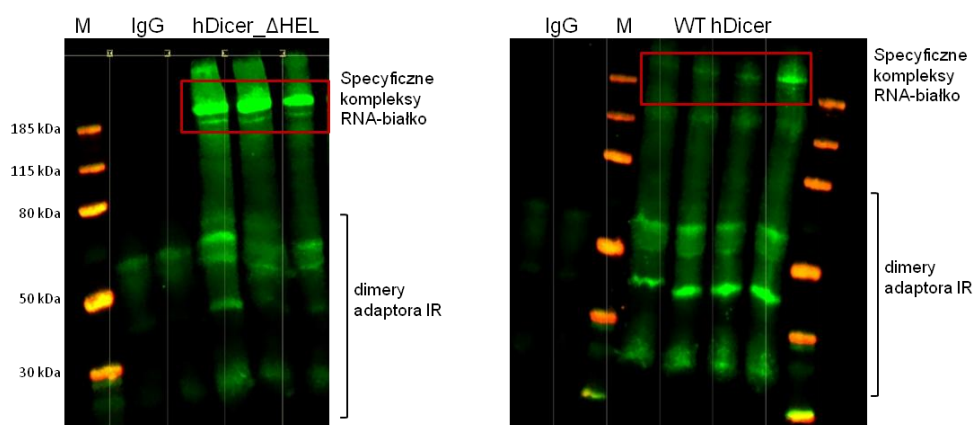
**Rysunek 24. Aktywność RNazowa preparatu hDicer\_ΔHEL.** Wykorzystano dwa rodzaje substratów pre-miRNA (pre-miR21 i pre-miR16-1) oraz dsRNA (dsRNA\_over). Zastosowano kontrolę pozytywną w postaci WT hDicer. K- oznacza kontrolę reakcji bez białka. Trójkątami zaznaczono wzrastające stężenia preparatu hDicer\_ΔHEL, (w kolejnych reakcjach stężenie enzymu wzrastało, odpowiednio: 1,25; 2,5; 5; 10 nM). Mieszaniny reakcyjne, do których dodano EDTA, oznaczono +. Rozdział prowadzono w 15% denaturującym żelu PAA.

### 3.2 Izolacja kompleksów RNA•WT hDicer oraz RNA•hDicer\_ΔHEL z ludzkich komórek typu HEK 293T NoDice

Szczegółowa procedura izolacji kompleksów RNA•WT hDicer oraz RNA•hDicer\_ΔHEL z ludzkich komórek typu HEK 293T została opisana w rozdziale: Metody 2.24. Skrótowo, procedurę izolacji rozpoczęto od naświetlania komórek: (i) HEK 293T – linia typu dzikiego (kontrola), (ii) HEK 293T NoDice (4-25) transfekowanych plazmidem kodującym WT hDicer („rescue control”) oraz (iii) HEK 293T NoDice (4-25) transfekowanych plazmidem kodującym hDicer\_ΔHEL, światłem UV (254 nm), w celu stabilizacji powstających w komórce kompleksów RNA•białko za pomocą tworzących się wiązań kowalencyjnych między RNA a białkiem (ang. *UV crosslinking*). Następnym krokiem była izolacja kompleksów RNA•białko z komórek, z wykorzystaniem złoża magnetycznego opłaszczonego: (i) przeciwciałem specyficznym wobec C-końca hDicer (Anti-Dicer Antibody sc-136979, Santa Cruz Biotechnology) lub (ii) przeciwciałem anty-IgG (Normal Mouse IgG sc-2025, Santa Cruz Biotechnology), które służy jako kontrola izolacji specyficznych kompleksów RNA•białko. Kolejnym krokiem była defosforylacja końców 3' cząsteczek RNA związanych z białkiem oraz ligacja do końca 3' RNA adaptera posiadającego barwnik bliskiej podczerwieni. Po uwolnieniu ze złoża magnetycznego, kompleksy RNA•białko rozdzielane były w żelu SDS-PAGE i przenoszone na membranę

nitrocelulozową. Po transferze, kompleksy RNA•białko wizualizowano na membranie nitrocelulozowej, dzięki obecności adaptera z barwnikiem bliskiej podczerwieni, który został wcześniej doligowany do RNA, **Rysunek 25** (Rozdział: Metody 2.24).

Następnie, wycięto specyficzne kompleksy RNA•hDicer\_ΔHEL i RNA•WT hDicer, zaznaczone na **Rysunku 25**.



**Rysunek 25. Analiza kompleksów RNA•WT hDicer i RNA•hDicer\_ΔHEL wyizolowanych z komórek HEK 293T NoDice (4-25) z wykorzystaniem metody irCLIP.** Pożądanе kompleksy RNA•białko, wybrane do dalszej analizy, zaznaczono czerwoną ramką. M – *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). IgG – kontrola specyficzności izolacji kompleksów. Wizualizacja za pomocą barwnika bliskiej podczerwieni (IR). Kompleksy wizualizowano z wykorzystaniem aparatu Odyssey Li-COR CLx Imager.

Kolejnym krokiem była izolacja RNA z wyciętego fragmentu membrany, poprzez trawienie białka proteinazą K (pozostaje jedynie fragment białka z motywem wiążącym RNA, z uwagi na wiązanie kowalencyjne między RNA a białkiem), po izolacji (metodą fenol:chloroform:alkohol izoamylowy) RNA strącano w obecności etanolu. Następne etapy obejmowały: reakcję odwrotnej transkrypcji, w której matrycą był wyizolowany RNA, cyrkularyzację otrzymanego cDNA, namnożenie cDNA z użyciem PCR oraz przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania NGS (sekwencjonowanie z wykorzystaniem sekwenatora Illumina NextSeq550), zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale: Metody 2.24.

### 3.3 Wstępna analiza danych po sekwencjonowaniu NGS

Przygotowane biblioteki cDNA przekazano do sekwencjonowania NGS (sekwencjonowanie z wykorzystaniem sekwenatora Illumina NextSeq550). Uzyskane dane bioinformatyczne poddano kontroli jakości, wstępnej obróbce i uporządkowaniu, zgodnie z opisem zamieszczonym w rozdziale: Metody 2.24.11. W oparciu o analizy różnicowe przeprowadzone za pomocą pakietu DESeq2, który umożliwia ujawnienie zmian ilościowych między grupami eksperymentalnymi (tzw. identyfikację genów wyrażanych różnicowo; (DE), ang. *differential expression analysis*), wyznaczono geny, do których mapowały się odczyty sekwencji dla prób: (i) hDicer\_ΔHEL oraz (ii) WT hDicer (**Tabela S1** i **S2** w elektronicznej wersji Rozprawy Doktorskiej). Dane zostały uszeregowane od największej do najmniejszej liczby zliczeń, tj. parametru: „baseMean” (średnia znormalizowanych wartości zliczeń, podzielona przez współczynniki wielkości próby, przyjęta dla wszystkich próbek) dla danego genu. Dane dla prób: (i) hDicer\_ΔHEL oraz (ii) WT hDicer zamieszczono w elektronicznej wersji Rozprawy Doktorskiej, **Tabela S1** (hDicer\_ΔHEL) i **S2** (WT hDicer).

Dla arbitralnie wybranych genów: *PRPC2A* (gen kodujący białkową fosfatą PrpC), *PLIN2* (gen kodujący białko z rodziny perilipin – białka budujące krople lipidowe) oraz *DICER1* (gen kodujący hDicer), charakteryzujących się wysokimi wartościami „baseMean”, przeprowadzono wstępną analizę w programie Interactive Genome Viewer (IGV) [168]. IGV jest łatwym w użyciu, interaktywnym narzędziem do wizualizacji analiz danych genomicznych.

Wstępna analiza porównawcza wykazała, że w puli wyizolowanych RNA, które w komórce utworzyły kompleks z białkiem, pojawiło się wiele sekwencji, które były wiązane wyłącznie przez hDicer\_ΔHEL, natomiast nie były wiązane przez WT hDicer (**Rysunek 26 A-E**) i odwrotnie, były wiązane wyłącznie przez WT hDicer lecz nie przez hDicer\_ΔHEL (**Rysunek 27 A-E**).

W obrębie genu *PRPC2A* zmapowano miejsca dla transkryptów wiązanych wyłącznie przez wariant hDicer\_ΔHEL (**Rysunek 26 A-C**). Dla tej pozycji w genomie nie zaobserwowano odczytów dla białka kontrolnego WT hDicer (endogenna hDicer)

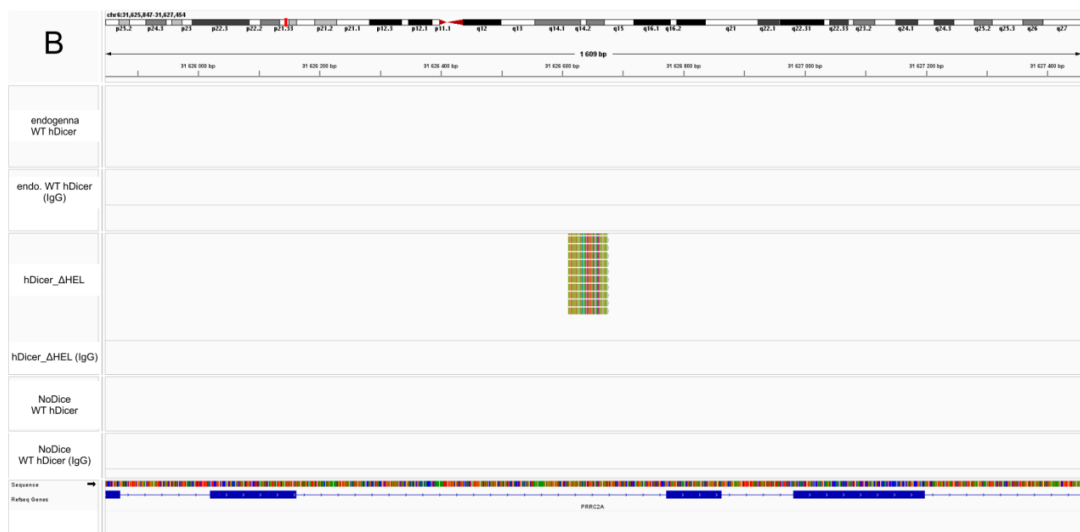
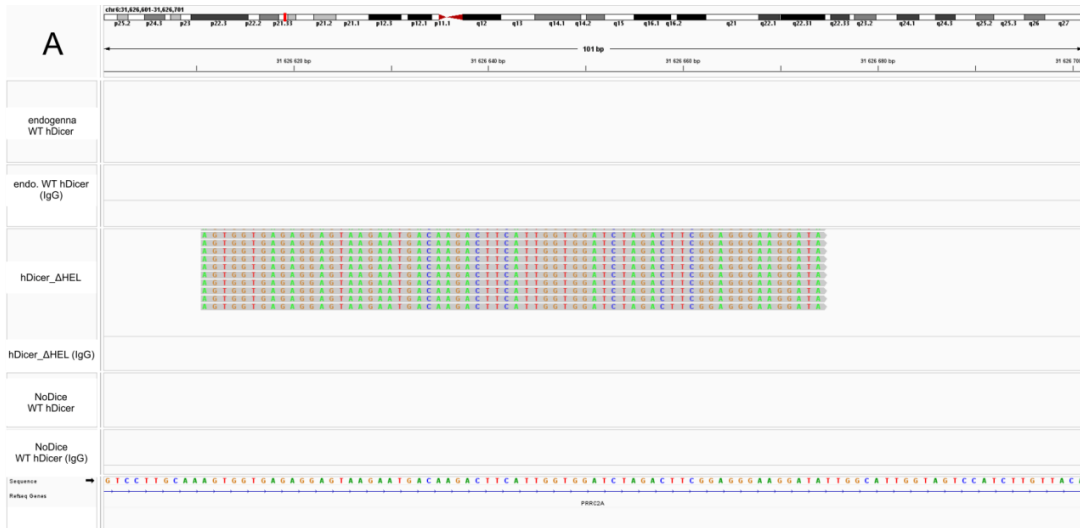
i WT hDicer (NoDice WT hDicer) „rescue control”. Brak odczytów dla kontroli hDicer\_ΔHEL IgG i pozostałych kontroli IgG potwierdził, że izolacja kompleksów RNA•hDicer\_ΔHEL była specyficzna. Odczyty występujące wewnątrz intronów sugerują, że do wiązania transkryptu z hDicer\_ΔHEL dochodziło w jądrze.

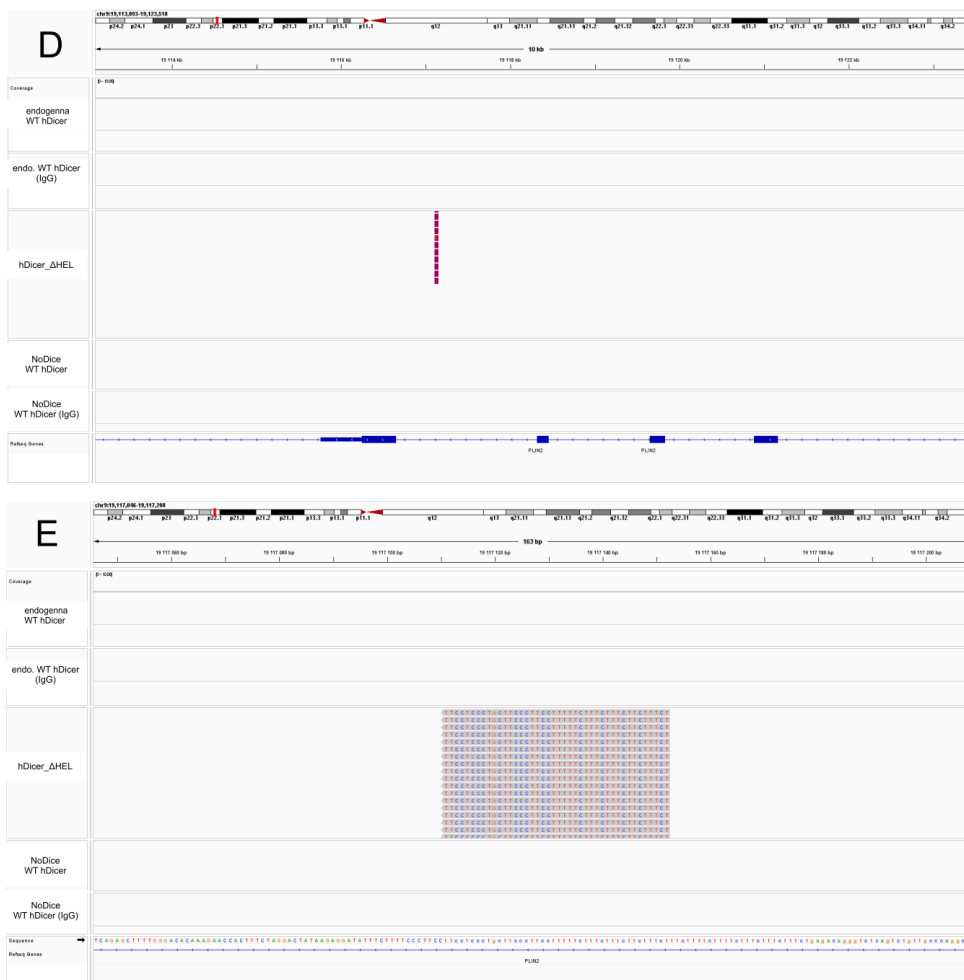
W obrębie genu *PLIN2* zmapowano miejsca dla transkryptów wiązanych wyłącznie przez wariant hDicer\_ΔHEL (**Rysunek 26 D-E**). Dla tej pozycji w genomie nie zaobserwowano odczytów dla białka kontrolnego WT hDicer (endogenna hDicer) i WT hDicer (NoDice WT hDicer) „rescue control”. Brak odczytów dla kontroli hDicer\_ΔHEL IgG i pozostałych kontroli IgG potwierdził, że izolacja kompleksów RNA•hDicer\_ΔHEL była specyficzna. Odczyty te także występowały wewnątrz intronów.

Zaobserwowano także bliskie sąsiedztwo zmapowanych miejsc dla transkryptów wiązanych przez hDicer\_ΔHEL oraz WT hDicer (endogennej hDicer i NoDice WT hDicer) w obrębie genu *PRPC2A* (**Rysunek 26 C**). Co ciekawe, odczyty dla transkryptów wiązanych przez hDicer\_ΔHEL występowały w obrębie intronu, zaś odczyty dla transkryptów wiązanych przez oba białka WT hDicer pochodziły od sekwencji znajdującej się w egzonie.

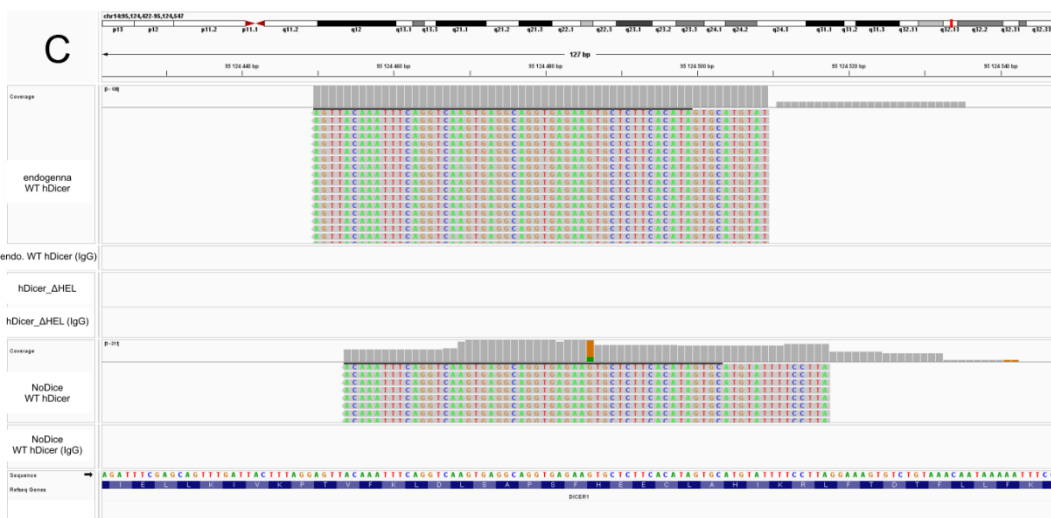
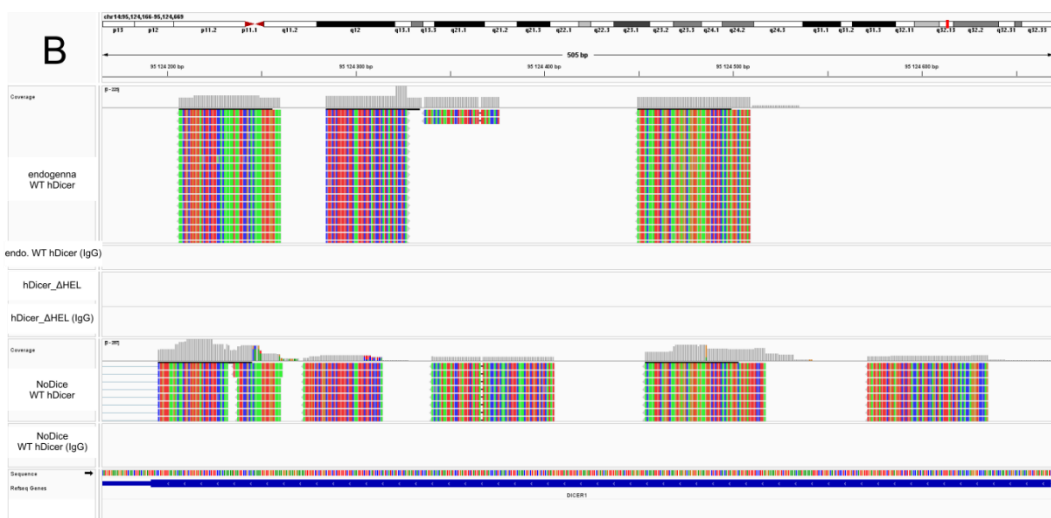
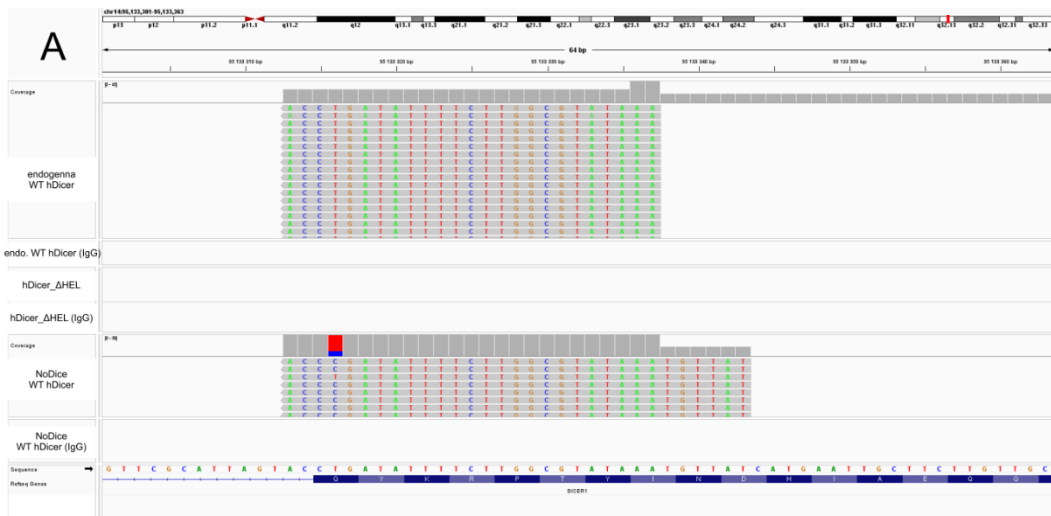
W obrębie genu *DICER1* zmapowano miejsca dla transkryptów wiązanych wyłącznie przez WT hDicer (**Rysunek 27 A-E**). Dla tych pozycji w genomie zaobserwowano podobne odczyty dla białka kontrolnego WT hDicer (endogenna hDicer) i WT hDicer (NoDice WT hDicer) „rescue control” i brak odczytów dla hDicer\_ΔHEL. Brak odczytów dla kontroli WT hDicer IgG i pozostałych kontroli IgG potwierdził, że izolacja kompleksów RNA•WT hDicer była specyficzna. Odczyty dla WT hDicer występowały wewnątrz sekwencji egzonu.







**Rysunek 26. Analiza sekwencji genów, których transkrypty zostały związane przez hDicer\_ΔHEL w komórce, otrzymane po sekwencjonowaniu NGS, wykonana w programie IGV służącym do analiz danych genomicznych. (A–E) sekwencje związane wyłącznie przez hDicer\_ΔHEL. Endogenna WT hDicer – kontrola w postaci linii typu dzikiego HEK 293T. hDicer\_ΔHEL – próba badana, białko otrzymane w komórkach HEK 293T NoDice (4-25) transfekowanych plazmidem kodującym hDicer\_ΔHEL. NoDice WT hDicer – kontrola tzw. „rescue control”, białko otrzymane po transfekcji komórek HEK 293T NoDice (4-25) plazmidem kodującym WT hDicer. IgG – kontrola izolacji.**





Podsumowując, odczyty znaleziono zarówno w obrębie sekwencji kodujących białko (egzonów), (**Rysunek 26 C; Rysunek 27 A-E**), jak i w intronach (dane dla hDicer\_ΔHEL dla genów: *PRPC2A* i *PLIN2*; **Rysunek 26 A-E**), co sugeruje jądrową lokalizację hDicer i jej wiązanie do transkryptów, które nie przeszły jeszcze pełnego procesu dojrzewania.

Na podstawie wstępnych analiz danych zebranych z eksperymentu irCLIP-seq można wnioskować, że w komórkach człowieka, wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej oddziałuje z inną pulą cząsteczek RNA, czy też innymi fragmentami tożsamych RNA, niż hDicer typu dzikiego.

### 3.4 Plany

W najbliższym czasie kontynuowana będzie analiza danych pochodzących z analiz irCLIP-seq dla zbiorów: (i) RNA•hDicer\_ΔHEL, (ii) RNA•WT hDicer (typu „rescue control”) oraz (iii) RNA•WT hDicer (kompleksy izolowane z linii typu dzikiego HEK 293T). W szczególności przeprowadzona zostanie szczegółowa analiza różnicowa zbiorów sekwencji (wraz z koordynatami genomowymi, zgodnie z hg38), uzyskanych dla prób (i-iii), która pozwoli wskazać różnice między pulami RNA wiązanych przez hDicer\_ΔHEL i WT hDicer, z uwzględnieniem analizy przewidywanych struktur drugorzędowych przyjmowanych przez wiązane w komórce RNA. Następnie, znajdowane będą motywy sekwencyjne charakterystyczne dla danych grup RNA (wiązanym przez WT hDicer lub wiązanych przez wariant hDicer\_ΔHEL). Dzięki temu, możliwa będzie szersza analiza specyficzności substratowej domeny helikazowej hDicer *in cellulo*, co pozwoli wnioskować o znaczeniu domeny helikazowej dla wiązania komórkowych RNA przez hDicer.

Opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej badania są częścią projektu realizowanego w ramach grantu PRELUDIUM 20 (2021/41/NZ2/03849) pt. „Komórkowa sieć oddziaływań pomiędzy RNA i domeną helikazową rybonukleazy Dicer człowieka” (kierownik: mgr Kinga Ciechanowska). Kolejnym etapem, realizowanym w ramach projektu PRELUDIUM, będzie charakterystyka aktywności biochemicznych wariantu hDicer z mutacją w motywie A Walkera, w domenie helikazowej (hDicer\_K70A, Addgene #41589). Motyw ten odpowiedzialny jest za

hydrolizę ATP, a mutacja K70A całkowicie znosi jego aktywność ATPazową, wobec czego, potencjalnie, mutacja K70A może mieć wpływ na niektóre aktywności domeny helikazowej lub samej hDicer. Białko hDicer\_K70A, będzie produkowane w komórkach HEK 293T NoDice (4-25) i oczyszczane metodą immunoprecypitacji, podobnie jak białko WT hDicer [96] oraz hDicer\_ΔHEL. Planowane jest zbadanie: (i) aktywności wiązania RNA przez hDicer\_K70A; (ii) aktywności cięcia pre-miRNA oraz dsRNA przez hDicer\_K70A; (iii) aktywności wspierania parowania sekwencji komplementarnych cząsteczek RNA przez hDicer\_K70A oraz (iv) aktywności rozplatania dsRNA przez hDicer\_K70A. Dodatkowo, przeprowadzona zostanie analiza oddziaływań pomiędzy komórkowymi RNA i wariantem hDicer\_K70A, w oparciu o metodę irCLIP-seq.

## V. DYSKUSJA

Produkcja rekombinowanych białek w bakteryjnym systemie ekspresyjnym jest najbardziej powszechną i wydajną metodą otrzymywania białek. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się szczepy ekspresyjne bakterii *E. coli*, np. BL21 (DE3). Wykorzystanie systemu bakteryjnego do produkcji białek rekombinowanych jest stosunkowo łatwe, tanie i umożliwia otrzymanie dużych ilości preparatu, który później można równie łatwo oczyścić, np. z wykorzystaniem metod chromatografii jonowymiennej czy powinowactwa. Niestety, system ten niesie ze sobą pewne ograniczenia, które wynikają głównie z braku możliwości wprowadzania modyfikacji potranslacyjnych w komórkach bakteryjnych, w przeciwieństwie do eukariotycznych systemów ekspresyjnych, a także ograniczonych możliwości produkcji białek rekombinowanych o masie większej niż ok. 100 kDa [169].

W badaniach prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej autorstwa I.R. Obi, dotyczącej helikazy hDicer [A], domena helikazowa została wyprodukowana zarówno w bakulowirusowym systemie ekspresyjnym, jak i w bakteryjnym systemie ekspresji genów. Po oczyszczeniu, preparat uzyskany w bakteryjnym systemie ekspresyjnym charakteryzował się jednak większym stopniem homogenności niż preparat uzyskiwany w bakulowirusowym systemie ekspresji genów, dlatego też został on wybrany do dalszych analiz funkcjonalnych. Prowadzone przez I.R. Obi badania wykazały, że preparat helikazy hDicer otrzymany w bakteriach posiada aktywność hydrolizy ATP, co sugerowało, że jeśli modyfikacje potranslacyjne zachodzą w obrębie domeny helikazowej hDicer, nie są one niezbędne dla jej aktywności ATPazowej [A]. Podobnie, badania prowadzone przez zespół prof. Jennifer Doudny, w których wykorzystano hDicer zrekonstruowaną z poszczególnych domen produkowanych w bakteriach *E. coli*, w tym domeny helikazowej, ujawniły, iż tak odtworzona hDicer prezentuje aktywność RNazową [74]. Ponadto, inne domeny hDicer były również z powodzeniem produkowane w komórkach *E. coli*, przykładowo domena DUF283 [94] oraz domena PAZ [104], podobnie jak inne białka zawierające domenę helikazy z motywem DExD/H-box [170]. Badania zaprezentowane w niniejszej

pracy doktorskiej zostały przeprowadzone z wykorzystaniem preparatu domeny helikazowej hDicer wyprodukowanej w szczepie ekspresyjnym *E. coli* One Shot™ BL21 Star™. Otrzymana domena ma masę ok. 72 kDa i obejmuje pozycje aminokwasowe (aa) od 1 do 624 aa hDicer; długość badanego fragmentu została wybrana w oparciu o analizę sekwencji aminokwasowej hDicer i stanowi brakujący fragment domeny helikazowej w wariacie delecyjnym hDicer\_ΔHEL (**Rysunek 12**). Aminokwas 625 jest pierwszym aminokwasem wchodzącym w skład kolejnej domeny hDicer, tj. domeny DUF283. Helikaza hDicer otrzymana przez I.R. Obi obejmowała obszar od 1 do 566 aa hDicer (helikaza bez pełnej subdomeny HEL2) [A], natomiast przez grupę J. Doudny, pozycje aminokwasowe od 1 do 604 aa hDicer [74]. Preparat otrzymany przez I.R. Obi został oczyszczony dwuetapowo, za pomocą chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem immobilizowanych na złożu agarozowym jonów  $\text{Ni}^{2+}$  (HisTrap) oraz amylozy [A]. Preparat otrzymany przez zespół J. Doudny, został oczyszczony metodą immunoprecypotacji z wykorzystaniem C-końcowego znacznika hemaglutyniny (HA) i złoża agarozowego opłaszczonego przeciwciałem anti-HA [74]. Preparat HEL hDicer wykorzystany podczas opisywanych w niniejszej rozprawie doktorskiej badań został oczyszczony metodą chromatografii powinowactwa z użyciem złoża z immobilizowanymi jonami  $\text{Ni}^{2+}$  (HisTrap). Po tym etapie oczyszczania, preparat HEL hDicer wykazywał stopień homogenności 95%< (**Rysunek 11 B**), zatem nie było konieczności dalszego oczyszczania białka.

Domena helikazowa hDicer należy do helikaz z nadrodziny SF2, między innymi dzięki obecności motywu DExD/H-box [28]. Motyw ten odpowiada za rozplatanie dwuniciowych struktur RNA i DNA, w sposób zależny od hydrolizy ATP. Pomimo obecności pełnego motywu DExD/H-box w subdomenie HEL1 hDicer, aktywności helikazowej nie zaobserwowano jednak w przypadku tej i żadnej innej Dicer. Niemniej jednak, podobnie jak w przypadku domeny helikazowej wyprodukowanej przez I.R. Obi, preparat wykorzystywany w badaniach opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej posiada zdolność wiązania i hydrolizy ATP (**Rysunek 13**). Co więcej, po raz pierwszy udało się pokazać, że cała hDicer również potrafi przeprowadzać hydrolizę ATP (**Rysunek 13 D**). Wariant hDicer\_ΔHEL,



pozbawiony domeny helikazowej, nie wykazywał aktywności ATPazowej (**Rysunek 13 C**), co wspiera przypuszczenia, że domeną odpowiedzialną za wiązanie i hydrolizę ATP w hDicer jest domena helikazowa. Zachowanie aktywności ATPazowej przez domenę helikazową hDicer może wskazywać na istnienie niepoznanej dotychczas aktywności tej domeny, która mogłaby być zależna od hydrolizy ATP. Dla porównania, motyw DExD/H-box znajdujący się w domenie helikazowej Dicer-1 *D. melanogaster* uległ degeneracji, w wyniku czego doszło do utraty aktywności ATPazowej przez Dicer-1 [171]. Owadzia Dicer-1 zaangażowana jest w produkcję miRNA, jednakże obecnie wiadomo, że aktywność ATPazowa Dicer nie jest wymagana w procesie biogenezy miRNA [172]. Opublikowane w 2022 w *Nature* dane dotyczące struktury białka Dicer-2 *D. melanogaster* w kompleksie z dsRNA umożliwiły zaproponowanie mechanizmu wiązania, cięcia i uwalniania substratu dsRNA przez Dicer-2 [173]. Badania strukturalne ujawniły rearanżacje strukturalne, które zachodzą w obrębie domeny helikazowej podczas wiązania, cięcia i uwalniania dsRNA. W zdeponowanych strukturach widoczna jest także cząsteczka ATP oraz jon  $Mg^{2+}$ , których związanie w obrębie motywu DExD/H-box konieczne jest do translokacji Dicer-2 wzdłuż substratu [173]. Niestety, jak dotąd nie udało się zobrazować wiązania, cięcia i uwalniania substratu dla hDicer, jednakże w ostatnim czasie zespołowi prof. P. Svobody udało się pokazać mechanizm działania mysiej Dicer [172], który przypuszczalnie jest bardzo zbliżony do mechanizmu działania hDicer. Sugeruje się, że ssacze Dicer mogą przyjmować dwa stany strukturalne: (i) „zamknięty” (ang. *locked*) i (ii) „otwarty” (ang. *open*), w zależności od etapu cięcia pre-miRNA [172]. W stanie „zamkniętym” domena helikazowa stanowi miejsce wiązania pętli apikalnej pre-miRNA, w ten sposób możliwe jest rozpoznanie substratu. Na skutek związania pre-miRNA, dochodzi do zmiany struktury Dicer z „zamkniętej” na „otwartą”, która umożliwia umieszczenie substratu w rejonie katalitycznym i cięcie substratu przed domeny RNazy IIIa i IIIb. W zmianie stanu z „zamkniętego” na „otwarty” pomaga także białko TARBP2, które wymusza przyjęcie stanu „otwartego” przez Dicer [172]. Niemniej jednak, elastyczność domeny helikazowej mysiej Dicer jest kluczowa dla zmiany stanów z „zamkniętego” na „otwarty” [172].

Badania strukturalne ujawniły, że cząsteczki pre-miRNA są wiązane w obrębie domeny Platformy i PAZ hDicer, koniec 3' substratu kotwiczony jest w kieszeni wiążącej 3', zaś koniec 5', w kieszeni wiążącej 5' [80]. Dodatkowo, pętla apikalna pre-miRNA oddziałuje z domeną helikazową hDicer [56]. Dane opublikowane przez prof. Rajewsky'ego i jego zespół wskazują, że w warunkach *in vivo*, hDicer może także oddziaływać z innymi cząsteczkami RNA, przykładowo z mRNA czy z lncRNA [159]. Wiązanie innych niż pre-miRNA cząsteczek RNA prawdopodobnie zachodzi w sposób pasywny, czyli niepowiązany z procesem hydrolizy RNA (niezależny od aktywności RNazowej Dicer) [159]. Autorzy postawili hipotezę, że w przypadku pasywnego wiązania RNA przez Dicer, rozpoznanie substratu odbywa się poprzez domenę helikazową. W celu lepszego poznania specyficzności substratowej domeny helikazowej hDicer, w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono reakcje wiązania, w których wykorzystano szereg jedno- i dwuniciowych cząsteczek RNA i DNA oraz otrzymany w systemie bakteryjnym preparat HEL hDicer (**Rysunek 11**). Zgromadzone wyniki wykazały, że HEL hDicer wiąże jednoniciowe cząsteczki RNA i DNA o długości powyżej 20 nt. Wydajność wiązania była wyższa w przypadku dłuższych substratów (40-50 nt) (**Rysunek 14**). Niemniej jednak, cząsteczki RNA, które z racji swojej długości zaczynały przyjmować bardziej złożone struktury zawierające regiony dwuniciowe, np. cząsteczki pre-miRNA, nie były wydajnie wiązane przez HEL hDicer (**Rysunek 15**). W przypadku DNA, dochodziło do tworzenia jednego stabilnego kompleksu DNA•HEL (**Rysunek 14 B**), podczas gdy przy wiązaniu RNA obserwowano powstawanie kilku kompleksów RNA•białko (**Rysunek 14 A**). Co więcej, zaobserwowano także zmiany w szybkości migracji niezwiązanego z białkiem RNA (**Rysunek 14 A**), co sugerowało, że domena helikazowa hDicer może indukować zmiany strukturalne w obrębie substratu RNA (**Rysunek 14 A**). Przypuszczenia te potwierdzono przeprowadzając dodatkowe badania oddziaływań RNA z HEL hDicer. Analiza produktów reakcji wiązania RNA przez HEL hDicer metodą elektroforezy w denaturujących żelach poliakrylamidowych potwierdziła, że RNA nie ulega degradacji w obecności HEL hDicer (**Rysunek 20 A**), natomiast analiza produktów tej samej reakcji z wykorzystaniem elektroforezy w warunkach natywnych oraz w obecności czynnika denaturującego białko (1% SDS),

ujawniła powstawanie dodatkowych form RNA po dodaniu HEL hDicer (**Rysunek 20 B**). Obserwowane zmiany były niezależne od ATP. Zachodzenie zmian strukturalnych w obrębie RNA pod wpływem HEL hDicer potwierdzono także z wykorzystaniem metod spektroskopii CD (**Rysunek 21**).

Biorąc pod uwagę wyniki badań strukturalnych [172, 174], a także wyniki analiz kompleksów pre-miRNA•HEL (**Rysunek 15**), można przypuszczać, że po związaniu substratu pre-miRNA przez hDicer, domena helikazowa indukuje szereg zmian strukturalnych w obrębie pętli apikalnej pre-miRNA. Pętle apikalne pre-miRNA występują w postaci jednoniciowego RNA. Zmiany strukturalne w pętli apikalnej pre-miRNA mogłyby służyć jak najlepszemu dopasowaniu substratu do centrum katalitycznego enzymu w obrębie domen: RNazy IIIa i RNazy IIIb. Lepsze dopasowanie substratu do miejsca aktywnego Dicer przypuszczalnie przekłada się na bardziej precyzyjne cięcie pre-miRNA. Dodatkowym argumentem potwierdzającym te przypuszczenia jest zaobserwowanie powstawania pul niehomogennych miRNA w komórkach produkujących Dicer pozbawioną fragmentu domeny helikazowej [172]. W obecności HEL hDicer nie zaobserwowano natomiast zmian w szybkości migracji niezwiązanego z białkiem DNA, co sugeruje, że domena helikazowa hDicer nie indukuje, bądź tylko w niewielkim stopniu indukuje zmiany strukturalne w obrębie DNA.

Z uwagi na powstawanie szeregu kompleksów RNA•HEL hDicer, a także pojawianie się różnych konformerów RNA w obecności HEL hDicer, wyznaczenie równowagowych stałych dysocjacji ( $K_d$ ) dla kompleksów RNA•HEL hDicer było problematyczne. Wyznaczono natomiast równowagowe stałe dysocjacji ( $K_d$ ) dla kompleksów DNA (>40 nt) i HEL hDicer; wyniosły one odpowiednio, dla pomiarów uzyskanych z wykorzystaniem metody EMSA:  $K_d$  (D40•HEL)  $\approx$  8,5  $\mu$ M i  $K_d$  (D50•HEL)  $\approx$  7,4  $\mu$ M oraz dla pomiarów uzyskanych z wykorzystaniem metody BLI:  $K_d$  (D40•HEL)  $\approx$  22  $\mu$ M i  $K_d$  (D50•HEL)  $\approx$  21  $\mu$ M. Różnice w wartościach stałych dysocjacji mogą wynikać z zastosowania dwóch różnych podejść do wyznaczenia wartości  $K_d$ . W przeciwieństwie do metody EMSA, metoda BLI jest bardziej czuła i umożliwia monitorowanie powstawania i dysocjacji kompleksów w czasie rzeczywistym. Niemniej jednak, metoda BLI ma także ograniczenia wynikające

z wielkości cząsteczek, które mogą być immobilizowane na sensorze (im mniejsza cząsteczka tym lepiej, ponieważ łatwiej jest monitorować zmiany grubości warstwy na sensorze po związaniu ligandu). W metodzie EMSA, użyto rosnącego stężenia HEL hDicer, podczas gdy w metodzie BLI, HEL hDicer była immobilizowana na sensorze, a wzrastało stężenie substratu, co mogło być przyczyną zaobserwowanych różnic w wartościach  $K_d$ . Metodą BLI udało się natomiast wyznaczyć równowagową stałą dysocjacji dla kompleksu R50•HEL, wyniosła ona ok. 23  $\mu\text{M}$ .

Wyznaczone wartości stałych dysocjacji dla kompleksów RNA•HEL oraz DNA•HEL są zbliżone do wartości stałych dysocjacji wyznaczonych dla kompleksów domeny DUF283 hDicer z kwasami nukleinowymi [94]. W przypadku kompleksu 22 nt RNA•DUF283,  $K_d \approx 9,5 \mu\text{M}$  [94]. Podobne wartości równowagowej stałej dysocjacji otrzymano dla kompleksów: 20 pz dsRNA•dsRBD,  $K_d \approx 6,5 \mu\text{M}$  [127] oraz  $>8,0 \mu\text{M}$  [123]. Dla porównania, wartości  $K_d$  dla wiązania 21 nt RNA przez kasetę PPC hDicer wynosiły ok. 0,05  $\mu\text{M}$  [175].

Wyniki reakcji wiązania z użyciem dwuniciowych RNA lub DNA, zarówno w pełni sparowanych, jak i posiadających 2 wolne nukleotydy na końcu 3', wykazały, że HEL hDicer nie wiąże dwuniciowych kwasów nukleinowych (**Rysunek 16**). Biorąc pod uwagę wyniki badań strukturalnych opublikowanych dla kompleksów dsRNA•Dicer-2 *D. melanogaster* [173], pre-miRNA•DCL1 *A. thaliana* [81] oraz pre-miRNA•Dicer *Mus musculus* [172], jedną z przyczyn niewiązania dwuniciowych RNA lub DNA przez domenę helikazową hDicer mogą być ograniczenia strukturalne wynikające z przestrzennej aranżacji domen hDicer. Opublikowane na łamach *Nature plants* przez zespół prof. Fenga struktury białka DCL1 z *A. thaliana*, w odniesieniu do struktur Dicer-2 z *D. melanogaster* oraz hDicer, pokazały, że do wiązania dsRNA wymagana jest obecność szerokiej szczeliny wiążącej w obrębie domeny helikazowej, co zostało zaobserwowane dla kompleksu dsRNA•Dicer-2 [81]. W przypadku hDicer, tak szeroka szczelina wiążąca substrat nie jest obserwowana w strukturze białka, co może sugerować, że w obrębie domeny helikazowej hDicer brakuje miejsca do wiązania substratu dwuniciowego. Podsumowując, biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, można

zauważyć, że pod względem specyficzności substratowej, domena helikazowa hDicer wykazuje podobieństwo do domeny DUF283, ponieważ DUF283 wiąże jednoniciowe cząsteczki RNA i DNA, natomiast nie wiąże cząsteczek dwuniciowych [94].

Dane uzyskane w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej potwierdziły brak aktywności rozplatania dwuniciowych RNA oraz DNA dla domeny helikazowej hDicer (**Rysunek 22**). Dodatek ATP do mieszanin reakcyjnych nie wpłynął na wynik reakcji. Podobne wyniki uzyskał I.R. Obi podczas realizacji swojej pracy doktorskiej [A]. Brak aktywności helikazowej dla całej hDicer potwierdziły również wyniki naszych wcześniejszych badań [94]. Jak dotąd nie pojawiły się w literaturze wzmianki o aktywności helikazowej hDicer, ani żadnej innej Dicer. Zważywszy na fakt, że domena helikazowa hDicer nie wiąże dwuniciowych kwasów nukleinowych, brak aktywności rozplatania dwuniciowych RNA, czy też DNA nie jest zaskoczeniem. W przypadku białek Dicer wiążących długie dsRNA, np. owadziej Dicer-2, pomimo braku aktywności rozplatania struktur dwuniciowych, białka te mogą poruszać się (translokować) wzdłuż kwasów nukleinowych; do aktywności tej potrzebna jest hydroliza ATP [28, 173].

Wcześniejsze badania prowadzone w naszym zespole badawczym wykazały, że hDicer, prawdopodobnie dzięki obecności domeny DUF283, wspiera proces parowania sekwencji komplementarnych występujących w kwasach nukleinowych (tzw. *nucleic acid annealing activity*) [94]. Ponadto, niektóre z helikaz typu DExD/H-box zostały opisane w literaturze jako białka zdolne do wspierania parowania sekwencji komplementarnych RNA, np. helikazy: Ddx42p [176], Ded1 i Mss116 [177]. Dane zgromadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazały, że otrzymany preparat HEL hDicer nie posiada zdolności do wydajnego wspierania parowania komplementarnych RNA, czy też DNA (**Rysunek 23**). W przypadku cząsteczek RNA, brak wspomnianej aktywności mógłby wynikać z możliwości indukowania zmian strukturalnych w obrębie RNA przez domenę helikazową hDicer (**Rysunek 14 A, 19 i 20 B**), co w konsekwencji mogłoby utrudniać dostępność sekwencji komplementarnych do oddziaływań międzycząsteczkowych.

Wyniki zgromadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej odbiegają od wyników zaprezentowanych w rozprawie doktorskiej I.R. Obi [A]. Wykorzystywany w badaniach I.R. Obi preparat domeny helikazowej hDicer wspierał hybrydyzację w pełni komplementarnych RNA o długości 21 nt. I.R. Obi zastosował metodę rezonansowego transferu energii fluorescencji (ang. *Resonance Energy Transfer*, FRET), a komplementarne cząsteczki RNA posiadały na końcach 5' fluorofory: Cy3 i Cy5. Fluorofor Cy3 (będący donorem), po znalezieniu się w bliskim sąsiedztwie fluoroforu Cy5 (będącego akceptorem), np. po utworzeniu dupleksu przez cząsteczki RNA, przekazywał energię wzbudzenia, powodując fluorescencję akceptora. W obecności helikazy hDicer, obserwowano wzrost sygnału fluorescencyjnego, w porównaniu do reakcji kontrolnej prowadzonej bez dodatku preparatu helikazy. Zaobserwowana aktywność była niezależna od ATP. W tym miejscu należy wspomnieć, że preparat wyprodukowany przez I.R. Obi różnił się od preparatu HEL hDicer częściowym brakiem subdomeny HEL2. Różnica ta mogłaby, hipotetycznie, wpłynąć na aktywność preparatu helikazowego I.R. Obi. Niemniej jednak, metoda FRET nie daje możliwości obserwacji substratów i produktów reakcji, w odróżnieniu od metody EMSA. Być może w mieszaninach reakcyjnych dochodziło do zmian strukturalnych w obrębie cząsteczek RNA pod wpływem helikazy, w wyniku których następowało wzbudzenie fluorescencji barwników. W celu dokładniejszego zbadania tego zagadnienia, planowane są dalsze badania aktywności wspierającej parowanie komplementarnych sekwencji kwasów nukleinowych z wykorzystaniem otrzymanego preparatu HEL hDicer oraz szeregu komplementarnych RNA i DNA charakteryzujących się różną stabilnością struktur. Warto jednak wspomnieć, że wcześniejsze badania prowadzone w naszym zespole badawczym wykazały, iż wariant delecyjny hDicer pozbawiony domeny DUF283, posiadający wszystkie pozostałe domeny, nie wspiera procesu parowania sekwencji komplementarnych występujących w kwasach nukleinowych [96]. Dane te pozwalają przypuszczać, iż w przypadku braku DUF283, pozostałe z domen hDicer, w tym również domena helikazowa, nie są w stanie zrekompensować aktywności DUF283 wspierającej parowanie komplementarnych cząsteczek kwasów nukleinowych.

Biorąc pod uwagę wyniki badań grupy prof. Rajewsky'ego, prezentujące udział rybonukleazy Dicer w pasywnym wiązaniu komórkowych RNA i potencjalnie kluczową rolę domeny helikazowej Dicer w tym procesie [159], kolejnym celem badawczym zaprezentowanym w niniejszej rozprawie doktorskiej było określenie pul komórkowych RNA, których wiązanie może być uzależnione od obecności domeny helikazowej hDicer. Chcąc porównać pule komórkowych RNA wiązanych przez hDicer oraz wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej (hDicer\_ΔHEL), wykorzystano metodę irCLIP-seq, która umożliwia „wyławianie” specyficznych kompleksów RNA•białko, powstających w żywych komórkach i identyfikację związanych z białkiem RNA. W badaniach wykorzystano linie komórkowe: (i) HEK 293T NoDice (4-25) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą hDicer\_ΔHEL; (ii) HEK 293T NoDice (4-25) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą WT hDicer (tzw. „rescue control”); (iii) HEK 293T z endogenną WT hDicer. Wariant hDicer z delecją domeny helikazowej został już wcześniej otrzymany i scharakteryzowany przez grupę prof. J. Doudny [72]. Zauważono, że usunięcie domeny helikazowej hDicer powoduje zwiększenie aktywności RNazowej takiego wariantu delecyjnego hDicer, w porównaniu do kompletnej hDicer [72]. Wyniki testów aktywności RNazowej dla hDicer\_ΔHEL i kanonicznych substratów Dicer, zaprezentowane w niniejszej rozprawie, potwierdziły wcześniejsze obserwacje zespołu J. Doudny, dotyczące wariantu hDicer z delecją domeny helikazowej (**Rysunek 24**). Uzyskane metodą irCLIP-seq dane pozwoliły na poznanie pul cząsteczek RNA wiązanych w komórce przez ludzką rybonukleazę Dicer oraz porównanie ich do pul cząsteczek RNA wiązanych w komórce przez wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej. Wstępne analizy porównawcze wykazały, iż wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej oddziałuje z inną pulą cząsteczek RNA, czy też z innymi fragmentami tożsamych RNA, niż hDicer typu dzikiego. Wyniki tych wstępnych analiz sugerują, że domena helikazowa hDicer bierze udział nie tylko w rozróżnianiu substratów pre-miRNA od dsRNA, lecz może także mieć ważne znaczenie przy wyborze i wiązaniu innego typu cząsteczek RNA występujących w komórkach. Poznanie komórkowej sieci oddziaływań pomiędzy Dicer i RNA jest bez wątpienia niezbędne dla lepszego zrozumienia procesów komórkowych, w które jest zaangażowana rybonukleaza Dicer.

Zainteresowanie domeną helikazową rybonukleaz typu Dicer znacznie wzrosło w ostatnim czasie. W 2022 roku ukazało się wiele artykułów naukowych prezentujących wyniki badań strukturalnych obrazujących kompleksy białek Dicer z substratami RNA. Dane te dotyczą zarówno owadzie Dicer (Dicer-2 z *D. melanogaster*) [173], roślinnych białek DCL (DCL1 z *A. thaliana*) [81], jak i ssaczej Dicer (Dicer z *M. musculus*) [172]. Zaprezentowane wyniki wskazują, że odpowiednie ułożenie domeny helikazowej w strukturze Dicer podczas procesu biogenezy siRNA, czy też miRNA jest kluczowe dla specyficznego oddziaływania Dicer z substratem i dalszego procesu cięcia substratu. Być może w przypadku pasywnego wiązania substratów przez Dicer, elastyczna struktura domeny helikazowej umożliwia taką rearanżację substratu, że nie zostaje on umieszczony w centrum katalitycznym białka. W konsekwencji, nie dochodzi do cięcia substratu, a substrat pozostaje związany z Dicer w sposób pasywny, przykładowo prowadząc do sekwestracji białka, co zostało zaproponowane przez zespół prof. Rejewsky'ego [159].

Jak wspomniano wcześniej, domena helikazowa owadziej Dicer-2, czy też roślinnych białek DCL, może działać jako czujnik wirusowego RNA, aktywujący odpowiedni efektorowy szlak RNAi prowadzący do cięcia wirusowego RNA [67]. Przypuszcza się, że rybonukleazy Dicer kręgowców utraciły zdolność rozpoznawania wirusowego RNA z powodu rozwoju innych sensorów infekcji wirusowej, przykładowo helikazy RIG-I [70]. W 2021 roku pojawiło się doniesienie dotyczące oddziaływania hDicer z białkami wiążącymi dsRNA i helikazami RNA podczas infekcji wirusowej [178]. W ludzkich komórkach raka okrężnicy HCT 116 zakażonych wirusem SINV (*Sindbis virus*) znaleziono białka takie jak: DHX9, ADAR-1 oraz kinazę białkową aktywowaną RNA (PKR), które wchodziły w interakcję z hDicer poprzez oddziaływanie z jej domeną helikazową [178]. Sugeruje się, że domena helikazowa hDicer może mieć istotne znaczenie podczas infekcji wirusowych poprzez wiązanie specyficznych partnerów białkowych biorących udział w odpowiedzi przeciwwirusowej. Niemniej jednak, rola domeny helikazowej hDicer w odpowiedzi na infekcje wirusowej nie została jeszcze dobrze poznana [76, 178].



Dane zgromadzone w niniejszej rozprawie doktorskiej dotyczące oddziaływań między domeną helikazową hDicer a różnymi typami kwasów nukleinowych, zarówno RNA jak i DNA, mogą znaleźć zainteresowanie szerokiego grona badaczy zajmujących się problematyką nieprawidłowej regulacji procesów komórkowych prowadzących do rozwoju wielu chorób, w tym także chorób nowotworowych. Zważając na udokumentowane znaczenie domeny helikazowej hDicer w obronie przeciwwirusowej, uzyskane wyniki mogą również przyczynić się do lepszego zrozumienia chorób wywoływanych przez wirusy i roli hDicer w oddziaływaniach wirus-gospodarz.

## VI. PODSUMOWANIE

Badania realizowane w ramach przedłożonej pracy doktorskiej miały na celu poszerzenie stanu wiedzy na temat domeny helikazowej hDicer, w szczególności określenie jakie aktywności biochemiczne prezentuje domena helikazowa hDicer oraz jakiego rodzaju kwasy nukleinowe mogą stanowić substraty dla domeny helikazowej hDicer, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in cellulo*. W badaniach *in vitro* wykorzystano preparat domeny helikazowej hDicer (HEL hDicer) wyprodukowany w bakteriach *E. coli* typu BL21 (DE). Chcąc zgłębić rolę domeny helikazowej w wiązaniu komórkowych RNA przez hDicer, wykorzystano metodę irCLIP-seq (ang. *Infrared Crosslinking Immunoprecipitation followed by NGS sequencing*), która umożliwia „wyławianie” specyficznych kompleksów RNA•białko, powstających w żywych komórkach i identyfikację związanych z białkiem RNA. W badaniach tych użyto: (i) komórki HEK 293T NoDice (4-25) (bez endogennej hDicer) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej, oraz jako kontrole (ii) komórki HEK 293T NoDice (4-25) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą hDicer typu dzikiego (tzw. „rescue control”) i (iii) komórki HEK 293T z endogenną hDicer (linia typu dzikiego).

Podczas prowadzonych badań wykazano, że:

- HEL hDicer prezentuje aktywność wiązania i hydrolizy ATP,
- hDicer typu dzikiego (tzw. „kompletna” hDicer) także wykazuje aktywność hydrolizy ATP,
- wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej nie wykazuje aktywności ATPazowej, co wspiera przypuszczenia, że domeną odpowiedzialną za wiązanie i hydrolizę ATP w hDicer jest domena helikazowa,
- HEL hDicer wiąże jednoniciowe RNA i DNA o długości powyżej 20 nukleotydów, w sposób niezależny od ATP,
- HEL hDicer może indukować zmiany strukturalne w obrębie cząsteczek RNA, również w sposób niezależny od ATP,
- HEL hDicer nie wiąże dwuniciowych RNA i dwuniciowych DNA,

- HEL hDicer nie wykazuje aktywności helikazowej wobec dwuniciowych RNA oraz dwuniciowych DNA, pomimo obecności motywu DExD/H-box, który znany jest z aktywności rozplatania dwuniciowych struktur kwasów nukleinowych,
- HEL hDicer nie prezentuje aktywności wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acid annealing activity*),
- w komórkach człowieka, wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej oddziałuje z inną pulą cząsteczek RNA, czy też innymi fragmentami tożsamych RNA, niż hDicer typu dzikiego.

Zgromadzone dane pozwalają sądzić, że domena helikazowa hDicer bierze udział nie tylko w rozróżnianiu substratów pre-miRNA od dwuniciowych RNA, lecz może mieć także ważne znaczenie przy wyborze i wiązaniu innego typu cząsteczek RNA występujących w komórkach. Obecność domeny helikazowej może indukować zmiany strukturalne w obrębie RNA, co przypuszczalnie wpływa na dopasowanie substratu do centrum aktywnego (miejsca hydrolizy RNA) w obrębie hDicer. Być może dzięki tej aktywności domena helikazowa hDicer może decydować, bądź współdecydować razem z innymi domenami hDicer, czy białkami partnerującymi hDicer, o losie związanej cząsteczki RNA: czy ulegnie ona przecięciu przez hDicer, czy też nie. Interesującym aspektem jest zachowanie aktywności ATPazowej przez domenę helikazową hDicer i kompletną hDicer, co może wskazywać na istnienie niepoznanej dotychczas aktywności hDicer, która mogłaby być zależna od hydrolizy ATP.

## VII. STRESZCZENIE

Rybonukleazy Dicer kojarzone są głównie z ich ważnej roli w biogenezie mikroRNA (miRNA) oraz małych interferujących RNA (siRNA). Substratami Dicer w tym procesie są odpowiednio: prekursor miRNA (pre-miRNA) oraz długie dwuniciowe RNA (dsRNA). Jednakże białka te mogą uczestniczyć także w wielu innych procesach, przykładowo, w remodelowaniu struktury chromatyny, degradacji chromosomalnego DNA podczas apoptozy, czy procesie naprawy uszkodzeń DNA. Zaangażowanie Dicer w tak różne procesy wskazuje, że rybonukleaza ta może oddziaływać z różnymi rodzajami kwasów nukleinowych, zarówno RNA, jak i DNA. Większość enzymów Dicer to wielodomenowe białka zbudowane, począwszy od końca aminowego, z domeny helikazowej, domeny DUF283 (ang. *domain of unknown function*), domeny PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), dwóch domen RNazy III (RNaza IIIa i RNaza IIIb) oraz domeny wiążącej dwuniciowy RNA. Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej skupiają się na domenie helikazowej ludzkiej rybonukleazy Dicer (hDicer).

Obecnie wiadomo, że domena helikazowa hDicer odpowiada za odróżnianie substratów pre-miRNA od dsRNA, przypuszczalnie poprzez oddziaływanie z pętlą apikalną pre-miRNA. Warianty delecyjne hDicer pozbawione domeny helikazowej, w porównaniu do kompletnej hDicer, wydajniej wiążą długie dsRNA i wydajniej tną je na fragmenty o długości ok. 22 par zasad. Bez wątplenia interesującym aspektem jest udział hDicer w „pasywnym” wiązaniu komórkowych RNA, czyli wiązaniu, któremu nie towarzyszy proces cięcia substratu. Przypuszczalnie kluczową rolę w pasywnym wiązaniu komórkowych RNA odgrywa domena helikazowa hDicer. Szczegółowa charakterystyka aktywności biochemicznych, w tym specyficzności substratowej, domeny helikazowej hDicer nie została jednak przeprowadzona. Celem badań prowadzonych w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej było poszerzenie stanu wiedzy na temat domeny helikazowej hDicer, w szczególności określenie jakie aktywności biochemiczne prezentuje domena helikazowa hDicer oraz jakiego rodzaju kwasy nukleinowe mogą stanowić substraty dla domeny helikazowej hDicer, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in cellulo*.

W badaniach *in vitro* wykorzystano preparat domeny helikazowej hDicer (HEL hDicer) wyprodukowany w bakteriiach *E. coli* typu BL21 (DE). Otrzymany preparat prezentował aktywność wiązania i hydrolizy ATP. Na uwagę zasługuje fakt, że po raz pierwszy udało się pokazać, że hDicer również potrafi hydrolizować ATP. Wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej nie wykazywał aktywności ATPazowej, co wspiera przypuszczenia, że domeną odpowiedzialną za wiązanie i hydrolizę ATP w hDicer jest domena helikazowa. Następnie, wykorzystując metodę spowolnionej migracji w żelach poliakrylamidowych (EMSA) oraz interferometrię biowarstwową (BLI), pokazano, że HEL hDicer wiąże jednoniciowe RNA i DNA o długości powyżej 20 nukleotydów, nie wiąże natomiast dsRNA i dsDNA. Wiązanie

kwasów nukleinowych przez HEL hDicer odbywało się w sposób niezależny od ATP. Co ciekawe, zauważono, iż HEL hDicer może indukować zmiany strukturalne w obrębie cząsteczek RNA, również w sposób niezależny od ATP. W dalszej kolejności pokazano, że HEL hDicer nie wykazuje aktywności helikazowej wobec dsRNA oraz dsDNA, pomimo obecności motywu DExD/H-box, który znany jest z aktywności rozplatania dwuniciowych struktur kwasów nukleinowych. HEL hDicer nie prezentował także aktywności wspierania parowania sekwencji komplementarnych kwasów nukleinowych (ang. *nucleic acid annealing activity*).

Chcąc zgłębić rolę domeny helikazowej w wiązaniu komórkowych RNA przez hDicer, wykorzystano metodę irCLIP-seq (ang. *Infrared Crosslinking Immunoprecipitation followed by NGS sequencing*), która umożliwia „wyławianie” specyficznych kompleksów RNA•białko powstających w żywych komórkach i identyfikację związanych z białkiem RNA. W badaniach użyto: (i) komórki HEK 293T 4-25 NoDice (bez endogennej hDicer) transfekowane wektorem z sekwencją kodującą wariant hDicer pozbawiony domeny helikazowej (hDicer\_ΔHEL) oraz jako kontrole (ii) komórki 4-25 NoDice transfekowane wektorem z sekwencją kodującą WT hDicer (tzw. „rescue control”) i (iii) komórki HEK 293T z endogenną WT hDicer (linia typu dzikiego). Wstępne analizy porównawcze wykazały, iż hDicer\_ΔHEL oddziałuje z inną pulą cząsteczek RNA, czy też innymi fragmentami tożsamych RNA, niż WT hDicer. Wyniki wstępnych analiz sugerują, że domena helikazowa hDicer bierze udział nie tylko w rozróżnianiu substratów pre-miRNA od dsRNA, lecz może mieć także ważne znaczenie przy wyborze i wiązaniu innego typu cząsteczek RNA występujących w komórkach.

Poznanie komórkowej sieci oddziaływań pomiędzy RNA i hDicer pozwoli na poszerzenie wiedzy na temat funkcji hDicer wykraczających poza ścieżki biogenezy miRNA i siRNA. Uzyskane wyniki mogą znaleźć zainteresowanie szerokiego grona badaczy zajmujących się problematyką nieprawidłowej regulacji procesów komórkowych prowadzących do rozwoju wielu chorób, w tym także chorób nowotworowych. Zważając na udokumentowane znaczenie domeny helikazowej hDicer w obronie przeciwwirusowej, uzyskane wyniki mogą również przyczynić się do lepszego zrozumienia chorób wywoływanych przez wirusy i roli hDicer w oddziaływaniach wirus-gospodarz.

## VIII. ABSTRACT

Dicer ribonucleases are mostly known from their important role in microRNA (miRNA) and small interfering RNA (siRNA) biogenesis. Their substrates in this process are: precursors of miRNAs (pre-miRNAs) and long double stranded RNAs (dsRNAs), respectively. However, Dicers have also been reported to be involved in other processes, like chromatin structure remodeling, apoptotic DNA degradation or DNA damage repair. Contribution of Dicer to these processes implies that this ribonuclease can interact with many different RNA- and DNA-type substrates. Most Dicer enzymes are multi-domain proteins, comprising an amino-terminal helicase domain, a domain of unknown function (DUF283), Piwi–Argonaute–Zwille (PAZ) domain, two RNase III domains (RNase IIIa and RNase IIIb), and a dsRNA-binding domain. The research presented in this doctoral dissertation focuses on the helicase domain of human Dicer (hDicer).

Currently it is known that the helicase domain of hDicer contributes to recognizing the precursors of miRNAs from siRNAs, presumably through the interactions with the apical loop of pre-miRNAs. In comparison to the full-length hDicer, hDicer variants lacking the helicase domain bind and cleave long dsRNA substrates more efficiently. The hDicer helicase domain is also suggested to participate in Dicer “passive” binding, i.e. binding without further cleavage of different cellular RNAs. Presumably, the helicase domain of hDicer plays a key role in this passive binding of cellular RNAs. Nevertheless, a comprehensive characterization of the biochemical activities of the hDicer helicase domain and its substrate specificity towards different nucleic acids have never been reported. Consequently, the aim of the research conducted as part of this doctoral dissertation was to expand the state of knowledge about the hDicer helicase domain, in particular to determine what biochemical activities the hDicer helicase domain presents and what kind of nucleic acids can be substrates for the hDicer helicase domain, both *in vitro* and *in cellulo*.

In *in vitro* studies, the hDicer helicase domain preparation (HEL hDicer), produced in *E. coli* BL21 (DE) system, was used. The obtained preparation displayed ATP-binding and ATP-hydrolysis activities. Importantly, for the first time it was shown that the full-length hDicer can also hydrolyze ATP. The hDicer variant lacking the helicase domain showed no ATPase activity, supporting the hypothesis that the domain responsible for ATP-binding and hydrolysis in hDicer is the helicase domain. Then, by applying the Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) and Bio-layer Interferometry (BLI), it was shown that HEL hDicer binds single-stranded RNAs and single-stranded DNAs longer than 20 nucleotides, but it does not bind dsRNA and dsDNA. Binding of nucleic acids by HEL hDicer was ATP-independent. Interestingly, it was noticed that HEL hDicer can induce structural changes within RNA molecules; this activity was also an ATP-independent. It was further shown that HEL hDicer

cannot unwind double-stranded nucleic acids, despite the presence of the DExD/H-box motif, which is known from the dsRNA and dsDNA unwinding activity. HEL hDicer also did not support base-pairing of complementary nucleic acids.

To explore the role of the helicase domain in the binding of cellular RNAs by hDicer, the irCLIP-seq strategy (Infrared Crosslinking Immunoprecipitation followed by NGS sequencing) was used. This strategy allows the immunoprecipitation of specific RNA•protein complexes formed in living cells, and then the identification of the protein-bound RNAs. The following were used in the study: (i) HEK 293T 4-25 NoDice cells (hDicer knock-out) transfected with a plasmid encoding for the hDicer variant lacking the helicase domain (hDicer\_ΔHEL), and as controls (ii) 4-25 NoDice cells transfected with a plasmid encoding for the wild-type full-length hDicer, WT hDicer (so-called "rescue control") and (iii) HEK 293T cells with endogenous WT hDicer (wild-type line). Preliminary comparative analysis showed that hDicer\_ΔHEL interacts with a different pool of RNA molecules or with different fragments of identical RNAs, than WT hDicer. The results from these preliminary studies suggest that the helicase domain of hDicer is involved not only in the differentiation of pre-miRNA substrates from dsRNA, but may also be important in the selection and binding of other types of RNA molecules present in cells.

Understanding the cellular network of interactions between RNA and hDicer would allow to expand our knowledge on hDicer's functions beyond miRNA and siRNA biogenesis pathways. The obtained results may be of interest to a wide range of the researchers focused on the problem of misregulation of cellular processes that may cause the development of many diseases, including cancer. Given the documented importance of the hDicer helicase domain in antiviral defense, the obtained results may also contribute to a better understanding of viral diseases and the role of hDicer in virus-host interactions.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Bass, B.L., S.R. Hurst, and J.D. Singer, *Binding properties of newly identified Xenopus proteins containing dsRNA-binding motifs*. *Curr Biol*, 1994. **4**(4): p. 301-14.
2. Provost, P., B. Samuelsson, and O. Radmark, *Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 1881-5.
3. Matsuda, S., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel human gene (HERNA) which encodes a putative RNA-helicase*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1490**(1-2): p. 163-9.
4. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
5. Jacobsen, S.E., M.P. Running, and E.M. Meyerowitz, *Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems*. *Development*, 1999. **126**(23): p. 5231-43.
6. Reinhart, B.J., et al., *MicroRNAs in plants*. *Genes Dev*, 2002. **16**(13): p. 1616-26.
7. Meyers, B.C. and M.J. Axtell, *MicroRNAs in Plants: Key Findings from the Early Years*. *Plant Cell*, 2019. **31**(6): p. 1206-1207.
8. Schauer, S.E., et al., *DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development*. *Trends Plant Sci*, 2002. **7**(11): p. 487-91.
9. Macrae, I.J., et al., *Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer*. *Science*, 2006. **311**(5758): p. 195-8.
10. Zhang, H., et al., *Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III*. *Cell*, 2004. **118**(1): p. 57-68.
11. Elela, S.A., H. Igel, and M. Ares, *RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site*. *Cell*, 1996. **85**(1): p. 115-24.
12. Chanfreau, G., et al., *Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III*. *Genes Dev*, 1997. **11**(20): p. 2741-51.
13. Abou Elela, S. and M. Ares, *Depletion of yeast RNase III blocks correct U2 3' end formation and results in polyadenylated but functional U2 snRNA*. *EMBO J*, 1998. **17**(13): p. 3738-46.
14. Chanfreau, G., et al., *Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1*. *EMBO J*, 1998. **17**(13): p. 3726-37.
15. Bardwell, J.C., et al., *Autoregulation of RNase III operon by mRNA processing*. *EMBO J*, 1989. **8**(11): p. 3401-7.
16. Zer, C. and G. Chanfreau, *Regulation and surveillance of normal and 3'-extended forms of the yeast aci-reductone dioxygenase mRNA by RNase III cleavage and exonucleolytic degradation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(32): p. 28997-9003.
17. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
18. Chong, M.M., et al., *Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery*. *Genes Dev*, 2010. **24**(17): p. 1951-60.



19. Wu, H., et al., *Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36957-65.
20. Liang, X.H. and S.T. Crooke, *Depletion of key protein components of the RISC pathway impairs pre-ribosomal RNA processing*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(11): p. 4875-89.
21. Johanson, T.M., A.M. Lew, and M.M. Chong, *MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Drosha and Dicer*. Open Biol, 2013. **3**(10): p. 130144.
22. Valli, A.A., et al., *Most microRNAs in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii are produced by Dicer-like 3-mediated cleavage of introns and untranslated regions of coding RNAs*. Genome Res, 2016. **26**(4): p. 519-29.
23. Sun, W., A. Pertzev, and A.W. Nicholson, *Catalytic mechanism of Escherichia coli ribonuclease III: kinetic and inhibitor evidence for the involvement of two magnesium ions in RNA phosphodiester hydrolysis*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(3): p. 807-15.
24. Cordin, O., et al., *The DEAD-box protein family of RNA helicases*. Gene, 2006. **367**: p. 17-37.
25. Abdel-Monem, M. and H. Hoffmann-Berling, *Enzymic unwinding of DNA. 1. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1976. **65**(2): p. 431-40.
26. Burgers, P.M.J. and T.A. Kunkel, *Eukaryotic DNA Replication Fork*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 417-438.
27. Mitterer, V. and B. Pertschy, *RNA folding and functions of RNA helicases in ribosome biogenesis*. RNA Biol, 2022. **19**(1): p. 781-810.
28. Byrd, A.K. and K.D. Raney, *Superfamily 2 helicases*. Front Biosci (Landmark Ed), 2012. **17**: p. 2070-88.
29. Fairman, M.E., et al., *Protein displacement by DExH/D "RNA helicases" without duplex unwinding*. Science, 2004. **304**(5671): p. 730-4.
30. Gorbalenya, A.E., et al., *Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(12): p. 4713-30.
31. Walker, J.E., et al., *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. EMBO J, 1982. **1**(8): p. 945-51.
32. Spinks, R.R., et al., *DnaB helicase dynamics in bacterial DNA replication resolved by single-molecule studies*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(12): p. 6804-6816.
33. Singleton, M.R., M.S. Dillingham, and D.B. Wigley, *Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 23-50.
34. Ellis, N.A., *DNA helicases in inherited human disorders*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(3): p. 354-63.
35. Aravind, L., D.R. Walker, and E.V. Koonin, *Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(5): p. 1223-42.
36. Shabalina, S.A. and E.V. Koonin, *Origins and evolution of eukaryotic RNA interference*. Trends Ecol Evol, 2008. **23**(10): p. 578-87.
37. Tanner, N.K. and P. Linder, *DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 251-62.

38. Jankowsky, E. and H. Bowers, *Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(15): p. 4181-8.
39. Cordin, O., et al., *The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity*. *EMBO J*, 2004. **23**(13): p. 2478-87.
40. Caruthers, J.M. and D.B. McKay, *Helicase structure and mechanism*. *Curr Opin Struct Biol*, 2002. **12**(1): p. 123-33.
41. Fry, D.C., S.A. Kuby, and A.S. Mildvan, *ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(4): p. 907-11.
42. Pause, A. and N. Sonenberg, *Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A*. *EMBO J*, 1992. **11**(7): p. 2643-54.
43. Pause, A., N. Méthot, and N. Sonenberg, *The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(11): p. 6789-98.
44. Soultanas, P. and D.B. Wigley, *Unwinding the 'Gordian knot' of helicase action*. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(1): p. 47-54.
45. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-7.
46. Barral, P.M., et al., *Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity*. *Pharmacol Ther*, 2009. **124**(2): p. 219-34.
47. Jabłońska, A. and E. Paradowska, *[Role of the RIG-I-like receptors in antiviral response]*. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2014. **68**: p. 541-56.
48. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
49. Feng, Y., et al., *A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer*. *RNA*, 2012. **18**(11): p. 2083-92.
50. Svobodova, E., J. Kubikova, and P. Svoboda, *Production of small RNAs by mammalian Dicer*. *Pflugers Arch*, 2016. **468**(6): p. 1089-102.
51. Jonas, S. and E. Izaurralde, *Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing*. *Nat Rev Genet*, 2015. **16**(7): p. 421-33.
52. Kurzynska-Kokorniak, A., et al., *The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(9): p. 4365-80.
53. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. *Genome Res*, 2009. **19**(1): p. 92-105.
54. Martello, G., et al., *A MicroRNA targeting dicer for metastasis control*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1195-207.
55. Lau, P.W., et al., *The molecular architecture of human Dicer*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(4): p. 436-40.
56. Liu, Z., et al., *Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate*. *Cell*, 2018. **173**(6): p. 1549-1550.
57. Kidwell, M.A., J.M. Chan, and J.A. Doudna, *Evolutionarily conserved roles of the dicer helicase domain in regulating RNA interference processing*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(41): p. 28352-62.

58. Lestini, R., F. Delpesch, and H. Myllykallio, *DNA replication restart and cellular dynamics of Hef helicase/nuclease protein in Haloferax volcanii*. *Biochimie*, 2015. **118**: p. 254-63.
59. Zou, J., et al., *Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family*. *BMC Evol Biol*, 2009. **9**: p. 85.
60. Kadotani, N., et al., *One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi Magnaporthe oryzae genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(43): p. 44467-74.
61. Lee, Y.S., et al., *Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways*. *Cell*, 2004. **117**(1): p. 69-81.
62. Welker, N.C., et al., *Dicer's helicase domain discriminates dsRNA termini to promote an altered reaction mode*. *Mol Cell*, 2011. **41**(5): p. 589-99.
63. Colmenares, S.U., et al., *Coupling of double-stranded RNA synthesis and siRNA generation in fission yeast RNAi*. *Mol Cell*, 2007. **27**(3): p. 449-61.
64. Tworak, A., et al., *Six Medicago truncatula Dicer-like protein genes are expressed in plant cells and upregulated in nodules*. *Plant Cell Rep*, 2016. **35**(5): p. 1043-52.
65. Liu, C., M.J. Axtell, and N.V. Fedoroff, *The helicase and RNaseIII domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis*. *Plant Physiol*, 2012. **159**(2): p. 748-58.
66. Fukudome, A. and T. Fukuhara, *Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis*. *J Plant Res*, 2017. **130**(1): p. 33-44.
67. van Rij, R.P., et al., *The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*, 2006. **20**(21): p. 2985-95.
68. Ahmad, S. and S. Hur, *Helicases in Antiviral Immunity: Dual Properties as Sensors and Effectors*. *Trends Biochem Sci*, 2015. **40**(10): p. 576-585.
69. Kowalinski, E., et al., *Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA*. *Cell*, 2011. **147**(2): p. 423-35.
70. Hansen, S.R., et al., *Dicer's Helicase Domain: A Meeting Place for Regulatory Proteins*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2019. **84**: p. 185-193.
71. Poirier, E.Z., et al., *An isoform of Dicer protects mammalian stem cells against multiple RNA viruses*. *Science*, 2021. **373**(6551): p. 231-236.
72. Ma, E., et al., *Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain*. *J Mol Biol*, 2008. **380**(1): p. 237-43.
73. Chakravarthy, S., et al., *Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing*. *J Mol Biol*, 2010. **404**(3): p. 392-402.
74. Ma, E., et al., *Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing*. *J Mol Biol*, 2012. **422**(4): p. 466-76.
75. Taylor, D.W., et al., *Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer*. *Nat Struct Mol Biol*, 2013. **20**(6): p. 662-70.
76. Kennedy, E.M., et al., *Production of functional small interfering RNAs by an amino-terminal deletion mutant of human Dicer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(50): p. E6945-54.

77. Welker, N.C., et al., *Dicer's helicase domain is required for accumulation of some, but not all, C. elegans endogenous siRNAs*. RNA, 2010. **16**(5): p. 893-903.
78. Mukherjee, K., H. Campos, and B. Kolaczowski, *Evolution of animal and plant dicers: early parallel duplications and recurrent adaptation of antiviral RNA binding in plants*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(3): p. 627-41.
79. Sinha, N.K., et al., *Dicer uses distinct modules for recognizing dsRNA termini*. Science, 2018. **359**(6373): p. 329-334.
80. Tian, Y., et al., *A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer*. Mol Cell, 2014. **53**(4): p. 606-16.
81. Wei, X., et al., *Structural basis of microRNA processing by Dicer-like 1*. Nat Plants, 2021. **7**(10): p. 1389-1396.
82. Wilson, R.C., et al., *Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis*. Mol Cell, 2015. **57**(3): p. 397-407.
83. Lee, H.Y., et al., *Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(13): p. 6568-76.
84. Fukunaga, R., et al., *Dicer Partner Proteins Tune the Length of Mature miRNAs in Flies and Mammals*. Cell, 2012. **151**(4): p. 912.
85. Lee, H.Y. and J.A. Doudna, *TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro*. RNA, 2012. **18**(11): p. 2012-9.
86. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
87. Liu, Q., et al., *R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway*. Science, 2003. **301**(5641): p. 1921-5.
88. Liu, X., et al., *Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes*. RNA, 2006. **12**(8): p. 1514-20.
89. Liu, X., et al., *Dicer-1, but not Loquacious, is critical for assembly of miRNA-induced silencing complexes*. RNA, 2007. **13**(12): p. 2324-9.
90. Qin, H., et al., *Structure of the Arabidopsis thaliana DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction*. RNA, 2010. **16**(3): p. 474-81.
91. Gleghorn, M.L. and L.E. Maquat, *'Black sheep' that don't leave the double-stranded RNA-binding domain fold*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(7): p. 328-40.
92. Lee, Y., et al., *The role of PACT in the RNA silencing pathway*. EMBO J, 2006. **25**(3): p. 522-32.
93. Dlakic, M., *DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold*. Bioinformatics, 2006. **22**(22): p. 2711-4.
94. Kurzynska-Kokorniak, A., et al., *Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23989.
95. Pokornowska, M., et al., *The RNA-RNA base pairing potential of human Dicer and Ago2 proteins*. Cell Mol Life Sci, 2019.
96. Szczepanska, A., M. Wojnicka, and A. Kurzynska-Kokorniak, *The Significance of the DUF283 Domain for the Activity of Human Ribonuclease Dicer*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(16).
97. Ota, H., et al., *ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing*. Cell, 2013. **153**(3): p. 575-89.

98. Park, J.E., et al., *Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing*. *Nature*, 2011. **475**(7355): p. 201-5.
99. Tahbaz, N., et al., *Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(2): p. 189-94.
100. Kolb, F.A., et al., *Human dicer: purification, properties, and interaction with PAZ PIWI domain proteins*. *Methods Enzymol*, 2005. **392**: p. 316-36.
101. Flynn, R.L. and L. Zou, *Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010. **45**(4): p. 266-75.
102. Lingel, A., et al., *Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain*. *Nature*, 2003. **426**(6965): p. 465-9.
103. Song, J.J., et al., *The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(12): p. 1026-32.
104. Ma, J.B., K. Ye, and D.J. Patel, *Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain*. *Nature*, 2004. **429**(6989): p. 318-22.
105. Nicholson, A.W., *Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2014. **5**(1): p. 31-48.
106. Conrad, C. and R. Rauhut, *Ribonuclease III: new sense from nuisance*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(2): p. 116-29.
107. Blaszczyk, J., et al., *Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA*. *Structure*, 2004. **12**(3): p. 457-66.
108. Gan, J., et al., *Structural insight into the mechanism of double-stranded RNA processing by ribonuclease III*. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 355-66.
109. Takeshita, D., et al., *Homodimeric structure and double-stranded RNA cleavage activity of the C-terminal RNase III domain of human dicer*. *J Mol Biol*, 2007. **374**(1): p. 106-20.
110. Tyczewska, A., et al., *Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human dicer activity in vitro*. *Nucleic Acid Ther*, 2011. **21**(5): p. 333-46.
111. Kurzynska-Kokorniak, A., et al., *A New Short Oligonucleotide-Based Strategy for the Precursor-Specific Regulation of microRNA Processing by Dicer*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77703.
112. MacRae, I.J., K. Zhou, and J.A. Doudna, *Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(10): p. 934-40.
113. Mickiewicz, A., et al., *Modeling of the catalytic core of Arabidopsis thaliana Dicer-like 4 protein and its complex with double-stranded RNA*. *Comput Biol Chem*, 2017. **66**: p. 44-56.
114. MacRae, I.J. and J.A. Doudna, *Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(1): p. 138-45.
115. Shi, H., C. Tschudi, and E. Ullu, *An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in Trypanosoma brucei*. *RNA*, 2006. **12**(12): p. 2063-72.
116. Drinnenberg, I.A., et al., *RNAi in budding yeast*. *Science*, 2009. **326**(5952): p. 544-550.
117. Weinberg, D.E., et al., *The inside-out mechanism of Dicers from budding yeasts*. *Cell*, 2011. **146**(2): p. 262-76.

118. Sasaki, T. and N. Shimizu, *Evolutionary conservation of a unique amino acid sequence in human DICER protein essential for binding to Argonaute family proteins*. *Gene*, 2007. **396**(2): p. 312-20.
119. Wang, H.W., et al., *Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(11): p. 1148-53.
120. Banerjee, S. and P. Barraud, *Functions of double-stranded RNA-binding domains in nucleocytoplasmic transport*. *RNA Biol*, 2014. **11**(10): p. 1226-32.
121. Kerner, P., et al., *Evolution of RNA-binding proteins in animals: insights from genome-wide analysis in the sponge *Amphimedon queenslandica**. *Mol Biol Evol*, 2011. **28**(8): p. 2289-303.
122. Masliah, G., P. Barraud, and F.H. Allain, *RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence*. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **70**(11): p. 1875-95.
123. Doyle, M., et al., *The double-stranded RNA binding domain of human Dicer functions as a nuclear localization signal*. *RNA*, 2013. **19**(9): p. 1238-52.
124. Cai, Y., et al., *A brief review on the mechanisms of miRNA regulation*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2009. **7**(4): p. 147-54.
125. Ramos, A., et al., *RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain*. *EMBO J*, 2000. **19**(5): p. 997-1009.
126. Wu, H., et al., *Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(22): p. 8307-12.
127. Wostenberg, C., et al., *The role of human Dicer-dsRBD in processing small regulatory RNAs*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51829.
128. Jin, L., et al., *The molecular mechanism of dsRNA processing by a bacterial Dicer*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(9): p. 4707-4720.
129. Sinkkonen, L., et al., *Dicer is associated with ribosomal DNA chromatin in mammalian cells*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12175.
130. Yadav, R.P., et al., *DICER regulates the expression of major satellite repeat transcripts and meiotic chromosome segregation during spermatogenesis*. *Nucleic Acids Res*, 2020. **48**(13): p. 7135-7153.
131. Pong, S.K. and M. Gullerova, *Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes - Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins*. *FEBS Lett*, 2018. **592**(17): p. 2973-2986.
132. de Jong, D., et al., *Multiple dicer genes in the early-diverging metazoa*. *Mol Biol Evol*, 2009. **26**(6): p. 1333-40.
133. Drinnenberg, I.A., G.R. Fink, and D.P. Bartel, *Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi*. *Science*, 2011. **333**(6049): p. 1592.
134. Nicolas, F.E., S. Torres-Martinez, and R.M. Ruiz-Vazquez, *Loss and retention of RNA interference in fungi and parasites*. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(1): p. e1003089.
135. Liu, Q., Y. Feng, and Z. Zhu, *Dicer-like (DCL) proteins in plants*. *Funct Integr Genomics*, 2009. **9**(3): p. 277-86.
136. Xie, Z., et al., *Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants*. *PLoS Biol*, 2004. **2**(5): p. E104.
137. Bouché, N., et al., *An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs*. *EMBO J*, 2006. **25**(14): p. 3347-56.

138. Mlotshwa, S., et al., *DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1755.
139. Chan, S.W., et al., *RNA silencing genes control de novo DNA methylation*. Science, 2004. **303**(5662): p. 1336.
140. Allen, E., et al., *microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants*. Cell, 2005. **121**(2): p. 207-21.
141. Nakayashiki, H., *RNA silencing in fungi: mechanisms and applications*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5950-7.
142. Cogoni, C. and G. Macino, *Gene silencing in Neurospora crassa requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase*. Nature, 1999. **399**(6732): p. 166-9.
143. Catalanotto, C., et al., *Redundancy of the two dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in Neurospora crassa*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(6): p. 2536-45.
144. Hammond, S.M., *Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway*. FEBS Lett, 2005. **579**(26): p. 5822-9.
145. Volpe, T.A., et al., *Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1833-7.
146. Kadotani, N., et al., *RNA silencing in the phytopathogenic fungus Magnaporthe oryzae*. Mol Plant Microbe Interact, 2003. **16**(9): p. 769-76.
147. Catalanotto, C., et al., *Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in Neurospora*. Genes Dev, 2002. **16**(7): p. 790-5.
148. Mochizuki, K. and M.A. Gorovsky, *A Dicer-like protein in Tetrahymena has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase*. Genes Dev, 2005. **19**(1): p. 77-89.
149. Merchant, S.S., et al., *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions*. Science, 2007. **318**(5848): p. 245-50.
150. Casas-Mollano, J.A., et al., *Diversification of the core RNA interference machinery in Chlamydomonas reinhardtii and the role of DCL1 in transposon silencing*. Genetics, 2008. **179**(1): p. 69-81.
151. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
152. Ghildiyal, M. and P.D. Zamore, *Small silencing RNAs: an expanding universe*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(2): p. 94-108.
153. Axtell, M.J., J.O. Westholm, and E.C. Lai, *Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals*. Genome Biol, 2011. **12**(4): p. 221.
154. Reyes-Turcu, F.E. and S.I. Grewal, *Different means, same end-heterochromatin formation by RNAi and RNAi-independent RNA processing factors in fission yeast*. Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(2): p. 156-63.
155. Chitale, S. and H. Richly, *DICER and ZRF1 contribute to chromatin decondensation during nucleotide excision repair*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(10): p. 5901-5912.
156. Chitale, S. and H. Richly, *DICER- and MMSET-catalyzed H4K20me2 recruits the nucleotide excision repair factor XPA to DNA damage sites*. J Cell Biol, 2018. **217**(2): p. 527-540.

157. Nakagawa, A., et al., *Caspase-dependent conversion of Dicer ribonuclease into a death-promoting deoxyribonuclease*. *Science*, 2010. **328**(5976): p. 327-34.
158. Kang, Y.W., et al., *Hypoxia-induced apoptosis of astrocytes is mediated by reduction of Dicer and activation of caspase-1*. *Cell Biol Int*, 2020. **44**(6): p. 1394-1404.
159. Rybak-Wolf, A., et al., *A variety of dicer substrates in human and C. elegans*. *Cell*, 2014. **159**(5): p. 1153-1167.
160. Bogerd, H.P., et al., *Derivation and characterization of Dicer- and microRNA-deficient human cells*. *RNA*, 2014. **20**(6): p. 923-37.
161. Huppertz, I., et al., *iCLIP: protein-RNA interactions at nucleotide resolution*. *Methods*, 2014. **65**(3): p. 274-87.
162. Stols, L., et al., *A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site*. *Protein Expr Purif*, 2002. **25**(1): p. 8-15.
163. Eschenfeldt, W.H., et al., *A family of LIC vectors for high-throughput cloning and purification of proteins*. *Methods Mol Biol*, 2009. **498**: p. 105-15.
164. Yakhnin, A.V., H. Yakhnin, and P. Babitzke, *Gel mobility shift assays to detect protein-RNA interactions*. *Methods Mol Biol*, 2012. **905**: p. 201-11.
165. Nirschl, M., F. Reuter, and J. Vörös, *Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis*. *Biosensors (Basel)*, 2011. **1**(3): p. 70-92.
166. Kibbe, W.A., *OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(Web Server issue): p. W43-6.
167. Zarnegar, B.J., et al., *irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions*. *Nat Methods*, 2016. **13**(6): p. 489-92.
168. Robinson, J.T., et al., *Integrative genomics viewer*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(1): p. 24-6.
169. Rosano, G.L. and E.A. Ceccarelli, *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. *Front Microbiol*, 2014. **5**: p. 172.
170. Floor, S.N., et al., *Analog sensitive chemical inhibition of the DEAD-box protein DDX3*. *Protein Sci*, 2016. **25**(3): p. 638-49.
171. Jiang, F., et al., *Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in Drosophila*. *Genes Dev*, 2005. **19**(14): p. 1674-9.
172. Zapletal, D., et al., *Structural and functional basis of mammalian microRNA biogenesis by Dicer*. *Mol Cell*, 2022. **82**(21): p. 4064-4079.e13.
173. Su, S., et al., *Structural insights into dsRNA processing by Drosophila Dicer-2-Loqs-PD*. *Nature*, 2022. **607**(7918): p. 399-406.
174. Liu, Z., et al., *Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate*. *Cell*, 2018. **173**(5): p. 1191-1203.e12.
175. Koralewska, N., et al., *RNA and DNA G-quadruplexes bind to human dicer and inhibit its activity*. *Cell Mol Life Sci*, 2021. **78**(7): p. 3709-3724.
176. Uhlmann-Schiffler, H., C. Jalal, and H. Stahl, *Ddx42p--a human DEAD box protein with RNA chaperone activities*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(1): p. 10-22.
177. Jankowsky, E. and M.E. Fairman, *RNA helicases--one fold for many functions*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(3): p. 316-24.
178. Montavon, T.C., et al., *Human DICER helicase domain recruits PKR and modulates its antiviral activity*. *PLoS Pathog*, 2021. **17**(5): p. e1009549.



179. Ciechanowska, K., M. Pokornowska, and A. Kurzyńska-Kokorniak, *Genetic Insight into the Domain Structure and Functions of Dicer-Type Ribonucleases*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).

**Cytowana rozprawa doktorska:**

A. [https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/2413/1/Dissertation\\_Ikenna\\_R\\_Obi.pdf](https://ediss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/2413/1/Dissertation_Ikenna_R_Obi.pdf)

**W trakcie realizacji pracy doktorskiej byłam współautorką następujących publikacji i doniesień konferencyjnych:**

Koralewska N, Szczepanska A, Ciechanowska K, Wojnicka M, Pokornowska M, Milewski MC, Gudanis D, Baranowski D, Nithin C, Bujnicki JM, Gdaniec Z, Figlerowicz M, Kurzynska-Kokorniak A. *RNA and DNA G-quadruplexes bind to human dicer and inhibit its activity*. Cell Mol Life Sci. 2021 Apr;78(7):3709-3724. doi: 10.1007/s00018-021-03795-w. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33733306; PMCID: PMC8038994.

Ciechanowska K, Pokornowska M, Kurzyńska-Kokorniak A. *Genetic Insight into the Domain Structure and Functions of Dicer-Type Ribonucleases*. Int J Mol Sci. 2021 Jan 9;22(2):616. doi: 10.3390/ijms22020616. PMID: 33435485; PMCID: PMC7827160.

Pokornowska M, Milewski MC, Ciechanowska K, Szczepańska A, Wojnicka M, Radogostowicz Z, Figlerowicz M, Kurzynska-Kokorniak A. *The RNA-RNA base pairing potential of human Dicer and Ago2 proteins*. Cell Mol Life Sci. 2020 Aug;77(16):3231-3244. doi: 10.1007/s00018-019-03344-6. Epub 2019 Oct 26. PMID: 31655860; PMCID: PMC7391396.

Koralewska N, Ciechanowska K, Pokornowska M, Figlerowicz M, Kurzyńska-Kokorniak A. *Ludzka rybonukleaza Dicer – struktura i funkcje biologiczne*. Postepy Biochem. 2019 Oct 1;65(3):173-182. Polish. doi: 10.18388/pb.2019\_267. PMID: 31643164.

K. Ciechanowska, A. Szczepanska, M. Wojnicka, A. Kurzynska-Kokorniak. *The Role of the PAZ Domain in the RNA-RNA Base Pairing Activity of Human Ribonuclease Dicer*. 2020. BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY

A. Szczepanska, M. Wojnicka, K. Ciechanowska, A. Kurzynska-Kokorniak. *The Importance of the DUF283 Domain to the Activity of Human Ribonuclease Dicer*. 2020. BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY

M. Wojnicka, A. Szczepańska, K. Ciechanowska, A. Kurzynska-Kokorniak. *Non-canonical RNAs Produced by Human Ribonuclease Dicer*. 2020. BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY

**Osiągnięcia naukowe w czasie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej:**

- Kierownik (PI) w projekcie **PRELUDIUM 20 (2021/41/NZ2/03849)** pt. „Komórkowa sieć oddziaływań pomiędzy RNA i domeną helikazową rybonukleazy Dicer człowieka”.
- Trzymiesięczny staż (10.05.2021 – 09.08.2021r.) w **Ośrodku Genomiki Medycznej – OMICRON Wydziału Lekarskiego UJ CM w Krakowie**
- **Błękitny Krzyż Zasługi** przyznany w 2020 roku przez Prezydenta RP Andrzeja Dudę za działalność na rzecz zwalczania epidemii wirusa SARS-CoV-2
- Wystąpienie posterowe na konferencjach międzynarodowych:  
**9<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology and Bioengineering 2019**  
(25 - 28.09.2019 r. Poznań)  
**4<sup>th</sup> International Conference on the Long and the Short of Non-Coding RNAs 2022**  
(12 – 17.06.2022 r. Rodos, Grecja)

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Nov 29, 2022

---

---

This Agreement between Instytut Chemii Bioorganicznej PAN -- Kinga Ciechanowska ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5438171234407
License date	Nov 29, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Molecular Cell
Licensed Content Title	DEXD/H Box RNA Helicases From Generic Motors to Specific Dissociation Functions
Licensed Content Author	N.Kyle Tanner,Patrick Linder
Licensed Content Date	Aug 1, 2001
Licensed Content Volume	8
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	12
Start Page	251
End Page	262
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	New insights into the helicase domain of human Dicer and its biochemical activities, with particular emphasis on the RNA binding activity
Institution name	Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences
Expected presentation date	Dec 2022
Portions	Fig. 2a (upper structure) with polish titles instead of english "Domain 1" and "Domain 2"; without title "MjDEAD". Fig. 3 with polish titles for models: "Active Rolling Model" and "Inchworm Model"; polish titles for domains in "Inchworm Model".
Specific Languages	formal scientific polish language, molecular biology
Requestor Location	Instytut Chemii Bioorganicznej PAN Noskowskiego 12/14 Poznań, Polska 61-705 Poland Attn: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

## Terms and Conditions

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

2/7

## INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

#### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to

bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:



**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.10

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.