



Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej

Transferowy RNA jako substrat deaminazy APOBEC3A

Transfer RNA as a substrate of APOBEC3A deaminase

mgr inż. Karolina Hoffa-Sobiech

Praca wykonana pod kierunkiem promotora

dr hab. Pauliny Jackowiak, prof. ICHB PAN

oraz promotora pomocniczego

dr Lucyny Budźko

Poznań 2025

*Serdecznie dziękuję
dr hab. Paulinie Jackowiak, prof. ICHB PAN,
za kierownictwo naukowe, zaangażowanie, cenne wskazówki oraz życzliwość
okazywaną na każdym etapie realizacji niniejszej pracy.*

*Dziękuję również dr Lucynie Budźko
za opiekę naukową, merytoryczne wsparcie, serdeczność
oraz wyrozumiałość okazywaną w trakcie realizacji pracy.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję także do
prof. dr hab. Marka Figlerowicza
za stworzenie inspirującego środowiska badawczego.*

*Dziękuję wszystkim Pracownikom Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej
za owocną współpracę, otwartość i przyjazną atmosferę.*

*Szczególne podziękowania składam mojej Rodzinie i Przyjaciółom
oraz mojemu Mężowi, Albertowi,
za nieustanne wsparcie, motywację i wiarę we mnie.*

Z całego serca – dziękuję.

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju,
w ramach projektu LIDER IX, nr projektu:
LIDER/30/0111/L9/17/NCBR/201

Spis treści

Streszczenie	8
Abstract.....	9
Wykaz skrótów stosowanych w pracy	10
1. Wprowadzenie.....	15
1.1. Rodzina białek AID/APOBEC	17
1.2. Funkcje białek AID/APOBEC	18
1.3. Ewolucja białek AID/APOBEC	21
1.4. Struktura i właściwości biochemiczne białek AID/APOBEC	23
1.5. APOBEC3A	29
1.5.1. Specyficzność substratowa APOBEC3A.....	29
1.5.2. Rola APOBEC3A	32
1.5.2.1. Działanie przeciwwirusowe APOBEC3A	33
1.5.2.2. Rola APOBEC3A w nowotworzeniu	34
1.5.2.3. Wykorzystanie APOBEC3A w biotechnologii	35
2. Cel pracy.....	38
3. Materiały i metody.....	39
3.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy	39
3.1.1. Podstawowe odczynniki, materiały, enzymy, wzorce mas oraz zestawy gotowych odczynników	39
3.1.2. Oligonukleotydy	42
3.1.3. Plazmidy	44
3.1.4. Szczepy bakteryjne i linie komórkowe.....	44
3.1.5. Roztwory i bufony.....	44
3.1.6. Pożywki	46
3.1.7. Żele	48
3.2. Wykaz metod stosowanych w pracy	50
3.2.1. Cięcie enzymami restrykcyjnymi typu FastDigest produktów PCR oraz plazmidów	50
3.2.2. Deacylacja tRNA	50
3.2.3. Defosforylacja końców 5' liniowego plazmidu	50
3.2.4. Ligacja adapterów z tRNA	51

3.2.5. Ligacja z wektorem pET42a(+)	51
3.2.6. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	52
3.2.7. Przygotowanie bibliotek tRNA do sekwencjonowania NGS	53
3.2.8. Trawienie DNA i RNA do nukleozydów	54
3.2.9. Izolacja kwasów nukleinowych	55
3.2.9.1. Izolacja plazmidów w małej skali	55
3.2.9.2. Izolacja całkowitego RNA z HEK293T	55
3.2.9.3. Izolacja krótkich RNA z całkowitego RNA z HEK293T	55
3.2.9.4. Izolacja tRNA z krótkich RNA z HEK293T	56
3.2.10. Oczyszczanie kwasów nukleinowych	56
3.2.10.1. Oczyszczanie z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification Kit	56
3.2.10.2. Oczyszczanie z wykorzystaniem zestawu Oligo Clean & Concentrator	56
3.2.10.3. Oczyszczanie metodą strącaniową	56
3.2.10.4. Oczyszczanie z żeli poliakrylamidowych	57
3.2.11. Analiza kwasów nukleinowych i białek	57
3.2.11.1. Pomiar stężenie metodą fluorometryczną	57
3.2.11.2. Pomiar stężenia metodą spektrofotometryczną	57
3.2.11.3. Analiza długości kwasów nukleinowych z wykorzystaniem systemu TapeStation 4150	57
3.2.11.4. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	58
3.2.11.5. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym w warunkach natywnych	58
3.2.11.6. Rozdział elektroforetyczny krótkich RNA (<200 nt) w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	59
3.2.11.7. Rozdział elektroforetyczny produktów deaminacji w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	59
3.2.11.8. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych	59
3.2.11.9. Analiza białek metodą spektrometrii mas z wykorzystaniem analizatora Orbitrap	60
3.2.12. Otrzymywanie białek A3A_WT oraz A3A_E72A	60
3.2.12.1. Otrzymanie wektora ekspresyjnego WT_A3A	60
3.2.12.2. Transformacja komórek bakteryjnych metodą szoku cieplnego	61

3.2.12.3. Przygotowanie glicerolowych banków komórek bakteryjnych.....	61
3.2.12.4. Produkcja białek w systemie bakteryjnym w skali preparatywnej	62
3.2.12.5. Oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa	62
3.2.12.6. Oczyszczanie białek metodą sączenia molekularnego	63
3.2.12.7. Enzymatyczne odcinanie znacznika GST oraz wymiana buforu.....	63
3.2.13. Hodowla komórek HEK293T.....	64
3.2.14. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A	64
3.2.14.1. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec DNA metodą biochemiczną	64
3.2.14.2. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec DNA i RNA metodą ultrawydajnej chromatografii cieczowej	65
3.2.14.3. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec tRNA metodą sekwencjonowania nowej generacji (YAMAT-seq).....	67
3.2.15. Modelowanie kompleksów APOBEC3A z tRNA oraz dynamika molekularna	68
3.2.16. Analiza bioinformatyczna i statystyczna	68
4. Wyniki.....	69
4.1. Opracowanie metody produkcji deaminazy APOBEC3A w systemie bakteryjnym	69
4.1.1. Stworzenie konstruktów do ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> typu dzikiego oraz nieaktywnego wariantu w komórkach bakteryjnych	69
4.1.2. Produkcja deaminazy APOBEC3A typu dzikiego i jej nieaktywnego wariantu w komórkach bakteryjnych	72
4.1.3. Oczyszczanie otrzymanych preparatów białkowych APOBEC3A	73
4.2. Charakterystyka otrzymanych preparatów białkowych APOBEC3A.....	75
4.2.1. Identyfikacja otrzymanych preparatów białkowych metodą spektrometrii mas z wykorzystaniem analizatora Orbitrap	75
4.2.2. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A	76
4.2.2.1. Badanie aktywności deaminazowej metodą biochemiczną	76
4.2.2.2. Badanie aktywności deaminazowej metodą ultrawydajnej chromatografii cieczowej.....	79
4.3. Charakterystyka aktywności deaminazy APOBEC3A wobec tRNA.....	82
4.3.1. Aktywność APOBEC3A wobec tRNA <i>in vitro</i>	82
4.3.2. Strukturalne uwarunkowania aktywności APOBEC3A wobec tRNA	93
4.3.3. Identyfikacja edycji cytydyny do urydyny w tRNA w komórkach nowotworowych <i>in vivo</i>	96

4.4. Aktywność deaminazy APOBEC3A wobec metylowanych pochodnych cytydyny w RNA	100
4.4.1. Aktywność deaminazy APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w modelowym RNA.....	100
4.4.2. Aktywność deaminazy APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny w tRNA ...	101
5. Dyskusja.....	105
5.1. Otrzymywanie aktywnej deaminazy APOBEC3A.....	105
5.2. Deaminacja cytydyny w tRNA <i>in vitro</i>	107
5.3. Deaminacja cytydyny w tRNA pochodzących z tkanek nowotworowych	109
5.4. Potencjalne skutki deaminacji cytydyny w tRNA	111
5.4.1. Wpływ deaminacji na proces translacji.....	111
5.4.2. Wpływ deaminacji na występowanie modyfikacji tRNA	114
5.4.2. Wpływ deaminacji na biogenezę i funkcje tRF	115
5.4. Deaminacja 5-metylocytydyny w RNA	115
6. Wnioski.....	119
7. Załączniki.....	120
8. Bibliografia	129

Streszczenie

APOBEC3A to deaminaza cytydyny zależna od cynku, której główna aktywność enzymatyczna polega na katalizowaniu reakcji deaminacji cytydyny do urydyny w jednoniciowym DNA (ssDNA). Dodatkowo APOBEC3A ma zdolność do przekształcania 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny, odpowiednio, do tymidyny i 5-hydroksymetylouracydyny w ssDNA. W warunkach fizjologicznych aktywność APOBEC3A odgrywa kluczową rolę w mechanizmach odporności wrodzonej. Zaburzenia w regulacji aktywności tego białka mogą prowadzić także do nowotworzenia. Między innymi z tego względu w ostatnim czasie APOBEC3A budzi szczególne zainteresowanie badaczy. Aktywność APOBEC3A wobec cytydyny w RNA została odkryta zaledwie kilka lat przed rozpoczęciem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy. Dotyczyła ona deaminacji cytydyn ułożonych w strukturach typu spinki do włosów w mRNA. Odkrycie to stworzyło podstawy do badania udziału APOBEC3A w edycji RNA. Biorąc pod uwagę, że motyw spinki do włosów stanowi kluczowy element struktury drugorzędowej cząsteczek tRNA, oraz że deaminazy APOBEC pochodzą od deaminaz tRNA, w niniejszej pracy postawiono hipotezę, że tRNA jest substratem dla APOBEC3A. W celu weryfikacji tej hipotezy opracowano metodę produkcji APOBEC3A w systemie bakteryjnym i przetestowano jej aktywność wobec cząsteczek tRNA *in vitro*. Zarówno na podstawie wyników analiz ilościowych, wykorzystujących ultrawydajną chromatografię cieczową, jak i jakościowych, obejmujących sekwencjonowanie nowej generacji, stwierdzono, że w warunkach *in vitro* APOBEC3A deaminowała cytydynę w cząsteczkach tRNA pochodzących z ludzkiej linii komórkowej. Ponadto, edycję cytydyny do urydyny wykryto w puli fragmentów tRNA pochodzących od pacjentów z nowotworami. W kolejnym etapie badań wykazano, że *in vitro* APOBEC3A deaminowała 5-metylocytydynę w modelowej cząsteczce mRNA i w antykodonie syntetycznego tRNA-Leu-CAA. Uzyskane wyniki znacząco poszerzają dotychczasową wiedzę dotyczącą aktywności APOBEC3A wobec RNA i stanowią podstawę do dalszych badań nad funkcją tego enzymu zarówno w kontekście procesów fizjologicznych, jak i patologicznych.

Abstract

APOBEC3A is a zinc-dependent cytidine deaminase whose main enzymatic activity involves catalyzing the deamination of cytidine to uridine in single-stranded DNA (ssDNA). In addition, APOBEC3A is capable of converting 5-methylcytidine and 5-hydroxymethylcytidine in ssDNA into thymidine and 5-hydroxymethyluridine, respectively. Under physiological conditions, APOBEC3A activity plays a key role in innate immune systems. Dysregulation of its activity may also contribute to tumorigenesis. For this reason, APOBEC3A has recently attracted particular attention from researchers. Its ability to target cytidine in RNA was discovered only a few years before the studies described in this work began. It involved the deamination of cytidines located within stem-loop structures in mRNA. This discovery opened the way for investigating the involvement of APOBEC3A in RNA editing. Considering that the stem-loop motif represents a key element of the secondary structure of tRNA molecules, and that APOBEC3A has evolved from tRNA deaminases, in this study was hypothesized that tRNA serves as a substrate for APOBEC3A. To verify this hypothesis, a method for producing APOBEC3A in a bacterial expression system was developed, and its activity on tRNA molecules was tested *in vitro*. Both quantitative analysis using ultra-high-performance liquid chromatography and qualitative analysis using next-generation sequencing demonstrated that, under *in vitro* conditions, APOBEC3A deaminated cytidines in human cell-derived tRNA molecules. Moreover, cytidine to uridine editing was detected in pools of tRNA fragments accumulated in cancer patients. In the subsequent stage of the study, it was shown that *in vitro* APOBEC3A deaminated 5-methylcytidine in a model mRNA molecule and in the anticodon loop of a synthetic tRNA-Leu-CAA. The results obtained significantly expand the current knowledge of APOBEC3A activity on RNA and provide a foundation for further research on the function of this enzyme in both physiological and pathological contexts.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

AARS (ang. *aminoacyl-tRNA synthetases*) syntetazy aminoacylo-tRNA

aa-tRNA (ang. *aminoacyl-tRNA*) tRNA związany z aminokwasem

AAV (ang. *adeno-associated Virus*) wirus towarzyszący adenowirusom

ADAR (ang. *adenosine deaminase acting on RNA*) deaminaza adenozyiny aktywna wobec RNA

ADAT (ang. *adenosine deaminase, tRNA specific*) deaminaza adenozyiny, specyficzna wobec tRNA

AID (ang. *activation-induced cytidine deaminase*) deaminaza cytydyny indukowana aktywacją limfocytów B

ALKBH1 (ang. *alkB homolog 1*) oksigenaza DNA, RNA i histonów

ALYREF (ang. *ALY/REF export factor*) czynnik eksportu ALY/REF

AML (ang. *acute myeloid leukemia*), ostra białaczka szpikowa

AP (ang. *aprimidic site*) miejsce apirymidynowe

APE (ang. *apurinic/aprimidinic endonuclease*) endonukleaza apurynowo/apirymdynowa

apoB - apolipoproteina B

APOBEC (ang. *apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like*) enzym edytujący mRNA apolipoproteiny B typu polipeptydu katalitycznego

BER (ang. *base excision repair pathway*) mechanizmu szlaku naprawy przez wycinanie zasad

BLCA (ang. *bladder urothelial carcinoma*) rak urotelialny pęcherza moczowego

BRCA (ang. *breast invasive carcinoma*) inwazyjny rak piersi

CD (ang. *catalytic domain*) domena katalityczna

CDAT8 (ang. *tRNA-specific cytidine deaminase*) deaminaza cytydyny, specyficzna wobec tRNA

cDNA (ang. *complementary DNA*) komplementarny DNA

CESC (ang. *cervical squamous cell carcinoma and endocervical*)

adenocarcinoma) rak szyjki macicy
(płaskonabłonkowy i gruczołowy)

CHD4 (ang. *chromodomain helicase
DNA-binding protein 4*) helikaza
biorąca udział w remodelowaniu
chromatyny

COAD (ang. *colon adenocarcinoma*)
gruczolakorak okrężnicy

CRL (ang. *custom RNA ladder*) wzorzec
RNA

Cryo-EM (ang. *cryogenic electron
microscopy*) kriogeniczna mikroskopia
elektronowa

CSR (ang. *class switch recombination*)
rekombinacyjne przełączanie klas

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) kwas
deoksyrybonukleinowy

dNTP (ang. *deoxynucleoside
triphosphate*) trifosforan
deoksyrybonukleozydu

dsDNA (ang. *double-stranded DNA*)
dwuniciowy kwas
deoksyrybonukleinowy

EM-seq (ang. *enzymatic methyl-seq*)
metoda enzymatyczna do identyfikacji
5mC i 5hmC w genomie

GST (ang. *glutathione S-transferase*) S-
transferaza glutationu

HBB (ang. *hemoglobin beta*) gen
kodujący beta hemoglobinę

HBV (ang. *hepatitis B virus*) wirus
zapalenia wątroby typu B

HDAC1 (ang. *histone deacetylase 1*)
deacetylaza histonowa typu 1

HEK 293T (ang. *human embryonic
kidney 293 cell line*) linia komórkowa
ludzkich komórek embrionalnych nerki
293

HIV-1 (ang. *human immunodeficiency
virus type 1*) pierwszy ludzki wirus
niedoboru odporności

HNSC (ang. *head and neck squamous
cell carcinoma*) rak płaskonabłonkowy
głowy i szyi

HPV (ang. *human papilloma virus*)
wirusa brodawczaka ludzkiego

HRL (ang. *high resolution ladder*)
wzorzec RNA

IFN- α (ang. *interferon-alpha*)
interferon-alfa

IPTG izopropyl- β -D-1-
tiogalaktopiranozydu

kDa - kilodalton	MWC (ang. <i>molecular weight cut-off</i>) próg odcięcia masy molekularnej
KICH (ang. <i>kidney chromophobe</i>) rak chromofobowy nerki	NES (ang. <i>nuclear export signal</i>) sygnał eksportu jądrowego
KIRC (ang. <i>kidney renal clear cell carcinoma</i>) rak jasnokomórkowy nerki	NGS (ang. <i>next generation sequencing</i>) sekwencjonowanie następnej generacji
KIRP (ang. <i>kidney renal papillary cell carcinoma</i>) brodawkowaty rak nerki	NLS (ang. <i>nuclear localization signal</i>) sygnał lokalizacji jądrowej
LGG (ang. <i>brain lower grade glioma</i>) glejak niskiego stopnia złośliwości	NMR (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>) magnetyczny rezonans jądrowy
LIHC (ang. <i>liver hepatocellular carcinoma</i>) rak wątrobowokomórkowy	NuRD (ang. <i>nucleosome remodeling and deacetylase complex</i>) kompleks białkowy remodelujący nukleosomy i deacetylujący histony
LINE-1 (ang. <i>long interspersed nuclear element-1</i>) długi rozproszony element jądrowy typu 1	OV (ang. <i>ovarian serous cystadenocarcinoma</i>) surowiczy gruczolakorak jajnika
LTR (ang. <i>long terminal repeat</i>) długie powtórzenia końcowe	PAA (ang. <i>polyacrylamide</i>) poliakrylamid
LUAD (ang. <i>lung adenocarcinoma</i>) gruczolakorak płuca	PCR (ang. <i>polymerase chain reaction</i>) łańcuchowa reakcja polimerazy
LUSC (ang. <i>lung squamous cell carcinoma</i>) rak płaskonabłonkowy płuca	PmCDA1 ang. (<i>Petromyzon marinus cytidine deaminase 1</i>) deaminaza cytydyny 1 minoga morskiego
mRNA (ang. messenger RNA) informacyjny kwas rybonukleinowy	PRAD (ang. <i>prostate adenocarcinoma</i>) gruczolakorak prostaty
MVM (ang. <i>minute virus of mice</i>) mały wirus myszy	

pz - par zasad	SDS (ang. <i>sodium dodecyl sulfate</i>) siarczan dodecyłu sodu
READ (ang. <i>rectum adenocarcinoma</i>) gruczolakorak odbytnicy	SHM (ang. <i>somatic hypermutation</i>) hiperzmienność somatyczna
REV1 (ang. <i>reversionless 1</i>) polimeraza naprawiająca uszkodzony DNA przez kontynuowanie syntezy mimo obecności uszkodzonych nukleotydów	ssDNA (ang. <i>single-stranded DNA</i>) jednoniciowy kwas deoksyrybonukleinowy
RNA (ang. <i>ribonucleic acid</i>) kwas rybonukleinowy	ssRNA (ang. <i>single-stranded RNA</i>) jednoniciowy kwas rybonukleinowy
RPL22A (ang. <i>ribosomal protein L22A</i>) rybosomalne białko L22A	STAD (ang. <i>stomach adenocarcinoma</i>) gruczolakorak żołądka
rpm (ang. <i>rotations per minute</i>) obroty na minutę	T4-βGT (ang. <i>T4-phage beta-glucosyltransferase</i>) beta- glukozylotransferaza faga T4
RSV (ang. <i>respiratory syncytial virus</i>) syncytialny wirus oddechowy	TadA (ang. <i>tRNA-specific adenosine deaminase A</i>) deaminaza A adenozyiny specyficzna wobec tRNA
SARC (ang. <i>sarcoma</i>) mięsak	TCGA (ang. <i>the cancer genome atlas</i>) baza danych zawierająca sekwencje genomów i transkryptomów tkanek nowotworowych.
SARS-CoV-2 (ang. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>) drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego	TET2 (ang. <i>ten-eleven-translocation methylcytosine dioxygenase 2</i>) druga dioksygenaza 5-metylocytydyny związana z translokacją między chromosomami 10 i 11
SBS (ang. <i>single base substitution</i>) substytucje pojedynczych nukleotydów	THCA (ang. <i>thyroid carcinoma</i>) rak tarczycy
SDHB (ang. <i>succinate dehydrogenase B gene</i>) gen dehydrogenazy bursztynianowej B	

tRFs (ang. *tRNA derived fragments*)
fragmenty pochodzące z tRNA

tRNA (ang. *transfer RNA*) transferowy
kwas rybonukleinowy

UCEC (ang. *uterine corpus endometrial carcinoma*) rak endometrialny trzonu
macicy

UDG (ang. *uracil-DNA glycosylase*)
glikozydaza DNA zależna od uracylu

UPLC (ang. *ultra performance liquid chromatography*) ultrawydajna
chromatografia cieczowa

VIF (ang. *viral infectivity factor*)
wirusowy czynnik infekcyjności

VLRs (ang. *variable lymphocyte receptors*) zmienne receptory
limfocytów T i B

YAMAT-seq (ang. *Y-shaped Adapter-ligated MAture TRNA sequencing*)
metoda przygotowania bibliotek do
sekwencjonowania tRNA
wykorzystująca adaptory w kształcie
litery Y

1. Wprowadzenie

Edycja kwasów nukleinowych to naturalny mechanizm umożliwiający organizmom modyfikację informacji zapisanej w DNA lub RNA. U kręgowców za to zjawisko odpowiadają enzymy katalizujące reakcje deaminacji cytydyny do urydyny lub adenozyiny do inozyiny w DNA i/lub RNA. Edycja kwasów nukleinowych odgrywa istotną rolę w swoistej i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, metabolizmie tłuszczów czy prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego. Konwersję adenozyiny do inozyiny w transferowym RNA (ang. *transfer RNA*, tRNA) katalizuje deaminaza ADAT (ang. *adenosine deaminase, tRNA specific*), a analogiczną reakcję w informacyjnym RNA (ang. *messenger RNA*, mRNA) katalizują białka z rodziny ADAR (ang. *adenosine deaminase acting on RNA*). Za deaminację cytydyny do urydyny w łańcuchach DNA i/lub RNA odpowiedzialne są enzymy z rodziny AID/APOBEC (ang. *activation-induced cytidine deaminase/ apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like*). U człowieka rodzina AID/APOBEC jest reprezentowana przez 11 białek. Mimo że katalizują one tę samą reakcję, ich funkcje są bardzo zróżnicowane ze względu na różne wzorce ekspresji, odmienną lokalizację subkomórkową oraz specyficzność substratów.

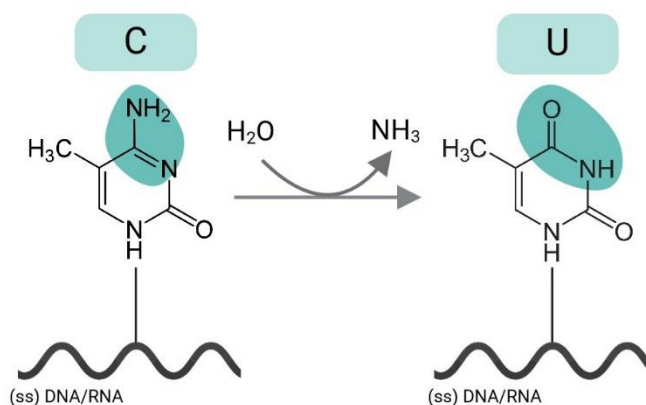
Badania prowadzone w ramach realizacji mojej pracy doktorskiej koncentrowały się na najbardziej aktywnym przedstawicielu rodziny AID/APOBEC – APOBEC3A. Znaczenie deaminazy APOBEC3A można rozpatrywać w trzech aspektach. Po pierwsze, APOBEC3A odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej. Mutacje cytydyny do urydyny wprowadzone przez to białko w kwasach nukleinowych wirusów mogą prowadzić do ich degradacji lub do utrwalenia zmian i powstania nowych wariantów wirusowych. Po drugie, niekontrolowana ekspresja genu kodującego APOBEC3A lub dysfunkcje tego białka mogą prowadzić do powstawania mutacji w ludzkim genomie, co z kolei sprzyja destabilizacji genomu i rozwojowi nowotworów. Po trzecie, dzięki zdolności do zmiany sekwencji kwasów nukleinowych, APOBEC3A może być wykorzystana jako narzędzie w systemach do precyzyjnej edycji genomu i transkryptomu.

Ze względu na tak wielowymiarowe efekty aktywności deaminazy APOBEC3A, zrozumienie molekularnych podstaw jej działania jest kluczowe nie tylko dla wyjaśnienia roli biologicznej APOBEC3A, ale także dla zrozumienia mechanizmów powstawania chorób wynikających z jej dysfunkcji. O ile strukturalne uwarunkowania aktywności

deaminazy APOBEC3A wobec DNA są dobrze poznane, o tyle aktywność APOBEC3A wobec RNA została odkryta stosunkowo niedawno i nie została jeszcze w pełni scharakteryzowana.

1.1. Rodzina białek AID/APOBEC

Rodzina białek AID/APOBEC należy do nadrodziny deaminaz zależnych od cynku, których cechą wspólną jest obecność motywu strukturalnego chelatującego jon cynku (Zn^{2+}) [1]. Jest to duża grupa enzymów, które katalizują hydrolityczną deaminację zasad, zarówno w wolnych nukleotydach, jak i łańcuchach polinukleotydowych [2, 3]. W ostatnich latach deaminazy wykazujące aktywność wobec łańcuchów polinukleotydowych stały się szczególnie interesujące ze względu na ich zdolność do modyfikowania informacji genetycznej na poziomie DNA lub RNA. Tak jak wspomniano we wprowadzeniu należą do nich: (1) deaminaza ADAT przekształcająca adenozyne do inozyny w tRNA (2) deaminazy ADAR modyfikujące adenozyne do inozyny w mRNA oraz (3) deaminazy AID/APOBEC, które przekształcają cytydynę do urydyny w jednoniciowym DNA (ang. *single-stranded DNA*, ssDNA) lub RNA (ang. *single-stranded RNA*, ssRNA) [1, 4-9]. W niniejszej pracy termin „cytydyna” jest używany w odniesieniu do obu rodzajów kwasów nukleinowych, z wyraźnym wskazaniem, którego z nich (RNA/DNA) w danym momencie dotyczy. Takie podejście przyjęto, ponieważ w wielu przypadkach opis odnosi się zarówno do cytydyny w RNA, jak i w DNA, a stosowanie oddzielnych terminów, takich jak „cytydyna” i „deoksycytydyna”, rozbijałoby płynność tekstu.



Rysunek 1. Schemat reakcji deaminacji cytydyny do urydyny w ssDNA/ssRNA. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Reakcja deaminacji katalizowana przez przedstawicieli rodziny AID/APOBEC polega na odłączeniu grupy aminowej przy atomie węgla C4 cytydyny i zastąpieniu jej atomem tlenu w jednoniciowych łańcuchach DNA i/lub RNA (rysunek 1) [1, 10, 11]. Katalizowana przez te enzymy konwersja cytydyny do urydyny prowadzi do zmian

w sekwencji DNA i/lub RNA, potencjalnie zmieniając informację genetyczną lub funkcję cząsteczek RNA. W genomie człowieka jest 11 genów kodujących białka należące do rodziny AID/APOBEC: AID, APOBEC1, APOBEC2, siedem genów APOBEC3 oraz APOBEC4 [10].

1.2. Funkcje białek AID/APOBEC

Mimo że białka rodziny AID/APOBEC katalizują tę samą reakcję chemiczną, ich funkcje są bardzo zróżnicowane (rysunek 2). Różnice te wynikają m. in. z odmiennych: lokalizacji subkomórkowej, wzorców ekspresji oraz elementów strukturalnych, odpowiedzialnych za rozpoznawanie substratów [10, 12].

APOBEC1, pierwsza odkryta deaminaza w rodzinie AID/APOBEC, pełni kluczową rolę w metabolizmie lipidów, edytując cytydynę do urydyny w pozycji 6666 mRNA apolipoproteiny B (apoB) w jelicie cienkim. Skutkiem deaminacji jest wygenerowanie przedwczesnego kodonu STOP i powstanie białka apoB-48, które jest krótszą formą apoB-100, tworzonego w wątrobie, gdy transkrypt nie jest edytowany. Każda z tych form pełni odrębną funkcję biologiczną: apoB-100 uczestniczy w transporcie triglicerydów i cholesterolu syntetyzowanych endogennie, natomiast krótsza forma, apoB-48, bierze udział we wchłanianiu i transporcie egzogennych triglicerydów [13].

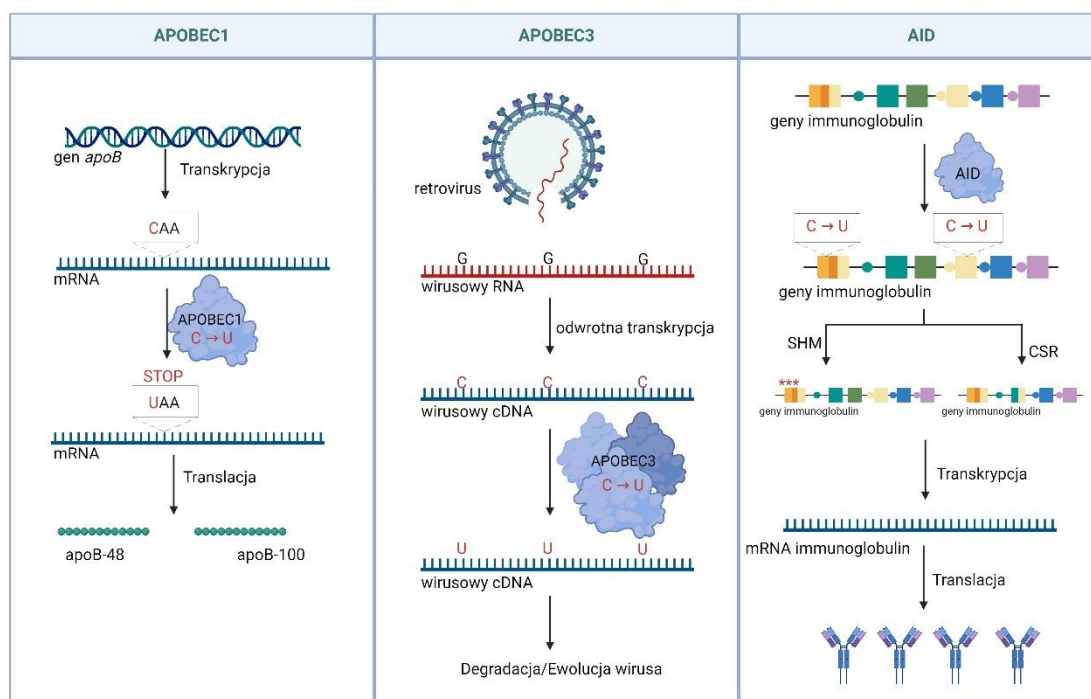
AID odgrywa kluczową rolę w adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej, uczestnicząc w produkcji przeciwciał. Rola AID polega na indukowaniu procesów rekombinacyjnego przełączania klas (ang. *class switch recombination*, CSR) i hiperzmienności somatycznej (ang. *somatic hypermutation*, SHM), poprzez deaminację cytydyny do urydyny w regionach stałych i zmiennych genów immunoglobulin [14-16].

Grupa białek **APOBEC3** bierze udział w mechanizmach odporności wrodzonej [17, 18]. Enzymy należące do APOBEC3 unieczynnijają wirusy oraz retroelementy na dwa sposoby: niezależne od deaminacji oraz poprzez generowanie hipermutacji w kwasach nukleinowych [19-23]. W pierwszym przypadku poszczególni przedstawiciele APOBEC3 hamują proces transkrypcji (w przypadku wirusów DNA) lub odwrotnej transkrypcji (w przypadku retrowirusów i retroelementów) poprzez oddziaływanie z matrycą DNA lub RNA. W rezultacie, enzymy wirusów lub retroelementów mają ograniczony dostęp do matrycy, co uniemożliwia im skuteczne powielenie materiału genetycznego [19, 24]. Alternatywnie, sugeruje się, że białka

APOBEC3 mogą bezpośrednio oddziaływać z tymi enzymami i zaburzać ich aktywność [25, 26]. W mechanizmie zależnym od deaminacji, APOBEC3 indukuje bezpośrednio hipermutacje w genomach wirusów i retroelementach, dokonując w wielu miejscach konwersji cytydyny do urydyny. Replikacja DNA/RNA o tak zmienionej sekwencji może prowadzić do powstania niefunkcjonalnych wariantów wirusowych lub retroelementów [27-30]. Należy zauważyć, że wspomniany proces może także kształtować ewolucję wirusów i retroelementów. Dzieje się tak, gdy liczba mutacji jest niewystarczająca do ich dezaktywacji, więc zostaje utrwalona po replikacji i skutkuje powstaniem wariantów o zmienionych właściwościach w porównaniu do pierwotnego wariantu. Tego rodzaju zmiany mogą wpływać na zdolność wirusów i retroelementów do unikania odpowiedzi immunologicznej lub ich odporność na stosowane leczenie (rysunek 2) [31-33]. Alternatywnie, w DNA, obecność urydyn może wywołać aktywację mechanizmu szlaku naprawy przez wycinanie zasad (ang. *base excision repair pathway*, BER), który prowadzi do degradacji DNA. Pierwszy etap BER polega na wycięciu uracylu z DNA przez glikozylazę DNA (ang. *uracil-DNA-glycosylase*, UDG), w wyniku czego powstają liczne miejsca apirymidynowe (ang. *aprimidic site*, AP). Następnie, endonukleaza apurynowo/apirymidynowa (ang. *apurinic/aprimidinic endonuclease*, APE) rozcina DNA, co prowadzi do powstania krótkich, niefunkcjonalnych fragmentów DNA [27, 34, 35].

W przeciwieństwie do pozostałych członków rodziny AID/APOBEC, których funkcje zostały wcześniej omówione, białka **APOBEC2** i **APOBEC4** nie wykazują aktywności enzymatycznej *in vitro*. Ich sekwencje są jednak wysoce zachowawcze u kręgowców, co wskazuje na funkcjonalne znaczenie tych białek [36]. APOBEC2 odgrywa kluczową rolę w rozwoju mięśni, co potwierdzają obserwacje, że u zwierząt z wyciszonym genem *APOBEC2* rozwija się miopatia [37, 38]. W procesie różnicowania się mioblastów do miotub, APOBEC2 działa jako regulator transkrypcyjny. Mechanizm regulacji polega na wiązaniu się APOBEC2 z DNA w specyficznych regionach promotorowych genów i rekrutacji kompleksu represorowego NuRD (ang. *nucleosome remodeling and deacetylase complex*). W skład tego kompleksu wchodzi m.in. deacetylaza histonowa (ang. *histone deacetylase 1*, HDAC1) i helikaza CHD4 (ang. *chromodomain helicase DNA-binding protein 4*), które odpowiadają za wyciszanie genów, do których zostały skierowane. Co istotne, geny wyciszane za pośrednictwem APOBEC2 nie są bezpośrednio zaangażowane w różnicowanie mięśni,

lecz są regulatorami transkrypcyjnymi szlaków różnicowania innych komórek, np. odpornościowych [39]. Sugeruje to, że kluczowa rola APOBEC2 polega na utrzymaniu tożsamości komórek mięśniowych poprzez tłumienie ekspresji genów związanych z alternatywnymi losami komórkowymi. Białko APOBEC4, którego gen ulega ekspresji w jądrach, prawdopodobnie bierze udział w spermatogenezie, choć jego dokładna funkcja pozostaje słabo poznana [40]. Najnowsze badania wykazały, że ekspresja *APOBEC4* jest podwyższona w komórkach zakażonych drugim koronawirusem ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2), co sugeruje, że kodowane przezeń białko może odgrywać rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej [41]. W kontekście tych danych możliwe jest również, że zaobserwowany brak aktywności APOBEC2 i APOBEC4 *in vitro* wynika z nieobecności w takim układzie specyficznych kofaktorów, które nie zostały dotąd zidentyfikowane, a mogą okazać się niezbędne dla funkcjonowania tych enzymów [18, 40, 42].



Rysunek 2. Funkcje białek AID/APOBEC. APOBEC1 pełni kluczową rolę w metabolizmie tłuszczów. Grupa białek należąca do podrodziny APOBEC3 stanowi istotną część wrodzonego układu odpornościowego, podczas gdy AID uczestniczy w adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach sugerują, że niektóre enzymy AID/APOBEC są jednym z czynników przyczyniających się do procesu onkogenezy [43]. Analizy genomów nowotworowych zdeponowanych w bazie TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) wykazały obecność mutacji cytydyny do tymidyny w motywach sekwencyjnych preferowanych przez te białka. Mutacje te zidentyfikowano w 40-70% genomów, głównie w nowotworach piersi, pęcherza moczowego, płuc, szyjki macicy i przełyku [44-48].

Co ciekawe, oprócz deaminacji niemodyfikowanej cytydyny w jednoniciowych łańcuchach DNA, AID, APOBEC3A, APOBEC3B oraz APOBEC3H mają zdolność do deaminacji 5-metylocytydyny do tymidyny [49-51]. Ponadto, APOBEC3A deaminuje 5-hydroksymetylocytydynę [52, 53]. Znaczenie biologiczne deaminacji pochodnych cytydyny nie zostało do tej pory poznane, choć istnieją przesłanki wskazujące na udział enzymów AID/APOBEC w procesach regulacji epigenetycznej (szczególnie w procesie aktywnej demetylacji genomu) [8, 54-56].

1.3. Ewolucja białek AID/APOBEC

Na podstawie analiz filogenetycznych, organizacji genów oraz budowy centrum katalitycznego uważa się, że rodzina białek AID/APOBEC wyodrębniła się z grupy deaminaz adenozyne, przekształcających adenozyne do inozyny w pozycji 34 w niektórych tRNA zarówno u *Prokaryota* jak i *Eukaryota* [1, 57, 58]. U bakterii deaminacja adenozyne jest katalizowana przez homodimeryczny enzym TadA (ang. *tRNA-specific adenosine deaminase A*) specyficzny wobec tRNA. Natomiast u eukariontów ta sama reakcja jest katalizowana przez heterodimeryczną deaminazę ADAT [5, 59-61]. Modyfikacje w pętli antykodonowej modulują oddziaływania kodon-antykodon. Inozyna może tworzyć pary z adenozyną, cytydyną i urydyną, co oznacza, że deaminacja pozycji 34 antykodonu zwiększa zdolność dekodowania danej cząsteczki tRNA (jeden tRNA może rozpoznać więcej niż jeden kodon w mRNA) [62]. Na ewolucyjne pokrewieństwo między białkami AID/APOBEC a deaminazami adenozyne TadA/ADAT wskazuje kilka faktów. Po pierwsze, jest to podobieństwo struktur trzeciorzędowych, szczególnie w obrębie centrum katalitycznego. Zarówno TadA/ADAT, jak i AID/APOBEC zawierają motyw aminokwasowy: His-X-Glu-X₂₃₋₂₈-Pro-Cys-X-Cys (X-dowolna reszta aminokwasowa lub kilka takich reszt), w którym atom cynku jest koordynowany przez jedną resztę histydynową i dwie

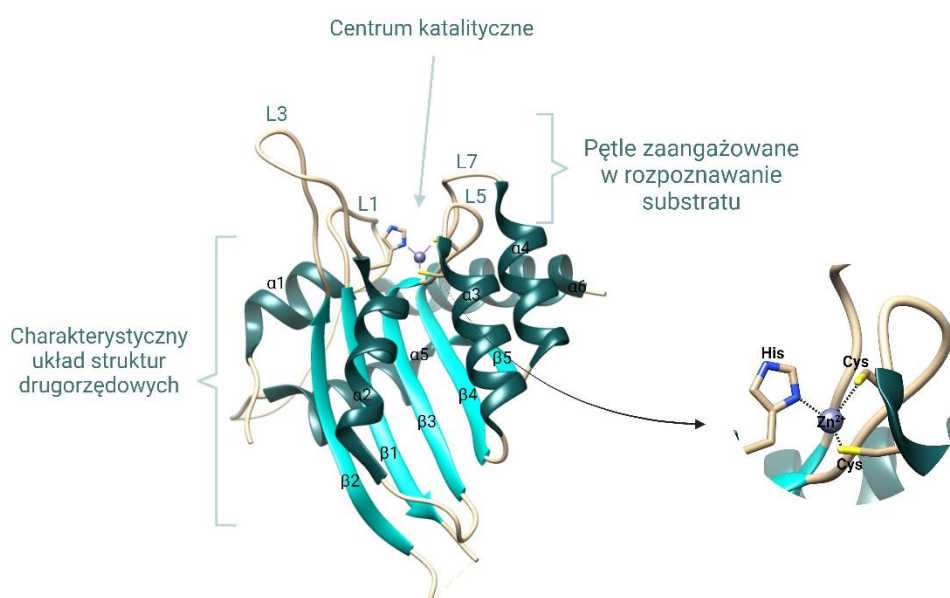
cysteinowe. Taka budowa sugeruje zachowawczość mechanizmu deaminacji zasad w łańcuchach DNA/RNA [57, 63-65]. Po drugie, deaminaza adenozyiny ADAT zarówno u wiciowców (*Trypanosoma brucei*), jak i strunowców (*Branchiostoma japonicum*) wykazuje zdolność do deaminacji cytydyny w DNA [62, 66]. Po trzecie, postuluje się, że w procesie ewolucyjnym częściej dochodzi do modyfikacji istniejącej kieszeni katalitycznej niż do tworzenia *de novo* struktur wiążących łańcuch polinukleotydowy [57]. Zmiana rozpoznawanego nukleotydu z adenozyiny na cytydynę mogła być skutkiem zmniejszenia kieszeni katalitycznej przodka białek AID/APOBEC. Konserwatywna reszta kwasu asparaginowego w pętli 7 białek TadA/ADAT w toku ewolucji została zastąpiona większą resztą aromatyczną, taką jak tyrozynowa, fenyloalaninowa lub tryptofanowa, która zmniejsza rozmiar kieszeni katalitycznej [36]. Po czwarte, struktura genów kodujących białka AID/APOBEC wykazuje podobieństwo do struktury genów deaminaz TadA/ADAT. Większość genów kodujących białka obu grup składa się z pięciu eksonów, gdzie centrum katalityczne tych enzymów jest kodowane przez ekson trzeci [58, 67, 68].

Ewolucja rodziny białek AID/APOBEC u kręgowców jest ściśle związana z rozwojem układu odpornościowego. Przyjmuje się, że najstarszym przedstawicielem rodziny AID/APOBEC u kręgowców jest AID. Homolog AID, PmCDA1 (ang. *Petromyzon marinus cytidine deaminase 1*) występuje u wczesnych kręgowców – bezzuchwowców, których przedstawicielem jest minóg. PmCDA1 jest zaangażowana w generowanie zmienności genów receptorów limfocytarnych (ang. *variable lymphocyte receptors*, VLRs). Receptory te rozpoznają patogeny, dlatego są uważane za pierwotny system nabytej odpowiedzi immunologicznej [69]. Duplikacja genów *AID* doprowadziła do powstania, odpowiednio, *APOBEC1* i *APOBEC3* u ssaków i ssaków łżyskowych [36, 58]. U ssaków łżyskowych doszło do szybkiej ekspansji podrodziny białek APOBEC3 w odpowiedzi na presję selekcyjną wywołaną przez retrowirusy i retroelementy, które są celem działania tych białek. Genom człowieka koduje 7 genów *APOBEC3*, myszy tylko jeden gen *APOBEC3*, natomiast u nietoperza występuje aż 18 genów kodujących *APOBEC3* [67, 70, 71]. Białka APOBEC2 oraz APOBEC4 pojawiają się u ryb chrzęstnoszkieletowych [1]. Ze względu na słabo poznane funkcje tych białek, ich ścieżka ewolucyjna pozostaje niejasna. Co ciekawe, białka o podobnej sekwencji aminokwasowej i aktywności enzymatycznej do przedstawicieli rodziny AID/APOBEC u kręgowców zidentyfikowano u szkarłupni i ramienionogów. Co więcej, ekspresja

genów kodujących te białka jest indukowana w odpowiedzi na kontakt z patogenami. Można więc sądzić, że deaminacja cytydyny w łańcuchach polinukleotydowych jest pierwotnym mechanizmem odpornościowym organizmów, który wykształcił się już u przodka zwierząt dwubocznie symetrycznych [72].

1.4. Struktura i właściwości biochemiczne białek AID/APOBEC

Dzięki zastosowaniu technik takich jak: spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR), krystalografia rentgenowska oraz kriogeniczna mikroskopia elektronowa (ang. *cryogenic electron microscopy*, Cryo-EM), poznano strukturę trzeciorzędową prawie wszystkich przedstawicieli rodziny AID/APOBEC (z wyjątkiem APOBEC3D oraz APOBEC4) [16, 63, 73-81].



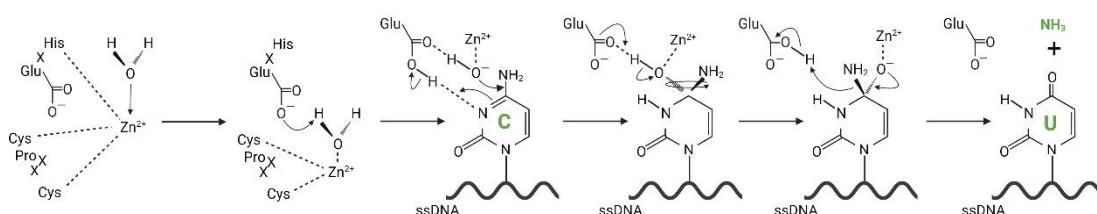
Rysunek 3. Struktura trzeciorzędowa białka APOBEC3A (PDB 5SWW).

Na rysunku oznaczono charakterystyczny dla rodziny AID/APOBEC układ struktur drugorzędowych: harmonijki β ($\beta 1$ - $\beta 5$), helisy α ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) oraz pętle zaangażowane w rozpoznawanie substratu (L1, L3, L5, L7) [11, 82]. Fioletowa kula przedstawia kation cynku koordynowany przez jedną resztę histydynową i dwie cysteinowe. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Wszystkie białka AID/APOBEC mają w swej strukturze trzeciorzędowej charakterystyczny układ struktur drugorzędowych (pięć harmonijek β i sześć helis α), które tworzą rdzeń domeny katalitycznej (ang. *catalytic domain*, CD) (rysunek 3) [83]. Jak wspomniano powyżej, centrum katalityczne tych białek tworzy motyw

aminokwasowy: His-X-Glu-X₂₃₋₂₈-Pro-Cys-X-Cys (X-dowolna reszta lub kilka reszt aminokwasowych), w którym jon Zn^{2+} jest koordynowany przez jedną resztę histydynową i dwie cysteinowe (rysunek 3) [57, 83].

Mechanizm deaminacji cytydyny przez białka AID/APOBEC został zaproponowany na podstawie badań nad bakteryjną deaminazą wolnej cytydyny i wydaje się być wspólny dla całej nadrodziny deaminaz cytydyny zależnych od cynku [58, 84]. Reakcja deaminacji rozpoczyna się od rozszczepienia i aktywacji cząsteczki wody przez zdeprotowaną resztę kwasu glutaminowego obecną w centrum katalitycznym. W wyniku rozszczepienia cząsteczki wody powstaje jon wodorotlenkowy stabilizowany przez kation cynku. Konserwatywna reszta glutaminowa, będąca donorem protonu, tworzy wiązanie wodorowe z azotem N3, co destabilizuje podwójne wiązanie między azotem N3 a atomem węgla C4 w pierścieniu cytydyny. W ten sposób C4 cytydyny staje się podatny na nukleofilowy atak jonu hydroksylowego. W wyniku tego ataku powstaje niestabilny produkt przejściowy. Produkt ten rozpada się, gdy grupa aminowa otrzymuje proton przechwycony przez resztę kwasu glutaminowego od grupy hydroksylowej. W konsekwencji następuje rozerwanie wiązania C-N i powstanie podwójnego wiązania między tlenem, a węglem C4 ($C=O$). Produktami reakcji są urydyna oraz amoniak (rysunek 4) [85-88].

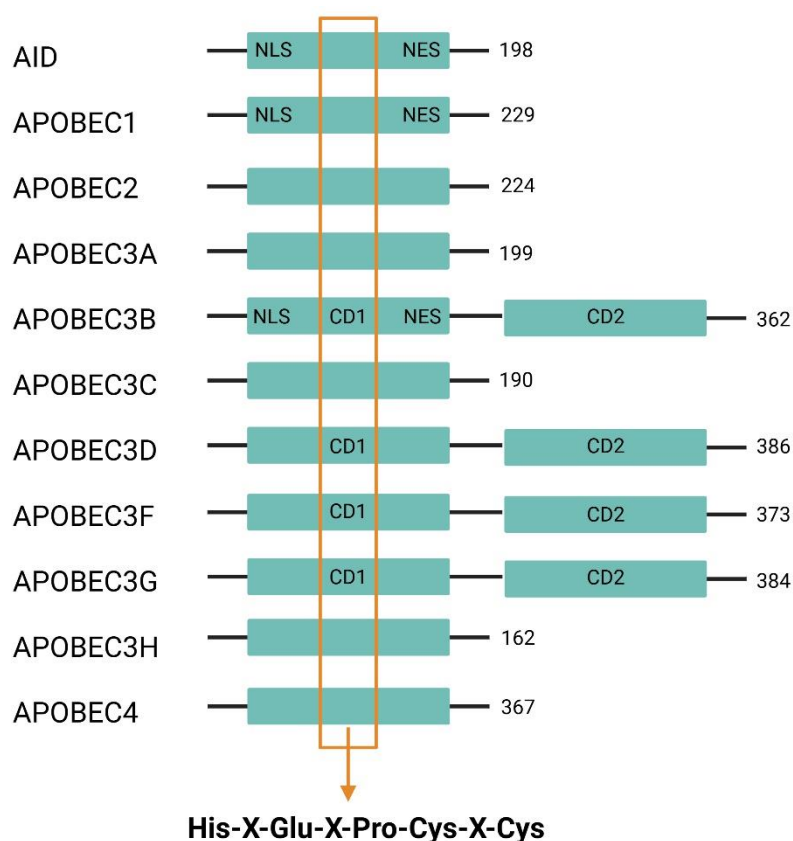


Rysunek 4. Proponowany mechanizm deaminacji cytydyny z udziałem białek AID/APOBEC. Produktami reakcji deaminacji cytydyny są urydyna oraz amoniak. Szczegółowy opis mechanizmu znajduje się w tekście. Na podstawie [85]. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Helisy α i harmonijki β są połączone dziesięcioma pętlami, które stanowią najmniej konserwatywne regiony w strukturze opisywanych białek. Szczególnie istotne są cztery pętle otaczające centrum katalityczne (pętle 1, 3, 7 oraz częściowo 5) [82]. Wykazano, że pętle te odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniach białek AID/APOBEC z ich substratami [75, 89-91]. Uważa się, że długość, skład aminokwasowy

czy plastyczność pętli determinują preferencję enzymu wobec określonego motywu strukturalnego oraz specyficzność białka wobec modyfikowanych lub niemodyfikowanych zasad. Większość deaminaz preferuje cytydynę w sekwencji 5'TC, podczas gdy APOBEC3G – 5'CC, a AID – 5'WRC (gdzie W=A/T, R=A/G) [75, 92-94]. Tabela 1 przedstawia preferowane motywy sekwencyjne poszczególnych białek AID/APOBEC. Właściwość tę wykorzystuje się w podejściach biotechnologicznych [95]. Zastąpienie pętli jednego białka AID/APOBEC pętlą innego przedstawiciela tej rodziny lub nawet zmiana pojedynczych reszt aminokwasowych pozwala zmodyfikować specyficzność substratową danej deaminazy. Na przykład, zastąpienie pętli 7 białka APOBEC3G pętlą pochodzącą od APOBEC3A skutkuje zmianą preferencji substratowej na charakterystyczną dla białka-dawcy (motyw 5'CC preferowany przez APOBEC3G, zostaje zastąpiony motywem 5'TC) [94]. Z kolei substytucja reszty asparaginowej resztą alaninową w pozycji 51 AID powoduje utratę zdolności tego enzymu do deaminacji cytydyny, przy jednoczesnym zachowaniu jego aktywności wobec 5-metylocytydyny [51].

Białka APOBEC3B, APOBEC3D, APOBEC3F oraz APOBEC3G posiadają dwie domeny katalityczne wiążące jon cynku. Co ciekawe, we wszystkich tych dwudomenowych enzymach, jedynie domena C-terminalna wykazuje aktywność katalityczną. Domena N-terminalna pozostaje nieaktywna, mimo obecności wszystkich elementów strukturalnych wymaganych do katalizowania reakcji deaminacji [63]. Układ domen poszczególnych przedstawicieli rodziny AID/APOBEC przedstawiono schematycznie na rysunku 5. Szereg badań sugeruje, że nieaktywne domeny pełnią funkcje regulatorowe. Na przykład, nieaktywna domena APOBEC3G uczestniczy w wiązaniu wirusowego RNA (co prowadzi do wbudowania tego białka do wirionów potomnych), podczas gdy aktywna domena jest odpowiedzialna za deaminację cytydyny [83].



Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie struktur poszczególnych białek AID/APOBEC. Zielone prostokąty reprezentują domeny katalityczne (w przypadku enzymów dwudomenowych oznaczone CD1 i CD2). Na końcach struktur umieszczono liczbę reszt aminokwasowych poszczególnych białek. Elementy strukturalne determinujące lokalizację subkomórkową obejmują sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) oraz sygnał eksportu jądrowego (NES) [96].

Niezależnie od zdolności białek AID/APOBEC do wiązania i deaminacji DNA i/lub RNA, ich aktywność jest uzależniona także od lokalizacji subkomórkowej (tabela 1). Podczas gdy niektóre kwasy nukleinowe, takie jak mRNA, czy wirusowy DNA/RNA, mogą być deaminowane zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie, deaminacja genomowego DNA gospodarza może zajść tylko w jądrze komórkowym. Na przykład, dwudomenowa deaminaza APOBEC3G ma zdolność do wiązania i deaminacji wirusowego DNA, ale jej aktywność wobec genomowego DNA jest ograniczona, ponieważ białko to jest zlokalizowane przede wszystkim w cytoplazmie [97]. Inni przedstawiciele omawianej rodziny mogą przemieszczać się między kompartmentami komórkowymi dzięki biernym lub aktywnym mechanizmom transportu. Przykładowo, AID i APOBEC1 na końcach N oraz C posiadają, odpowiednio, sygnały lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS) oraz eksportu z jądra (ang. *nuclear export signal*, NES), które umożliwiają transport tych białek między jądrem

a cytoplazmą [98, 99]. Z kolei APOBEC2 posiada region N-terminalny bogaty w reszty glutaminowe, które oddziałują z białkami transportowymi, co pozwala na zmianę lokalizacji tego enzymu [100]. APOBEC3A, APOBEC3C oraz APOBEC3H natomiast są wystarczająco małe i mogą swobodnie przemieszczać się w sposób bierny między jądrem a cytoplazmą [12].

Tabela 1. Charakterystyka białek rodziny AID/APOBEC pod względem preferowanych motywów sekwencyjnych, lokalizacji subkomórkowej, specyficzności tkankowej oraz funkcji biologicznej. Na podstawie [9, 10].

Białko	Preferowany motyw sekwencyjny	Lokalizacja subkomórkowa	Miejsce ekspresji genu	Funkcja biologiczna
AID	5'WRC (W=A/T, R=A/G)	Jądro/Cytoplazma	Limfocyty B, tkanka limfatyczna	Dojrzewanie przeciwciał
APOBEC1	5'TC w ssDNA 5'AC w RNA	Jądro/Cytoplazma	Przewód pokarmowy	Regulacja metabolizmu cholesterolu
APOBEC2	Nie ustalono	Jądro/Cytoplazma	Mięśnie (szkieletowe i sercowe), niektóre subpopulacje limfocytów B/T	Rozwój mięśni
APOBEC3A	5'TC	Jądro/Cytoplazma	Monocyty, makrofagi, szpik kostny, tkanka limfatyczna, drogi moczowe, pęcherz moczowy	Ochrona przed wirusami i retroelementami
APOBEC3B	5'TC	Jądro	Komórki wątroby aktywowane Inα, szpik kostny, przewód pokarmowy, nerki, układ moczowy, pęcherz	
APOBEC3C	5'TC	Jądro/Cytoplazma	Komórki krwi obwodowej, szpik kostny i	

			tkanka limfatyczna, skóra, mięśnie, gruczoł piersiowy, układ rozrodczy, nerki, układ moczowy i pęcherz, przewód pokarmowy, wątroba i pęcherzyk żółciowy, przewód pokarmowy, drogi oddechowe, tkanki endokrynne	
APOBEC3D	5'TC	Cytoplazma	Komórki krwi obwodowej, szpik kostny i tkanka limfatyczna, przewód pokarmowy, żeński układ rozrodczy	
APOBEC3F	5'TC	Cytoplazma	Komórki krwi obwodowej, komórki aktywowane interferonem alfa, szpik kostny, tkanka limfatyczna, układ rozrodczy, tkanki endokrynne, mięśnie	
APOBEC3G	5'CC	Cytoplazma	Komórki krwi obwodowej, komórki aktywowane interferonem alfa, szpik kostny i tkanka limfatyczna, tkanka piersi, układ rozrodczy, układ moczowy	

			i pęcherz, przewód pokarmowy, wątroba i pęcherzyk żółciowy, drogi oddechowe	
APOBEC3H	5' TC	Jądro/Cytoplazma	Komórki krwi obwodowej, szpik kostny, tkanka limfatyczna	
APOBEC4	Nie ustalono	Jądro/Cytoplazma	Jądra	Nie ustalono

1.5. APOBEC3A

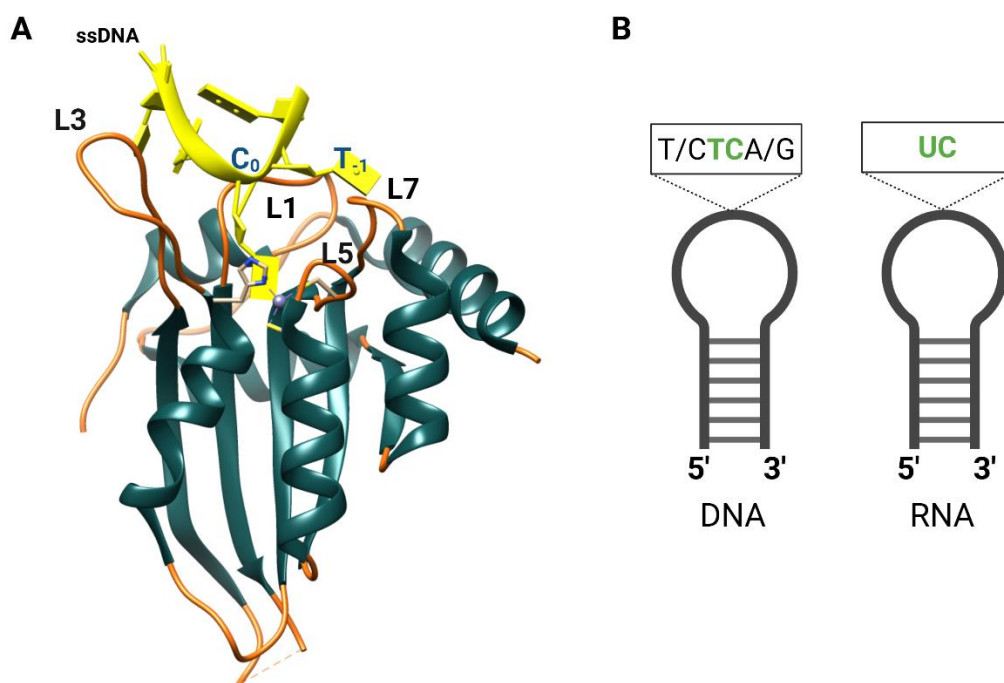
APOBEC3A jest najbardziej aktywnym przedstawicielem rodziny AID/APOBEC [49]. Deaminaza APOBEC3A to jednodomenowe białko o masie 23 kDa, które występuje zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie. Ekspresja kodującego ją genu nie zachodzi w sposób konstytutywny, lecz jest indukowana głównie w makrofagach i monocytach, w odpowiedzi na interferon alfa [101-104].

1.5.1. Specyficzność substratowa APOBEC3A

Obecnie wiadomo, że deaminaza APOBEC3A wykazuje zdolność do deaminacji cytydyny zarówno w ssDNA, jak i ssRNA [103, 105]. Przez dłuższy czas, mimo wykazania zdolności APOBEC3A do wiązania ssDNA i ssRNA, wyniki badań sugerowały brak aktywności deaminacyjnej APOBEC3A wobec ssRNA [106]. Przełom w tym zakresie nastąpił dzięki odkryciom Sharma i współpracowników, którzy jako pierwsi wykazali jej aktywność deaminacyjną wobec mRNA w monocytach i makrofagach [103, 107]. W związku z tym badania nad aktywnością APOBEC3A wobec DNA są znacznie bardziej zaawansowane w porównaniu do badań dotyczących jej aktywności wobec RNA.

Badania aktywności wobec syntetycznych substratów zawierających cytydynę w różnych kontekstach sekwencyjnych wykazały, że APOBEC3A preferuje substraty DNA zawierające motyw 5' TC [91, 93, 108]. Analizy strukturalne kompleksów APOBEC3A z ssDNA wykazały, że zarówno cytydyna, jak i tymidyna są zakotwiczone w kieszeni katalitycznej białka dzięki tworzeniu oddziaływań van der Waalsa oraz wiązań wodorowych z resztami aminokwasowymi (rysunek 6A) [93]. Uwarunkowania

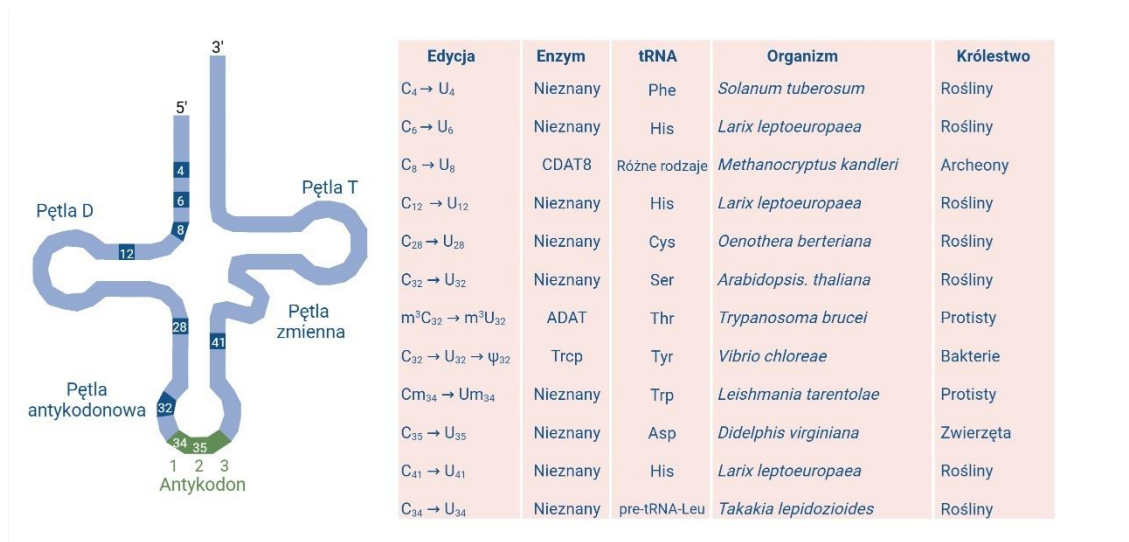
oddziaływań APOBEC3A z resztami nukleotydowymi oskrzydłającymi motyw 5'TC nie zostały jeszcze dokładnie poznane, choć wyniki badań biochemicznych *in vitro* wskazują, że preferowany jest kontekst 5'(T/C)TC(A/G) [108, 109]. Analizy strukturalne wykazały również, że liniowy substrat DNA po związaniu z APOBEC3A przyjmuje charakterystyczny kształt litery U, w którym tymidyna i cytydyna znajdują się w centrum. Obserwacje te doprowadziły do odkrycia, że oprócz motywu sekwencyjnego, na aktywność deaminazy APOBEC3A wpływa także struktura drugorzędowa substratu. Ustalono, że APOBEC3A preferuje struktury drugorzędowe DNA typu spinek do włosów (ang. *stem-loop structures*), w których deaminacji ulega cytydyna zlokalizowana w jednoniciowej pętli (rysunek 6B) [75, 93]



Rysunek 6. Specyficzność substratowa APOBEC3A. (A) Struktura trzeciorzędowa kompleksu APOBEC3A-ssDNA (PDB: 5SWW). Liniowy substrat DNA po związaniu z APOBEC3A przyjmuje charakterystyczny kształt litery U. Cytydyna (C₀) i poprzedzająca ją tymidyna (T₋₁) oddziałują z resztami aminokwasowymi pętli zaangażowanych w rozpoznawanie substratu (L1, L3, L5, L7), które pozwalają im wnikać w głąb centrum katalitycznego białka. (B) Struktura drugorzędowa substratów DNA i RNA preferowanych przez APOBEC3A. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Obecnie brak jest struktur kompleksów białko-substrat RNA. Na podstawie badań aktywności *in vitro* wobec syntetycznych cząsteczek RNA ustalono, że podobnie jak w przypadku DNA, APOBEC3A preferuje substraty RNA zawierające motyw 5'UC w drugorzędowych strukturach typu spinek do włosów (rysunek 6B) [110]. Odkrycie to otwiera pole do dalszych poszukiwań naturalnych substratów tego enzymu. Wymieniony motyw strukturalny jest bowiem bardzo powszechny w cząsteczkach RNA reprezentujących różne klasy. Szczególnie obficie występuje w tRNA, gdzie można znaleźć co najmniej trzy struktury typu spinki do włosów w jednej cząsteczce [111]. Powstaje zatem pytanie, czy mRNA jest jedyną klasą RNA podlegającą deaminacji przez APOBEC3A. Chociaż najlepiej poznanym przykładem edycji tRNA jest katalizowana przez deaminazę TadA/ADAT konwersja adenozy do inozyny, to edycja cytydyny do urydyny została również zidentyfikowana w różnych organizmach (rysunek 7) [112-116], jednak jest to zjawisko zdecydowanie rzadsze. Konwersji ulegają cytydyny zarówno w pętli antykodonowej (pozycje 32, 34 i 35), jak i w innych regionach tRNA (pozycje 4, 6, 8, 12, 28 i 41) (rysunek 7). Zmiany w obrębie antykodonu mogą zmieniać zestaw kodonów, które tRNA jest w stanie rozpoznać, natomiast edycja poza pętlą antykodonową jest prawdopodobnie związana ze zwiększoną stabilnością strukturalną cząsteczki tRNA [62, 113-121]. Enzymy odpowiedzialne za ten proces pozostają w dużej mierze nieznane. Wyjątki stanowią deaminazy CDAT8 i ADAT katalizujące konwersję, odpowiednio, cytydyny w pozycji 8 tRNA u *Methanopyrus kandleri* oraz 5-metylocytydyny w pozycji 32 tRNA u *Trypanosoma brucei* [62, 113, 122].

Dojrzałe cząsteczki tRNA ulegają enzymatycznej fragmentacji, głównie w obrębie pętli antykodonowej, tworząc krótsze pochodne, które ulegają akumulacji w komórkach i często mają znaczenie funkcjonalne. Ze względu na złożoną nomenklaturę tych cząsteczek, wszystkie ich podtypy będą tutaj określane zbiorczo jako fragmenty pochodzące z tRNA (ang. *tRNA-derived fragments*, tRFs). Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że tRF odgrywają kluczową rolę w wyciszaniu ekspresji genów, regulacji transkrypcji czy kontroli translacji [123]. Zaburzenia poziomu akumulacji tRF są związane z procesami patologicznymi, w tym z rozwojem nowotworów [124].

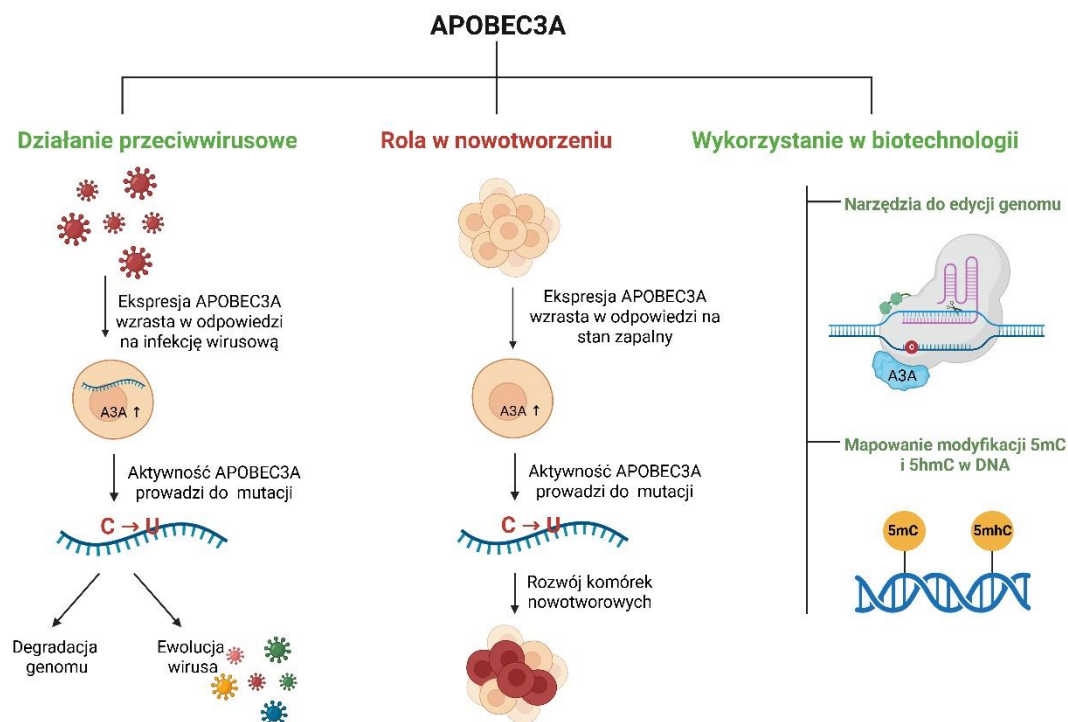


Rysunek 7. Przykłady edycji cytydyny do urydyny w różnych cząsteczkach tRNA, opisane dotychczas w literaturze. Pozycje 34, 35 i 36 zazwyczaj odpowiadają pierwszej, drugiej i trzeciej pozycji antykodonu, choć może to zależeć od długości tRNA. Zmieniono na podstawie [96].

APOBEC3A wykazuje także zdolność do deaminacji metylowanych reszt cytydynowych w ssDNA, 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny. Deaminacja tych zasad prowadzi odpowiednio do powstania tymidyny oraz 5-hydroksymetylouracydyny [50, 52, 53, 125]. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że wydajność deaminacji 5-metylocytydyny jest porównywalna z efektywnością klasycznej deaminacji cytydyny, natomiast aktywność enzymu wobec 5-hydroksymetylocytydyny jest istotnie niższa [53]. Czynniki determinujące różnice w aktywności APOBEC3A wobec tych trzech form cytydyny nie zostały jeszcze dokładnie poznane.

1.5.2. Rola APOBEC3A

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, aktywność deaminazowa APOBEC3A ma dwie zasadnicze konsekwencje. Pierwsza z nich to ograniczanie rozprzestrzeniania się wirusów oraz retroelementów, natomiast druga to rozwój procesów nowotworzenia [20, 74, 126-129]. Ze względu na wysoką aktywność enzymatyczną, białko to znajduje także swoje zastosowanie w biotechnologii (rysunek 8) [130, 131].



Rysunek 8. Rola białka APOBEC3A. Stworzono w serwisie BioRender.com.

1.5.2.1. Działanie przeciwwirusowe APOBEC3A

APOBEC3A wykazuje aktywność wobec DNA i RNA wirusów [104, 132]. Ze względu na to, że aktywność wobec DNA wykryto znacznie wcześniej niż wobec RNA, wpływ tego białka na wirusy DNA jest obecnie lepiej poznany. APOBEC3A pełni funkcję ochrony organizmu przed wirusami DNA na dwa wymienione wyżej sposoby: niezależnie od deaminacji oraz poprzez generowanie hipermutacji w kwasach nukleinowych [20, 133]. Pierwsze przeciwwirusowe właściwości APOBEC3A zostały opisane w odniesieniu do parwowirusów (wirusy ssDNA), takich jak wirus towarzyszący adenowirusom (ang. *adeno-associated virus*, AAV) i mały wirus myszy (ang. *minute virus of mice*, MVM). APOBEC3A hamuje replikację parwowirusów wykorzystując mechanizm niezależny od aktywności katalitycznej [20, 104]. Z kolei wirusy posiadające genom w postaci dwuniciowego DNA (ang. *double-stranded DNA*, dsDNA), u których wykryto hipermutacje wywołane przez APOBEC3A, obejmują wirusa zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*, HBV) oraz wirusa brodawczaka ludzkiego (ang. *human papilloma virus*, HPV) [23, 133]. Rola APOBEC3A w ograniczaniu infekcji wywoływanych przez retrowirusy jest wciąż dyskutowana. Wcześniejsze doniesienia literaturowe sugerowały, że deaminaza ta jest niezdolna do hamowania replikacji retrowirusów, w tym pierwszego ludzkiego wirusa niedoboru odporności

(ang. *human immunodeficiency virus-1*, HIV-1). Jednakże, wyniki najnowszych badań wskazują, że APOBEC3A może częściowo przeciwdziałać infekcji HIV-1 zarówno w sposób zależny, jak i niezależny od deaminacji [101, 104, 134]. Niedawno wykazano aktywność APOBEC3A wobec wirusa RNA SARS-CoV-2. W komórkach z ekspresją *APOBEC3A* zainfekowanych tym wirusem zaobserwowano liczne mutacje cytydyny do urydyny, zlokalizowane w strukturach drugorzędowych typu spinek do włosów genomowego RNA SARS-CoV-2, w kontekście sekwencyjnym preferowanym przez APOBEC3A (5'UC). Co ciekawe, nie wpływało to znacząco na ograniczenie replikacji wirusa. Przypuszcza się zatem, że APOBEC3A odgrywa rolę w generowaniu zmienności tego wirusa, co może wpływać na jego ewolucję [132, 135]. Oprócz wirusów, APOBEC3A hamuje także endogenne ruchome elementy genetyczne, takie jak LINE-1 (ang. *long interspersed nuclear element-1*), Alu i retrotranspozony z długimi powtórzeniami końcowymi (ang. *long terminal repeat*, LTR), poprzez mechanizmy zależne od deaminacji cytydyny lub od niej niezależne [104, 136].

1.5.2.2. Rola APOBEC3A w nowotworzeniu

Deaminaza APOBEC3A odgrywa kluczową rolę w powstawaniu mutacji, które przyczyniają się do niestabilności genomu i rozwoju procesów onkogennych [129, 137]. Inne białka z rodziny, chociaż w mniejszym stopniu, mogą wykazywać podobną rolę [109, 138, 139]. Przedstawicielom AID/APOBEC przypisuje się powstawanie mutacji cytydyny do tymidyny (C>T) oraz cytydyny do guanozyny (C>G) w motywach sekwencyjnych 5'TCN (N = A lub T). Mutacja C>T powstaje bezpośrednio w wyniku deaminacji cytydyny do urydyny i replikacji zmienionej nici, podczas gdy mutacja C>G jest wynikiem pośrednim działania polimerazy REV1 (ang. *reversionless 1*) podczas naprawy genomu. Polimeraza REV1 wbudowuje resztę cytydynową naprzeciwko miejsc apirymidynowych powstałych w wyniku deaminacji cytydyny i wycięcia uracylu [140]. Rodzaj mutacji w danym motywie sekwencyjnym jest określany mianem sygnatury mutacyjnej (ang. *single base substitution*, SBS). Mutacje C>T oraz C>G w motywie sekwencyjnym 5'TCN są charakterystyczne odpowiednio dla sygnatur SBS2 oraz SBS13. Sygnatury te należą do najbardziej typowych w nowotworach szyjki macicy, pęcherza moczowego, piersi, głowy i szyi oraz płuc [141-143].

Wyniki najnowszych badań wskazują na wiodącą rolę APOBEC3A w powstawaniu sygnatur SBS2 i SBS13. Przykładowo, w badaniach *in vitro* wykazano,

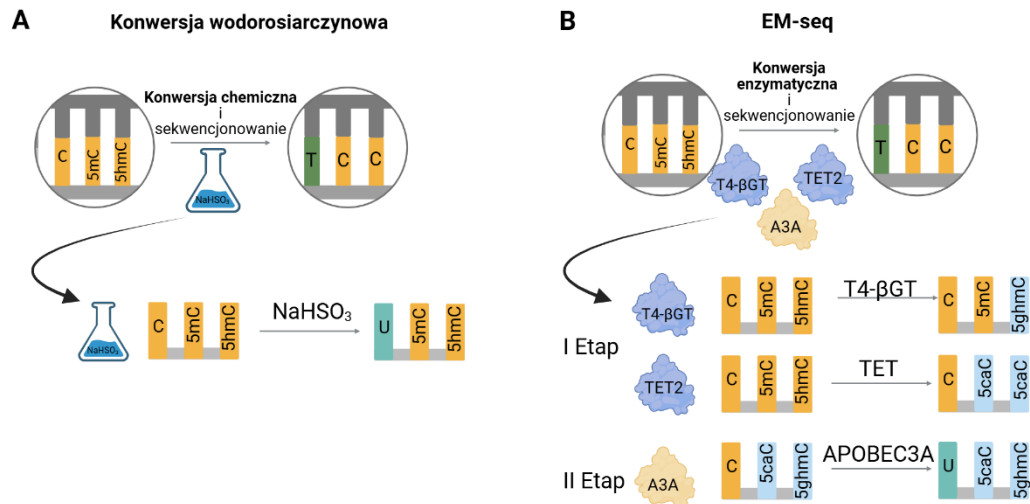
że wyciszenie genu *APOBEC3A*, zmniejsza sumaryczną liczbę mutacji w liniach komórkowych chłoniaka oraz nowotworu piersi [44]. Z kolei ekspresja *APOBEC3A* w drożdżach, ludzkich liniach komórkowych oraz modelach mysich wiąże się z pojawieniem się sygnatur SBS2 i SBS13 w genomie [128, 129, 138, 144]. Co więcej, w badaniach wykorzystujących dwa modele nowotworów u myszy wykazano wiodącą rolę *APOBEC3A* w rozwoju nowotworu. W pierwszym modelu, dotyczącym raka jelita grubego, ekspresja *APOBEC3A* prowadziła do zwiększonego tworzenia polipów. W drugim modelu, dotyczącym raka wątroby, ekspresja *APOBEC3A* znacząco zwiększała liczbę guzów wątrobowych [129]. Odkąd odkryto aktywność *APOBEC3A* wobec RNA, sugeruje się, że enzym ten może modyfikować nie tylko genomowy DNA, ale również mRNA i w ten sposób przyczyniać się do nowotworzenia. Analizy danych transkryptomicznych pacjentów z ostrą białaczką szpikową (ang. *acute myeloid leukemia*, AML) wykazały obecność zmian C>T, które nie były obecne w genomie [145, 146]. Mutacje związane z aktywnością *APOBEC3A* w nowotworach, zarówno w DNA, jak i transkryptach, w przeważającym stopniu pojawiają się w preferowanych przez ten enzym motywach sekwencyjnych oraz w kontekście przewidywanych struktur drugorzędowych typu spinki do włosów [147-149].

1.5.2.3. Wykorzystanie *APOBEC3A* w biotechnologii

Ze względu na wysoką aktywność deaminazową, *APOBEC3A* znajduje zastosowanie w systemach do edycji genomu i transkryptomu. Narzędzia edytujące zasady umożliwiają wprowadzenie substytucji pojedynczych nukleotydów w określonych miejscach zarówno w DNA, jak i RNA. Zasadniczo składają się one z dwóch modułów: enzymu zdolnego do edycji kwasów nukleinowych (edytora) oraz modułu kierującego, który dostarcza enzym do specyficznego miejsca w genomie lub transkrypcie. Narzędzia do edycji genomu zawierające *APOBEC3A* znajdują szerokie zastosowanie w naukach przyrodniczych, medycynie i biotechnologii. [130, 150-152]. W badaniach podstawowych wykorzystuje się je do modelowania chorób genetycznych wywołanych mutacjami pojedynczych nukleotydów oraz do badania funkcji genów – na przykład poprzez wprowadzanie przedwczesnego kodonu stop lub modyfikację kodonu start. Dzięki tym narzędziom udało się opracować m.in. model zespołu niewrażliwości na androgeny oraz albinizmu oczno-skórnego [152, 153]. W medycynie systemy do edycji genomu umożliwiają tworzenie innowacyjnych terapii genowych chorób związanych z mutacją pojedynczych nukleotydów. Na przykład, w układzie

in vitro, system złożony z APOBEC3A oraz modułu kierującego (nieaktywnej nukleazy Cas9 z przewodnim RNA (ang. *guide RNA*)) został zastosowany do naprawy odpowiedzialnej za β -thalasemię mutacji w promotorze genu hemoglobiny beta [130]. W biotechnologii systemy te pozwalają na modyfikację roślin uprawnych i mikroorganizmów produkujących biofarmaceutyki w celu poprawy ich cech użytkowych. Wykorzystano je na przykład do wprowadzenia mutacji w genie syntazy acetolaktatowej pszenicy, dla zapewnienia roślinie odporności na nikosulfuron – herbicyd o działaniu systemicznym [154].

Deaminaza APOBEC3A znalazła także zastosowanie w metodzie służącej do wykrywania miejsc występowania 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w genomie [131]. Ze względu na rolę metylowanych cytydyn w regulacji ekspresji genów, ich precyzyjne mapowanie ma kluczowe znaczenie dla rozwoju współczesnej epigenetyki [155]. Jedną z pierwszych metod wykrywania tych zmodyfikowanych reszt nukleotydowych była konwersja wodorosiarczynowa, która nadal jest powszechnie stosowana. Polega ona na chemicznej deaminacji cytydyn do urydyn, przy czym metylowane cytydyny pozostają nienaruszone (rysunek 9A) [156-158]. Mimo że jest uznawana za złoty standard, ma pewne ograniczenia. Do jej wad należy degradacja DNA podczas konwersji i jego utrata podczas oczyszczania, co przekłada się na niską wydajność tej metody, szczególnie w przypadku małych ilości analizowanego materiału genetycznego [159]. Alternatywne podejście stanowi enzymatyczne mapowanie 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny zaproponowane w metodzie EM-seq (ang. *enzymatic-methyl sequencing*), które eliminuje wcześniej wspomniane ograniczenia (rysunek 9B) [131]. Metoda EM-seq wykorzystuje aktywność trzech enzymów. W pierwszym etapie enzymy TET2 (ang. *ten-eleven-translocation methylcytosine dioxygenase 2*) i T4- β GT (ang. *T4-phage beta-glucosyltransferase*) przekształcają 5-metylocytydynę i 5-hydroksymetylocytydynę w produkty, których nie deaminuje APOBEC3A. W drugim etapie APOBEC3A przekształca niezmodyfikowane cytydyny do urydyn, które są odczytywane jako tymidyny podczas sekwencjonowania [131].



Rysunek 9. Metody wykrywania 5-metylocytydyny i 5-hydroksymetylocytydyny w genomie.

(A) Chemiczna konwersja wodorosiarczynowa – wodorosiarczyn powoduje deaminację cytydyn do urydyn, natomiast 5-metylocytydyny i 5-hydroksymetylocytydyny pozostają nienaruszone. Po sekwencjonowaniu możliwe jest rozróżnienie cytydyny od 5-metylocytydyny i 5-hydroksymetylocytydyny. (B) Enzymatyczna konwersja Em-seq – wykorzystuje aktywność trzech enzymów. W pierwszym etapie T4-βGT zabezpiecza 5-hydroksymetylocytydynę przez glikozylację w wyniku czego powstaje 5-glukozylohydroksymetylocytydyna (5ghmC), natomiast enzym TET2 katalizuje wieloetapowe utlenianie 5-metylocytydyny i 5-hydroksymetylocytydyny do 5-karboksylocytydyny (5caC). Produkty obydwu reakcji w tym etapie nie są substratami APOBEC3A. W drugim etapie APOBEC3A deaminuje niezmodyfikowane cytydyny do urydyn, które podczas sekwencjonowania są odczytywane jako tymidyny. Stworzono w serwisie BioRender.com.

2. Cel pracy

Deaminaza APOBEC3A odgrywa istotną rolę biologiczną, która zgodnie z obecnym stanem wiedzy, wynika przede wszystkim ze zdolności tego enzymu do deaminacji cytydyny do urydyny w ssDNA. Dodatkowo APOBEC3A wykazuje także zdolność do deaminacji 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w ssDNA. Aktywność APOBEC3A wobec cytydyn zlokalizowanych w strukturach typu spinki do włosów w mRNA została odkryta zaledwie kilka lat przed rozpoczęciem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy. Odkrycie to poszerzyło dotychczasową wiedzę na temat funkcji APOBEC3A i stało się inspiracją do rozważenia, czy enzym ten wykazuje aktywność również wobec innych klas RNA. Biorąc pod uwagę, że: (i) rodzina AID/APOBEC wywodzi się od deaminaz tRNA, (ii) motyw spinki do włosów jest kluczowym elementem struktury drugorzędowej tRNA, (iii) u niektórych organizmów stwierdzono edycję cytydyny do urydyny w tej klasie cząsteczek, postawiono hipotezę, że tRNA jest substratem dla deaminazy APOBEC3A. Weryfikacja tej hipotezy stała się zasadniczym celem niniejszej rozprawy. Osiągnięcie tego celu wymagało realizacji następujących zadań szczegółowych:

- 1) opracowania metody produkcji APOBEC3A typu dzikiego wykazującej aktywność deaminazową *in vitro* i jej wariantu nieaktywnego katalitycznie;
- 2) opracowania ilościowych i jakościowych metod testowania aktywności APOBEC3A wobec substratów DNA i RNA (zarówno zawierających cytydynę, jak i jej metylowane pochodne: 5-metylocytydynę i 5-hydroksymetylocytydynę);
- 3) przeprowadzenia analizy aktywności APOBEC3A wobec cytydyny w natywnych cząsteczkach tRNA *in vitro*;
- 4) przeprowadzenia analizy występowania edycji cytydyny do urydyny w tRNA *in vivo*;
- 5) przeprowadzenia analizy aktywności APOBEC3A wobec metylowanych pochodnych cytydyny w wybranych cząsteczkach RNA *in vitro*.

3. Materiały i metody

3.1. Wykaz materiałów stosowanych w pracy

3.1.1. Podstawowe odczynniki, materiały, enzymy, wzorce mas oraz zestawy gotowych odczynników

Tabela 2. Zestawienie podstawowych odczynników

Odczynnik	Producent
40% akrylamid/N,N'-metylenobis-akrylamid	BioShop
Agar	Serva
Agaroza	BioShop
Ampicylina	BioShop
Błękit bromofenolowy	BioShop
Bufor 10× TBE (Tris/kwas borowy/EDTA)	Novex
Bufor 10× TGS (Tris/glicyna/SDS)	Bio-Rad
Bufor 6× DNA Gel Loading Dye	Thermo Scientific™
Chloramfenikol	BioShop
Chlorek cynku (ZnCl ₂)	Sigma-Aldrich
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich
Chlorek sodu (NaCl)	BioShop
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	BioShop
Etanol (96% CZDA)	Chempur
Glicerol	Thermo Scientific™
Glutation zredukowany	Sigma-Aldrich
HEPES, pH=7,2	Thermo Scientific™
izopropylo-β-D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG)	BioShop
Kanamycyna	BioShop
Kwas etylenodiamino-tetraoctowy (EDTA)	BioShop
Kwas octowy	Chempur
MES, pH=6,2	Thermo Scientific™
Metanol	Chempur
Midori Green Advanced DNA stain	Nippon Genetics
Mix dNTP (roztwory wodne dATP, dCTP, dGTP i dTTP, każdy o końcowym stężeniu 10 mM)	Thermo Scientific™
Mocznik	BioShop

Nadsiarczan amonu (APS)	BioShop
Octan sodu	Sigma-Aldrich
PBS	Gibco
Pepton	BioShop
Serva Blue R-250	SERVA
Sybr TM Gold	Invitrogen TM
Tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Roth
Tris(2-karboksyetylo)fosfina (TCEP)	BioShop
Tris	BioShop
Tris-HCl, pH=6,8	Invitrogen TM
Tris-HCl, pH=8,0	Invitrogen TM
Tris-HCl, pH=8,8	Invitrogen TM
Woda ultraczysta – otrzymana przy zastosowaniu systemu TKA GenPure (do przygotowywania buforów i roztworów, żeli, pożywek)	Thermo Scientific TM
Woda wolna od nukleaz (do reakcji enzymatycznych)	Ambion
Wodorotlenek sodu (NaOH)	Polskie Odczynniki Chemiczne
Wyciąg drożdżowy	BioShop
B-merkaptoetanol	Merck

Tabela 3. Zestawienie materiałów

Materiał	Producent
Amicon [®] Ultra Centrifugal Filter, 10 kDa MWCO	Millipore
Costar [®] Spin-X [®] Centrifuge Tube Filters	Corning
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent
High Sensitivity RNA ScreenTape	Agilent
SnakeSkin TM Dialysis Tubing, 10 kDa MWCO	Thermo Scientific TM
Złoże glutationowe Glutathione Sepharose TM 4 Fast Flow	Cytiva
Złoże Superdex75 16/60 HiLoad	Cytiva

Tabela 4. Zestawienie enzymów

Enzym	Producent
Benzonaza (250 U/μl)	Merck
Enzym restrykcyjny FastDigest: SpeI (10 U/μl)	Thermo Scientific™
Enzym restrykcyjny FastDigest: XhoI (10 U/μl)	Thermo Scientific™
Glikozylaza UDG (1 U/μl)	Thermo Scientific™
Kinaza polinukleotydowa T4 (10 U/μl)	Thermo Scientific™
Ligaza dsDNA: T4 RNA Ligase 2 (10 U/μl)	NEB
Ligaza T4 DNA (5 U/μl)	Thermo Scientific™
Polimeraza DNA: Phusion Hot Start II (2 U/μl)	Thermo Scientific™
SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen™
Trombina (500 U/μl)	Amersham Bioscience

Tabela 5. Zestawienie wzorców mas

Wzorzec mas	Producent
CRL (ang. <i>custom RNA ladder</i>)	Illumina
DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	Sigma-Aldrich
High Sensitivity D1000 Ladder	Agilent
High Sensitivity RNA ScreenTape Ladder	Agilent
HRL (ang. <i>high resolution ladder</i>)	Illumina
Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards	Invitrogen™
Perfect Tricolor Protein Ladder	Eurx®

Tabela 6. Zestawy odczynników

Zestaw odczynników	Producent
Zestaw do izolacji całkowitego RNA oraz krótkich RNA: mirVana™miRNA Isolation Kit	Invitrogen™
Zestaw do izolacji plazmidów w małej skali: Plasmid Mini Kit	Qiagen
Zestaw do oczyszczania kwasów nukleinowych: QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Zestaw do oczyszczania oligonukleotydów: Oligo Clean & Concentrator	Zymo Research

Zestaw do pomiaru stężenia metodą fluorometryczną: Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit	Invitrogen™
Zestaw do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania NGS: TruSeq® Small RNA Library Prep Kit	Illumina
Zestaw do trawienia DNA i RNA: Nucleoside Digestion Mix	NEB

3.1.2. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy DNA pełniące rolę starterów podczas reakcji amplifikacji lub odwrotnej transkrypcji były syntetyzowane przez firmę Genomed S.A.

Oligonukleotydy pełniące rolę adapterów w sekwencjonowaniu YAMAT-seq (*ang. Y-shaped Adapter-ligated MAture TRNA sequencing*) były syntetyzowane przez firmę Integrated DNA Technologies (IDT).

Oligonukleotydy do badania aktywności APOBEC3A były syntezowane przez firmę FutureSynthesis.

Tabela 7. Zestawienie oligonukleotydów

Oligonukleotyd	Sekwencja
DNA	
F_05_A3ApET42a	ATACTAGTCTGGTTCCGCGTGGATCCCACCATCATCAT CATCATGA
R_03_A3ApET42a	ATCTCGAGCTATTAATTACCCTGATTCTGCAG
Y-3'-AD	[P]GTATCCAGTTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG[3ddC]
Y-5'-AD-A	G TTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCACTGGATACTG GA
Y-5'-AD-G	G TTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCACTGGATACTG GG
Y-5'-AD-C	G TTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCACTGGATACTG GC
Y-5'-AD-T	G TTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCACTGGATACTG GU

Oligo_dC	GGATTGGTTGGTTATTTGTTTAAGGAAGGTGGATTAAA ATCTTAATAAGGTGATGGAAGTTATGTTTGGTAGATTG ATGG
Oligo_5mdC	GGATTGGTTGGTTATTTGTTTAAGGAAGGTGGATTAAA AT[5mC]TTAATAAGGTGATGGAAGTTATGTTTGGTAGA TTGATGG
Oligo_5hmdC	GGATTGGTTGGTTATTTGTTTAAGGAAGGTGGATTAAA AT[5hmC]TTAATAAGGTGATGGAAGTTATGTTTGGTAG ATTGATGG
Oligo_dU	GGATTGGTTGGTTATTTGTTTAAGGAAGGTGGATTAAA ATUTTAATAAGGTGATGGAAGTTATGTTTGGTAGATTG ATGG
RNA	
SDHB_rC	CCAUCUAUCGAUGG
SDHB_m5rC	CCAUCUAU[m5C]GAUGG
SDHB_hm5rC	CCAUCUAU[hm5C]GAUGG
tRNA-Asp-GTC-m5rC	UCCUCGUUAGUAUAGUGGUGAGUAUCCCCGCCUGU CAm5CGCGGGAGACCGGGGUUCGAUCCCCGACGGG GAGCCA
tRNA-Gly-GCC-m5rC	GCAUUGGUGGUUCAGUGGUAGAAUUCUCGCCUGCC Am5CGCGGGAGGCCCGGGUUCGAUCCCCGGCCAAUG CACCA
tRNA-Val-IAC-m5rC	GUUUCCGUAGUGUAGUGGUUAUCACGUUCGCCUIAC Am5CGCGAAAGGUCCCCGGUUCGAAACCGGGCGGAA ACACCA
tRNA-Leu-CAA-m5rC	GUCAGGAUGGCCGAGUGGUCUAAGGCGCCAGACUm5 CAAGUUCUGGUCUCCGGAUGGAGGCGUGGGUUCGA AUCCCACUUCUGACACCA

[P] – grupa monofosforanowa

[3ddC] – 3' dideoksy-C

GA/GG/GC/GU – rybonukleotydy

3.1.3. Plazmidy

Tabela 8. Zestawienie plazmidów

Nazwa	Rodzaj wektora	Firma
pET42a(+)	Wektor ekspresyjny	Sigma-Aldrich
pGEX4T1_E72A_A3A	Wektor ekspresyjny	GeneArt
pMK_WT_A3A	Wektor replikacyjny	GeneArt

3.1.4. Szczepy bakteryjne i linie komórkowe

- Szczep bakteryjny do namnażania plazmidów: *E.coli* One shot® TOP10 (Invitrogen™)
- Szczep bakteryjny do produkcji białka: *E.coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen™)
- linia ludzkich embrionalnych komórek typu epitelialnego pochodzących z nerki (ang. *human embryonic kidney*, HEK293T) (ATCC)

Tabela 9. Zestawienie używanych szczepów bakteryjnych i linii komórkowych oraz zastosowanie warunków hodowli

Szczep bakteryjny/linia komórkowa	Plazmid	Antybiotyk	Pożywka
<i>E.coli</i> One shot® TOP10 (Invitrogen™)	pET42a(+)	kanamycyna	- pożywka płynna LB - pożywka stała LB
<i>E.coli</i> One shot® TOP10 (Invitrogen™)	pGEX4T1	ampicylina	- pożywka płynna LB - pożywka stała LB
<i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS (Invitrogen™)	pET42a(+)	kanamycyna, chloramfenikol	-pożywka płynna LB
<i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS (Invitrogen™)	pGEX4T1	ampicylina, chloramfenikol	-pożywka płynna LB

3.1.5. Roztwory i bufor

Tabela 10. Bufory do oczyszczania białek

Nazwa buforu	Odczynniki i ich stężenia
Bufor do oczyszczania białek na złożu glutationowym – bufor do lizy (BL)	1× PBS, pH=7,2 0,2 M NaCl 1 mM TCEP
Bufor do oczyszczania białek na złożu glutationowym – bufor 1 do przemywania (BP1)	1× PBS, pH=7,2 0,1 M NaCl 1 mM TCEP

Bufor do oczyszczania białek na złożu glutationowym – bufor 2 do przemywania (BP2)	50 mM Hepes, pH=7,2 1 mM TCEP 1M NaCl
Bufor do oczyszczania białek na złożu glutationowym – bufor 3 do przemywania (BP3)	50 mM Hepes, pH=7,2 1 mM TCEP 0,1 M NaCl
Bufor do oczyszczania białek na złożu glutationowym – bufor do elucji (BE)	50 mM Hepes, pH=7,2 1 mM TCEP 0,1 M NaCl 10 mM zredukowany glutation
Bufor do sączenia molekularnego (BSM)	50 mM Hepes, pH=7,2 1 mM TCEP 0,1 M NaCl

Tabela 11. Bufory do badania aktywności APOBEC3A

Nazwa buforu	Odczynniki i ich stężenia
10x stężony bufor do badania aktywności APOBEC3A	0,5 M MES, pH=6,2 10 mM TCEP 1 M NaCl
10x stężony bufor do badania aktywności APOBEC3A wobec tRNA	0,5 M MES, pH=6,2 10 mM TCEP 1 M NaCl 5 mM MgCl ₂

Tabela 12. Roztwory i bufory wykorzystywane w analizach kwasów nukleinowych i białek w żelach poliakrylamidowych

Nazwa roztworu	Odczynniki i ich stężenia
Roztwór do wybarwiania białek rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym – roztwór barwiący	50% metanol 10% kwas octowy 0,125% Serva Blue R-250
Roztwór do wybarwiania białek rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym – roztwór odbarwiający	5% metanol 12,5% kwas octowy

4× stężony bufor (4× SB) do rozdzielania białek w żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących	250 mM Tris-HCl, pH=6,8 20% β-merkaptotanol 8% SDS 0,15% błękit bromofenolowy 40% glicerol
2× stężony bufor obciążający (2× BB) do rozdzielania elektroforetycznego kwasów w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących	0,25% błękit bromofenolowy 7 M mocznik

Tabela 13. Bufor do przygotowania bibliotek tRNA do sekwencjonowania NGS

Nazwa buforu	Odczynniki i ich stężenia/objętości
10× bufor do hybrydyzacji YAMAT-seq	50 mM Tris-HCl, pH=8,0 5mM EDTA 100 mM MgCl ₂

3.1.6. Pożywki

Pożywka płynna SOC

- gotowy roztwór dostarczony w zestawie z komórkami kompetentnymi *E.coli* OneShot TOP10

Pożywka płynna LB

- 10 g peptonu
- 5 g wyciągu drożdżowego
- 5 g NaCl
- dopełniano wodą ultraczystą do objętości końcowej 1 l i sterylizowano w autoklawie

Pożywka płynna LB z kanamycyną

- 1 l płynnej pożywki LB
- 1 ml roztworu kanamycyny o stężeniu 30 mg/ml

Pożywka płynna LB z ampicyliną

- 1 l płynnej pożywki LB
- 2 ml roztworu ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml

Pożywka płynna LB z kanamycyną i chloramfenikolem

- 1 l płynnej pożywki LB
- 1 ml roztworu kanamycyny o stężeniu 30 mg/ml
- 1 ml roztworu chloramfenikolu o stężeniu 34 mg/ml

Pożywka płynna LB z ampicyliną i chloramfenikolem

- 1 l płynnej pożywki LB
- 2 ml roztworu ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml
- 1 ml roztworu chloramfenikolu o stężeniu 34 mg/ml

Pożywka stała LB z kanamycyną

- 1 g peptonu
- 1,25 g wyciągu drożdżowego
- 1,25 g NaCl
- 3,75 g agaru
- dopełniano wodą ultraczystą do objętości końcowej 250 ml i sterylizowano w autoklawie
- 250 µl roztworu kanamycyny o stężeniu 30 mg/ml (po schłodzeniu pożywki do 55°C)

Pożywka stała LB z ampicyliną

- 1 g peptonu
- 1,25 g wyciągu drożdżowego
- 1,25 g NaCl
- 3,75 g agaru
- dopełniano wodą ultraczystą do objętości końcowej 250 ml i sterylizowano w autoklawie
- 500 µl roztworu ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml (po schłodzeniu pożywki do 55°C)

3.1.7. Żele

Żel agarozowy 1% do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych

- 0,5 g agarozy
- 50 ml buforu 0,5× TBE

Agarozę rozpuszczano przez podgrzanie w kuchence mikrofalowej, po czym schładzano, dodawano 1 µl Midori Green Advanced DNA stain i wylewano do aparatu do elektroforezy. Podane objętości odczynników są wystarczające na jeden żel o wymiarach 7 cm × 11 cm.

Żele poliakrylamidowe do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących

➤ Żel rozdzielający 12%

- 3,6 ml 40% akrylamid/N,N'-metylenobis-akrylamid
- 4,4 ml 1M buforu Tris-HCl, pH=8,8
- 120 µl 10% SDS
- 120 µl 10% APS
- 6 µl TEMED
- 2,98 ml woda ultraczysta

Żel rozdzielający wylewano między szyby i spryskiwano 1% SDS, pozostawiano do polimeryzacji.

➤ Żel zagęszczający 5%

- 625 µl 40% akrylamid/N,N'-metylenobis-akrylamid
- 630 µl 1M buforu Tris-HCl, pH=6,8
- 50 µl 10% SDS
- 50 µl 10% APS
- 5 µl TEMED
- 3,6 ml woda ultraczysta

Żel zagęszczający wylewano na warstwę wcześniej spolimeryzowanego żelu, rozdzielającego, pozostawiono do polimeryzacji. Podane objętości odczynników są wystarczające na dwa żele o wymiarach 7,5 cm × 6,5 cm.

Żel poliakrylamidowy 15% do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących

- 18,75 ml 40% akrylamid/N,N'-metylenobis-akrylamid
- 5 ml buforu 10× TBE
- 21 g mocznika
- dopełniano wodą ultraczystą do 50 ml
- 300 µl 10% APS
- 32 µl TEMED

Wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji. Podane objętości odczynników są wystarczające do przygotowania żelu o wymiarach 13 cm x 19,5 cm.

Żel poliakrylamidowy 8% do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących

- 10 ml 40% akrylamid/N,N'-metylenobis-akrylamid
- 5 ml buforu 10× TBE
- 21 g mocznika
- dopełniano wodą ultraczystą do 50 ml
- 300 µl 10% APS
- 32 µl TEMED

Wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji. Podane objętości odczynników są wystarczające do przygotowania żelu o wymiarach 13 cm x 19,5 cm.

Żel poliakrylamidowy 8% do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych

- 4 ml 40% akrylamid/N,N'-metylenobis-akrylamid
- 2 ml buforu 10× TBE
- dopełniano wodą ultraczystą do 20 ml
- 120 µl 10% APS
- 12,8 µl TEMED

Wylewano między szyby i pozostawiano do polimeryzacji. Podane objętości odczynników są wystarczające do przygotowania 2 żeli o wymiarach 7,5 cm x 6,5 cm.

3.2. Wykaz metod stosowanych w pracy

3.2.1. Cięcie enzymami restrykcyjnymi typu FastDigest produktów PCR oraz plazmidów

Cięcie restrykcyjne stosowano w celu przygotowania wektora i insertu do ligacji (podrozdział 3.2.5.). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 14. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 1 h w temperaturze 37°C.

Tabela 14. Skład mieszaniny reakcyjnej cięcia enzymami restrykcyjnymi typu FastDigest

Odczynnik	Ilość
dsDNA	0,1 – 0,1 µg
Bufor 10x <i>FastDigest</i> *	1 µl
Enzym <i>FastDigest</i>	5 – 10 U
Woda wolna od nukleaz	Do 10 µl

*dostarczony przez producenta wraz z enzymami

Produkty trawienia enzymatycznego oczyszczano z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification Kit (podrozdział 3.2.10.1.) i analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (podrozdział 3.2.11.5.).

3.2.2. Deacylacja tRNA

Reakcję deacylacji tRNA prowadzono 40 minut w temperaturze 37°C w 0,1M buforze Tris-HCl, pH=8,8. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 15. tRNA oczyszczano metodą strącaniową (podrozdział 3.2.10.3.). Stężenie oczyszczonego tRNA mierzono metodą spektrofotometryczną (podrozdział 3.2.11.2.).

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej deacylacji

Odczynnik	Ilość
tRNA	1 µg
1M Tris-HCl, pH=8,8	5 µl
Woda wolna od nukleaz	Do 50 µl

3.2.3. Defosforylacja końców 5' liniowego plazmidu

Reakcję defosforylacji końców 5' liniowego plazmidu prowadzono 20 minut w temperaturze 37°C, a następnie dezaktywowano enzym 5 minut w temperaturze 75°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej defosforylacji końców liniowego DNA

Odczynnik	Ilość
Liniowy plazmid	1 µg
Bufor 10x <i>Buffer B</i> *	2 µl
Kinaza polinukleotydowa T4 (10 U/µl)	1 µl
Woda wolna od nukleaz	Do 20 µl

*dostarczony przez producenta wraz z enzymem

3.2.4. Ligacja adapterów z tRNA

Ligację adapterów z tRNA przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną w metodzie YAMAT-seq [160]. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz poszczególne etapy i warunki reakcji przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Skład mieszaniny, etapy oraz warunki ligacji adapterów do tRNA

Etap	Warunki	Odczynnik	Ilość
Denaturacja	90°C 2 min	Adapter: Y-5'-AD-A	10 pmol
		Adapter: Y-5'-AD-G	10 pmol
		Adapter: Y-5'-AD-C	10 pmol
		Adapter: Y-5'-AD-T	10 pmol
		Adapter: Y-3'-AD	40 pmol
		deacylowany tRNA	100 ng
		Woda wolna od nukleaz	do 9 µl
Hybrydyzacja	37°C 15 min	10x bufor do hybrydyzacji YAMAT-seq*	1 µl
Ligacja	37°C	10x T4 RnL2 Reaction Buffer** Ligaza T4 RNA Ligase 2 Woda wolna od nukleaz	1 µl
	1 godzina		1 µl
	↓		1 µl
	4°C 16 godzin		8 µl

*skład buforu zamieszczono w tabeli 13

**dostarczony przez producenta wraz z enzymem

3.2.5. Ligacja z wektorem pET42a(+)

Reakcję ligacji z wektorem pET42a(+) prowadzono z wykorzystaniem ligazy DNA T4. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 18. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 16 godzin w temperaturze 4°C.

Tabela 18. Skład mieszaniny reakcyjnej ligacji do wektora pET42a(+)

Odczynnik	Ilość
Liniowy wektor pET42a(+)	100 ng
Insert	Do stosunku molowego insert/wektor równego 3/1
Bufor 10× <i>T4 DNA Ligase buffer</i> *	1 µl
Ligaza T4 DNA (5 U/µl)	1 µl
Woda wolna od nukleaz	do 10 µl

*dostarczony przez producenta wraz z enzymem

3.2.6. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcję PCR (ang. *polymerase chain reaction*) wykorzystywano do powielania fragmentów DNA, wprowadzania do nich miejsc restrykcyjnych lub innych elementów (np. kodujących miejsce rozpoznawane przez trombinę). W doświadczeniach stosowano polimerazę DNA Phusion Hot Start II, która charakteryzuje się wysoką dokładnością kopiowania. Skład oraz warunki reakcji przedstawiono odpowiednio w tabeli 19. oraz 20. Reakcje prowadzono w termocyklerze T100 (Bio-Rad).

Tabela 19. Skład mieszaniny reakcyjnej z wykorzystaniem polimerazy Phusion Hot Start II

Odczynnik (stężenie początkowe)	Ilość (stężenie końcowe)
Matryca DNA	1-100 ng
Starter <i>forward</i>	15 pmol (0,5 µM)
Starter <i>reverse</i>	15 pmol (0,5 µM)
Bufor reakcyjny 5× Phusion HF buffer*	10 µl
Mix dNTPs (10 mM)	1 µl
Polimeraza DNA: Phusion Hot Start II (2 U/µl)	0,5 µl (1 U)
Woda wolna od nukleaz	do 50 µl

*dostarczony przez producenta wraz z zestawem

Tabela 20. Warunki reakcji z wykorzystaniem polimerazy Phusion Hot Start II

Numer etapu	Etap	Czas trwania	Temperatura	Liczba cykli
1	Denaturacja	30 s	98°C	1
2	Denaturacja	10 s	98°C	30
	Hybrydyzacja	30 s	(T _M)*	
	Elongacja	30 s	72°C	
3	Elongacja	7 min	72°C	1

*wartość zależna od temperatury topnienia starterów (T_M obliczono w wykorzystaniem narzędzia T_M Calculator

Produkty reakcji PCR oczyszczano z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification Kit (podrozdział 3.2.10.1.) i analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym (podrozdział 3.2.11.5.).

3.2.7. Przygotowanie bibliotek tRNA do sekwencjonowania NGS

Biblioteki tRNA do sekwencjonowania NGS (ang. *next generation sequencing*) przygotowano zgodnie z protokołem YAMAT-seq, który obejmował cztery główne etapy [160]. W pierwszym etapie usuwano aminokwasy z dojrzałych cząsteczek tRNA (podrozdział 3.2.2.). Następnie do cząsteczek tRNA dołączano adaptory (podrozdział 3.2.4). Kolejnym krokiem była odwrotna transkrypcja oraz amplifikacja komplementarnego DNA (ang. *complementary DNA*, cDNA), przeprowadzana przy użyciu zestawu TruSeq Small RNA Library Prep zgodnie z zaleceniami producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji odwrotnej transkrypcji przedstawiono w tabeli 21, natomiast skład reakcji amplifikacji cDNA oraz warunki jej przeprowadzenia przedstawiono w tabelach 22 i 23. Wszystkie reakcje prowadzono w termocyklerze T100 (Bio-Rad).

Tabela 21. Skład mieszaniny oraz warunki odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu TruSeq Small RNA Library Prep

Etap	Warunki	Odczynnik	Ilość
Denaturacja	70°C 2 min	tRNA z dołączonymi adapterami*	6 µl
		RT Primer	1 µl
Odwrotna transkrypcja	50°C 1 godzina	5x First Strand Buffer**	2 µl
		12,5 mM dNTP Mix	0,5 µl
		100 mM DTT	1 µl
		RNase Inhibitor	1 µl
		SuperScript II Reverse	1 µl
		Transcriptase	1 µl

*ligację adapterów z tRNA przeprowadzono zgodnie z protokołem zawartym w podrozdziale 3.2.4.

**dostarczony wraz z enzymem przez producenta

Tabela 22. Skład mieszaniny amplifikacji cDNA z wykorzystaniem zestawu TruSeq Small RNA Library Prep

Odczynnik	Ilość
cDNA*	12,5 µl
Woda wolna od nukleaz	8,5 µ
PML	25 µl
RP1	2 µl
RPX**	2 µl

*cDNA uzyskany w odwrotnej transkrypcji (tabela 21)

**RPX-starter z odpowiednim indeksem do sekwencjonowania

Tabela 23. Warunki reakcji amplifikacji cDNA z wykorzystaniem zestawu TruSeq Small RNA Library Prep.

Etap	Temperatura	Czas trwania	Liczba cykli
Denaturacja	98°C	30 s	1
Denaturacja	98°C	10 s	11
Hybrydyzacja	60°C	30 s	
Elongacja	72°C	15 s	
Elongacja	72°C	10 min	1

Produkty amplifikacji cDNA oczyszczano w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (podrozdział 3.2.10.4.). Stężenie uzyskanych bibliotek mierzono metodą fluorometryczną (podrozdział 3.2.11.1.), a rozkład wielkości fragmentów analizowano z wykorzystaniem systemu TapeStation (Agilent) zgodnie z opisem zawartym w podrozdziale 3.2.11.3. Biblioteki łączono do końcowego stężenia 2 nM każdej z nich. Sekwencjonowanie NGS zostało przeprowadzone w Pracowni Genomiki w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN z wykorzystaniem sekwenatora NovaSeq 6000 (Illumina).

3.2.8. Trawienie DNA i RNA do nukleozydów

Reakcję trawienia DNA i RNA przeprowadzano z wykorzystywaniem zestawu Nucleoside Digestion Mix. Trawienie do pojedynczych nukleozydów stosowano w celu przygotowania materiału do ilościowej analizy metodą ultrawydajnej chromatografii cieczowej (*ang. ultra performance liquid chromatography*, UPLC). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 24. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 16 godzin w temperaturze 37°C.

Tabela 24. Skład mieszaniny reakcyjnej trawienia DNA i RNA do nukleozydów.

Odczynnik	Ilość
DNA/RNA	3 µg
Bufor 10× <i>Nucleoside Digestion Mix</i> *	2 µl
Mieszanina enzymów <i>Nucleoside Digestion Mix</i>	5 – 10 U
Woda wolna od nukleaz	Do 20 µl

* zawarty w zestawie *Nucleoside Digestion Mix*

3.2.9. Izolacja kwasów nukleinowych

3.2.9.1. Izolacja plazmidów w małej skali

Pojedyncze kolonie bakteryjne zawierające docelowy plazmid przenoszono ze stałego podłoża LB do 2 ml płynnej pożywki LB zawierającej ten sam antybiotyk, co podłoże stałe (procedura przygotowania pożywek znajduje się w podrozdziale 3.1.6.). Zestawienie odporności poszczególnych szczepów bakteryjnych na odpowiedni antybiotyk przedstawiono w tabeli 9. Uzyskaną hodowlę inkubowano 16 godzin w temperaturze 37°C, wytrząsając z prędkością 250 rpm. Izolację plazmidów przeprowadzano za pomocą zestawu QIAGEN Plasmid Mini Kit, zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. Plazmidy eluowano 50 µl wody. Stężenie wyizolowanych plazmidów określano metodą spektrofotometryczną (podrozdział 3.2.11.2). Otrzymane plazmidy poddawano analizie z wykorzystaniem reakcji PCR (podrozdział 3.2.6.).

3.2.9.2. Izolacja całkowitego RNA z HEK293T

Całkowity RNA izolowano z zamrożonych osadów komórek HEK293T (podrozdział 3.2.13.) przy użyciu zestawu mirVanaTMmiRNA Isolation Kit zgodnie z instrukcją producenta. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono metodą spektrofotometryczną (podrozdział 3.2.11.2.), a jego integralność oceniano za pomocą systemu Agilent TapeStation (Agilent) (podrozdział 3.2.11.3.).

3.2.9.3. Izolacja krótkich RNA z całkowitego RNA z HEK293T

Krótkie RNA (< 200 nt) izolowano z całkowitego RNA (podrozdział 3.2.9.2.) z wykorzystaniem zestawu mirVanaTMmiRNA Isolation Ki zgodnie z instrukcją producenta. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono metodą spektrofotometryczną (podrozdział 3.2.11.2.), a jego integralność oceniano za pomocą systemu Agilent TapeStation (Agilent) (podrozdział 3.2.11.3.).

3.2.9.4. Izolacja tRNA z krótkich RNA z HEK293T

Mieszaninę krótkich RNA (podrozdział 3.2.9.3.) rozdzielano w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (procedurę przygotowania żelu zamieszczono w podrozdziale 3.1.7, natomiast procedurę prowadzenia elektroforezy umieszczono w podrozdziale 3.2.11.6.). Fragment żelu zawierający pożądane cząsteczki RNA wycinano z żelu i rozdrabniano mechanicznie. Do rozdrobnionego żelu dodawano 400 μ l 0,3 M octanu sodu, pH=5,5 i inkubowano 16 godzin w temperaturze 4°C, delikatnie wytrząsając. Mieszaninę nanoszono na kolumnę Costar z filtrem z octanu celulozy (Spin-X centrifuge Tube Filter 0,45 μ M) i wirowano 5 minut z prędkością 16000 $\times$ g. Fragmenty żelu odrzucano, a do filtratu dodawano 3 objętości zimnego, 96% etanolu i wytrącano kwasy nukleinowe zgodnie z procedurą zawartą w podrozdziale 3.2.10.3.

3.2.10. Oczyszczanie kwasów nukleinowych

3.2.10.1. Oczyszczanie z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification Kit

Oczyszczanie przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification Kit zgodnie z procedurą producenta, przy czym w końcowym etapie produkt z kolumny wymywano 30 μ l wody.

3.2.10.2. Oczyszczanie z wykorzystaniem zestawu Oligo Clean & Concentrator

Oczyszczanie przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Oligo Clean & Concentrator zgodnie z procedurą producenta, przy czym w końcowym etapie produkt z kolumny wymywano 10 μ l wody.

3.2.10.3. Oczyszczanie metodą strącaniową

Do wodnego roztworu kwasów nukleinowych dodawano 0,1 objętości 0,1M octanu sodu, pH=5,0, 3 objętości zimnego, 96% etanolu i inkubowano 16 godzin w temperaturze -20°C. Następnie próby wirowano 30 minut w temperaturze 4°C z prędkością 16000 $\times$ g. Supernatant odrzucano, a osad przemywano 200 μ l zimnego 70% etanolu. Próby ponownie wirowano 20 minut w temperaturze 4°C z prędkością 16000 $\times$ g. Supernatant odrzucano, a osad suszono 15 minut w temperaturze pokojowej i rozpuszczano w 10 μ l wody.

3.2.10.4. Oczyszczanie z żeli poliakrylamidowych

Mieszaninę kwasów nukleinowych rozdzielano w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (podrozdział 3.2.11.8.) lub w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.6). Fragment o pożądanej długości wycinano z żelu i rozdrabniano mechanicznie. Do rozdrobnionego żelu dodawano 400 µl 0,3 M octanu sodu, pH=5,5 i inkubowano 16 godzin w temperaturze 4 °C, delikatnie wytrząsając. Mieszaninę nanoszono na kolumnę Costar z filtrem z octanu celulozy (Spin-X centrifuge Tube Filter 0,45 µM) i wirowano 5 minut z prędkością 16000 × g. Fragmenty żelu odrzucano, a do filtratu dodawano 3 objętości zimnego, 96% etanolu i wytrącano kwasy nukleinowe zgodnie z procedurą zawartą w podrozdziale 3.2.10.3.

3.2.11. Analiza kwasów nukleinowych i białek

3.2.11.1. Pomiar stężenie metodą fluorometryczną

Stężenie gotowych bibliotek do sekwencjonowania NGS mierzono metodą fluorometryczną, wykorzystując zestaw Qubit™ 1× dsDNA High Sensitivity Assay Kit zgodnie z instrukcją producenta. Pomiarów dokonano przy użyciu fluorometru Qubit 4 (Invitrogen™).

3.2.11.2. Pomiar stężenia metodą spektrofotometryczną

Pomiar stężenia cząsteczek DNA, RNA oraz białek metodą spektrofotometryczną wykonywano spektrofotometrem Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific™) zgodnie z instrukcją producenta.

3.2.11.3. Analiza długości kwasów nukleinowych z wykorzystaniem systemu TapeStation 4150

Rozkład długości kwasów nukleinowych analizowano za pomocą automatycznej elektroforezy kapilarnej – TapeStation 4150 System (Agilent) zgodnie z procedurą producenta, przy użyciu specyficznych materiałów i odczynników dedykowanych dla DNA lub RNA. Do analizy rozkładu wielkości bibliotek do sekwencjonowania stosowano taśmy High Sensitivity D1000 ScreenTape, wraz z odpowiednim buforem (High Sensitivity D1000 Sample Buffer) i wzorcem mas (High Sensitivity D1000 Ladder). W celu rozdzielenia wyizolowanych frakcji RNA z komórek HEK293T (całkowity RNA, krótkie RNA, tRNA) stosowano taśmy High Sensitivity RNA ScreenTape,

odpowiedniego buforu (High Sensitivity RNA ScreenTape Sample Buffer) oraz wzorca mas (High Sensitivity RNA ScreenTape Ladder). Rozdziały prowadzono z wykorzystaniem urządzenia TapeStation 4150 System (Agilent).

3.2.11.4. Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Żel poliakrylamidowy do elektroforetycznego rozdzielania białek składał się z dwóch warstw: 5% żelu zagęszczającego oraz 15% żelu rozdzielającego, przygotowanych zgodnie z opisem w podrozdziale 3.1.7. Żel umieszczano w aparacie Mini-Protean firmy BioRad. Do analizowanych preparatów białkowych dodawano 4× stężonego buforu obciążającego SB do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego. Próby denaturowano przez inkubację 5 minut w temperaturze 95°C i następnie inkubowano na lodzie 5 minut. Tak przygotowane próby oraz wzorzec mas (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards lub Perfect Tricolor Protein Ladder) rozdzielano w żelu. Elektroforezę prowadzono w 1× stężonym buforze TGS przy napięciu 80 V dla żelu zagęszczającego oraz 130 V dla żelu rozdzielającego. Po zakończeniu rozdzielania białek produkty wizualizowano, podgrzewając żel w kuchence mikrofalowej w roztworze barwiącym (tabela 12), a następnie płucząc go przez kilka godzin w temperaturze pokojowej w roztworze odbarwiającym (tabela 12). Dokumentację żeli przeprowadzano przy użyciu urządzenia Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

3.2.11.5. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym w warunkach natywnych

Do badanych próbek dodawano 6× DNA Gel Loading Dye do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego. Przygotowane próby oraz wzorzec mas DNA (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker) nakładano na 1% żel agarozowy do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych (żel przygotowano zgodnie z instrukcją zawartą w podrozdziale 3.1.7.). Rozdział prowadzono w buforze 0,5× TBE pod napięciem 125 V przez godzinę. Wynik rozdzielania wizualizowano z wykorzystaniem urządzenia Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

3.2.11.6 Rozdział elektroforetyczny krótkich RNA (<200 nt) w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Do badanych próbek dodawano bufor obciążający 2× BB bez błękitu bromofenolowego (tabela 12) do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego. Próbkę poddawano denaturacji poprzez inkubację 5 minut w temperaturze 95°C, a następnie gwałtownie schładzano na lodzie. Przygotowane w ten sposób próby nanoszono na 8% żel poliakrylamidowy do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących (żele przygotowane zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.7.). Elektroforezę prowadzono w buforze 1× TBE, początkowo przy natężeniu prądu 10 mA przez 30 minut (tzw. preelektroforeza), a następnie przy natężeniu prądu 40 mA. Rozdzielone kwasy nukleinowe wizualizowano na transiluminatorze UV Gel Logic 200 (Kodak). Wycinano fragmenty żelu zawierające pożądane produkty, a następnie te produkty oczyszczano (podrozdział 3.2.10.4.).

3.2.11.7. Rozdział elektroforetyczny produktów deaminacji w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Do badanych próbek dodawano bufor obciążający 2× BB (tabela 12) do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego. Próbkę poddawano denaturacji poprzez inkubację 5 minut w temperaturze 95°C, a następnie gwałtownie schładzano na lodzie. Przygotowane w ten sposób próby nanoszono na 15% żel poliakrylamidowy do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach denaturujących (żele przygotowane zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.7.). Elektroforezę prowadzono w buforze 1× TBE, początkowo przy natężeniu prądu 10 mA przez 30 minut (tzw. preelektroforeza), a następnie przy natężeniu prądu 40 mA. Żele poliakrylamidowe po rozdzielaniu barwiono przez 15 minut w buforze zawierającym SybrTM Gold, zgodnie z instrukcją producenta. Wynik rozdzielania wizualizowano z wykorzystaniem urządzenia Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

3.2.11.8. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną w zestawie TruSeq Small RNA Library Prep Kit. Do badanych próbek dodawano bufor obciążający 6× DNA Gel Loading Dye. W elektroforezie używano dwóch wzorców mas

dołączonych do zestawu TruSeq® Small RNA Library Prep Kit: CRL oraz HRL. 2 µl wzorca CRL oraz 1 µl wzorca HRL rozcieńczono w stosunku 1:1 z buforem 6× DNA Gel Loading Dye. Tak przygotowane próby oraz wzorce mas nanoszono na 8% żel poliakrylamidowy do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych (żel przygotowany zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.7.). Elektroforezę prowadzono w buforze 1× TBE pod napięciem 145 V przez godzinę lub do momentu, aż niebieski barwnik opuścił żel. Po zakończonym rozdziale, żel barwiono przez 15 minut w buforze zawierającym Sybr™ Gold, zgodnie z instrukcją producenta. Rozdzielone kwasy nukleinowe wizualizowano na transiluminatorze UV Gel Logic 200 (Kodak). Wycinano fragmenty żelu zawierające pożądane produkty, a następnie te produkty oczyszczano (podrozdział 3.2.10.4.).

3.2.11.9. Analiza białek metodą spektrometrii mas z wykorzystaniem analizatora Orbitrap

Oczyszczone preparaty białkowe rozdzielano w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.4.), po czym wycięto prążki odpowiadające masie cząsteczkowej ~24 kDa. Do identyfikacji białek w przygotowanych próbach wykorzystano spektrometrię mas z wykorzystaniem analizatora Orbitrap. Analiza została przeprowadzona w Pracowni Metabolomiki i Proteomiki ICHB PAN w Poznaniu.

3.2.12. Otrzymywanie białek A3A_WT oraz A3A_E72A

3.2.12.1. Otrzymanie wektora ekspresyjnego WT_A3A

DNA kodujący WT_A3A zoptymalizowany pod względem kodonów do produkcji w systemie prokariotycznym, zawarty w plazmidzie pMK_WT_A3A namnażano w reakcji PCR (podrozdział 3.2.6.). W reakcji użyto starterów (F_05_A3ApET42 oraz R_03_A3ApET42) (tabela 7), które dodatkowo wprowadzały sekwencję rozpoznawaną przez trombinę, 6× His Tag oraz miejsca restrykcyjne rozpoznawane przez enzymy SpeI oraz XhoI. Powielony DNA kodujący APOBEC3A oraz wektor ekspresyjny pET42a(+) poddawano cięciu restrykcyjnemu (podrozdział 3.2.1.) enzymami FastDigest SpeI oraz FastDigest XhoI. Produkty reakcji oczyszczono z wykorzystaniem zestawu QIAquick PCR Purification Kit (podrozdział 3.2.10.1.) i analizowano w 1% żelu agarozowym w warunkach natywnym (podrozdział 3.2.11.5.). W celu uniknięcia ligowania się końców wektora bez wstawionego insertu DNA, końce

5' liniowego wektora pET42a(+) poddawano defosforylacji (podrozdział 3.2.3.). DNA kodujący APOBEC3A po cięciu restrykcyjnym i oczyszczeniu poddawano ligacji z wcześniej przygotowanym wektorem pET42a(+) (podrozdział 3.2.5.). Produkty ligacji wprowadzano do komórek kompetentnych metodą szoku cieplnego (podrozdział 3.2.12.2.). Z uzyskanych kolonii bakteryjnych izolowano plazmidy w małej skali (podrozdział 3.2.9.1.), poddawano je analizie z wykorzystaniem reakcji PCR (podrozdział 3.2.6.). W przypadku reakcji PCR używano tych samych starterów co do amplifikacji sekwencji kodującej APOBEC3A z wektora pMK_WT_A3A. Produkty reakcji PCR analizowano w 1% żelu agarozowym (podrozdział 3.2.11.5.). Wybrane plazmidy poddawano sekwencjonowaniu metodą Sangera w firmie Genomed S.A w Warszawie lub Laboratorium Technik Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Do dalszych doświadczeń wybrano jeden plazmid z poprawnie wklonowaną sekwencją (pET42a(+)_WT_A3A). Posłużył on do transformacji szczepu bakterii stosowanego do produkcji białka (podrozdział 3.2.12.2.).

3.2.12.2. Transformacja komórek bakteryjnych metodą szoku cieplnego

Do zawiesiny komórek *E. coli* (One Shot® TOP10 lub BL21(DE3)pLysS) dodawano 10 ng oczyszczonego plazmidu lub 5 µl produktu ligacji, po czym próbki inkubowano przez 5 minut na lodzie. Następnie zawiesinę poddawano szokowi cieplnemu – ogrzewano przez 30 sekund w temperaturze 42°C. Po ogrzaniu, próbki natychmiast umieszczano na lodzie na 5 minut. Do transformowanych komórek dodawano 250 µl pożywki SOC i inkubowano 1 godzinę w temperaturze 37°C wytrząsając z prędkością 250 rpm. Otrzymaną zawiesinę rozprowadzano na szalkach ze stałą pożywką LB zawierającą odpowiedni antybiotyk (pożywkę przygotowywano zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.1.6. oraz tabelą 9) zgodny z genem oporności plazmidu (tabela 9). Szalki inkubowano 16 godzin w temperaturze 37°C.

3.2.12.3. Przygotowanie glicerolowych banków komórek bakteryjnych

Otrzymany wektor ekspresyjny pET42a(+)_WT_A3A oraz zakupiony wektor pGEX4T1_E72A_A3A wprowadzano do komórek ekspresyjnych *E.coli* szczepu BL21(DE3)pLysS (podrozdział 3.2.12.2.). Pojedyncze kolonie bakteryjne wyhodowane na szalce ze stałą pożywką LB z odpowiednim antybiotykiem (podrozdział 3.1.6. oraz tabela 9) przenoszono do 2 ml płynnej pożywki LB zawierającej odpowiedni antybiotyk (podrozdział 3.1.6. oraz tabela 9). Hodowlę inkubowano w temperaturze 37°C

wytrząsając z prędkością 250 rpm do momentu osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$. Z otrzymanej zawiesiny komórek przygotowywano banki glicerolowe poprzez zawieszenie 800 μ l kultury bakteryjnej w 80% glicerolu. Glicerolowe banki komórek bakteryjnych przechowywano w temperaturze -80°C .

3.2.12.4. Produkcja białek w systemie bakteryjnym w skali preparatywnej

Z glicerolowych banków bakterii *E.coli* szczepu BL21(DE3)pLysS transformowanych plazmidem pET42a(+)_WT_A3A lub pGEX4T1_E72A_A3A (podrozdział 3.2.12.3.) pobierano 300 μ l zawiesiny i zaszczipiano, odpowiednio, 20 ml pożywki płynnej LB z kanamycyną i chloramfenikolem lub ampicyliną i chloramfenikolem (procedurę przygotowania pożywek zamieszczono w podrozdziale 3.1.6.). Następnie kulturę bakteryjną inkubowano 16 godzin w temperaturze 37°C wytrząsając z prędkością 250 rpm. Hodowlę przenoszono do 1 litra świeżej pożywki LB z odpowiednim antybiotykiem (podrozdział 3.1.6. oraz tabela 9) i kontynuowano inkubację w tych samych warunkach, aż do osiągnięcia gęstości optycznej OD_{600} wynoszącej 0,6–0,8. Pożywkę suplementowano 0,1 M roztworem chlorku cynku do stężenia końcowego 0,06 mM, po czym indukowano ekspresję genu kodującego białko WT_A3A lub E72A_A3A przez dodanie do pożywki 1 M izopropyl- β -D-1-tiogalaktopiranozydu (IPTG) do uzyskania stężenia końcowego odpowiednio 0,2 mM lub 0,5 mM. Produkcję białka WT_A3A prowadzono przez 2 godziny w temperaturze 37°C , natomiast produkcję E72A_A3A przez 16 godzin w temperaturze 18°C . Po zakończeniu inkubacji zawiesinę bakterii wirowano przez 20 minut z prędkością $6240 \times g$ w temperaturze 4°C . Supernatant usuwano, a osad zamrażano w temperaturze -80°C .

3.2.12.5. Oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa

Oczyszczanie białek fuzyjnych ze znacznikiem S-transferazy glutationu (ang. *glutathione S-transferase*, GST) przeprowadzano przy użyciu chromatografii powinowactwa na złożu Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare). Osady bakteryjne (podrozdział 3.2.12.4.) rozpuszczano w buforze do lizy (BL) (tabela 10), suplementowanym 50 U/ml benzonazy. Zawiesinę inkubowano 30 minut na lodzie, a następnie sonikowano (30 cykli: 30 sekund sonikacja/30 sekund pauza) i wirowano przez 30 minut z prędkością $75600 \times g$ w temperaturze 16°C . Osad odrzucano, a supernatant nanoszono na kolumnę upakowaną 3 ml złoża Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow, uprzednio zrównoważonego buforem do przemywania (BP1) (tabela 10).

Kolumnę przemywano kolejno buforami: B1, B2 (bufor o wysokiej zawartości soli) oraz B3 (tabela 10). Rekombinowane białko eluowano buforem do elucji (BE) (tabela 10). Eluowaną frakcję analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.4.), a stężenie eluowanych białek badano metodą spektrofotometryczną (podrozdział 3.2.11.2.).

3.2.12.6. Oczyszczanie białek metodą sączenia molekularnego

Sączenie molekularne przeprowadzano przy użyciu kolumny Superdex75 16/60 HiLoad (GE Healthcare), zainstalowanej w systemie chromatograficznym AKTA Prime Plus (GE Healthcare). Preparaty białkowe, o objętości 1,2 ml i stężeniu minimalnym 2 mg/ml, nanoszono na złożę wcześniej zrównoważone buforem do sączenia molekularnego (BSM) (tabela 10.) przy przepływie 1 ml/min. Rozdział prowadzono w temperaturze 4°C. Detekcję białek prowadzono przy długości fali 280 nm. Wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania Unicorn (GE Healthcare). Frakcje zbierano i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.4.). Wybrane frakcje zagęszczano przy użyciu filtrów Amicon Ultra o pojemności 15 ml i punkcie odcięcia 10 000 MWCO, zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie oczyszczonych białek mierzono metodą spektrofotometryczną (podrozdział 3.2.11.2.) oraz analizowano ich czystość metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.4.).

3.2.12.7. Enzymatyczne odcinanie znacznika GST oraz wymiana buforu

Proces odcinania znacznika GST z białek fuzyjnych APOBEC3A prowadzono równolegle z usuwaniem glutationu obecnego w buforze elucyjnym. Znacznik GST odcinano trombiną. Do oczyszczonego białka fuzyjnego znajdującego się w buforze elucyjnym, dodawano trombinę w ilości 0,5 U na 1 mg białka. Mieszaninę umieszczano w woreczku dializacyjnym o punkcie odcięcia masy cząsteczkowej wynoszącym 10 kDa (SnakeSkin™ Dialysis Tubing. Woreczek dializacyjny umieszczono w buforze do sączenia molekularnego (tabela 10). Reakcję cięcia wraz z usuwaniem glutationu prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 4°C, delikatnie mieszając. W przypadku konieczności, preparat białkowy dodatkowo zagęszczano przy użyciu filtrów Amicon Ultra o pojemności 15 ml i punkcie odcięcia 10 kDa, zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie zagęszczonych preparatów białkowych mierzono metoda spektrofotometryczną

(podrozdział 3.2.11.2.). Efektywność cięcia analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.4.).

3.2.13. Hodowla komórek HEK293T

Hodowla komórek HEK293T była prowadzona przez mgr Aleksandrę Błaszczak z Pracowni Hodowli Komórkowych i Tkankowych oraz mgr Aleksandrę Mierzwę z Zakładu Biologii molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN [96]. Do analiz wykonanych w ramach niniejszej pracy wykorzystywano osad komórkowy zamrożony w ciekłym azocie i przechowywany w temperaturze -80°C.

3.2.14. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A

3.2.14.1. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec DNA metodą biochemiczną

W celu potwierdzenia aktywności enzymatycznej otrzymanych preparatów białkowych przeprowadzano test deaminacji wobec pojedynczego motywu 5'TC w ssDNA [161]. Aktywność enzymatyczną testowano wobec 80 nt cząsteczki ssDNA zawierającej tylko jedną resztę cytydynową w pozycji 40 w kontekście sekwencyjnym preferowanym przez APOBEC3A 5'TC (Oligo_dC, tabela 7) [93, 108]. Kontrolę pozytywną stanowiła cząsteczka zawierająca resztę urydynową w miejscu cytydyny (Oligo_dU, tabela 7). Kontrolę negatywną stanowiła próba bez preparatu białkowego. 800 ng ssDNA inkubowano 30 minut w temperaturze 37°C z testowanym preparatem białkowym w jednokrotnie stężonym buforze reakcyjnym dla białka APOBEC3A (skład buforu podano w tabeli 11), w objętości 10 µl. W przypadku wystąpienia aktywności deaminazowej, dochodziło do przekształcenia cytydyny do urydyny. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2 U glikozylazy UDG i kontynuowano inkubację 30 minut w temperaturze 37°C. UDG usuwał urydynę, pozostawiając miejsce apirymidynowe. Do mieszaniny dodawano 1 M NaOH do stężenia końcowego 0,2 M, co prowadziło do alkalicznej hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w miejscu apirymidynowym. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 15% żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.7.). W przypadku aktywności enzymatycznej APOBEC3A lub kontroli pozytywnej obserwowano produkt o długości 40 nt. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych podczas testu deaminacji APOBEC3A wobec pojedynczego motywu TC metodą biochemiczną

Odczynnik	WT_A3A	E72A_A3A	Kontrola pozytywna	Kontrola negatywna
Oligo_dC	800 ng	800 ng	-----	800 ng
Oligo_dU	-----	-----	800 ng	-----
10× bufor reakcyjny dla APOBEC3A*	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Preparat białkowy	4,5 µg	4,5 µg	-----	-----
Woda wolna od nukleaz	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl	do 10 µl

*skład buforu zamieszczono w tabeli 11

3.2.14.2. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec DNA i RNA metodą ultrawydajnej chromatografii cieczowej

Do ilościowej analizy aktywności enzymatycznej APOBEC3A wobec modyfikowanych i niemodyfikowanych substratów DNA i RNA wykorzystano metodę UPLC. W zależności od badanego substratu, wyróżniano kilka sposobów prowadzenia testu deaminacji:

- **Badanie aktywności wobec oligonukleotydów DNA**

Aktywność enzymatyczną testowano wobec 80 nt cząsteczek ssDNA zawierających tylko jedną cytydynę, 5-metylocytydynę lub 5-hydroksymetylocytydynę w pozycji 40 w kontekście sekwencyjnym preferowanym przez APOBEC3A 5'TC/5'T5mC/5'T5hmC (Oligo_dC, Oligo_5mdC, Oligo_5hmdC, tabela 7). 3 µg ssDNA inkubowano 3 godziny w temperaturze 37°C z testowanym preparatem białkowym w jednokrotnie stężonym buforze reakcyjnym dla białka APOBEC3A (skład buforu podano w tabeli 11), w objętości 25 µl. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabeli 26.

Tabela 26. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych podczas testów deaminacji APOBEC3A wobec oligonukleotydów DNA metodą UPLC

Odczynnik	WT_A3A	E72A_A3A	Kontrola negatywna
Oligonukleotyd	3 µg	3 µg	3 µg
10× bufor reakcyjny dla APOBEC3A	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Preparat białkowy	6 µg	6 µg	-----

Woda wolna od nukleaz	do 25 µl	do 25 µl	do 25 µl
-----------------------	----------	----------	----------

*skład buforu zamieszczono w tabeli 11

▪ Badanie aktywności wobec oligonukleotydów RNA

Aktywność enzymatyczną testowano wobec oligonukleotydów RNA: 14 nt fragmentu transkryptu genu dehydrogenazy bursztynianowej B (ang. *succinate dehydrogenase B gene*, SDHB) (SDHB_rC, tabela 7), który tworzy strukturę typu spinki do włosów [162] lub jego zmodyfikowanej formy, w której cytydynę w pętli zastąpiono 5-metylocytydyną lub 5-hydroksymetylocytydyną (SDHB_m5rC, SDHB_hm5rC, tabela 7) oraz syntetycznych cząsteczek tRNA z 5-metylocytydyną w odpowiedniej pozycji (tRNA-Asp-GTC-m5rC, tRNA-Gly-GCC-m5rC, tRNA-Val-IAC-m5rC, tRNA-Leu-CAA-m5rC, tabela 7). W pierwszym etapie odtwarzano strukturę drugorzędową oligonukleotydów RNA. 3 µg każdego z oligonukleotydów zawieszono w 1× buforze do badania aktywności APOBEC3A (skład buforu podano w tabeli 11) oraz denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C i powoli schładzano do 10°C. Następnie, oligonukleotydy inkubowano 3 godziny w temperaturze 37°C z badanym preparatem białkowym w jednokrotnie stężonym buforze reakcyjnym do badania aktywności APOBEC3A (skład buforu podano w tabeli 11), w objętości 25 µl. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabeli 27.

Tabela 27. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych podczas testów deaminacji APOBEC3A wobec oligonukleotydów RNA metodą UPLC

Odczynnik	WT_A3A	E72A_A3A	Kontrola negatywna
Oligonukleotyd	3 µg	3 µg	3 µg
10× bufor reakcyjny dla APOBEC3A	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Preparat białkowy	6 µg	6 µg	-----
Woda wolna od nukleaz	do 25 µl	do 25 µl	do 25 µl

*skład buforu zamieszczono w tabeli 11

▪ Badanie aktywności wobec tRNA pochodzącego z komórek HEK293T

W pierwszym etapie odtwarzano strukturę trzeciorzędową tRNA pochodzącego z komórek HEK293T (podrozdział 3.2.9.4.). 3 µg tRNA zawieszonego w 1x buforze do badania aktywności APOBEC3A wobec tRNA (skład buforu podano w tabeli 11) denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C i powoli schładzano do 10°C. Następnie, tRNA inkubowano 3 godziny w temperaturze 37°C z badanym preparatem

białkowym w jednokrotnie stężonym buforze reakcyjnym do badania aktywności APOBEC3A wobec tRNA (skład buforu podano w tabeli 11), w objętości 25 µl. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabeli 28.

Tabela 28. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych podczas testów deaminacji APOBEC3A wobec tRNA metodą UPLC

Odczynnik	WT_A3A	E72A_A3A	Kontrola negatywna
tRNA z HEK293T	3 µg	3 µg	3 µg
10× bufor reakcyjny dla APOBEC3A wobec tRNA	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Preparat białkowy	6 µg	6 µg	-----
Woda wolna od nukleaz	do 25 µl	do 25 µl	do 25 µl

*skład buforu zamieszczono w tabeli 11

Produkty deaminacji po każdym teście deaminacji bezpośrednio trawiono do pojedynczych nukleozydów z wykorzystaniem zestawu Nucleoside Digestion Mix zgodnie z opisem zawartym w podrozdziale 3.2.8. Analizy chromatograficzne zostały wykonane w Katedrze Biochemii Klinicznej na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika Toruniu.

3.2.14.3. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec tRNA metodą sekwencjonowania nowej generacji (YAMAT-seq)

W pierwszym etapie odtwarzano strukturę trzeciorzędową tRNA wyizolowanego z komórek HEK293T (podrozdział 3.2.9.4.). 3 µg tRNA zawieszonego w 1x buforze do badania aktywności APOBEC3A wobec tRNA (skład buforu podano w tabeli 11) denaturowano przez 5 minut w temperaturze 95°C i powoli schładzano do 10°C. Następnie, tRNA inkubowano 3 godziny w temperaturze 37°C z badanym preparatem białkowym w jednokrotnie stężonym buforze reakcyjnym do badania aktywności APOBEC3A wobec tRNA (skład buforu podano w tabeli 11), w objętości 25 µl. Skład mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabeli 29. tRNA oczyszczano z wykorzystaniem zestawu Oligo Clean and Concentrator (podrozdział 3.2.10.2), deacylowano (podrozdział 3.2.2.) i ponownie oczyszczano metodą strącenia (podrozdział 3.2.10.3.). Do cząsteczek tRNA dołączano adaptory zgodnie z protokołem metody YAMAT-Seq (podrozdział 3.2.4.) i przygotowywano biblioteki do sekwencjonowania nowej generacji (podrozdział 3.2.7.) [160]. Sekwencjonowanie NGS zostało wykonane w Pracowni Genomiki w ICHB PAN z wykorzystaniem sekwenatora NovaSeq 6000 (Illumina).

Tabela 29. Skład mieszanin reakcyjnych stosowanych podczas testów deaminacji APOBEC3A wobec tRNA metodą sekwencjonowania NGS.

Odczynnik	WT_A3A	E72A_A3A	Kontrola negatywna
tRNA z HEK293T	3 µg	3 µg	3 µg
10× bufor reakcyjny dla APOBEC3A wobec tRNA	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Preparat białkowy	6 µg	6 µg	-----
Woda wolna od nukleaz	do 25 µl	do 25 µl	do 25 µl

*skład buforu zamieszczono w tabeli 11.

3.2.15. Modelowanie kompleksów APOBEC3A z tRNA oraz dynamika molekularna

Modelowanie kompleksów oraz dynamika molekularna APOBEC3A z trzema tRNA (Lys-CTT-3.1; Arg-TCG-1.1; Glu-TTC-3.1) zostało przeprowadzone w Zakładzie Biologii Strukturalnej Eukariontów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN przez dr hab. Miłosza Ruszkowskiego, prof. ICHB PAN [96].

3.2.16. Analiza bioinformatyczna i statystyczna

Wszystkie bioinformatyczne oraz statystyczne analizy zostały przeprowadzone przez mgr inż. Jarosława Sikorę z Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN [96].

4. Wyniki

4.1. Opracowanie metody produkcji deaminazy APOBEC3A w systemie bakteryjnym

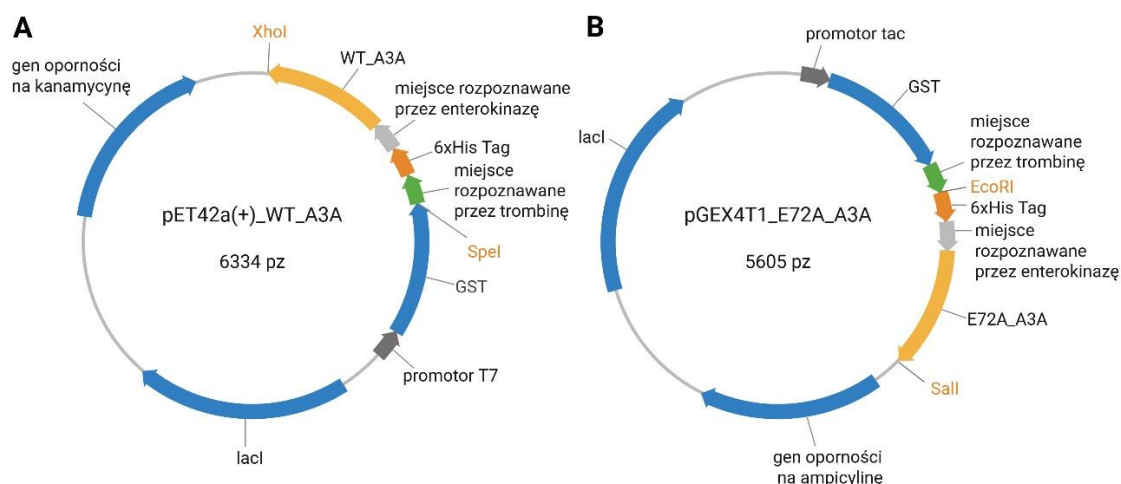
W chwili rozpoczęcia niniejszych badań rekombinowane białko APOBEC3A nie było dostępne handlowo. W związku z tym, celem pierwszego etapu prac było opracowanie wydajnego systemu produkcji aktywnej deaminazy APOBEC3A, z myślą o jej zastosowaniu w badaniach biochemicznych. Do produkcji deaminazy APOBEC3A wybrano bakteryjny system ekspresyjny, uznawany za najbardziej efektywny. Mimo tej zalety, otrzymywanie białka APOBEC3A, w tym systemie, wiązało się z koniecznością przezwyciężenia pewnych ograniczeń. Logue i współpracownicy [91] pokazali bowiem, że białko APOBEC3A jest toksyczne dla bakterii, a jego produkcja w komórkach bakteryjnych prowadziła do nagromadzenia mutacji w wektorze ekspresyjnym. Dlatego w niniejszych badaniach proces projektowania konstruktów ekspresyjnych oraz hodowli bakteryjnych był poddany szeregowi optymalizacji, np. przez zastosowanie promotorów odpowiednich do kontrolowanej ekspresji genów kodujących toksyczne białka (minimalizujących ryzyko aktywacji promotora pod nieobecność induktora).

4.1.1. Stworzenie konstruktów do ekspresji genu *APOBEC3A* typu dzikiego oraz nieaktywnego wariantu w komórkach bakteryjnych

W pierwszym etapie zaprojektowano konstrukty ekspresyjne kodujące białko APOBEC3A typu dzikiego (WT_A3A) oraz nieaktywny wariant białka, stanowiący kontrolę w przeprowadzanych doświadczeniach (E72A_A3A). Konstrukt kodujący nieaktywne białko zawierał mutację prowadzącą do zastąpienia reszty kwasu glutaminowego (E) w centrum katalitycznym resztą alaninową (A).

Bazując na wcześniejszych doświadczeniach dr Lucyny Budźko z Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN w produkcji innego białka z rodziny AID/APOBEC, jako wektor ekspresyjny wybrano pGEX4T1. Kontrola ekspresji genu wklonowanego do tego wektora odbywa się dzięki obecności w wektorze indukowalnego promotora *tac*, którego aktywność regulowana jest przez IPTG. IPTG wiąże się z represorem *lac*, co prowadzi do zniesienia represji promotora *tac* i inicjacji transkrypcji. Dodatkowo, pGEX4T1 koduje znacznik GST w tej samej ramce odczytu co miejsce klonowania, co pozwala na otrzymanie białka fuzyjnego. GST poprawia rozpuszczalność

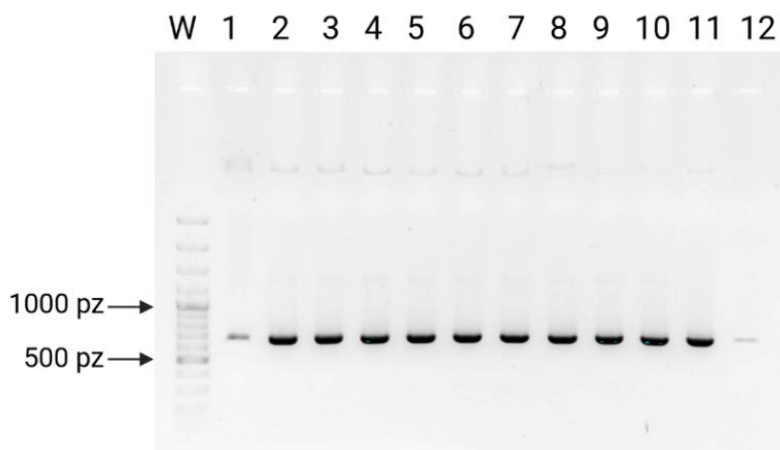
białka oraz ułatwia jego oczyszczanie metodami chromatografii powinowactwa. Na selekcję transformowanych bakterii pozwala obecny w konstrukcie gen oporności na ampicylinę. Zaprojektowany insert do klonowania do wektora pGEX4T1, oprócz sekwencji kodującej WT_A3A lub E72A_A3A, zawierał sekwencję kodującą motyw rozpoznawany przez enterokinazę, znacznik heksahistydynowy (6xHis Tag) oraz sekwencję kodującą motyw rozpoznawany przez trombinę. Zaproponowana strategia pozwalała na produkcję białka z dołączonymi znacznikami GST oraz 6xHis Tag, co umożliwiało testowanie dwóch metod oczyszczania przy użyciu chromatografii powinowactwa: z wykorzystaniem glutationu oraz jonów niklu. Ponadto, miejsca rozpoznawane przez enterokinazę i trombinę umożliwiały odcięcie obu znaczników (w tym niezależne usunięcie znacznika GST), a tym samym uzyskanie natywnej formy białka. Syntezę konstruktu ekspresyjnego pGEX4T1_WT_A3A oraz pGEX4T1_E72A_A3A zlecono firmie GeneArt. Niestety, zlecenie nie zostało zrealizowane – wielokrotne próby stworzenia konstruktów kodujących typ dziki białka zakończyły się niepowodzeniem. W rezultacie firma zrezygnowała z dalszych podejść, dostarczając wyłącznie konstrukt kodujący nieaktywny wariant białka: pGEX4T1_E72A_A3A o sekwencji potwierdzonej metodą sekwencjonowania Sangera. W związku z tym, podjęto próbę samodzielnego stworzenia konstruktów zawierających WT_A3A, wybierając inny wektor. W drugim podejściu, do produkcji białka WT_A3A wybrano wektor ekspresyjny pET42a(+). W tym wektorze ekspresja odbywa się pod ścisłą kontrolą promotora T7, który pochodzi z bakteriofaga T7. W porównaniu do wektora pGEX4T1, wektor pET42a(+) zapewnia ściślejszą kontrolę ekspresji, ponieważ inicjacja transkrypcji zależy nie tylko od obecności IPTG, ale także od ekspresji genu polimerazy RNA T7, który jest sztucznie wprowadzony do genomu niektórych szczepów bakteryjnych. Wektor pET42a(+) również umożliwia otrzymanie rekombinowanego białka ze znacznikiem GST. Na selekcję transformowanych bakterii pozwala obecny w konstrukcie gen oporności na kanamycynę. Różnice w antybiotykoodporności bakterii transformowanych konstruktem pET42a(+)_WT_A3A i pGEX4T1_E72A_A3A zapobiegają kontaminacji podczas hodowli bakteryjnych. Sekwencję insertu do ligacji z wektorem pET42a(+) zaprojektowano w analogiczny sposób jak do pGEX4T1, aby zapewnić identyczny układ sekwencyjny otrzymanych białek (GST, miejsce rozpoznawane przez trombinę, 6xHis Tag, miejsce rozpoznawane przez enterokinazę, WT_A3A). Schemat zaprojektowanych konstruktów przedstawiono na rysunku 10.



Rysunek 10. Konstrukty ekspresyjne zaprojektowane w celu produkcji białek WT_A3A oraz E72A_A3A w systemie bakteryjnym. Uproszczony schemat budowy wektorów pET42a(+) (A) oraz pGEX4T1 (B), wraz z wprowadzonym insertem kodującym: motyw rozpoznawany przez trombinę, znacznik 6xHis Tag, motyw rozpoznawany przez enterokinazę oraz WT_A3A (A) lub E72A_A3A (B). Stworzono w serwisie BioRender.com.

Szczegółowy opis przygotowania konstruktu ekspresyjnego pET42a(+)_WT_A3A znajduje się w podrozdziale 3.2.12.1. W firmie GeneArt zakupiono cDNA kodujący: (i) WT_A3A (NCBI: NM_145699.4), (ii) miejsce rozpoznawane przez enterokinazę oraz (iii) znacznik 6xHis Tag, poddany optymalizacji kodonów i wklonowany do wektora replikacyjnego pMK. W kolejnym etapie przeklonowano ten cDNA do wektora pET42a(+). W pierwszej kolejności, w reakcji PCR namnożono insert z użyciem starterów, które wprowadzały sekwencję rozpoznawaną przez trombinę, oraz sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne SpeI oraz XhoI. Produkt PCR oraz wektor ekspresyjny pET42a(+) poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi FastDigest SpeI oraz FastDigest XhoI. W celu uniknięcia ligacji końców wektora bez wstawionego insertu DNA, końce 5' liniowego wektora pET42a(+) poddano defosforylacji. Następnie przygotowany insert wprowadzono do wektora pET42a(+) na drodze ligacji, a otrzymanym konstruktem transformowano komórki kompetentne *E.coli* One shot® TOP10 metodą szoku cieplnego. Z uzyskanych kolonii bakteryjnych losowo wybrano 12 i wyizolowano z nich plazmidy. Wstępną ocenę poprawności procesu klonowania przeprowadzono wykorzystując plazmidy jako matryce w reakcjach PCR z użyciem starterów specyficznych wobec insertu. W przypadku prawidłowego włączenia insertu do wektora oczekiwano produktu o długości 670 pz. Produkty PCR analizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym w warunkach natywnych (podrozdział

3.2.11.4). We wszystkich reakcjach uzyskano produkt o pożądanej długości (670 pz) (rysunek 11). Następnie, wybrane konstrukty zostały poddane sekwencjonowaniu metodą Sangera w Laboratorium Technik Biologii Molekularnej UAM, co pozwoliło na potwierdzenie poprawności sekwencji zaprojektowanego insertu z dokładnością do jednej zasady. Prawidłowy konstrukct pET42a(+)_WT_A3A wykorzystano następnie do transformacji komórek ekspresyjnych.



Rysunek 11. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów powstałych w wyniku amplifikacji insertu wklonowanego do wektora pET42a(+). Rozdział prowadzono w 1% żelu agarozowym w warunkach natywnych. W – wzorzec wielkości; 1-12 – reakcje PCR. W każdej reakcji otrzymano produkt o długości 670 pz. Stworzono w serwisie BioRender.com.

4.1.2. Produkcja deaminazy APOBEC3A typu dzikiego i jej nieaktywnego wariantu w komórkach bakteryjnych

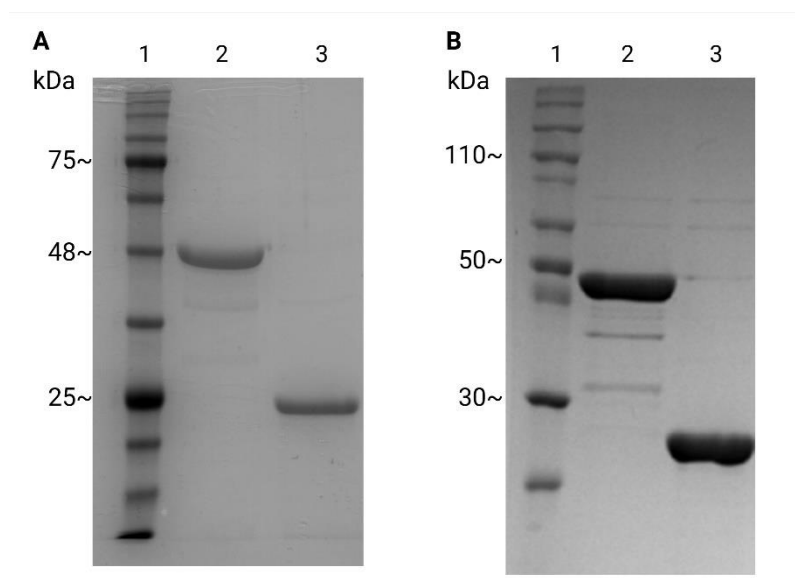
Do otrzymania WT_A3A oraz E72A_A3A wykorzystano szczep komórek kompetentnych *E.coli* BL21(DE3)pLysS, który jest przeznaczony do produkcji toksycznych białek. Szczep BL21(DE3)pLysS posiada gen kodujący polimerazę RNA T7 indukowaną IPTG, która jest niezbędna do inicjacji transkrypcji sekwencji wklonowanej do wektora pET42a(+) pod promotorem T7. Dodatkową kontrolę ekspresji zapewnia gen kodujący lizozym T7, którego ekspresja hamuje aktywność polimerazy RNA T7 przed indukcją. Dzięki temu, bazowa produkcja pożądanego białka rekombinowanego jest ograniczona i powinna rozpocząć się dopiero po dodaniu IPTG.

W celu przeprowadzenia ekspresji genu kodującego WT_A3A lub E72A_A3A w komórkach bakteryjnych, konstrukty ekspresyjne pET42a(+)_WT_A3A oraz pGEX4T1_E72A_A3A wprowadzono do komórek kompetentnych *E. coli* BL21(DE3)pLysS na drodze transformacji metodą szoku cieplnego. Szczegółowe opisy transformacji i hodowli bakteryjnych znajdują się, odpowiednio, w podrozdziałach 3.2.12.2. i 3.2.12.4. W przypadku produkcji WT_A3A zastosowano niewielkie odstępstwa od standardowego protokołu w celu zminimalizowania ryzyka wprowadzenia przez WT_A3A mutacji do genomu gospodarza lub konstruktu. Zmiany protokołu obejmowały: (i) zmniejszenie stężenia induktora IPTG z 0,5 mM do 0,2 mM, (ii) zmianę czasu i temperatury indukcji ekspresji genu z 16 godzin w temperaturze 18 °C do 2 godzin w temperaturze 37 °C, (iii) chlorek cynku, będący źródłem jonów cynku niezbędnych do utworzenia aktywnego centrum katalitycznego, dodawano równocześnie z IPTG. Aby uzyskać podobną wydajność produkcji WT_A3A i E72A_A3A, skala produkcji WT_A3A została zwiększona pięciokrotnie. W celu zabezpieczenia otrzymanych preparatów białkowych do momentu izolacji białek, hodowle bakteryjne wirowano, a osad przechowywano w temperaturze -80°C.

4.1.3. Oczyszczanie otrzymanych preparatów białkowych APOBEC3A

W celu uzyskania wysoce homogennych preparatów białek rekombinowanych WT_A3A oraz E72A_A3A, opracowano dwuetapowy protokół ich oczyszczania. W pierwszym etapie zastosowano chromatografię powinowactwa na złożu glutationowym, w której znacznik GST umożliwiał selektywne wiązanie białek ze złożem (podrozdział 3.2.12.5.). Komórki bakteryjne poddawano lizie w buforze zawierającym benzonazę. Otrzymany lizat poddawano sonikacji i wirowaniu, a następnie nanoszono na kolumnę chromatograficzną zrównoważoną buforem do przemywania. W celu usunięcia niespecyficznie związanych białek i kwasów nukleinowych złożę przemywano buforem o wysokiej zawartości soli (1M NaCl). Pozostałe białka związane ze złożem eluowano buforem zawierającym zredukowany glutation. Następnie białka poddawano trawieniu z wykorzystaniem trombiny w celu odcięcia znacznika GST. Reakcję trawienia prowadzono przez 16 godzin z jednoczesną dializą do buforu przeznaczonego do sączenia molekularnego. Homogenność preparatów białkowych po pierwszym etapie oczyszczania oraz efektywność odcinania znacznika GST analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.4.). W obu przypadkach, po elucji ze złoża

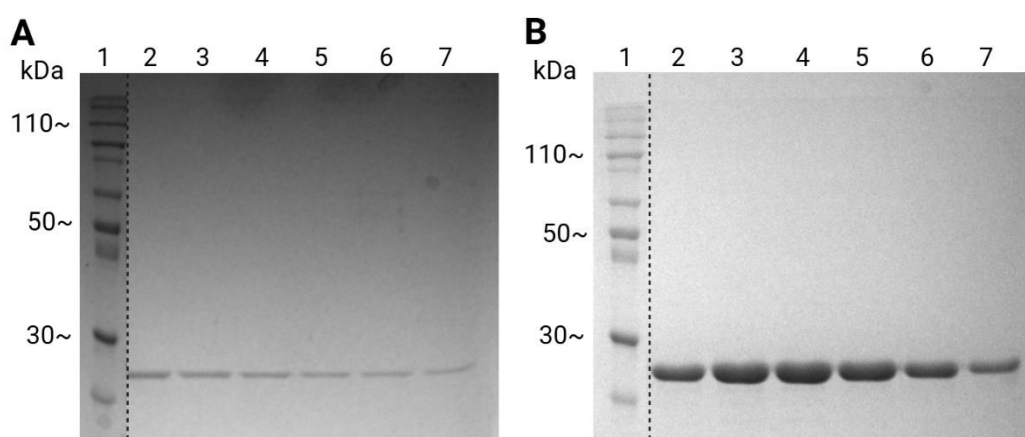
glutationowego, uzyskano preparaty, w których dominujące białko miało masę ~46 kDa. Po trawieniu trombiną, analiza elektroforetyczna wykazała obecność prążka odpowiadającego zarówno białku APOBEC3A jak i GST, z których każde ma masę ~23 kDa (rysunek 12). Jako alternatywę dla oczyszczania na złożu glutationowym testowano złoże niklowe. Ze względu na jej niewielką efektywność (uzyskiwano wysoce heterogeniczne preparaty), metoda ta została jednak odrzucona.



Rysunek 12. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatów białkowych WT_A3A (A) oraz E72A_A3A (B) uzyskanych po pierwszym etapie oczyszczania na złożu glutationowym. Rozdział prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. (A) W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 – wzorzec mas Perfect Tricolor Protein Ladder; 2 – preparat białkowy WT_A3A_GST po elucji ze złoża glutationowego; 3 – preparat białkowy WT_A3A po odcięciu znacznika GST trombiną. (B) W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 – wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 – preparat białkowy E72A_A3A_GST po elucji ze złoża glutationowego; 3 – preparat białkowy E72A_A3A po odcięciu znacznika GST trombiną. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Drugi etap oczyszczania otrzymanych preparatów białkowych przeprowadzono metodą sączenia molekularnego. Zastosowanie tego podejścia pozwoliło na rozdziel poszczególnych białek (a więc odciętego znacznika GST, rekombinowanego białka, trombiny oraz potencjalnych pozostałości rekombinowanego białka z nieodciętym znacznikiem GST) ze względu na ich rozmiar i zebranie ich w oddzielnych frakcjach. Szczegółowy opis sączenia molekularnego znajduje się w podrozdziale 3.2.12.6. Mieszaninę białek nałożono na kolumnę wypełnioną złożem Superdex 75, uprzednio

zrównoważoną buforem do sączenia molekularnego i eluowano białka w warunkach izokratycznych. Do dalszych analiz wybrano frakcje zawierające białka o masie ~23 kDa. Przykładowy wynik rozdziału elektroforetycznego zebranych frakcji przedstawiono na rysunku 13. Następnie połączono je i zmierzono stężenie metodą spektrofotometryczną (podrozdział 3.2.11.2.). Jeśli uzyskane stężenie było niższe niż 0,5 mg/ml, białko poddawano zagęszczaniu. Zastosowana dwuetapowa procedura oczyszczania zagwarantowała uzyskanie wysoce homogenicznych preparatów białkowych WT_A3A oraz E72A_A3A.



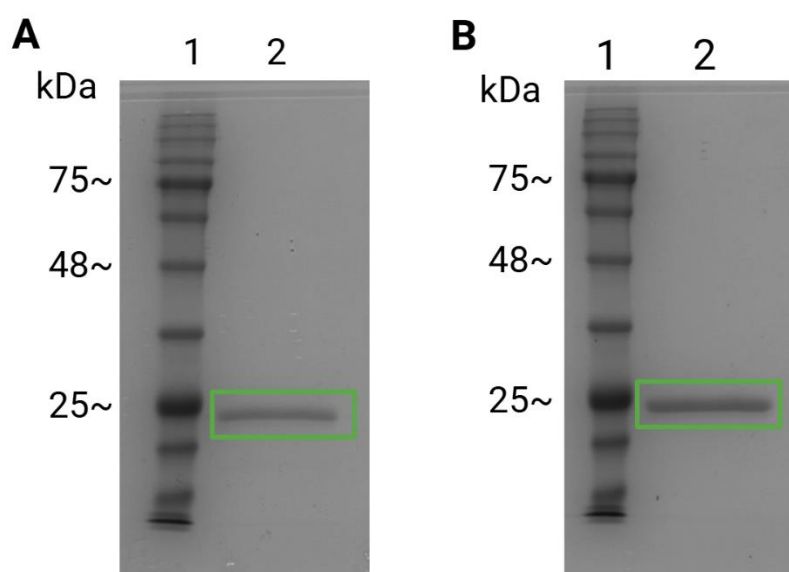
Rysunek 13. Wynik rozdziału elektroforetycznego frakcji białkowych WT_A3A (A) oraz E72A_A3A (B) zbieranych podczas sączenia molekularnego. Rozdział prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. (A,B) W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 – wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 – 7 – frakcje zawierające białko o masie właściwej dla WT_A3A (A) i E72_A3A (B). Stworzono w serwisie BioRender.com.

4.2. Charakterystyka otrzymanych preparatów białkowych APOBEC3A

4.2.1. Identyfikacja otrzymanych preparatów białkowych metodą spektrometrii mas z wykorzystaniem analizatora Orbitrap

W celu potwierdzenia, że otrzymano pożądane warianty białka APOBEC3A przeprowadzono analizę spektrometrii mas z wykorzystaniem analizatora Orbitrap – powszechnie stosowaną w badaniach proteomicznych technikę spektrometryczną do identyfikacji białek. Sposób przygotowania prób do badania przedstawiono w podrozdziale 3.2.11.9. Analizie poddano oczyszczone preparaty białkowe WT_A3A oraz E72A_A3A. Z żelu poliakrylamidowego wycięto prążek odpowiadający białku

o masie cząsteczkowej APOBEC3A (~23 kDa) i zawieszono w wodzie (rysunek 14). Tak przygotowane próby zostały przekazane do analizy w Pracowni Metabolomiki i Proteomiki ICHB PAN w Poznaniu. Uzyskane dane spektrometryczne zostały przeanalizowane z wykorzystaniem oprogramowania FragPipe. Porównanie uzyskanych wyników z bazą danych UniProtKB/Swiss-Prot wykazało wysoką zgodność z białkiem APOBEC3A człowieka, z pokryciem sekwencji wynoszącym odpowiednio 94% dla WT_A3A oraz 93% dla E72A_A3A.



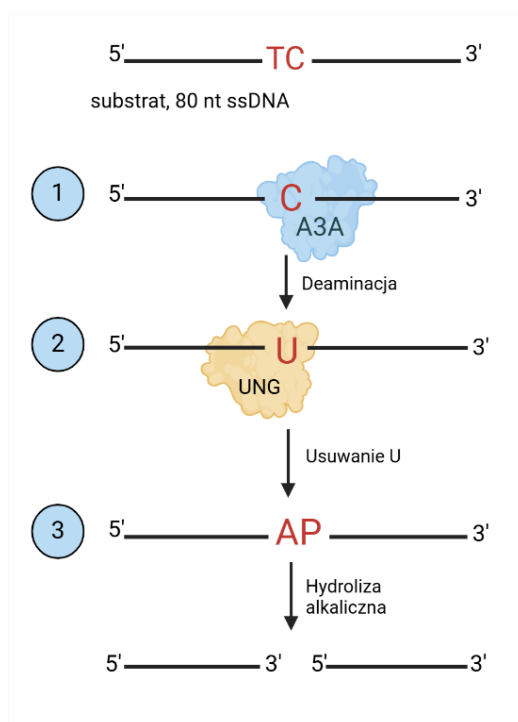
Rysunek 14. Wynik rozdziału elektroforetycznego preparatów białkowych WT_A3A (A) oraz E72A_A3A (B) uzyskanych po oczyszczaniu na złożu glutationowym i sączeniu molekularnym poddanych analizie Orbitrap. Rozdział prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. **(A)** W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 – wzorzec mas Perfect Tricolor Protein Ladder; 2 – preparat białkowy WT_A3A po dwuetapowym oczyszczaniu. **(B)** W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 – wzorzec mas Perfect Tricolor Protein Ladder; 2 – preparat białkowy E72A_A3A po dwuetapowym oczyszczaniu. Prążek, z którego eluowano białko i poddano analizie Orbitrap zaznaczono zielonym prostokątem. Stworzono w serwisie BioRender.com.

4.2.2. Badanie aktywności deaminazowej APOBEC3A

4.2.2.1. Badanie aktywności deaminazowej metodą biochemiczną

Aby ocenić, czy wyprodukowane białko WT_A3A wykazuje aktywność deaminazową, a wariant A3A_E72A jej nie posiada, po każdej izolacji preparatów białkowych analizowano ich aktywność enzymatyczną. Do oceny aktywności preparatów

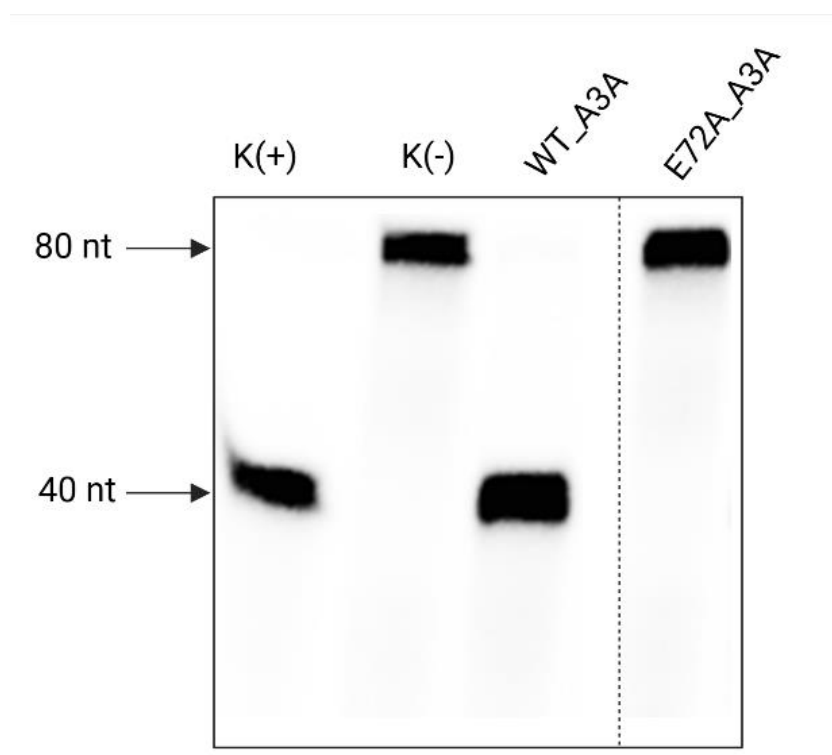
białkowych wykorzystano metodę zaproponowaną przez Sohail i współautorów [163]. Została ona wybrana ze względu na swoją szybkość, niski koszt oraz łatwość wdrożenia w warunkach laboratoryjnych, co pozwala na sprawne przeprowadzenie wstępnych analiz i szybkie przejście do kolejnych etapów badań. Jako substrat w reakcji wykorzystano 80-nukleotydową cząsteczkę ssDNA (Oligo_dC, tabela 7) zawierającą pojedynczą resztę cytydynową w pozycji 40, zlokalizowaną w obrębie motywu 5' TC preferowanego przez APOBEC3A. Test aktywności deaminazowej składał się z trzech etapów, których szczegółowe warunki opisano w podrozdziale 3.2.14.1. W pierwszym etapie, w przypadku obecności aktywnej deaminazy cytydyny, dochodziło do konwersji cytydyny do urydyny. Następnie enzym UDG usuwał uracyl, pozostawiając miejsce apirymidynowe, które w środowisku zasadowym ulegało hydrolizie alkalicznej, prowadzącej do przerwania wiązania fosfodiesterowego w miejscu apirymidynowym. Schemat reakcji przedstawiono na rysunku 15.



Rysunek 15. Schematyczne przedstawienie trzyletapiowej metody biochemicznej do badania aktywności deaminazowej APOBEC3A wobec pojedynczej cytydyny w oligonukleotydach DNA (szczegółowy opis w tekście). Stworzono w serwisie BioRender.com.

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 15% żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (podrozdział 3.2.11.7.). W próbach zawierających aktywną deaminazę spodziewano się uzyskania fragmentów o długości

40 nt. Równolegle przeprowadzono dwie reakcje kontrolne: (i) kontrolę pozytywną, bez preparatu białkowego, w której substrat zawierał pojedynczą resztę urydynową w pozycji 40 (Oligo_dU, tabela 7), (ii) kontrolę negatywną, bez preparatu białkowego, używając standardowego substratu (Oligo_dC, tabela 7). Analiza produktów reakcji wykazała obecność fragmentów o długości 40 nt w próbce zawierającej białko WT_A3A, co potwierdziło jego aktywność deaminazową (wydajność deaminacji oszacowana z wykorzystaniem programu ImageQuantTL wynosiła około 100%). Jednocześnie w próbce z wariantem A3A_E72A nie zaobserwowano powstania takich fragmentów, co świadczyło o braku aktywności enzymatycznej testowanego białka (rysunek 16). Zgodnie z oczekiwaniami, w kontroli pozytywnej zaobserwowano powstanie fragmentów o długości 40 nt, natomiast w kontroli negatywnej nie zaobserwowano fragmentacji.



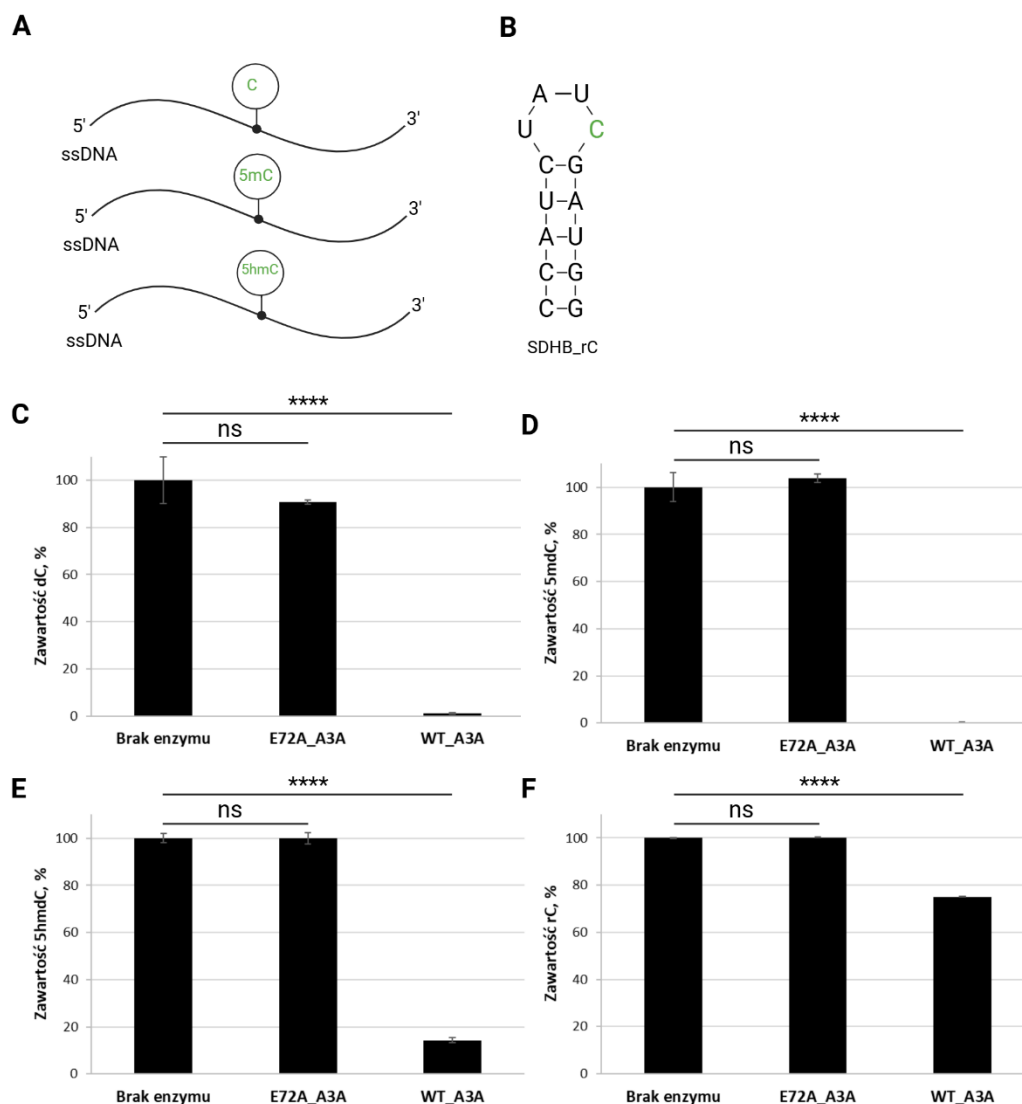
Rysunek 16. Przykładowy wynik analizy metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących produktów powstających w trójetapowym teście aktywności deaminazowej preparatów WT_A3A oraz E72A_A3A. „K+” – kontrola pozytywna, bez preparatu białkowego, w której substrat zawierał pojedynczą resztę urydynową w pozycji 40 (Oligo_dU, tabela 7), „K-” – kontrola negatywna, bez preparatu białkowego, ze standardowym substratem (Oligo_dC, tabela 7). Stworzono w serwisie BioRender.com.

4.2.2.2. Badanie aktywności deaminazowej metodą ultrawydajnej chromatografii cieczowej

Po wstępnej ocenie aktywności deaminazowej uzyskanego preparatu APOBEC3A, w kolejnym etapie przeanalizowano aktywność tego enzymu wobec wszystkich dotychczas poznanych substratów, w tym cytydyny, 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w ssDNA oraz cytydyny w cząsteczce RNA, przyjmującej strukturę typu spinki do włosów. W efekcie opracowano uniwersalny protokół do badania aktywności APOBEC3A wobec różnych cząsteczek DNA i RNA. Do określenia poziomu aktywności APOBEC3A wobec modyfikowanych i niemodyfikowanych substratów DNA i RNA wykorzystano UPLC, która jest obecnie uznawana za złoty standard w identyfikacji i ilościowej analizie zarówno modyfikowanych, jak i niemodyfikowanych rybo- oraz deoksyrybonukleozydów. Metoda ta umożliwiła precyzyjny pomiar nukleozydów zawartych w mieszaninie po reakcji deaminacji, dostarczając pełnego, ilościowego obrazu aktywności APOBEC3A wobec DNA i RNA. W niniejszym rozdziale dla zachowania precyzji opisu wyników wszystkich analiz UPLC zastosowano odrębne oznaczenia dla nukleozydów (rC, rU, m5rC, hm5rC) i deoksynukleozydów (dC, 5mdC, hm5dC). Analizy zostały wykonane w Katedrze Biochemii Klinicznej na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Jako kanonicznych substratów DNA, użyto 80-nukleotydowych cząsteczek ssDNA zawierających pojedynczą resztę cytydynową, 5-metylocytydynową lub 5-hydroksymetylocytydynową w pozycji 40, zlokalizowaną w obrębie motywu 5'TC preferowanego przez APOBEC3A (Oligo_dC, Oligo_5mdC, Oligo_5hmdC, tabela 7). W przypadku substratu RNA wybrano 14-nukleotydowy fragment transkryptu genu dehydrogenazy bursztynianowej B (SDHB_rC, tabela 7), dla którego wcześniej wykazano aktywność APOBEC3A *in vivo* [103]. Substrat ten przyjmuje strukturę drugorzędową typu spinki do włosów, która według danych literaturowych jest konieczna, by dana cząsteczka RNA mogła służyć jako substrat dla APOBEC3A. Szczegółowy przebieg kolejnych etapów badania opisano w podrozdziale 3.2.14.2. Dla każdego substratu przygotowano 3 zestawy reakcji: (i) próby z WT_A3A, (ii) próby kontrolne z wariantem E72A_A3A oraz (iii) próby kontrolne bez enzymu. Produkty reakcji deaminacji trawiono do nukleozydów, a następnie analizowano metodą UPLC.

Jak przedstawiono na rysunkach 17C – 17E, w przypadku WT_A3A zaobserwowano obniżenie zawartości dC (98,9%), 5mdC (99,8%), 5hmdC (86,0%) w porównaniu do kontroli z E72A_A3A lub bez białka. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, wskazującymi na wysoką aktywność APOBEC3A wobec cytydyny i 5-metylocytydyny w ssDNA oraz znacznie niższą aktywność wobec 5-hydroksymetylocytydyny [52]. W przypadku substratu SDHB_rC, biorąc pod uwagę, że APOBEC3A jest aktywna wyłącznie wobec jednoniciowych odcinków kwasów nukleinowych, tylko jedna z czterech reszt cytydynowych była dostępna do deaminacji. W otrzymanych wynikach zaobserwowano spadek zawartości rC o 25% w próbie, w której substrat inkubowano z WT_A3A oraz brak zmian zawartości rC w kontroli E72A_A3A oraz bez białka. Uwzględniając powyższe uwarunkowania, 25% spadek jest równoznaczny ze 100% wydajnością reakcji (rysunek 17F).

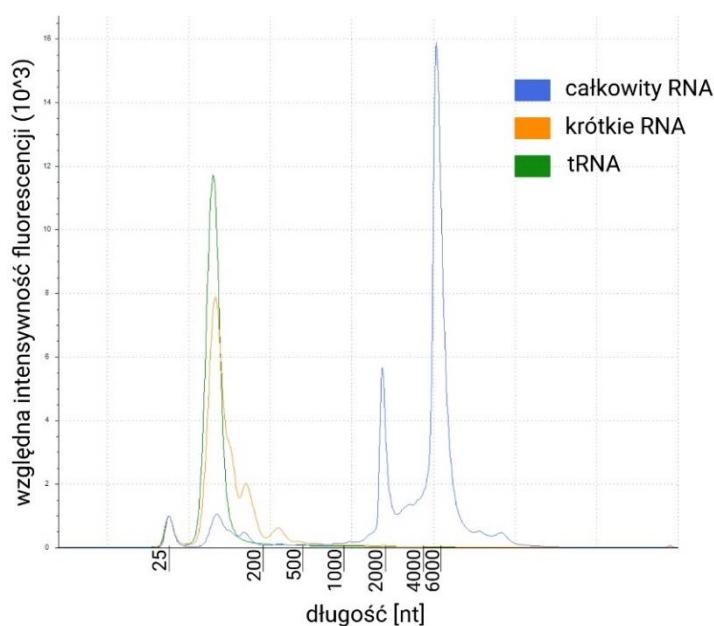


Rysunek 17. Analiza ilościowa aktywności APOBEC3A wobec kanonicznych substratów DNA i RNA. (A,B) Schematyczne przedstawienie kanonicznych substratów ssDNA i RNA poddawanych inkubacji z APOBEC3A. Resztę nukleotydową ulegającą deaminacji zaznaczono kolorem zielonym. (C, D, E, F) Wykresy przedstawiające zawartość nukleozydów: dC (C), 5mdC (D), 5hmdC (E), rC (F) powstałych w wyniku trawienia kanonicznych substratów po reakcji z APOBEC3A. Zawartość dC/5mdC/5hmdC/rC wyrażono jako procentowy udział danego nukleozydu w puli wszystkich nukleozydów w próbce odniesiony do kontroli bez białka. Wartości p obliczono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANNOVA) oraz testu Dunnetta. ****p < 0,0001. Stworzono w serwisie BioRender.com.

4.3. Charakterystyka aktywności deaminazy APOBEC3A wobec tRNA

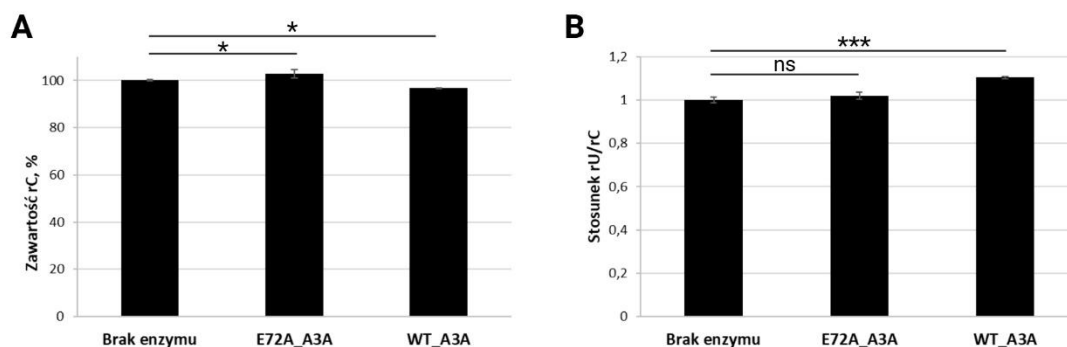
4.3.1. Aktywność APOBEC3A wobec tRNA *in vitro*

Biorąc pod uwagę postulowane pochodzenie rodziny białek AID/APOBEC od przodka deaminaz adenozytyny tRNA oraz fakt, że APOBEC3A wykazuje aktywność wobec RNA przyjmujących strukturę spinki do włosów (zasadniczy element struktury tRNA), w kolejnym etapie poddano weryfikacji hipotezę, że APOBEC3A może katalizować edycję cytydyny do urydyny w tRNA. Aby ustalić, czy APOBEC3A katalizuje konwersję cytydyny do urydyny w natywnych tRNA, z komórek HEK293T wyizolowano tę frakcję RNA a następnie przeprowadzono test deaminacji *in vitro*. Szczegółowy opis izolacji cząsteczek tRNA z komórek HEK293T znajduje się w podrozdziale 3.2.9.4. W pierwszym etapie przeprowadzono izolację całkowitego RNA, z którego następnie wydzielono frakcję tzw. krótkich RNA o długości mniejszej niż 200 nt (podrozdział 3.2.9.2. i 3.2.9.3.). Mieszaninę krótkich RNA rozdzielono w 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących, a następnie wycięto fragment żelu zawierający cząsteczki o długości właściwej dla tRNA (70-95 nt). Frakcję tRNA eluowano z żelu i oczyszczono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.2.10.4. Jakość wszystkich wyizolowanych frakcji RNA (w tym frakcji tRNA) oceniono za pomocą automatycznej elektroforezy kapilarnej (system Agilent TapeStation) (podrozdział 3.2.11.3.). Na rysunku 18 przedstawiono profil rozkładu wielkości poszczególnych frakcji RNA. Analiza potwierdziła ich wysoką integralność oraz oczekiwany profil rozkładu wielkości.



Rysunek 18. Profil rozkładu wielkości frakcji całkowitego RNA, krótkich RNA oraz tRNA wyizolowanych z komórek HEK293T. Stworzono w serwisie BioRender.com.

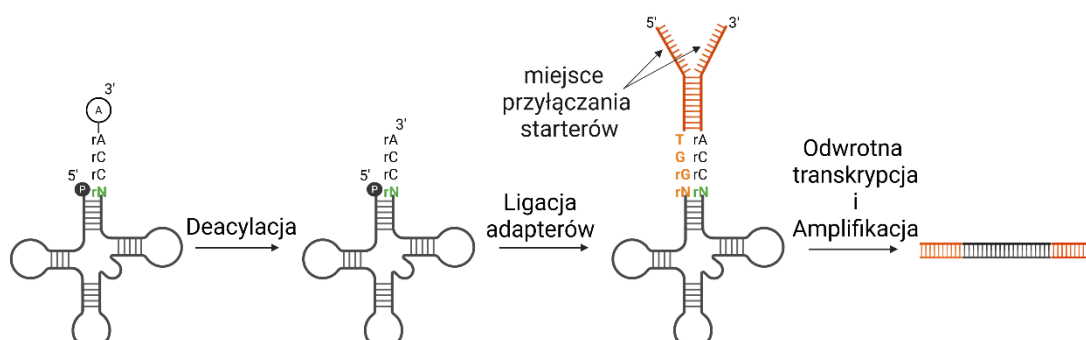
Frakcja tRNA z HEK293T posłużyła jako substrat w teście deaminacji. Przygotowano 3 zestawy reakcji: (i) próby z WT_A3A, (ii) próby kontrolne z E72A_A3A oraz (iii) próby kontrolne bez enzymu. Produkty reakcji deaminacji trawiono do nukleozydów, a następnie analizowano metodą UPLC (podrozdział 3.2.14.2.). Jak pokazano na rysunku 19, w próbie zawierającej WT_A3A zaobserwowano 1% spadek zawartości cytydyny w całkowitej puli nukleozydów w porównaniu z kontrolą zawierającą E72A_A3A oraz kontrolą bez białka. Taki spadek zawartości cytydyny mógł oznaczać, że średnio w jednej na cztery cząsteczki tRNA jedna cytydyna została edytowana (zakładając, że przeciętna długość tRNA wynosi 83 nukleotydy, a średnia zawartość cytydyny wynosi 32%). Powyższe obserwacje potwierdzono także na podstawie wzrostu stosunku stężenia produktu deaminacji (urydyny) do substratu (cytydyny) w próbie WT_A3A w porównaniu z próbami kontrolnymi. Aktywność deaminacyjna białek AID/APOBEC wobec tRNA nie była jak dotąd opisywana w literaturze. Niniejszy wynik jest zatem pierwszym doniesieniem o takiej aktywności.



Rysunek 19. Analiza ilościowa aktywności APOBEC3A wobec tRNA wyizolowanego z komórek HEK293T. (A) Wykres przedstawiający zawartość rC powstałego w wyniku trawienia tRNA pochodzącego z HEK293T po reakcji z APOBEC3A (B) Wykres przedstawiający stosunek zawartości rC do rU powstałych w wyniku trawienia tRNA pochodzącego z HEK293T po reakcji z APOBEC3A. Zawartość rC oraz rU wyrażono jako procentowy udział danego nukleozydu w puli wszystkich nukleozydów w próbce odniesiony do kontroli bez białka. Wartości p obliczono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANNOVA) oraz testu Dunnetta. * $p < 0,1$, *** $p < 0,001$. Stworzono w serwisie BioRender.com.

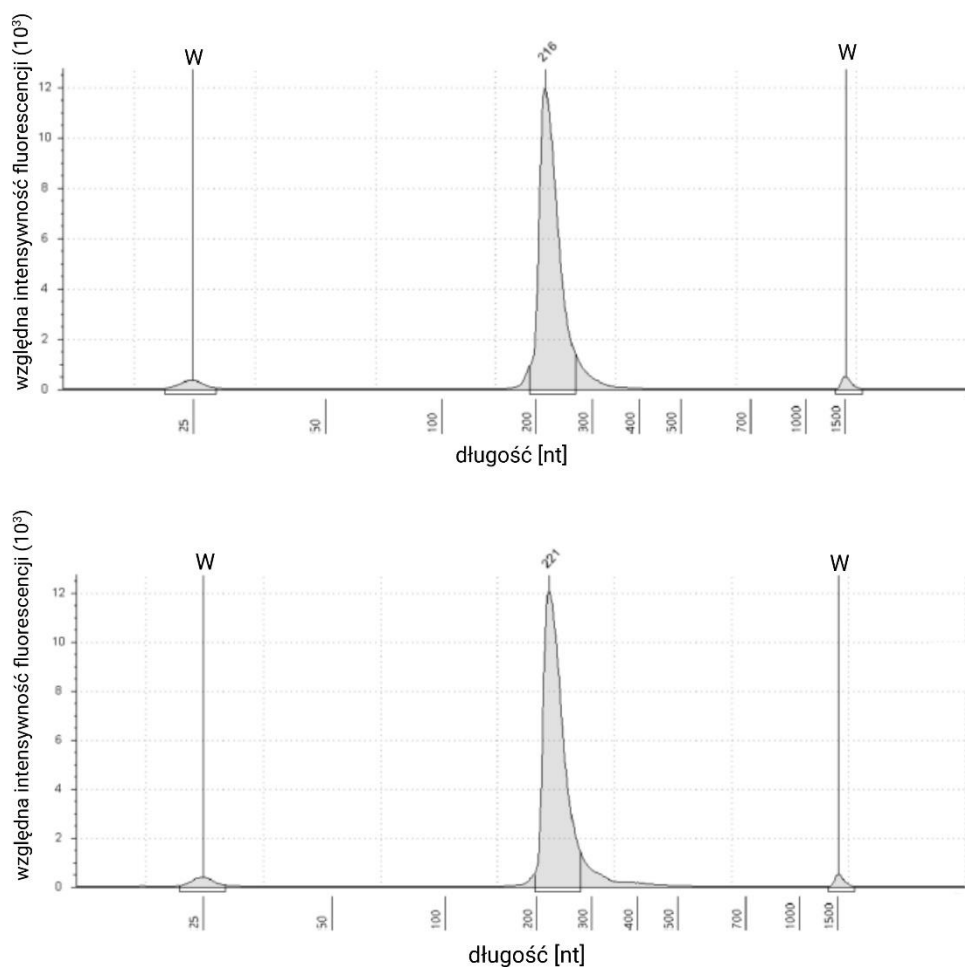
Spektrometria mas umożliwiła ilościową analizę zmian poziomu cytydyny oraz urydyny w badanych próbach. W następnym kroku podjęto działania w celu ustalenia, czy istnieje określony wzór edycji tRNA przez APOBEC3A, czy jest to może proces losowy. W tym celu przeprowadzono analizę NGS tRNA wyizolowanego z komórek HEK293T i poddanego działaniu WT_A3A. Jako kontrole wykorzystano tRNA poddany działaniu E72A_A3A oraz tRNA niepoddany działaniu białka. Aby przygotować biblioteki do sekwencjonowania, zastosowano protokół YAMAT-seq [160], zaprojektowany specjalnie do sekwencjonowania cząsteczek tRNA. Ze względu na wysoką stabilność struktury tRNA oraz komplementarne połączenie końca 5' z fragmentem końca 3', tworzące trzon cząsteczki tRNA, ligacja standardowych adapterów do amplifikacji i sekwencjonowania krótkich RNA jest utrudniona. Może to prowadzić do niekompletnej reprezentacji tRNA w zebranych danych z sekwencjonowania. YAMAT-seq omija problem nieefektywnej ligacji standardowych adapterów, wykorzystując adaptory w kształcie litery Y. Zaprojektowane Y-adaptory to hybrydy DNA-RNA, w których fragment RNA komplementarnie łączy się z wystającym, jednoniciowym końcem tRNA, natomiast do fragmentu DNA przyłączane są startery do odwrotnej transkrypcji i amplifikacji. Aby zapewnić efektywne

przyłączenie adapterów, w protokole YAMAT-seq uwzględniono również etap usuwania reszt aminokwasowych przyłączonych do końca 3' dojrzałych cząsteczek tRNA. Po przyłączeniu adapterów do cząsteczek tRNA kolejne etapy, czyli odwrotna transkrypcja oraz amplifikacja cDNA, przebiegają zgodnie ze standardowym protokołem przygotowania bibliotek do sekwencjonowania krótkich RNA. Schemat metody YAMAT-seq przedstawiono na rysunku 20. Szczegółowy opis przygotowania bibliotek metodą YAMAT-seq znajduje się w podrozdziale 3.2.7.



Rysunek 20. Schemat przygotowania bibliotek metodą YAMAT-seq. Proces przygotowania bibliotek tRNA do sekwencjonowania rozpoczyna się od usunięcia reszt aminokwasowych z końca 3' dojrzałych cząsteczek tRNA w wyniku deacylacji. Następnie do cząsteczek tRNA specyficznie przyłącza się hybrydowy adapter DNA/RNA w kształcie litery Y. Powstałe produkty (tRNA-adapter) są amplifikowane i sekwencjonowane. Kolorem pomarańczowym oznaczono adapter. Kolorem zielonym oznaczono niesparowany nukleotyd charakterystyczny dla danego tRNA. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Rozkład wielkości otrzymanych bibliotek tRNA oceniono za pomocą automatycznej elektroforezy kapilarnej (system Agilent TapeStation) (podrozdział 3.2.11.3.). Profil rozkładu wielkości wybranych bibliotek tRNA przedstawiono na rysunku 21. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone w Pracowni Genomiki w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN.



Rysunek 21. Profil rozkładu wielkości dwóch przykładowych bibliotek tRNA otrzymanych metodą YAMAT-seq. W – wzorzec wielkości High Sensitivity D1000 Ladder. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Dane uzyskane w wyniku sekwencjonowania NGS zostały przeanalizowane przez mgr inż. Jarosława Sikorę z Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN. Szczegółowy opis zastosowanych parametrów do identyfikacji cząsteczek tRNA oraz miejsc edycji cytydyny do urydyny w zidentyfikowanych tRNA znajduje się w manuskrypcie zdeponowanym w bazie bioRxiv [96]. Wysokiej jakości odczyty, po usunięciu sekwencji adapterów, zostały zmapowane do ludzkiego genomu hg38. Do dalszych analiz uwzględniono jedynie odczyty mapujące się do regionów tRNA, które miały pokrycie na poziomie co najmniej 250. Zastosowane podejście pozwoliło na identyfikację 87 różnych izodekoderów tRNA (załącznik 1).

W kolejnym etapie poszukiwano zjawiska edycji w cząsteczkach tRNA poddanych działaniu deaminazy APOBEC3A. Zidentyfikowano 55 izodekoderów tRNA, które posiadały co najmniej jedno miejsce edycji cytydyny do urydyny, widoczne

w odczytanych sekwencjach jako zmiana C>T. Niektóre z nich były edytowane w dwóch miejscach (załącznik 2). Wydajność edycji poszczególnych pozycji wahała się od 1,6% do 98,8%. Co istotne, częstość zmian w próbach kontrolnych była pomijalna (średnio ~0,4% dla próbek zawierających E72A_A3A oraz ~0,2% dla próbek bez białka). Ponadto, w żadnej z analizowanych prób nie zaobserwowano innych znaczących zmian sekwencji badanych tRNA. Dalsze analizy ograniczono do pozycji edytowanych z co najmniej 10% wydajnością. W rezultacie, zidentyfikowano 45 pozycji w 35 izodekoderach tRNA, (rysunek 22 oraz tabela 30).

Tabela 30. Izodekodery tRNA edytowane przez APOBEC3A (> 10% wydajność edycji).

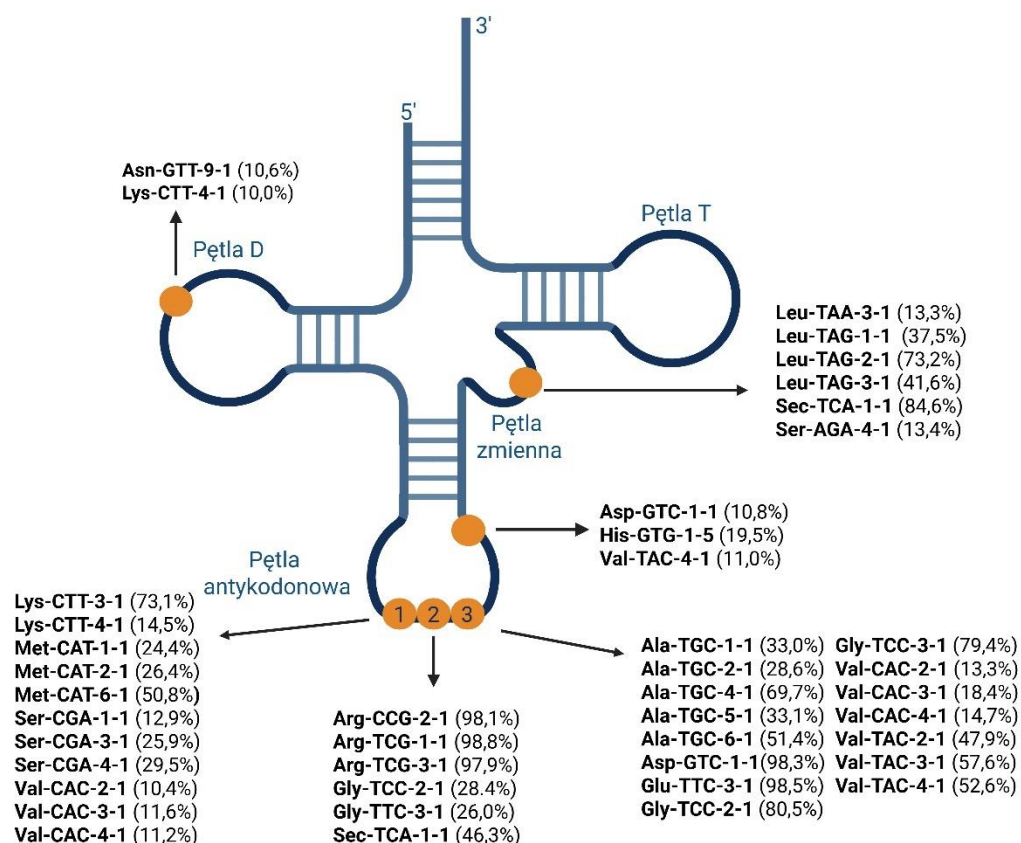
W tabeli podano średnią z trzech powtórzeń wydajność edycji danego izodekodera tRNA, motyw sekwencyjny deaminowanej cytydyny oraz nazwę regionu tRNA, w którym nastąpiła deaminacja.

W przypadku edycji w antykodonie, podano numer deaminowanej pozycji.

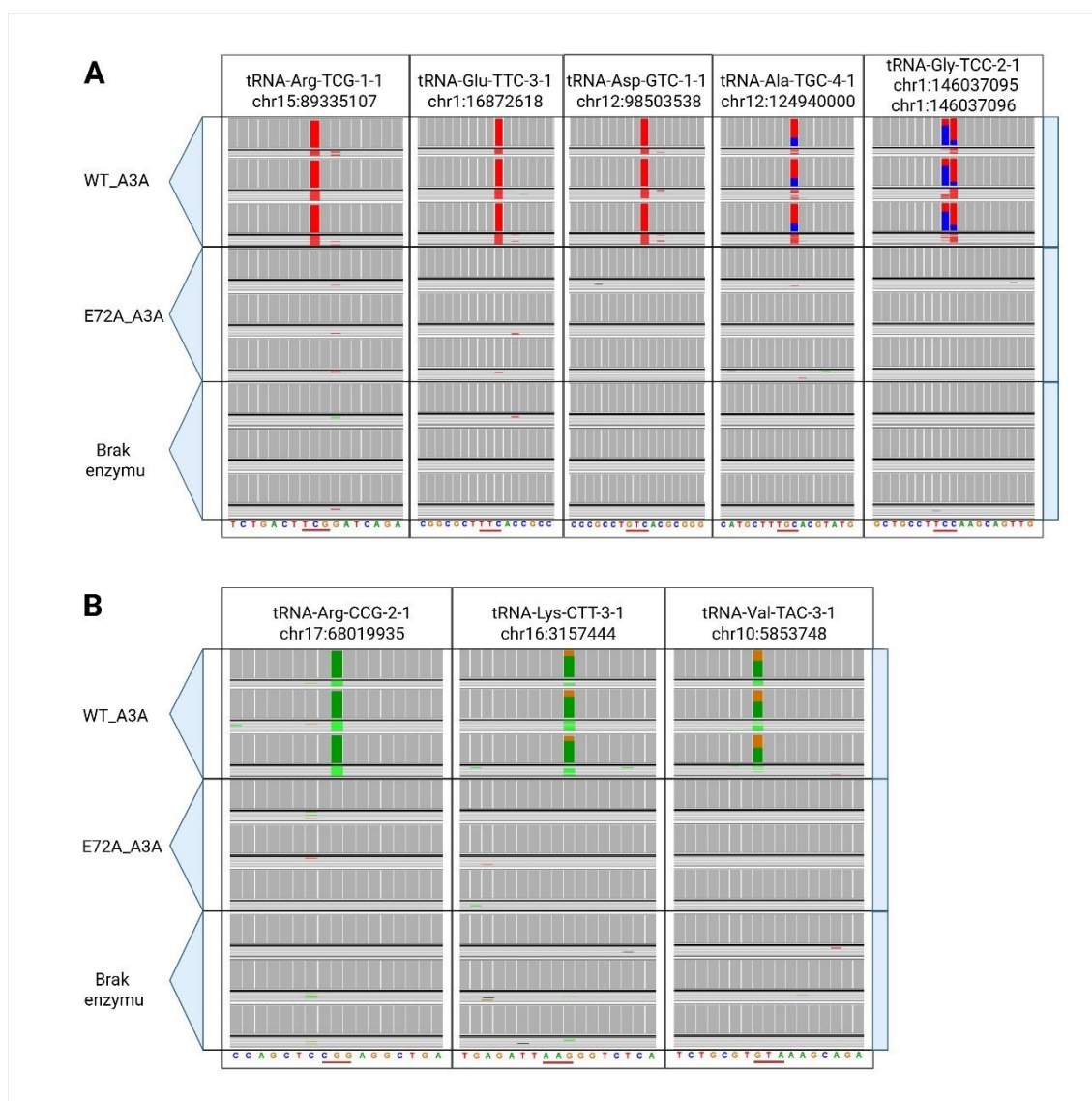
Lp.	tRNA	Średnia wydajność edycji [%]	Motyw sekwencyjny	Region tRNA	Pozycja w antykodonie
1	Ala-TGC-1-1	33.0	TGCAT	Pętla antykodonowa	3
2	Ala-TGC-2-1	28.6	TGCAT	Pętla antykodonowa	3
3	Ala-TGC-4-1	69.7	TGCAC	Pętla antykodonowa	3
4	Ala-TGC-5-1	33.1	TGCAT	Pętla antykodonowa	3
5	Ala-TGC-6-1	51.4	TGCAT	Pętla antykodonowa	3
6	Arg-CCG-2-1	98.1	TCCGG	Pętla antykodonowa	2
7	Arg-TCG-1-1	98,8	TTCGG	Pętla antykodonowa	2
8	Arg-TCG-3-1	97.9	TTCGG	Pętla antykodonowa	2
9	Asn-GTT-9-1	10.6	ATCGG	Pętla D	n.d.
10	Asp-GTC-1-1	98.3	GTCAC	Pętla antykodonowa	3
		10.8	CACGC	Pętla antykodonowa	n.d.
11	Glu-TTC-3-1	98.5	TTCAC	Pętla antykodonowa Pętla antykodonowa	3
12	Gly-TCC-1-1	26.4	TTCCA	Pętla antykodonowa	2
		79.9	TCCAA	Pętla antykodonowa	3
13	Gly-TCC-2-1	28.4	TTCCA	Pętla antykodonowa	2
		80.5	TCCAA	Pętla antykodonowa	3
14	Gly-TCC-3-1	26.0	TTCCA	Pętla antykodonowa	2
		79.4	TCCAA	Pętla antykodonowa	3
15	His-GTG-1-5	19.5	GGCCG	Pętla antykodonowa	n.d.
16	Leu-TAA-3-1	13.3	TTCAT	Pętla zmienna	n.d.

17	Leu-TAG-1-1	37.5	TTCGG	Pętla zmienna	n.d.
18	Leu-TAG-2-1	73.2	TTCGG	Pętla zmienna	n.d.
19	Leu-TAG-3-1	41.6	TTCGA	Pętla zmienna	n.d.
20	Lys-CTT-3-1	73.1	CCCTT	Pętla antykodonowa	1
21	Lys-CTT-4-1	14.5	CTCTT	Pętla antykodonowa	1
		10.0	GTCGG	Pętla D	n.d.
22	Met-CAT-1-1	24.4	CTCAT	Pętla antykodonowa	1
23	Met-CAT-2-1	26.4	CTCAT	Pętla antykodonowa	1
24	Met-CAT-6-1	50.8	CTCAT	Pętla antykodonowa	1
25	SeC-TCA-1-1	46.3	TTCAA	Pętla antykodonowa	2
		84.6	AGCGA	Pętla zmienna	n.d.
26	Ser-AGA-4-1	13.4	CTCCC	Pętla zmienna	n.d.
27	Ser-CGA-1-1	12.9	CTCGA	Pętla antykodonowa	1
28	Ser-CGA-3-1	25.9	CTCGA	Pętla antykodonowa	1
29	Ser-CGA-4-1	29.5	CTCGA	Pętla antykodonowa	1
30	Val-CAC-2-1	10.4	CTCAC	Pętla antykodonowa	1
		13.3	CACAC	Pętla antykodonowa	3
31	Val-CAC-3-1	11.6	CTCAC	Pętla antykodonowa	1
		18.4	CACAC	Pętla antykodonowa	3
32	Val-CAC-4-1	11.2	CTCAC	Pętla antykodonowa	1
		14.7	CACAC	Pętla antykodonowa	3
33	Val-TAC-2-1	47.9	TACAC	Pętla antykodonowa	3
34	Val-TAC-3-1	57.6	TACAC	Pętla antykodonowa	3
35	Val-TAC-4-1	52.6	TACAC	Pętla antykodonowa	3
		11.0	CACGC	Pętla antykodonowa	n.d.

n.d. – nie dotyczy



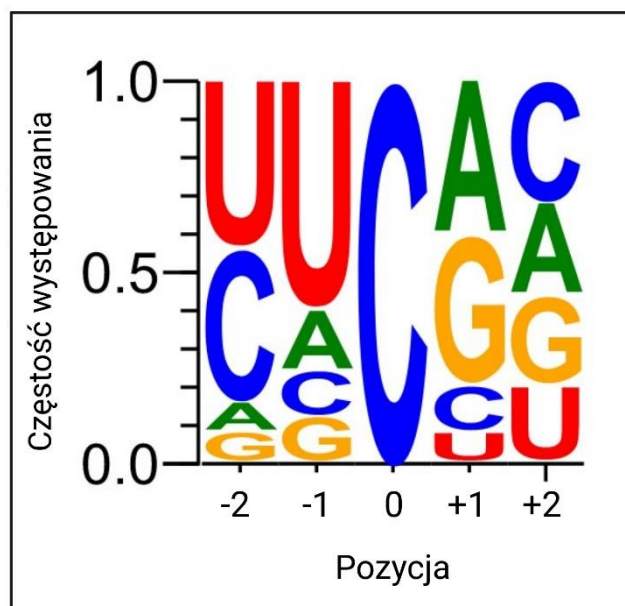
Rysunek 22. Schematyczne przedstawienie miejsc w tRNA ulegających deaminacji pod wpływem działania APOBEC3A. Pomarańczowe kropki wskazują cytydyny ulegające deaminacji w różnych izodekoderach tRNA. Na rysunku uwzględniono wszystkie miejsca edytowane z wydajnością powyżej 10%. W nawiasach podano wartość średniej wydajności edycji. Stworzono w serwisie BioRender.com.



Rysunek 23. Przykłady edycji cytydyny do urydyny w pętach antykodonowych wybranych izodekoderów tRNA. Wizualizacja zmapowanych odczytów do genów tRNA wykonana za pomocą programu Integrative Genomics Viewer (IGV) dla tRNA poddanych działaniu WT_A3A oraz odpowiednich kontroli (E72A_A3A i kontroli bez białka). Sekwencja referencyjna jest przedstawiona poniżej każdego zestawu odczytów. W ramach sekwencji referencyjnej nukleotydy antykodonu zostały podkreślone. Kolor szary oznacza brak zmian w zestawach odczytów względem sekwencji referencyjnej. **(A)** Edycję cytydyny do urydyny w tRNA kodowanym przez dodatnią nić w genomie przedstawiono jako proporcję koloru czerwonego (dla T) i niebieskiego (dla C), odpowiadającą wydajności edycji. **(B)** Edycję cytydyny do urydyny w tRNA kodowanym przez ujemną nić w genomie zobrazowano jako proporcję koloru zielonego (dla A) i pomarańczowego (dla G), odpowiadającą wydajności edycji. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Najwyższą wydajność edycji zaobserwowano w następujących tRNA: tRNA-Arg-TCG-1-1 (98,8%), tRNA-Glu-TTC-3-1 (98,5%), tRNA-Asp-GTC-1-1 (98,3%) oraz tRNA-Arg-CCG-2-1 (98,1%). Większość edytowanych cytydyn (37 z 45) znajdowała się w pętli antykodonowej, głównie w obrębie samego antykodonu. Na rysunku 23 przedstawiono wizualizacje przykładowych edycji cytydyn do urydyn w pętlach antykodonowych tRNA. W przypadku mapowania do dodatniej nici w genomie edycja ta jest obserwowana jako mutacja C>T, natomiast w przypadku mapowania do ujemnej nici w genomie ta zmiana jest obserwowana jako mutacja G>A. Wśród pozycji antykodonu najwydajniej były edytowane druga i trzecia pozycja antykodonu (>98% dla trzeciej pozycji w tRNA-Asp-GTC-1-1 i tRNA-Glu-TTC-3-1; >97% dla drugiej pozycji w tRNA-Arg-CCG-2-1 i tRNA-Arg-TCG-1-1). W trzech tRNA pętla antykodonowa była edytowana poza antykodonem – na końcu 3' pętli (pozycja 38), jednak ze stosunkowo niską wydajnością. Maksymalna wydajność edycji w tej pozycji wystąpiła w tRNA-His-GTC-1-5 i wyniosła 19,5%. Zaobserwowano również, że deaminaza APOBEC3A działa nie tylko w pętli antykodonowej, ale także w innych regionach tRNA. W dwóch tRNA (tRNA-Asn-GTT-9-1, tRNA-Lys-CTT-4-1) wykryto deaminację w obrębie pętli D (pozycja 17), jednak z niską wydajnością (~11%). Co ciekawe, tRNA-Asn-GTT-9-1 podlegał edycji wyłącznie w pętli D. tRNA-Leu-TAA-3-1, tRNA-Leu-TAG-1-1, tRNA-Leu-TAG-2-1, tRNA-Leu-TAG-3-1, tRNA-Ser-AGA-4-1, tRNA-Sec-TCA-1-1 ulegały deaminacji w pętli zmiennej. W dwóch izodekoderach edycja w pętli zmiennej była bardzo efektywna, osiągając ~85% w przypadku tRNA-Sec-TCA-1-1 oraz ~73% w przypadku tRNA-Leu-TAG-2-1. Co istotne, deaminacja dotyczyła jedynie tRNA posiadających długą pętlę zmienną. Podobnie jak w przypadku pętli antykodonowej, w pętli zmiennej edytowane były cytydyny znajdujące się w centrum pętli (tRNA-Leu-TAA-3-1, tRNA-Leu-TAG-1-1, tRNA-Leu-TAG-2-1, tRNA-Leu-TAG-3-1, tRNA-Ser-AGA-4-1) lub ułożone na jej końcu 3' (tRNA-Sec-TCA-1-1). Interesujące jest, że wszystkie tRNA edytowane wyłącznie poza pętlą antykodonową nie zawierały cytydyny w sekwencji antykodonu. 10 izodekoderów ulegało edycji w dwóch pozycjach. Aby sprawdzić czy cytydyny w tRNA ulegające deaminacji występowały w ramach preferowanego przez APOBEC3A kontekstu sekwencyjnego, przeanalizowano częstość występowania poszczególnych nukleozydów w sąsiedztwie deaminowanej cytydyny za pomocą aplikacji WebLogo. Jak przedstawiono na rysunku 24, edytowane cytydyny występowały głównie w motywie sekwencyjnym 5'(T/C)TC(A/G), gdzie cytydyna ulegająca deaminacji jest podkreślona.

Ciekawym przykładem jest tRNA-Sec-TCA, w którym cytydyna znajdująca się w pozycji 56 w pętli zmiennej w niepreferowanym przez APOBEC3A kontekście 5'GC, była edytowana z większą wydajnością niż cytydyna w pozycji 37 (druga pozycja antykodonu) w pętli antykodonowej, występująca w preferowanym motywie sekwencyjnym 5'UC. Sugeruje to, że na wydajność edycji mogą istotnie wpływać również czynniki strukturalne inne niż sam kontekst sekwencyjny.



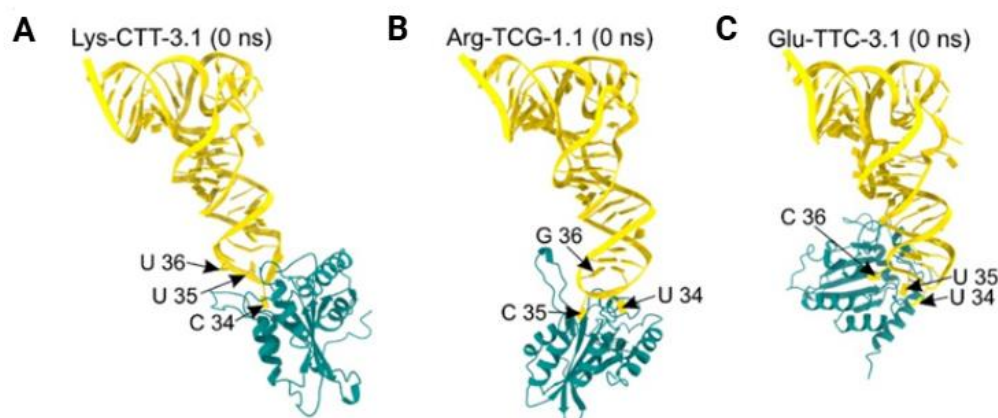
Rysunek 24. Schematyczne przedstawienie częstości nukleozydów otaczających cytydynę (± 2 nukleozydy od cytydyny w pozycji 0) deaminowaną przez APOBEC3A w izodekoderach tRNA. Rysunek wygenerowano przy pomocy aplikacji WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). Stworzono w serwisie BioRender.com.

Podsumowując, uzyskane dane wskazują, że enzym APOBEC3A katalizował deaminację cytydyny do urydyny w szerokim spektrum izodekoderów tRNA. Deaminacja charakteryzowała się wysoką specyficznością sekwencyjną oraz preferencją wobec cytydyn znajdujących się w antykodonie. Co istotne, preferencje sekwencyjne i strukturalne tej reakcji były zgodne z wcześniej opisanymi dla aktywności APOBEC3A wobec innych substratów [108-110].

4.3.2. Strukturalne uwarunkowania aktywności APOBEC3A wobec tRNA

W celu zbadania strukturalnych uwarunkowań deaminacji poszczególnych pozycji antykodonu przez APOBEC3A, stworzono modele struktur trzeciorzędowych kompleksów tego enzymu z trzema izodekoderami tRNA. Następnie dla wygenerowanych modeli przeprowadzono dynamikę molekularną. Modelowanie kompleksów APOBEC3A-tRNA oraz dynamika molekularna zostały przeprowadzone przez dr hab. Miłosza Ruszkowskiego, prof. ICHB PAN, z Zakładu Biologii Strukturalnej Eukariontów ICHB PAN.

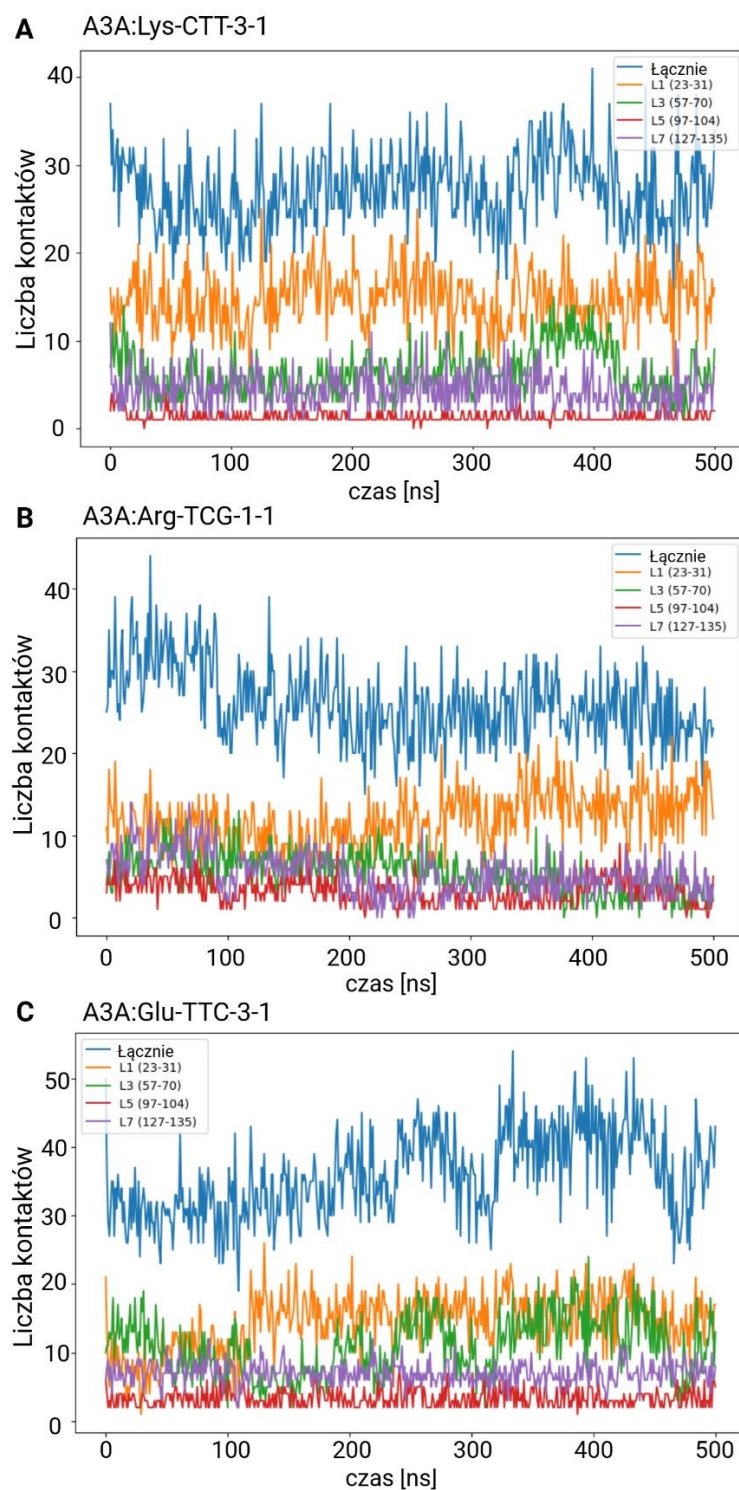
Do analizy wybrano trzy izodekodery tRNA: tRNA-Lys-CTT-3-1, tRNA-Arg-TCG-1-1 oraz tRNA-Glu-TTC-3-1, w których zidentyfikowano wysoce wydajną edycję cytydyny w, odpowiednio, pierwszej (73,1%), drugiej (98,8%) i trzeciej (98,5%) pozycji antykodonu. Dokowanie edytowanych w tRNA cytydyn do centrum aktywnego APOBEC3A zostało przeprowadzone z wykorzystaniem struktury APOBEC3A w kompleksie z ssDNA (PDB ID: 5keg). W żadnym z modeli nie zaobserwowano konfliktów sterycznych między białkiem a tRNA, co potwierdziło możliwość edycji wszystkich trzech pozycji antykodonu. Na rysunku 25 przedstawiono wygenerowane modele kompleksów APOBEC3A z wybranymi izodekoderami tRNA.



Rysunek 25. Modele struktur kompleksów APOBEC3A z tRNA-Lys-CTT-3-1 (A), tRNA-Arg-TCG-1-1 (B), Glu-TTC-3-1 (C) w punkcie początkowym symulacji. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Podczas symulacji dynamiki molekularnej zarejestrowano łączną liczbę oddziaływań utworzonych pomiędzy białkiem a tRNA, w tym w szczególności tych,

pochodzących od pętli otaczających centrum aktywne (L1, L3, L5, L7), którym przypisuje się udział w rozpoznawaniu substratów (rysunek 26). Największą łączną liczbę oddziaływań odnotowano w kompleksie APOBEC3A-tRNA-Glu-TTC-3-1. We wszystkich modelach dominujący był udział pętli L1 oraz L3. Co ciekawe, niedawno wykazano, że pętla L1 ma istotny udział w rozpoznawaniu mRNA przez APOBEC3A [162]. Należy jednak zauważyć, że pętla ta tworzyła porównywalną liczbę oddziaływań ze wszystkimi badanymi izodekoderami tRNA. Najistotniejsze różnice między analizowanymi modelami dotyczyły natomiast oddziaływań z pętlą L3, przy czym największą ich liczbą charakteryzował się model APOBEC3A-tRNA-Glu-TTC-3-1 (deaminacja w trzeciej pozycji antykodonu). Uzyskane wyniki wspierają wcześniejsze obserwacje dotyczące roli pętli L1 w rozpoznawaniu cząsteczek RNA (w tym przypadku tRNA), a także sugerują, że liczba lub rodzaj oddziaływań z udziałem pętli L3 są czynnikiem determinującym wydajność edycji określonej pozycji tRNA.

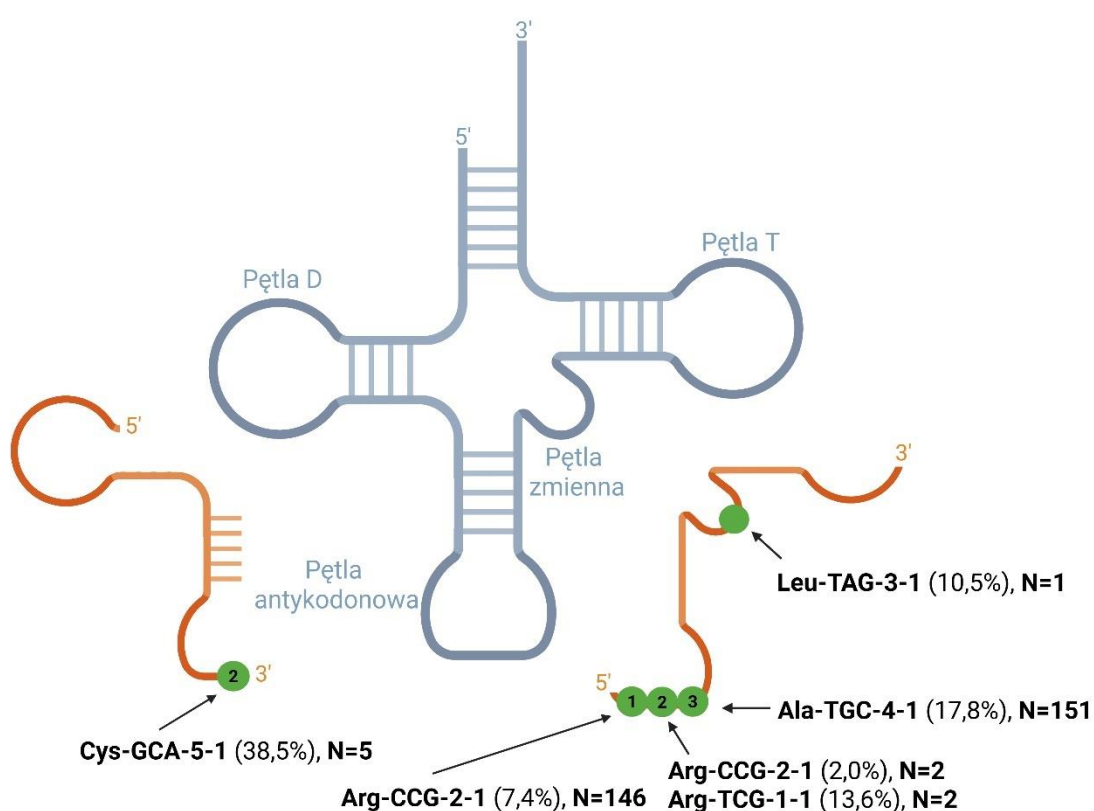


Rysunek 26. Analiza oddziaływań APOBEC3A z z tRNA-Lys-CTT-3-1 (A), tRNA-Arg-TCG-1-1 (B), Glu-TTC-3-1 (C) podczas symulacji dynamiki molekularnej. Na wykresach niebieskim kolorem zaznaczono całkowitą liczbę oddziaływań utworzonych w każdym kompleksie oraz liczbę oddziaływań utworzonych z pętlami L1, L3, L5, L7 zaznaczono, odpowiednio, kolorem pomarańczowym, zielonym, czerwonym i fioletowym. Stworzono w serwisie BioRender.com.

4.3.3. Identyfikacja edycji cytydyny do urydyny w tRNA w komórkach nowotworowych *in vivo*

Wiele doniesień literaturowych wskazuje, że ekspresja genu *APOBEC3A* jest podwyższona w komórkach nowotworowych [164]. Przedstawione wyżej wyniki dotyczące aktywności APOBEC3A wobec tRNA *in vitro* sugerują, że enzym ten może również wykazywać zdolność do edytowania tRNA *in vivo*. Jeśli proces edycji tRNA rzeczywiście zachodzi w warunkach fizjologicznych, można oczekiwać, że w komórkach nowotworowych z podwyższoną ekspresją genu *APOBEC3A* obecne będą produkty reakcji deaminacji. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadzono poszukiwania tego typu produktów w ludzkich komórkach nowotworowych, dla których dostępne są sekwencje: krótkich RNA (miRNA-Seq), mRNA (RNA-Seq) oraz genomowego DNA (WGS), zgromadzone w ramach projektu The Cancer Genome Atlas (TCGA). Analizy bioinformatyczne zostały przeprowadzone przez mgr inż. Jarosława Sikorę z Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej ICHB PAN, a szczegółowy opis analizy obliczeniowej znajduje się w pracy zdeponowanej w bazie bioRxiv [96]. Pełne zestawy danych w bazie TCGA obejmowały 1230 pacjentów z rozpoznanymi 19 typami nowotworów. Niestety, standardowe metody stosowane w analizie transkryptomu nie pozwalają na sekwencjonowanie tRNA. Przyjęto jednak założenie, że jeśli cząsteczki tRNA ulegają edycji, to zmiany C>U będą zachowane w powstających z nich tRF. Aby sprawdzić, czy tRNA ulegały edycji *in vivo*, wykorzystano zatem dane o sekwencjach tRF, które są dostępne w zestawach uzyskanych w wyniku sekwencjonowania miRNA. W celu identyfikacji edytowanych miejsc w tRF, sekwencje tych cząsteczek przyrównano do bazy MINTbase v2.0 [165]. Jest to kompleksowa baza danych zawierająca sekwencje tRF zebrane w ramach projektu TCGA. Edycji C>T poszukiwano wśród tRF powstałych z tRNA, w których wcześniej wykryto edycję *in vitro* (załącznik 2). Z analiz wykluczono wszystkie zidentyfikowane pozycje, których potencjalne miejsca edycji pokrywały się z wariantami somatycznymi lub germinalnymi. W rezultacie znaleziono 6 edytowanych pozycji w obrębie tRF pochodzących z 5 izodekoderów tRNA: tRNA-Ala-TGC-4-1, tRNA-Cys-GCA-5-1, tRNA-Arg-TCG-1-1, tRNA-Leu-TAG-3-1, tRNA-Arg-CCG-2-1. Pięć miejsc występowało w antykodonie tRNA: (i) w pierwszej pozycji antykodonu tRNA-Arg-CCG-2-1 (146 pacjentów), (ii) w drugiej pozycji antykodonu tRNA-Cys-GCA-5-2 (2 pacjentów), tRNA-Arg-TCG-1-1 (2 pacjentów)

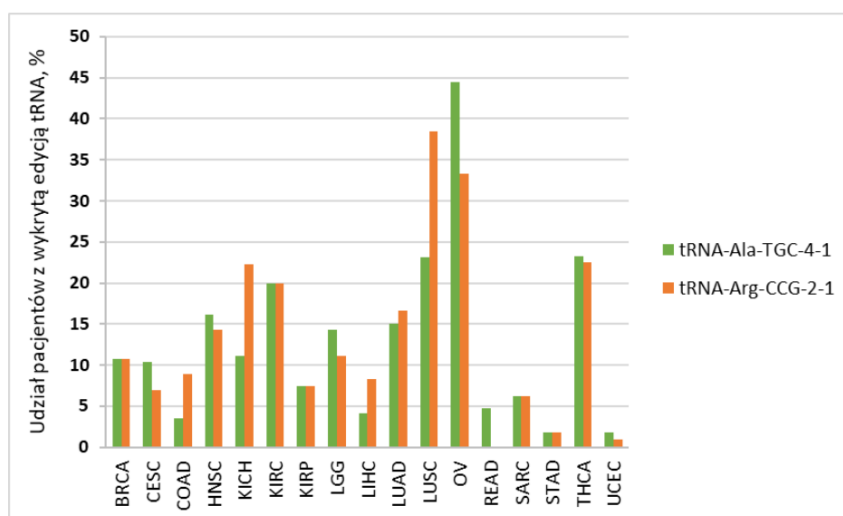
oraz tRNA-Arg-CCG-2-1 (2 pacjentów), (iii) w trzeciej pozycji antykodonu w tRNA-Ala-TGC-4-1 (151 pacjentów). Jedno miejsce zidentyfikowano w pętli zmiennej tRNA-Leu-TAG-3-1 (1 pacjent) (rysunek 27). Powyższy wzór, w którym edytowane miejsca były zlokalizowane w obrębie pętli, korespondował z wcześniejszymi wynikami dotyczącymi tRNA *in vitro*. Wskazywało to, że miejsca te tworzyły struktury pętli zanim doszło do ich edycji. Taką strukturę mogły przyjąć jedynie w obrębie całych tRNA, a nie tRF. W tych ostatnich stanowiłyby bowiem niesparowane końce 5' lub 3', albo tworzyłyby region dwuniciowy. Ta obserwacja przemawia zatem za słusznością przyjętego założenia, że dane o tRF mogą być wykorzystane do analizy edycji w tRNA.



Rysunek 27. Schematyczne przedstawienie miejsc w tRF ulegających deaminacji w komórkach nowotworowych. Zielone kropki oznaczają deaminowane cytydyny. W nawiasach podano średni poziom edycji danego tRF u pacjentów. N – liczba pacjentów, u których zidentyfikowano edycję danej pozycji tRF. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Do dalszych analiz wybrano tylko te tRNA, w których edytowana pozycja występowała u co najmniej 5 pacjentów z danym typem nowotworu. Taki warunek spełniały: tRNA-Ala-TGC-4-1 oraz tRNA-Arg-CCG-2-1 (załącznik 3). Na rysunku 28

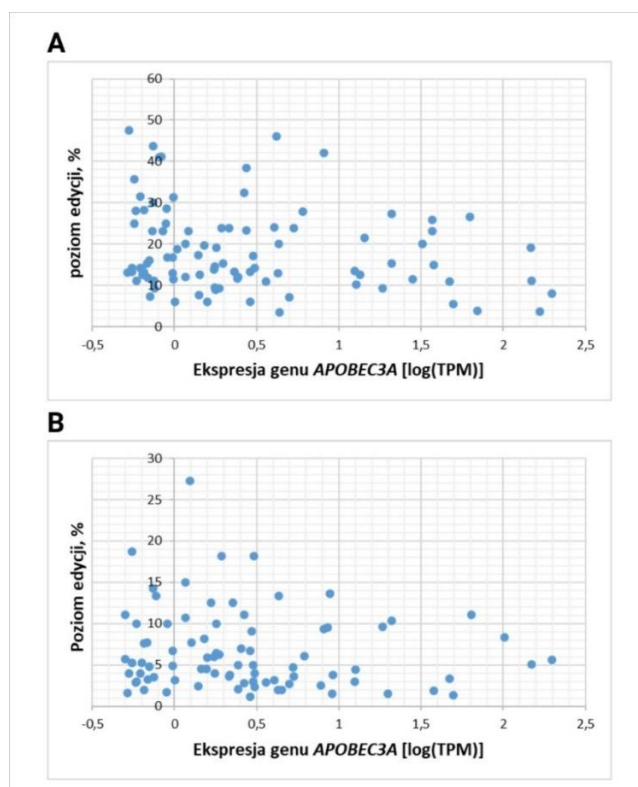
przedstawiono procentowy udział pacjentów z edycją w tRNA-Ala-TGC-4-1 lub tRNA-Arg-CCG-2-1 w danym typie nowotworu. Edycja tRNA-Ala-TGC-4-1 występowała najczęściej u pacjentów z: surowiczym gruczolakorakiem jajnika (ang. *ovarian serous cystadenocarcinoma*, OV), rakiem tarczycy (ang. *thyroid carcinoma*, THCA) oraz rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*, HNSC), natomiast edycja tRNA Arg-CCG-2-1 u pacjentów z: rakiem płaskonabłonkowym płuca (ang. *lung squamous cell carcinoma*, LUSC), OV oraz THCA.



Rysunek 28. Procentowy udział pacjentów z wykrytą edycją tRNA-Ala-TGC-4-1 oraz tRNA-Arg-CCG-2-1 w danym typie nowotworu. BRCA – inwazyjny rak piersi (ang. *breast invasive carcinoma*); CESC – rak szyjki macicy (płaskonabłonkowy i gruczolowy) (ang. *cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma*); COAD – gruczolakorak okrężnicy (ang. *colon adenocarcinoma*); HNSC – rak płaskonabłonkowy głowy i szyi (ang. *head and neck squamous cell carcinoma*); KICH – rak chromofobowy nerki (ang. *kidney chromophobe*); KIRC – rak jasnokomórkowy nerki (ang. *kidney renal clear cell carcinoma*); KIRP – brodawkowaty rak nerki (ang. *kidney renal papillary cell carcinoma*); LGG – glejak niskiego stopnia złośliwości (ang. *brain lower grade glioma*); LIHC – rak wątrobowokomórkowy (ang. *liver hepatocellular carcinoma*); LUAD – gruczolakorak płuca (ang. *lung adenocarcinoma*); LUSC – rak płaskonabłonkowy płuca (ang. *lung squamous cell carcinoma*); OV – surowiczy gruczolakorak jajnika (ang. *ovarian serous cystadenocarcinoma*); READ – gruczolakorak odbytnicy (ang. *rectum adenocarcinoma*); SARC – mięsak (ang. *sarcoma*); STAD – gruczolakorak żołądka (ang. *stomach adenocarcinoma*); THCA – rak tarczycy (ang. *thyroid carcinoma*); UCEC – rak endometrialny trzonu macicy (ang. *uterine corpus endometrial carcinoma*). Stworzono w serwisie BioRender.com.

Następnie przeanalizowano czy u tych pacjentów gen *APOBEC3A* ulegał ekspresji. Ekspresję genu *APOBEC3A* stwierdzono u 68,7% i 63,4% pacjentów, u których wykryto, odpowiednio, edycję tRNA-Ala-TGC-4-1 i tRNA-Arg-CCG-2-1 (załącznik 4 i 5). W ostatnim etapie sprawdzono, czy poziom ekspresji genu *APOBEC3A* korelował z poziomem edycji tRNA (rysunek 29). Współczynnik korelacji dla zależności poziomu edycji tRNA-Ala-TGC-4-1 i tRNA-Arg-CCG-2-1 od ekspresji *APOBEC3A* wynosił, odpowiednio, -0,21 i -0,05. Nie stwierdzono korelacji między poziomem ekspresji genu *APOBEC3A* a poziomem edycji analizowanych tRNA.

Podsumowując, uzyskane dane wskazują na występowanie *in vivo* edycji cytydyny do urydyny w tRNA u chorych na nowotwory. Na obecnym etapie kwestia udziału *APOBEC3A* w procesie deaminacji pozostaje nierozstrzygnięta. Uzyskane wyniki otwierają zatem drogę do dalszych, kompleksowych badań nad edycją tRNA *in vivo*.



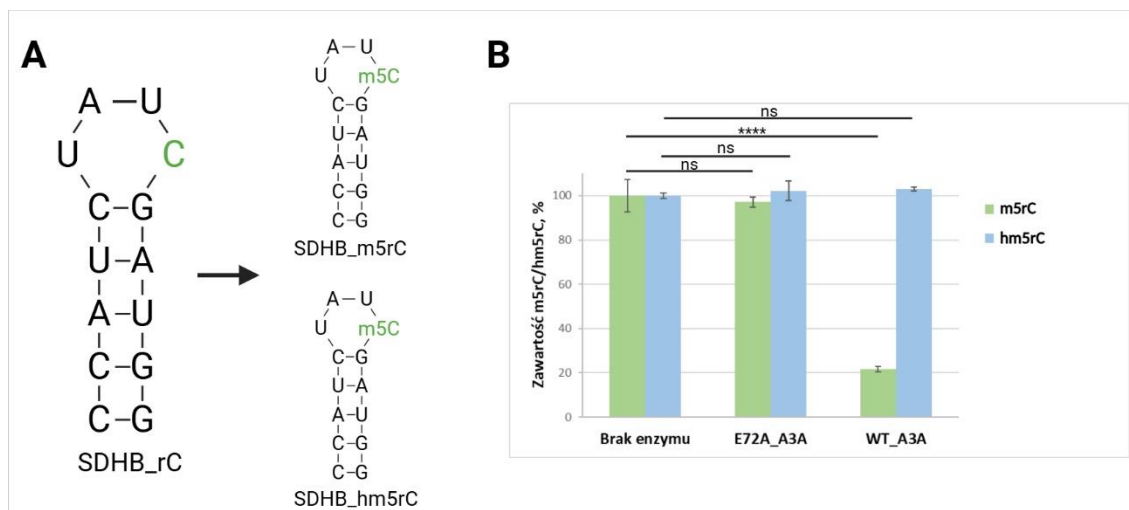
Rysunek 29. Analiza korelacji pomiędzy poziom ekspresji *APOBEC3A* a poziomem edycji tRNA-Ala-TGC-4-1 (A) oraz tRNA-Arg-CCG-2-1 (B). Na wykresach przedstawiono zależność poziomu edycji tRNA-Ala-TGC-4-1 (A) oraz tRNA-Arg-CCG-2-1 (B) od poziomu ekspresji *APOBEC3A*. Każdy punkt na wykresie odpowiada pacjentowi, u którego wykryto edycję danego tRNA. Stworzono w serwisie BioRender.com.

4.4. Aktywność deaminazy APOBEC3A wobec metylowanych pochodnych cytydyny w RNA

Ponieważ APOBEC3A efektywnie deaminuje 5-metylocytydynę oraz 5-hydroksymetylocytydynę w ssDNA, celem badań w kolejnym etapie było sprawdzenie, czy substratem tego enzymu może być także 5-metylocytyna oraz 5-hydroksymetylocytyna w RNA. Obydwie modyfikacje obficie występują zwłaszcza w tRNA. W pierwszym etapie przeanalizowano aktywność deaminazy APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w modelowym fragmencie transkryptu SDHB, w którym wcześniej zidentyfikowano aktywność APOBEC3A wobec cytydyny.

4.4.1. Aktywność deaminazy APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w modelowym RNA

W celu sprawdzenia czy deaminaza APOBEC3A katalizuje reakcję deaminacji 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w modelowym substracie RNA, przeprowadzono test deaminacji zgodnie z wcześniej zoptymalizowanym protokołem do badania aktywności APOBEC3A metodą UPLC. Jako substrat wykorzystano fragment transkryptu SDHB, w którym zlokalizowaną w pętli cytydynę zastąpiono 5-metylocytyną lub 5-hydroksymetylocytyną (SDHB_m5rC, SDHB_hm5rC, tabela 7, rysunek 30A). Oprócz prób z aktywnym białkiem WT_A3A, przygotowano dwie próby kontrolne: reakcje z nieaktywnym wariantem białka E72A_A3A oraz reakcje bez białka. Po przeprowadzeniu testu deaminacji, oligonukleotydy w mieszaninie poreakcyjnej strawiono do pojedynczych nukleozydów, a następnie analizowano metodą UPLC (podrozdział 3.2.14.2.). Jak przedstawiono na rysunku 30B, w próbie poddanej działaniu WT_A3A zaobserwowano spadek zawartości m5rC o około 78% oraz brak spadku zawartości hm5rC w porównaniu z próbami kontrolnymi. Uzyskane wyniki wskazują, że APOBEC3A wykazuje wysoką aktywność enzymatyczną wobec 5-metylocytydyny w modelowym fragmencie mRNA *in vitro*. Aktywność deaminacyjna białek AID/APOBEC wobec 5-metylocytydyny w RNA nie była jak dotąd opisywana w literaturze. Niniejszy wynik jest zatem pierwszym doniesieniem o takiej aktywności.

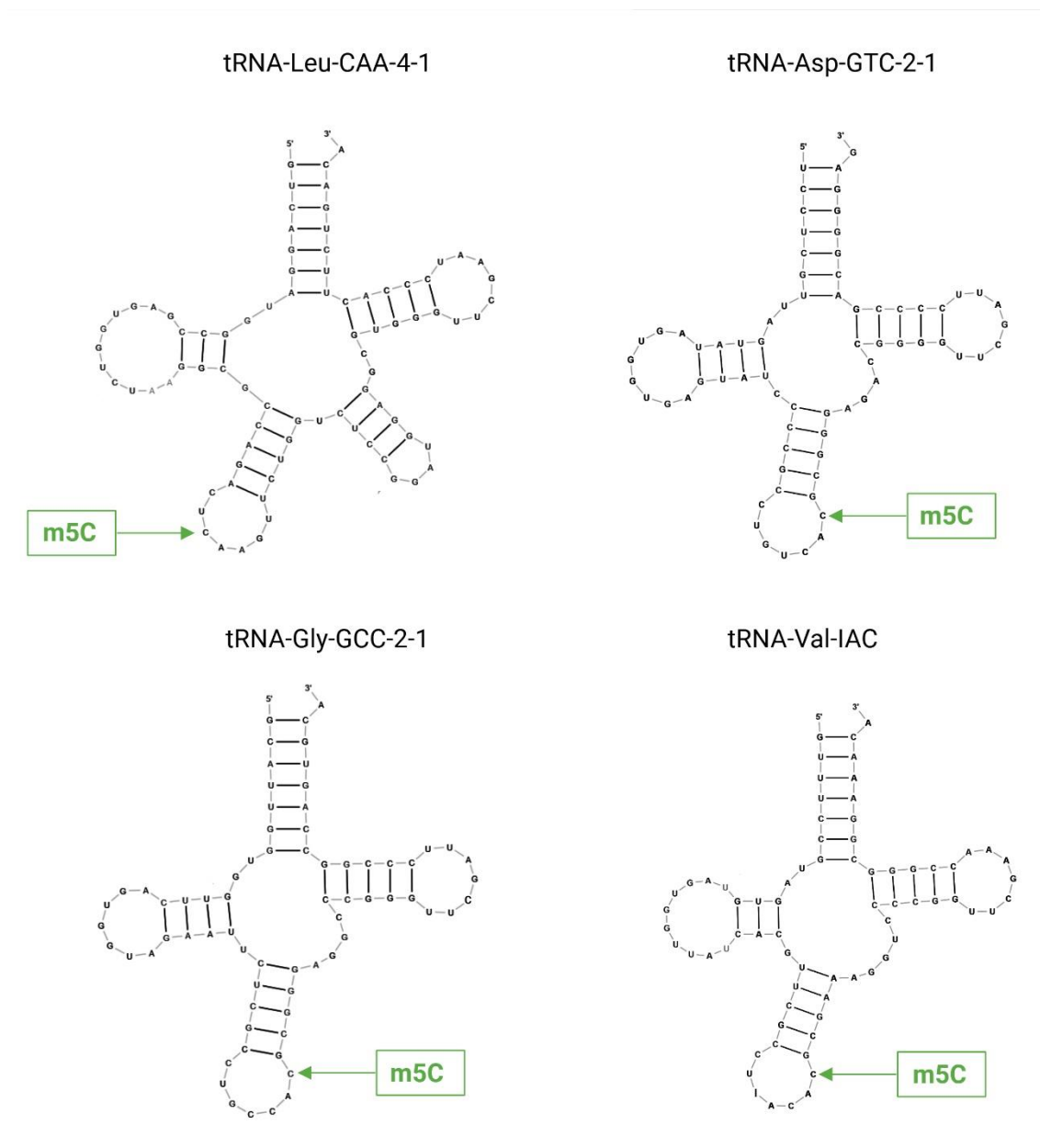


Rysunek 30. Analiza ilościowa aktywności APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w modelowym RNA. (A) Schematyczne przedstawienie kanonicznego substratu RNA (SDHB_rC) oraz analogicznego substratu zawierającego 5-metylocytydynę lub 5-hydroksymetylocytydynę zamiast cytydyny w pozycji 14 cząsteczki (SDHB_m5rC, SDHB_hm5rC). Resztę cytydynową i jej metylowaną pochodną oznaczono kolorem zielonym. (B) Wykres przedstawiający zawartość m5rC oraz hm5rC powstałych w wyniku trawienia oligonukleotydu SDHB_m5rC oraz SDHB_hm5rC po reakcji z APOBEC3A. Zawartość m5rC/hm5rC wyrażono jako procentowy udział danego nukleozydu w puli wszystkich nukleozydów w próbce odniesiony do kontroli bez białka. Wartości p obliczono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANNOVA) oraz testu Dunnetta. ****p < 0,0001. Stworzono w serwisie BioRender.com.

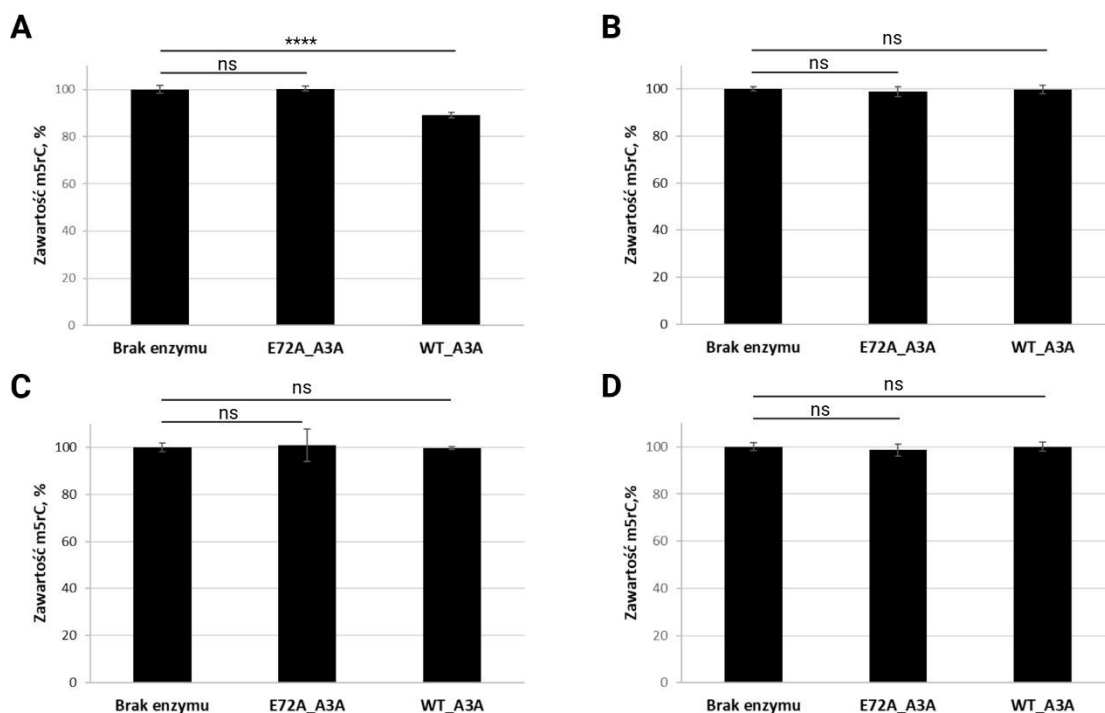
4.4.2. Aktywność deaminazy APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny w tRNA

Wobec braku aktywności APOBEC3A wobec 5-hydroksymetylocytydyny w modelowej cząsteczce mRNA, w testach z tRNA analizowano wyłącznie cząsteczki zawierające 5-metylocytydynę. W celu sprawdzenia aktywności APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny w tRNA przeprowadzono test aktywności deaminazowej z wykorzystaniem syntetycznych tRNA zawierających taką zmodyfikowaną zasadę. Ponieważ najwyższy poziom deaminacji cytydyny w tRNA zaobserwowano w pętli antykodonowej, do analiz wybrano takie cząsteczki tRNA, które naturalnie zawierają 5-metylocytydynę w obrębie tej pętli. Zgodnie z danymi literaturowymi [166, 167], u człowieka występują cztery takie tRNA: tRNA-Leu-CAA-4-1, tRNA-Asp-GTC-2-1, tRNA-Gly-GCC-2-1, tRNA-Val-IAC-1-1 (rysunek 31). tRNA-Leu-CAA-4-1 jest metylowany w pierwszej pozycji antykodonu (pozycja 34), podczas gdy pozostałe

tRNA posiadają metylację na końcu 3' pętli antykodonowej (pozycja 38 lub 39, w zależności od sekwencji tRNA). Wybrane cząsteczki wykorzystano jako substraty w reakcji deaminacji (podrozdział 3.2.14.2). Oprócz prób z aktywnym białkiem WT_A3A, przygotowano dwie próby kontrolne: reakcje z nieaktywnym wariantem białka E72A_A3A oraz reakcje bez białka. Po przeprowadzeniu testu deaminacji, oligonukleotydy w mieszaninie poreakcyjnej strawiono do pojedynczych nukleozydów, a następnie analizowano metodą UPLC. Jak przedstawiono na rysunku 32, WT_A3A wykazywała aktywność tylko wobec 5-metylocytydyny znajdującej się w pozycji 34 tRNA-Leu-CAA-4-1. Deaminacja tRNA-Leu-CAA-4-1 skutkowała około 11% spadkiem zawartości m5rC w puli nukleozydów. W żadnym z tRNA, który posiadał 5-metylocytydynę w pozycji 38 nie zaobserwowano obniżenia zawartości m5rC. W cząsteczkach poddanych działaniu E72A_A3A oraz w kontroli bez białka nie zaobserwowano zmiany zawartości poziomu m5rC.



Rysunek 31. Struktury drugorzędowe tRNA-Leu-CAA-4-1, tRNA-Asp-GTC-2-1, tRNA-Gly-GCC-2-1, tRNA-Val-IAC-1-1 zawierających cytydynę lub 5-metylocytydynę w pętli antykodonowej u człowieka. Pozycje 5-metylocytydyny oznaczono kolorem zielonym. Przedstawione struktury pochodzą z bazy RNACentral [168]. Stworzono w serwisie BioRender.com.



Rysunek 32. Analiza ilościowa aktywności APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny w syntetycznych cząsteczkach tRNA. (A,B,C,D) Wykresy przedstawiające zawartość m5rC powstałych w wyniku trawienia syntetycznych cząsteczek tRNA: tRNA-Leu-CAA-4-1 (**A**), tRNA-Asp-GTC-2-1 (**B**), tRNA-Gly-GCC-2-1 (**C**), tRNA-Val-IAC-1-1 (**D**) po reakcji z APOBEC3A. Zawartość m5rC wyrażono jako procentowy udział m5rC w puli wszystkich nukleozydów w próbce odniesiony do kontroli bez białka. Wartości p obliczono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANNOVA) oraz testu Dunnetta. *** $p < 0,001$. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Uzyskany wynik wskazuje, że 5-metylocytydyna w tRNA może być substratem deaminacji katalizowanej przez APOBEC3A. Konieczne są dalsze badania, które pozwolą określić czynniki determinujące specyficzność tej reakcji, takie jak kontekst strukturalny i sekwencyjny oraz wpływ obecności innych modyfikacji w sąsiedztwie.

5. Dyskusja

Należąca do rodziny białek AID/APOBEC deaminaza APOBEC3A katalizuje reakcję deaminacji w DNA i/lub RNA. Fizjologiczną funkcją APOBEC3A jest udział w mechanizmach odporności wrodzonej, jednak niekontrolowana aktywność tego białka może prowadzić do nowotworzenia. Dotychczas zidentyfikowano zdolność APOBEC3A do deaminacji cytydyny, 5-metylocytydyny i 5-hydroksymetylocytydyny w ssDNA oraz cytydyny w mRNA i wirusowym RNA. Zarówno w DNA, jak i RNA najwyższy stopień deaminacji obserwuje się, gdy cytydyna znajduje się w jednoniciowych pętlach struktur drugorzędowych typu spinki do włosów. Aktywność APOBEC3A wobec DNA jest dobrze scharakteryzowana w literaturze. Natomiast aktywność wobec RNA została odkryta stosunkowo niedawno i pozostaje słabo poznana [103]. Do tej pory nie wiadomo było, czy mRNA jest jedyną klasą komórkowych cząsteczek RNA podlegającą deaminacji katalizowanej przez APOBEC3A. Zważywszy na sugerowane ewolucyjne pochodzenie enzymów rodziny AID/APOBEC od deaminazy aktywnej wobec tRNA oraz preferencję APOBEC3A do struktur drugorzędowych typu spinki do włosów w niniejszej rozprawie doktorskiej zweryfikowano hipotezę, że enzym ten może katalizować deaminację cytydyny do urydyny w tRNA.

5.1. Otrzymywanie aktywnej deaminazy APOBEC3A

W niniejszej pracy opracowano wydajną metodę produkcji rekombinowanego białka APOBEC3A w systemie bakteryjnym. Stanowiło to kluczowy etap w realizacji głównego celu badawczego. Jednym z największych wyzwań w trakcie otrzymywania deaminazy APOBEC3A była jej toksyczność dla komórek bakteryjnych. Co więcej, wcześniejsze badania sugerowały, że indukcja ekspresji genu kodującego ten enzym prowadzi także do powstawania mutacji w wektorze ekspresyjnym [91]. W celu ominięcia wymienionych problemów, zastosowano zoptymalizowane warunki hodowli oraz odpowiedni wektor ekspresyjny. Pozwoliło to na uzyskanie wysoce homogennych preparatów białkowych w ilości umożliwiającej ich dalsze analizy biochemiczne.

W literaturze opisano różne strategie otrzymywania rekombinowanego białka APOBEC3A w systemach bakteryjnych, zazwyczaj w postaci fuzji ze znacznikami ułatwiającymi oczyszczanie lub zwiększającymi jego rozpuszczalność. Do najczęściej stosowanych znaczników należą: His Tag, GST oraz MBP [91, 169, 170]. W niektórych

przypadkach znaczniki te nie były usuwane. Co istotne, dostępne obecnie komercyjnie preparaty APOBEC3A, które wykazują aktywność enzymatyczną są oferowane w fuzji ze znacznikami (firmy: MyBioSource, Cusabio, Creative BioMart). W większości prac uzyskiwane preparaty charakteryzowały się wysoką czystością, choć rzadko przedstawiano szczegółowe dane dotyczące ich homogenności. W jednej z publikacji zwrócono uwagę, że ograniczenie się do jednoetapowego oczyszczania wynikało z niskiej wydajności produkcji białka (testowano 1-10 litrową hodowlę bakteryjną), co uniemożliwiało zastosowanie dodatkowych etapów oczyszczania, np. sączenia molekularnego [171].

W niektórych badaniach, w celu otrzymania APOBEC3A wykorzystywano również systemy eukariotyczne, m.in. linie komórkowe HEK293T oraz systemy owadzie [91, 172, 173]. Choć umożliwiają one uzyskanie białek modyfikowanych potranslacyjnie, to są one jednocześnie mniej wydajne, bardziej kosztowne i czasochłonne w porównaniu z systemami prokariotycznymi. W ostatnim czasie opublikowano pracę opisującą optymalizację ekspresji i oczyszczania białek z rodziny AID/APOBEC w systemach owadzych, co może sugerować rosnące zainteresowanie tym podejściem i jego potencjał w przyszłości [174]. Niemniej jednak, na obecnym etapie rozwoju metod otrzymywania białek rekombinowanych, systemy prokariotyczne – przy odpowiedniej optymalizacji – pozostają lepszym wyborem w przypadku produkcji deaminazy APOBEC3A na potrzeby badań biochemicznych *in vitro*. Podejście zaprezentowane w niniejszej pracy okazało się być bardzo efektywne i może być z powodzeniem stosowane w przyszłości.

Otrzymane preparaty białkowe typu dzikiego – WT_A3A oraz mutant – E72A_A3A przetestowano pod kątem aktywności. Podstawienie reszty kwasu glutaminowego w pozycji 72 resztą alaninową prowadzi do zakłócenia struktury centrum katalitycznego. Reszta glutaminowa zawiera grupę karboksylową (-COOH), która pełni rolę donora protonu niezbędnego do aktywacji cząsteczki wody. Zastąpienie jej grupą metylową (-CH₃) obecną w reszcie alaninowej powoduje utratę dawcy protonu, co skutkuje utratą aktywności enzymatycznej białka, przy zachowaniu jego zdolności do wiązania substratu [75, 93, 175]. E72A_A3A jest często wykorzystywany w badaniach biochemicznych mających na celu scharakteryzowanie funkcji APOBEC3A niezależnych od deaminacji, zatem doskonale nadaje się do przeprowadzenia prób kontrolnych w doświadczeniach ukierunkowanych na ocenę aktywności APOBEC3A [125, 145, 176].

Wyniki prostego testu biochemicznego opartego na metodzie zaproponowanej przez Sohail i współpracowników [163], stanowiącego etap przesiewowy po każdej izolacji białka, jednoznacznie potwierdziły aktywność deaminazową białka WT_A3A oraz brak tej aktywności w przypadku wariantu A3A_E72A w preferowanym motywie sekwencyjnym 5'TC w ssDNA. Ponieważ test przesiewowy pozwalał jedynie na detekcję produktów deaminacji cytydyny w DNA, w kolejnym etapie opracowano uniwersalny protokół do badania aktywności APOBEC3A wobec cytydyny oraz jej metylowanych pochodnych zarówno w DNA jak i RNA, z wykorzystaniem metody UPLC. Metoda ta jest obecnie uznawana za złoty standard w identyfikacji i ilościowej analizie zarówno modyfikowanych, jak i niemodyfikowanych rybo- oraz deoksyrybonukleozydów. Pozwala wykryć już pikomolowe, a nawet femtomolowe ilości nukleozydów w badanych próbach [177-180]. W niniejszej pracy z powodzeniem wykorzystano tę technikę do potwierdzenia aktywności WT_A3A wobec znanych z literatury substratów dla tego białka: (i) cytydyny, 5-metylocytydyny i 5-hydroksymetylocytydyny w DNA oraz (i) cytydyny w RNA w ramach cząsteczki przyjmującej strukturę spinki do włosów [50, 52, 53, 103]. W dalszej części niniejszej pracy stosowano tę metodę do testowania aktywności WT_A3A wobec wybranych potencjalnych substratów.

5.2. Deaminacja cytydyny w tRNA *in vitro*

Deaminacja adenozyne do inozyne w cząsteczkach tRNA powszechnie występuje we wszystkich trzech domenach życia: u archeonów, bakterii oraz eukariontów. Proces ten dotyczy przede wszystkim pozycji 34 tRNA, czyli pierwszej pozycji antykodonu. Jak wspomniano we wprowadzeniu, inozyna w tej pozycji zwiększa elastyczność odczytu kodonów, minimalizując w ten sposób liczbę niezbędnych sekwencji tRNA kodowanych przez genom [61]. Wysoka zachowawczość ewolucyjna deaminacji adenozyne do inozyne świadczy o kluczowym znaczeniu biologicznym tego procesu. Doskonale ilustruje to fakt, że u człowieka zamiana waliny na metioninę w pozycji 144 (V144M) białka ADAT, odpowiedzialnego za deaminację adenozyne, prowadzi do obniżenia poziomu inozyne w pozycji 34 tRNA i jest najczęstszą przyczyną autosomalnej recesywnej niepełnosprawności intelektualnej [181]. W tym kontekście deaminacja cytydyny do urydyny w tRNA stanowi zupełnie odmienne zjawisko. Została ona zidentyfikowana jedynie u niektórych organizmów (rysunek 7), a katalizujące ją enzymy pozostają zasadniczo nieznane. Deaminacja dotyczy przede wszystkim mitochondrialnych tRNA, choć u *Trypanosoma brucei* zachodzi w cytoplazmatycznym

tRNA-Thr [182]. Opisane dotychczas przypadki edycji cytydyny do urydyny mają jednak istotne znaczenie funkcjonalne. Na przykład, u roślin edycja koryguje niedopasowania zasad C-A w dwuniciowym trzonie prekursora tRNA, umożliwiając jego dalsze dojrzewanie i modyfikacje, np. pseudourydylację [120, 183]. W plastydach mchu *Takakia lepidozoides* deaminacja cytydyny w pierwszej pozycji antykodonu w pre-tRNA-Leu-CAA zachodzi tuż przed wycięciem intronu, co sugeruje, że procesy te są ze sobą związane [184]. U torbaczy, ze względu na brak mitochondrialnych tRNA rozpoznających kodony kodujące kwas asparaginowy, pozycja 35 tRNA-Gly-GCC jest edytowana do urydyny, dzięki czemu do edytowanego tRNA-Gly-GCC jest dołączana reszta kwasu asparaginowego zamiast reszty glicynowej [185]. Należy zwrócić uwagę, że powyższe przypadki dotyczą zasadniczo deaminacji odbywającej się w sposób konstytutywny, związanej z dojrzewaniem tRNA i przygotowaniem go do uczestniczenia w translacji.

Pomimo dobrze udokumentowanej edycji adenozyne do inozyny w tRNA u człowieka [186, 187], deaminacji cytydyny do urydyny dotąd nie zidentyfikowano. Tym bardziej nie rozpatrywano zagadnienia potencjalnej zdolności enzymów AID/APOBEC do deaminacji cytydyny w tRNA – w literaturze jest dostępna pojedyncza hipotetyczna propozycja udziału APOBEC w tym procesie [188]. Istnieją jedynie dane dotyczące preferencji ludzkiej APOBEC3A wobec genów kodujących tRNA [189]. W niniejszej pracy zweryfikowano hipotezę, że APOBEC3A może katalizować deaminację cytydyny do urydyny w cząsteczkach tRNA. Zarówno w analizie ilościowej wykorzystującej UPLC, jak i w analizie jakościowej wykorzystującej NGS wykazano, że w warunkach *in vitro* APOBEC3A deaminowała cytydyny obecne w cząsteczkach tRNA pochodzących z HEK293T. Przyjęta strategia, obejmująca analizę produktów reakcji katalizowanej przez APOBEC3A *in vitro*, pozwoliła wyeliminować wpływ komórkowych mechanizmów kontroli jakości na badaną pulę tRNA. Można bowiem przypuszczać, że w komórkach część zmienionych tRNA byłaby degradowana. W rezultacie uwidocznił się bezpośredni efekt deaminacji. Zastosowanie na tym etapie natywnych tRNA izolowanych z komórek pozwoliło z kolei zapewnić, że badaniom poddane były substraty, odzwierciedlające zarówno naturalną różnorodność sekwencji, jak i spektrum modyfikowanych zasad. Ponadto, dzięki zastosowaniu prób kontrolnych bez enzymu i zawierających nieaktywną deaminazę wykazano, że obserwowane konwersje reszt cytydynowych do urydynowych nie były wynikiem

spontanicznej deaminacji, zachodzącej w środowisku wodnym. Edycję tRNA z wydajnością co najmniej 10% wykryto w 35 izodekoderach tRNA. Specyficzność substratowa APOBEC3A była zgodna z opisaną wcześniej wobec substratów mRNA [110, 148, 162]. Deaminacja tRNA zachodziła bowiem w jednoniciowych pętlach struktur typu spinki do włosów, a miejsca edycji były wzbogacone w motywy sekwencyjne 5'(T/C)TC(A/G). Ciekawym przypadkiem była deaminacja tRNA-Sec-TCA, w którym mniej preferowany kontekst sekwencyjny (5'GC) w obrębie pętli zmiennej był wydajniej edytowany niż preferowany kontekst w pętli antykodonowej (5'UC). Wyniki analiz wykazały, że edycja tRNA była specyficzna dla określonych regionów tej cząsteczki. Do najczęściej edytowanych obszarów należała pętla antykodonowa (antykododon oraz pozycja 38 na końcu 3' pętli), następnie pętla zmienna oraz pętla D. Otrzymane rezultaty otwierają pole do dalszych badań, ukierunkowanych na szczegółowe scharakteryzowanie czynników decydujących o wydajności edycji danej pozycji tRNA. Wykonane w ramach niniejszej pracy pierwsze modele wiązania antykodonu przez APOBEC3A wskazały na ważne znaczenie pętli L3 APOBEC3A, w tym zwłaszcza liczby oddziaływań tworzonych między nią a cząsteczką substratu. Za zaangażowaniem tej pętli przemawiają także dane literaturowe, w których opisano rolę L3 w wiązaniu ssDNA, gdzie bierze ona udział w rozpoznawaniu konkretnej reszty, a także kształtuje specyficzność substratową [93].

5.3. Deaminacja cytydyny w tRNA pochodzących z tkanek nowotworowych

Chociaż analizy *in vitro* umożliwiają szczegółową charakterystykę działania enzymu w ściśle kontrolowanych warunkach, nie dostarczają one pełnego obrazu pozwalającego na ocenę biologicznego znaczenia badanego zjawiska. W kolejnym etapie badań określono zatem, czy edycja cytydyny do urydyny (C>U) w tRNA zachodzi u człowieka. Podstawowym wyzwaniem w tego typu analizach jest dostępność zbioru danych, który pozwoli jednoznacznie określić, czy zmiana C>U jest rezultatem edycji tRNA, czy też mutacji w genie go kodującym. Wiadomo bowiem, że częstość wprowadzania mutacji w intensywnie transkrybowanych odcinkach genomu kodujących tRNA jest 7-10-krotnie wyższa niż średnia całogenomowa [190]. Jednym z białek potencjalnie zaangażowanych we wprowadzanie tych mutacji jest właśnie deaminaza APOBEC3A [189]. Analizy ukierunkowane na detekcję zmian C>U w tRNA muszą zatem obejmować zarówno sekwencje genomowego DNA, jak i tRNA. W niniejszej pracy wykorzystano więc dane sekwencyjne zdeponowane w bazie TCGA, uzyskane

z tkanek nowotworowych. Ponieważ w nowotworach gen kodujący APOBEC3A często wykazuje podwyższoną ekspresję, użycie takich danych zwiększało szanse na identyfikację edycji katalizowanej przez ten enzym. Analizy bioinformatyczne wykazały obecność zmian C>T w sekwencjach tRF akumulujących się w tkankach nowotworowych. Porównując dane sekwencyjne krótkich RNA oraz genomu zidentyfikowano tRF zawierające zmiany C>T, które nie były obecne w odpowiadających im miejscach w genomie. Uznano je zatem za rezultat edycji C>U. Występowały one w pierwszej (tRNA-Ala-TGC-4-1) lub trzeciej pozycji antykodonu (tRNA-Arg-CCG-2-1). Lokalizacja zidentyfikowanych zmian wskazywała, że edycja zachodziła w tRNA, a nie dopiero w powstałych z nich tRF. Uzyskane wyniki stanowią pierwsze doniesienie na temat edycji C>U w tRNA człowieka i otwierają pole do dalszych badań. Przede wszystkim wskazują, że zjawisko to jest powszechniejsze niż dotąd sądzono i obejmuje szersze spektrum organizmów, w tym człowieka. Ponadto, w przeciwieństwie do scharakteryzowanej dotychczas w literaturze edycji C>U w tRNA, w opisanych powyżej przypadkach edycja wydaje się nie mieć charakteru procesu konstytutywnego, koniecznego dla przyjęcia właściwej struktury czy funkcji przez powstający tRNA. Na podstawie poczynionych obserwacji można postawić hipotezę, że tego typu edycji podlegają dojrzałe tRNA – jej sprawdzenie jest interesującym kierunkiem dalszych badań.

Należy zauważyć, że w niniejszej pracy celowo przyjęto kryteria, mające za zadanie wykluczenie jak największej liczby przypadków, w których zmianę C>U niesłusznie uznano by za edycję (wykluczenie wyników fałszywie pozytywnych). Po pierwsze, edycji C>U *in vivo* poszukiwano tylko wśród cząsteczek, w których wcześniej wykryto edycję *in vitro*; po drugie szczegółowym analizom poddano tylko te tRNA, w których edytowana pozycja występowała u co najmniej 5 pacjentów z danym typem nowotworu. Tym samym, można sądzić, że przedstawione w tej pracy przypadki stanowią jedynie przykładowe zdarzenia edycji. Ich odkrycie stało się podstawą do szerzej zakrojonych, systematycznych analiz, które zaplanowano jako przyszły projekt badawczy.

Ekspresję genu *APOBEC3A* wykryto u większości, lecz nie u wszystkich pacjentów, u których zidentyfikowano zjawisko edycji. Nie stwierdzono też korelacji między poziomem ekspresji genu *APOBEC3A* a poziomem edycji dwóch wybranych

do analiz tRNA. Nie wyklucza to jednak udziału tego enzymu w edytowaniu tRNA. Okazuje się bowiem, że ocena samej ekspresji genu *APOBEC3A* (na poziomie mRNA) nie stanowi wystarczającego wskaźnika, na podstawie którego można wnioskować o ilości odpowiadającego mu białka. Coraz więcej badań sugeruje, że kluczowe znaczenie ma bezpośrednia ocena efektów aktywności enzymatycznej APOBEC3A, a nie jedynie jej obecności. W tym kontekście pomocna może być analiza charakterystycznych dla tego enzymu sygnatur mutacyjnych w genomie [189]. Jeszcze bardziej obiecującym podejściem wydaje się jednak identyfikacja sygnatur edycyjnych na poziomie mRNA [145]. Planowane są zatem dalsze analizy, które pozwolą na dokładniejszą charakterystykę aktywności APOBEC3A w tkankach nowotworowych, w których wykryto edycję C>U w tRNA.

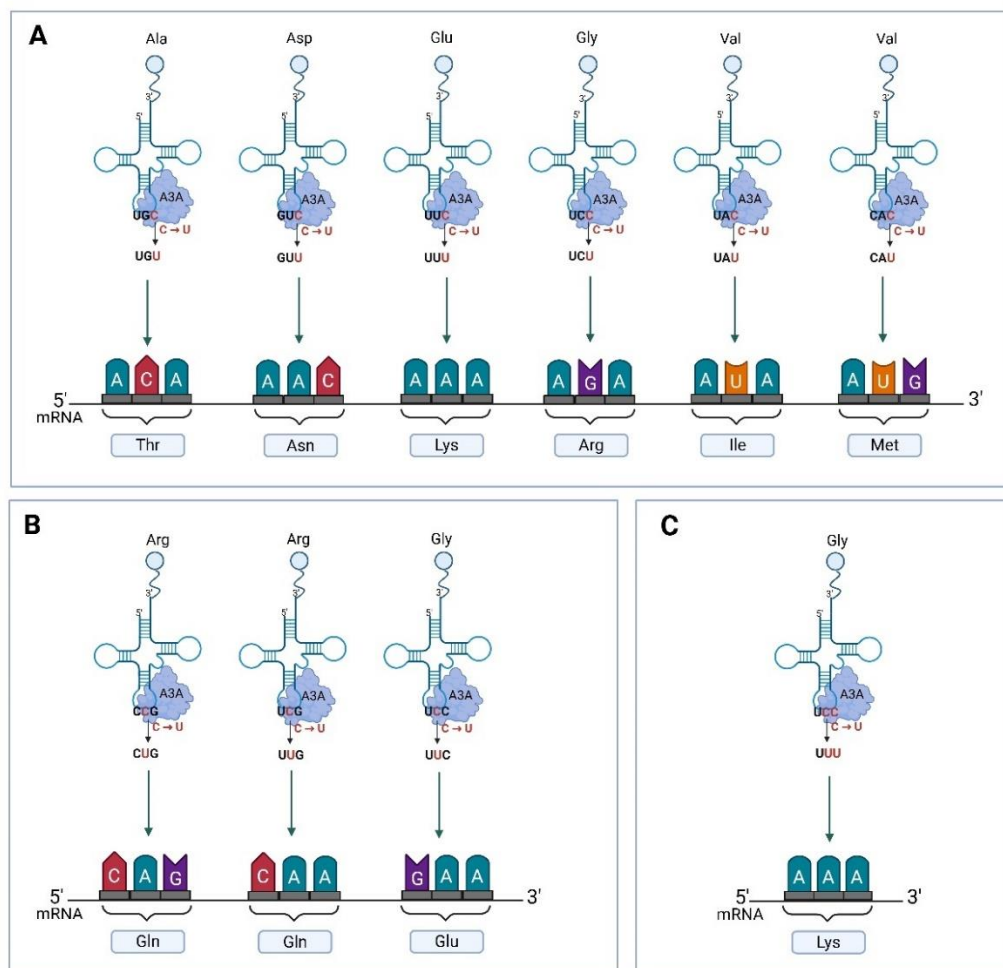
5.4. Potencjalne skutki deaminacji cytydyny w tRNA

Zidentyfikowana edycja C>U w cząsteczkach tRNA wydajnie zachodzi w warunkach *in vitro*, a jej obecność potwierdzono również *in vivo*. Fakt, że obserwuje się obecność edytowanych cząsteczek także *in vivo*, wskazuje na to, że nie są one eliminowane przez mechanizmy kontroli jakości RNA. W dalszej części przedstawiono potencjalne konsekwencje biologiczne takich edycji dla przebiegu niektórych procesów komórkowych.

5.4.1. Wpływ deaminacji na proces translacji

Katalizowana przez APOBEC3A deaminacja reszt cytydynowych obecnych w antykodnie tRNA może prowadzić do zaburzeń translacji na dwa sposoby, w zależności od tego czy deaminacji ulega tRNA związany z resztą aminokwasową (ang. *aminoacyl-tRNA*, aa-tRNA), czy tRNA, do którego reszta aminokwasowa nie została jeszcze dołączona. W pierwszym scenariuszu, deaminacja aa-tRNA może prowadzić do sytuacji, w której sekwencja aminokwasów określona w kodzie genetycznym nie jest odzwierciedlona w powstałym białku, jak pokazano na rysunku 33. Na przykład, edycja trzeciej pozycji antykodonu C₃₆>U₃₆ w tRNA-Asp-GTC-1-1 może zmieniać rozpoznawany kodon z GAC na AAC, co skutkowałoby wbudowaniem reszty asparaginowej (Asn) zamiast kwasu asparaginowego (Asp) do rosnącego łańcucha polipeptydowego podczas syntezy białka. Podobnie, edycja drugiej pozycji antykodonu C₃₅>U₃₅ w tRNA-Arg-CCG-2-1 może zmieniać rozpoznawany kodon z CGG na CAG, w wyniku czego następowałoby wprowadzenie reszty glutaminowej (Gln) zamiast

argininowej (Arg). W drugim scenariuszu, deaminacja tRNA bez przyłączonego aminokwasu może zakłócić funkcję syntetaz aminoacylo-tRNA (ang. *aminoacyl-tRNA synthetases*, AARS). AARS katalizują przyłączenie odpowiedniego aminokwasu do tRNA na podstawie specyficznych cech cząsteczki tRNA (np. sekwencji nukleotydowej). Elementy definiujące tożsamość tRNA znajdują się głównie w trzonie tRNA (pozycje 1, 72, 73) oraz w pętli antykodonowej (pozycje 35 i 36) [191-193]. Mutacje identyfikacyjnych reszt nukleotydowych mogą hamować aktywność AARS lub prowadzić do zmiany tożsamości tRNA, skutkując jego błędnym aminoacylowaniem. Udowodniono, że prawidłowe aminoacylowanie tRNA-Met, tRNA-Arg, tRNA-Glu oraz tRNA-Ile wymaga specyficznego rozpoznania nukleotydów występujących w antykodonie przez AARS. Nawet pojedyncza mutacja w tych pozycjach może zakłócić oddziaływanie tRNA-AARS [194-198].



Rysunek 33. Wpływ deaminacji trzeciej (A) lub drugiej (B) pozycji antykodonu, lub obu jednocześnie (C) na rozpoznawanie sekwencji kodonów przez cząsteczki tRNA [96]. Stworzono w serwisie BioRender.com.

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy ustalono, że mimo częstego występowania edycji w pierwszej pozycji antykodonu (tzw. pozycji wahadłowej, ang. *wobble position*) jej wydajność była niższa w porównaniu do edycji drugiej i trzeciej pozycji antykodonu (wynosiła maksymalnie 73%, w porównaniu z ponad 98%). Ponieważ pierwsza pozycja antykodonu charakteryzuje się elastycznością w tworzeniu par zasad (tj. odróżnia jedynie puryny od pirymidyn w kodonie), jej deaminacja rzadko prowadzi do zmiany rozpoznawanego kodonu. Wyjątek stanowią tRNA-Lys-CTT-3-1 i tRNA-Lys-CTT-4-1, których deaminacja, zaobserwowana w uzyskanych wynikach, może skutkować zmianą rozpoznawanego kodonu z AAG na AAC i substytucji reszty lizynowej (Lys) asparaginową (Asn). Deaminacja pozycji 34 może jednak wpływać na oddziaływania kodon-antykonon w sposób pośredni. Wiadomo bowiem, że urydyna tworzy słabe oddziaływania warstwowe z sąsiadującymi nukleotydami w pętli antykodonowej, co obniża stabilność struktury tRNA. Aby temu przeciwdziałać, do urydyny przyłączana jest grupa tiolowa (-SH), która zmienia układ przestrzenny rybozy, z 2' endo na 3' endo. Wykazano, że ta zmiana konformacji stabilizuje pętlę antykodonową a jednocześnie sprzyja parowaniu z adeniną obecną w kodonie [199]. Zatem deaminacja i następnie tiolacja może ograniczać elastyczność pozycji wahadłowej, wymuszając parowanie z kodonami zakończonymi resztą adenozykową.

Jak przedstawiono powyżej, edycja pozycji antykodonu może prowadzić do włączenia niewłaściwych reszt aminokwasowych do łańcuchów polipeptydowych podczas syntezy białek, czyli niepoprawnego odczytania informacji genetycznej. Zjawisko błędnego odczytywania kodonów występuje u wszystkich organizmów i jest dobrze udokumentowane zarówno w infekcjach wirusowych, jak i w rozwoju nowotworów [200, 201]. Wiadomo również, że ekspresja genu *APOBEC3A* jest podwyższona w obu tych patologicznych stanach [137, 202]. Postuluje się, że wirusy mogą wykorzystywać błędy translacyjne jako mechanizm sprzyjający własnej ewolucji [203]. Tego typu błędy mogą również prowadzić do powstawania białek gospodarza o zmienionej strukturze i funkcji, co może zakłócać kluczowe procesy komórkowe i sprzyjać rozwojowi nowotworów [204-206]. Co istotne, błędna translacja może być także aktywnie indukowana w określonych warunkach, przynosząc korzyści adaptacyjne poprzez zwiększanie różnorodności białek i umożliwienie komórkom szybkiej odpowiedzi na zmiany środowiskowe [207-209]. Warto również zauważyć, że edycja

pierwszej pozycji antykodonu może mieć znaczenie w interakcji wirus-gospodarz. Sekwencje kodujące wirusowy RNA często znacznie różnią się od mRNA gospodarza – wiele wirusów posiada kodony zakończone adeniną lub urydyną w przeciwieństwie do kodonów zakończonych cytydyną lub guaniną, dominujących w genomie człowieka [210, 211]. W związku z powyższym, edycja cytydyny do urydyny w pierwszej pozycji antykodonu sprzyja parowaniu edytowanych cząsteczek tRNA z kodonami wirusowymi. Innymi słowy edycja pozycji wahadłowej zwiększa pulę cząsteczek tRNA zdolnych do odczytu kodonów wirusowych. Powyższe może mieć potencjalnie pozytywny wpływ na translację wirusowego RNA

5.4.2. Wpły deaminacji na występowanie modyfikacji tRNA

Zidentyfikowane miejsca edycji cytydyny do urydyny występowały także w pozycjach, w których w warunkach fizjologicznych występują modyfikacje potranskrypcyjne tRNA. Ogólnie modyfikacje można podzielić na te występujące w pętli antykodonowej tRNA oraz poza nią. Uważa się, że pierwsze z nich bezpośrednio wpływają na dekodowanie, natomiast modyfikacje poza pętlą antykodonową wpływają na stabilność oraz fałdowanie cząsteczek tRNA [212]. Edycja cytydyny do urydyny mogłaby wpływać na występowanie 5-metylocytydny i jej pochodnych oraz modyfikacji, które wywodzą się z urydyny. Najbardziej modyfikowana jest pierwsza pozycja antykodonu (pozycja 34), w której występuje zarówno 5-metylocytydina, jak i pseudourydina. W tej pozycji deaminacja cytydyny może albo zakłócać szlaki modyfikacji cytydyny (np. powstawania 5-metylocytydyny oraz jej pochodnych) albo sprzyjać powstawaniu modyfikacji urydyny, np. pseudourydyny. W przeprowadzonych analizach zaobserwowano, że APOBEC3A deaminowała także pozycje poza antykodonem. W trzech tRNA deaminacja występowała w pozycji 38 w pętli antykodonowej, w dwóch – w pętli D (pozycja 17), a w sześciu w pętli zmiennej. Co istotne, niektóre z tych pozycji są znane z występowania modyfikacji potranskrypcyjnych. Dokładniej, pseudourydina oraz 5-metylocytydina są charakterystyczne dla pozycji 38 w pętli antykodonowej, natomiast dihydrourydina jest typowa dla pozycji 17 w pętli D [166, 213, 214]. Istnieją również doniesienia sugerujące występowanie pseudourydyny i 5-metylocytydyny w pętli zmiennej [215, 216]. Podobnie jak w przypadku deaminacji cytydyny w antykodonie, edycja pozycji 38 oraz pozycji w pętlach D i zmiennej może znacząco wpływać

na rozpoznawanie tRNA przez enzymy takie jak AARS czy enzymy modyfikujące, co w konsekwencji może zaburzać wydajność i wierność translacji.

5.4.2. Wpływ deaminacji na biogenezę i funkcje tRF

Edycja cytydyn w cząsteczkach tRNA może również wpływać na biogenezę tRF. Region pętli antykodonowej jest bardzo często celem działania enzymów z rodziny rybonukleaz, takich jak angiogenina czy RNaza-2, które poprzez cięcie w obrębie antykodonu generują co najmniej dwie klas tRF – połówki tRNA 5' oraz 3' [217, 218]. Jak wykazały analizy, deaminaza APOBEC3A najczęściej edytowała cytydyny w obrębie pętli antykodonowej. Można przypuszczać, że deaminacja cytydyny do urydyny w obrębie antykodonu może zmieniać wzorzec lub wydajność cięcia tRNA przez rybonukleazy. Szczególnie interesujące w tym kontekście są tRF generowane przez RNazę-2, ponieważ ekspresję genu tego białka zaobserwowano w makrofagach po zakażeniu syncytialnym wirusem oddechowym (ang. *respiratory syncytial virus*, RSV). Obecność tego białka związana jest z akumulacją określonego zestawu tRF. Wyciszenie ekspresji genu kodującego RNA-zę 2 prowadziło do zaburzeń w puli tRF i nasilenia infekcji RSV. Co ciekawe, wykazano, że wprowadzenie pojedynczej mutacji cytydyny do guanozyny, urydyny lub adeniny w trzeciej pozycji antykodonu tRNA-Asp-GTC wpływa na wzorzec jego cięcia przez RNazę-2 [217]. Biorąc pod uwagę, że aktywność APOBEC3A wiązałaby się ze zmianą C>U, pojawia się pytanie, o ewentualne współdziałanie APOBEC3A z RNazą-2 w odpowiedzi przeciwwirusowej. Zmiany C>U wprowadzone w cząsteczkach tRNA mogą także wpływać na funkcje regulatorowe powstałych z nich tRF. Funkcje te w wielu przypadkach wymagają bowiem oddziaływań zależnych od sekwencji tRF. Niektóre tRF pełnią rolę cząsteczek miRNA, hamując translację lub przyczyniając się do degradacji docelowego mRNA [219, 220]. Inne z kolei hamują translację w sposób globalny, poprzez wiązanie się z rybosomami lub czynnikami translacyjnymi [221]. Ponadto część tRF, oddziałując z białkami modyfikującymi RNA, odgrywa istotną rolę w regulacji epitranskryptomu [222].

5.4. Deaminacja 5-metylocytydyny w RNA

W niniejszej rozprawie zweryfikowano również hipotezę, że deaminaza APOBEC3A może wykazywać zdolność do deaminacji 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w RNA *in vitro*. W pierwszym etapie zbadano aktywność

wobec 5-metylocytydyny oraz 5-hydroksymetylocytydyny w syntetycznym fragmencie mRNA. Analizy ilościowe z wykorzystaniem UPLC wykazały, że APOBEC3A deaminowała wyłącznie 5-metylocytydynę z wydajnością 78%. Jest to pierwsze doniesienie opisujące aktywność APOBEC3A wobec zmodyfikowanych zasad w RNA *in vitro*, co otwiera pole do przyszłych badań tej aktywności *in vivo*. Jej potwierdzenie w takim układzie rozszerzyłoby spektrum funkcji biologicznych APOBEC3A o rolę w regulacji epitranskryptomu. Zmiany epigenetyczne w RNA wpływają na stabilność, transport, lokalizację i translację transkryptów [223]. Tym samym regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Coraz więcej danych wskazuje, że zaburzenia w tych procesach mogą mieć znaczenie w patogenezie chorób, m.in. nowotworów czy zaburzeń neurologicznych [224, 225]. APOBEC3A mogłaby dołączyć do grupy enzymów usuwających 5-metylocytydynę z mRNA (ang. *erasers*). Obecnie usuwanie 5-metylocytydyny w mRNA przypisuje się rodzinie enzymów TET, które katalizują reakcję utleniania 5-metylocytydyny. Deaminacja 5-metylocytydyny z udziałem APOBEC3A mogłaby także pośrednio wpływać na działanie enzymów, które rozpoznają docelowy transkrypt dzięki obecności 5-metylocytydyny (ang. *readers*), rozpoczynając dalsze przetwarzanie RNA. Na przykład, białko ALYREF (ang. *ALY/REF export factor*) wiąże transkrypty zawierające 5-metylocytydynę i ułatwia ich eksport do cytoplazmy. Zmiany epigenetyczne mają często charakter dynamiczny a ich aktualny poziom jest uzależniony od reakcji komórek na zmieniające się warunki środowiskowe, dlatego tak ważne są też wzajemne interakcje pomiędzy enzymami wprowadzającymi, usuwającymi oraz odczytującymi te zmiany [223].

Biorąc pod uwagę wykazaną wcześniej aktywność APOBEC3A wobec cytydyny w tRNA oraz 5-metylocytydyny w modelowym mRNA i fakt, że cząsteczki tRNA są najbardziej modyfikowaną klasą RNA [187], zweryfikowano hipotezę, że APOBEC3A może deaminować także 5-metylocytydynę w tRNA. Analizy ilościowe metodą UPLC wykazały aktywność APOBEC3A wobec 5-metylocytydyny zlokalizowanej w pierwszej pozycji antykodonu syntetycznego tRNA-Leu-CAA. Wydajność reakcji deaminacji wynosiła 11%. tRNA-Leu-CAA jest jedynym cytoplazmatycznym tRNA, który posiada 5-metylocytydynę w antykodonie [226]. U drożdży poziom tej modyfikacji w tRNA-Leu-CAA wzrasta w odpowiedzi na stres oksydacyjny. 5-metylocytydyna w pierwszej pozycji antykodonu tRNA-Leu-CAA preferencyjnie zwiększa odczytywanie kodonu UUG, co prowadzi do zwiększenia

translacji mRNA powstałych w wyniku transkrypcji genów bogatych w TTG [227]. 5-metylocytydina w pozycji 34 tRNA-Leu-CAA może ulegać dalszym przemianom do bardziej złożonych form, takich jak: 5-hydroksymetylocytydina, 5-formylocytydina, 5-hydroksymetylo-2'-O-metylocytydina, 5-formylo-2'-O-metylocytydina, katalizowanych przez enzym ALKBH1 [227-229]. Sugeruje się, że te modyfikacje mają udział w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondrium, ponieważ komórki z wyciszonym genem *ALKBH1* wykazywały powolny wzrost w środowisku wzbogaconym galaktozą oraz niskim zużyciem tlenu [228]. Deaminacja 5-metylocytydyny może zatem nieść ze sobą różnorakie konsekwencje, zarówno na poziomie wydajności translacji, jak i funkcjonowania szlaków zależnych od modyfikacji tRNA.

Obserwowana wydajność deaminacji 5-metylocytydyny w antykodonie tRNA była stosunkowo niska. Co więcej, nie zaobserwowano deaminacji w żadnym z tRNA, który posiadał 5-metylocytydynę w pozycji 38. Możliwym wyjaśnieniem niskiej wydajności i braku aktywności obserwowanej w syntetycznym tRNA jest fakt, że syntetyczne cząsteczki tRNA nie odzwierciedlają w pełni cech natywnego tRNA. Naturalne tRNA posiadają liczne modyfikacje, które wpływają m.in. na trzeciorzędową strukturę tRNA. Istnieje więc przypuszczenie, że struktura trzeciorzędowa charakterystyczna dla tRNA mogła nie zostać odtworzona w przeprowadzonych testach. Jak wykazują badania aktywności APOBEC3A wobec RNA, APOBEC3A ma wyraźne preferencje strukturalne. W związku z tym oddziaływania APOBEC3A z syntetycznymi cząsteczkami mogą być osłabione i w efekcie obserwowana wydajność deaminacji obniżona.

Podsumowując, w niniejszej pracy po raz pierwszy wykazano, że APOBEC3A może deminować nie tylko cytydynę, ale również 5-metylocytydynę w cząsteczkach RNA. Co więcej, udowodniono, że aktywność APOBEC3A nie ogranicza się wyłącznie do cząsteczek mRNA. Potwierdzono, że substratami APOBEC3A mogą być także cząsteczki tRNA. Zaobserwowano, że APOBEC3A deaminuje cytydyny w szerokim zakresie izodekoderów tRNA (najczęściej w pętli antykodonowej) oraz 5-metylocytydynę w pierwszej pozycji antykodonu tRNA-Leu-CAA. Chociaż edycja cytydyny oraz 5-metylocytydyny w tRNA z udziałem APOBEC3A *in vivo* nie została

jeszcze potwierdzona, wykrycie zmian C>T w tRF akumulujących się w tkankach nowotworowych stanowi punkt wyjścia do dalszych badań nad edycją tRNA. Uzyskane dane znacząco rozwijają dotychczasową wiedzę dotyczącą aktywności APOBEC3A wobec RNA i są punktem wyjścia do dalszych badań aktywności APOBEC3A wobec RNA zarówno w kontekście procesów fizjologicznych, jak i patologicznych.

6. Wnioski

Na podstawie wyników uzyskanych w trakcie realizacji niniejszej pracy sformułowano następujące wnioski:

1. Opracowana procedura otrzymywania dwóch wariantów białka APOBEC3A: WT_A3A oraz E72A_A3A jest efektywna i pozwala na uzyskanie preparatów o wysokiej czystości, z których WT_A3A wykazuje aktywność deaminazową wobec substratów DNA i RNA, natomiast E72A_A3A jest nieaktywny katalitycznie.
2. APOBEC3A katalizuje *in vitro* reakcję deaminacji cytydyny w cząsteczkach tRNA pochodzących z HEK293T.
3. Katalizowanej przez APOBEC3A edycji cytydyny *in vitro* podlegają tylko niektóre izodekodery tRNA.
4. Katalizowana przez APOBEC3A edycja cytydyny w tRNA *in vitro* jest specyficzna wobec określonych regionów tych cząsteczek. Najczęściej edytowana jest pętla antykodonowa (wszystkie trzy pozycje antykodonu oraz pozycja 38 na końcu 3' pętli), następnie pętla zmienna oraz pętla D.
5. Spośród czterech pętli otaczających centrum aktywne APOBEC3A, dominującą rolę w rozpoznawaniu tRNA pełnią pętle L1 i L3. Chociaż obie te pętle wiążą się z tRNA, to oddziaływania pętli L3 są odpowiedzialne za różnice w rozpoznawaniu poszczególnych pozycji antykodonu.
6. W puli fragmentów tRNA pochodzących od pacjentów z nowotworami występują cząsteczki, w których zidentyfikowano edycję cytydyny do urydyny. Reprezentują one te same izodekodery tRNA, które ulegały katalizowanej przez APOBEC3A edycji cytydyny do urydyny *in vitro*.
7. APOBEC3A katalizuje reakcję deaminacji 5-metylocytydyny w modelowym syntetycznym RNA *in vitro*, natomiast jest nieaktywny wobec 5-hydroksymetylocytydyny w tym samym układzie.
8. APOBEC3A katalizuje reakcję deaminacji 5-metylocytydyny w jednym z czterech testowanych syntetycznych tRNA *in vitro* (tRNA-Leu-CAA-4-1).

7. Załączniki

Załącznik 1. Izodekodery tRNA pochodzące z komórek HEK293T zidentyfikowane w analizie NGS.

Lp.	Nazwa tRNA	Lp.	Nazwa tRNA
1	tRNA-Ala-AGC-11-1	45	tRNA-Leu-TAG-2-1
2	tRNA-Ala-AGC-4-1	46	tRNA-Leu-TAG-3-1
3	tRNA-Ala-AGC-6-1	47	tRNA-Lys-CTT-3-1
4	tRNA-Ala-TGC-1-1	48	tRNA-Lys-CTT-4-1
5	tRNA-Ala-TGC-2-1	49	tRNA-Lys-TTT-1-1
6	tRNA-Ala-TGC-4-1	50	tRNA-Lys-TTT-2-1
7	tRNA-Ala-TGC-5-1	51	tRNA-Lys-TTT-3-1
8	tRNA-Ala-TGC-6-1	52	tRNA-Lys-TTT-3-3
9	tRNA-Arg-CCG-2-1	53	tRNA-Lys-TTT-3-5
10	tRNA-Arg-CCT-1-1	54	tRNA-Lys-TTT-4-1
11	tRNA-Arg-CCT-2-1	55	tRNA-Lys-TTT-6-1
12	tRNA-Arg-CCT-4-1	56	tRNA-Met-CAT-1-1
13	tRNA-Arg-TCG-1-1	57	tRNA-Met-CAT-2-1
14	tRNA-Arg-TCG-3-1	58	tRNA-Met-CAT-6-1
15	tRNA-Asn-GTT-1-1	59	tRNA-Pro-AGG-1-1
16	tRNA-Asn-GTT-3-1	60	tRNA-Pro-CGG-2-1
17	tRNA-Asn-GTT-9-1	61	tRNA-Pro-TGG-1-1
18	tRNA-Asp-GTC-1-1	62	tRNA-Pro-TGG-2-1
19	tRNA-Cys-GCA-14-1	63	tRNA-SeC-TCA-1-1
20	tRNA-Cys-GCA-4-1	64	tRNA-Ser-AGA-3-1
21	tRNA-Cys-GCA-5-1	65	tRNA-Ser-AGA-4-1
22	tRNA-Cys-GCA-6-1	66	tRNA-Ser-CGA-1-1
23	tRNA-Gln-CTG-2-1	67	tRNA-Ser-CGA-2-1
24	tRNA-Gln-CTG-5-1	68	tRNA-Ser-CGA-3-1
25	tRNA-Gln-CTG-6-1	69	tRNA-Ser-CGA-4-1
26	tRNA-Gln-TTG-1-1	70	tRNA-Ser-GCT-2-1
27	tRNA-Gln-TTG-2-1	71	tRNA-Ser-GCT-3-1
28	tRNA-Glu-TTC-3-1	72	tRNA-Ser-TGA-1-1
29	tRNA-Gly-TCC-1-1	73	tRNA-Ser-TGA-2-1
30	tRNA-Gly-TCC-2-1	74	tRNA-Ser-TGA-4-1
31	tRNA-Gly-TCC-2-6	75	tRNA-Thr-TGT-2-1
32	tRNA-Gly-TCC-3-1	76	tRNA-Thr-TGT-3-1
33	tRNA-His-GTG-1-1	77	tRNA-Thr-TGT-4-1
34	tRNA-His-GTG-1-2	78	tRNA-Thr-TGT-4-1

Lp.	Nazwa tRNA	Lp.	Nazwa tRNA
35	tRNA-His-GTG-1-3	79	tRNA-Thr-TGT-5-1
36	tRNA-His-GTG-1-5	80	tRNA-Val-AAC-2-1
37	tRNA-His-GTG-1-9	81	tRNA-Val-AAC-3-1
38	tRNA-Ile-AAT-8-1	82	tRNA-Val-CAC-2-1
39	tRNA-iMet-CAT-2-1	83	tRNA-Val-CAC-3-1
40	tRNA-Leu-TAA-1-1	84	tRNA-Val-CAC-4-1
41	tRNA-Leu-TAA-2-1	85	tRNA-Val-TAC-2-1
42	tRNA-Leu-TAA-3-1	86	tRNA-Val-TAC-3-1
43	tRNA-Leu-TAA-4-1	87	tRNA-Val-TAC-4-1
44	tRNA-Leu-TAG-1-1		

Załącznik 2. Izodekodery tRNA pochodzące z HEK293T, w których wykryto deaminację z udziałem APOBEC3A, zidentyfikowane w analizie NGS. W tabeli podano średnią z trzech powtórzeń wydajność edycji tRNA.

Lp.	Nazwa tRNA	Kontekst sekwencyjny	Wydajność edycji [%]
1	tRNA-Ala-AGC-11-1	AGCAT	5,80
2	tRNA-Ala-AGC-4-1	AGCAT	5,78
3	tRNA-Ala-AGC-6-1	AGCAT	4,54
4	tRNA-Ala-TGC-1-1	TGCAT	32,96
5	tRNA-Ala-TGC-2-1	TGCAT	28,63
6	tRNA-Ala-TGC-4-1	TGCAC	69,67
7	tRNA-Ala-TGC-5-1	TGCAT	33,10
8	tRNA-Ala-TGC-6-1	TGCAT	51,43
9	tRNA-Arg-CCG-2-1	TCCGG	98,07
10	tRNA-Arg-CCG-2-1	CTCCG	3,95
11	tRNA-Arg-CCT-4-1	CTCCT	8,31
12	tRNA-Arg-CCT-4-1	TCCTA	4,40
13	tRNA-Arg-TCG-1-1	TTCGG	98,79
14	tRNA-Arg-TCG-3-1	TTCGG	97,90
15	tRNA-Asn-GTT-1-1	ATCGG	5,83
16	tRNA-Asn-GTT-3-1	ATCGG	7,36
17	tRNA-Asn-GTT-9-1	ATCGG	10,58
18	tRNA-Asp-GTC-1-1	GTCAC	98,29
19	tRNA-Asp-GTC-1-1	CACGC	10,79
20	tRNA-Cys-GCA-1-1	TGCAG	7,93
21	tRNA-Cys-GCA-14-1	TGCAG	9,65
22	tRNA-Cys-GCA-4-1	TGCAG	7,66
23	tRNA-Cys-GCA-5-1	TGCAG	6,99
24	tRNA-Cys-GCA-6-1	TGCAG	9,14
25	tRNA-Gln-CTG-2-1	CTCTG	2,27
26	tRNA-Gln-CTG-5-1	CTCTG	4,15
27	tRNA-Gln-CTG-6-1	CTCTG	3,67
28	tRNA-Gln-CTG-6-1	GTCAG	1,57
29	tRNA-Glu-TTC-3-1	TTCAC	98,47
30	tRNA-Glu-TTC-3-1	CACCG	5,47
31	tRNA-Gly-TCC-1-1	TTCCA	26,36
32	tRNA-Gly-TCC-1-1	TCCAA	79,94
33	tRNA-Gly-TCC-2-1	TTCCA	28,37
34	tRNA-Gly-TCC-2-1	TCCAA	80,45
35	tRNA-Gly-TCC-3-1	TTCCA	26,02
36	tRNA-Gly-TCC-3-1	TCCAA	79,44
37	tRNA-His-GTG-1-5	GGCCG	19,45
38	tRNA-Leu-TAA-3-1	TTCAT	13,26
39	tRNA-Leu-TAG-1-1	TTCGG	37,49
40	tRNA-Leu-TAG-2-1	TTCGG	73,22
41	tRNA-Leu-TAG-3-1	TTCGA	41,63

Lp.	Nazwa tRNA	Kontekst sekwencyjny	Wydajność edycji [%]
42	tRNA-Lys-CTT-3-1	CCCTT	73,05
43	tRNA-Lys-CTT-3-1	GTCGG	9,80
44	tRNA-Lys-CTT-4-1	GTCGG	9,96
45	tRNA-Lys-CTT-4-1	CTCTT	14,45
46	tRNA-Lys-TTT-6-1	GTCGG	5,40
47	tRNA-Met-CAT-1-1	CTCAT	24,44
48	tRNA-Met-CAT-2-1	CTCAT	26,39
49	tRNA-Met-CAT-6-1	CTCAT	50,75
50	tRNA-Pro-AGG-1-1	GTCTA	1,55
51	tRNA-Pro-CGG-2-1	GTCTA	1,71
52	tRNA-SeC-TCA-1-1	AGCGA	84,63
53	tRNA-SeC-TCA-1-1	TTCAA	46,25
54	tRNA-Ser-AGA-4-1	CTCCC	13,41
55	tRNA-Ser-CGA-1-1	CTCGA	12,85
56	tRNA-Ser-CGA-3-1	TTCCC	4,63
57	tRNA-Ser-CGA-3-1	CTCGA	25,89
58	tRNA-Ser-CGA-4-1	CTCGA	29,50
59	tRNA-Ser-CGA-4-1	TTCCC	1,81
60	tRNA-Ser-GCT-2-1	TGCTA	2,85
61	tRNA-Ser-TGA-2-1	TTCCC	1,63
62	tRNA-Val-AAC-2-1	AACAC	7,57
63	tRNA-Val-AAC-3-1	ATCAA	3,06
64	tRNA-Val-AAC-3-1	AACAC	9,41
65	tRNA-Val-CAC-2-1	CACGC	2,18
66	tRNA-Val-CAC-2-1	CACAC	13,31
67	tRNA-Val-CAC-2-1	CTCAC	10,43
68	tRNA-Val-CAC-3-1	CACGC	2,05
69	tRNA-Val-CAC-3-1	CACAC	18,38
70	tRNA-Val-CAC-3-1	CTCAC	11,62
71	tRNA-Val-CAC-4-1	CACGC	3,07
72	tRNA-Val-CAC-4-1	CACAC	14,73
73	tRNA-Val-CAC-4-1	CTCAC	11,15
74	tRNA-Val-TAC-2-1	CACGC	5,06
75	tRNA-Val-TAC-2-1	TACAC	47,93
76	tRNA-Val-TAC-3-1	CACGC	5,48
77	tRNA-Val-TAC-3-1	TACAC	57,58
78	tRNA-Val-TAC-4-1	TACAC	52,63
79	tRNA-Val-TAC-4-1	CACGC	11,04
80	tRNA-Val-TAC-4-1	GTCGA	1,58

Załącznik 3. Izodekodery tRNA, dla których wykryto edycję C>T w danych sekwencyjnych tRF zdeponowanych w bazie TCGA. W tabeli podano liczę pacjentów posiadających edycję tRNA w danym typie nowotworu.

Lp.	Typ nowotworu	Łączna liczba pacjentów	tRNA-Ala-TGC-4-1	tRNA-Cys-GCA-5-1	tRNA-Arg-TCG-1-1	tRNA Leu-TAG-3-1	tRNA-Arg-CCG-2-1	tRNA-Arg-CCG-2-1
1	BLCA	75	0	0	0	0	0	0
2	BRCA	84	9	0	0	0	0	9
3	CESC	58	6	1	0	0	0	4
4	COAD	56	2	0	0	0	0	5
5	HNSC	105	17	2	0	0	1	15
6	KICH	9	1	0	0	0	0	2
7	KIRC	5	1	0	0	0	0	1
8	KIRP	27	2	0	0	0	0	2
9	LGG	63	9	0	0	0	0	7
10	LIHC	24	1	0	0	0	0	2
11	LUAD	120	18	0	1	0	0	20
12	LUSC	13	3	0	0	0	0	5
13	OV	27	12	1	0	1	0	9
14	PRAD	75	0	0	0	0	0	0
15	READ	21	1	0	0	0	0	0
16	SARC	32	2	0	0	0	0	2
17	STAD	56	1	0	0	0	0	1
18	THCA	271	63	0	1	0	1	61
19	UCEC	109	2	1	0	0	0	1
	Razem	1230	150	5	2	1	2	146

Załącznik 4. Lista pacjentów, u których zidentyfikowano edycję tRNA-Ala-TGC-4-1 w danych sekwencyjnych tRF zdeponowanych w bazie TCGA. W tabeli podano średni poziom edycji, poziom ekspresji *APOBEC3A* oraz typ nowotworu, z którego pochodziła dana próba.

Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]	Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]
1	BRCA	40,91	0,81	45	LUAD	24	4,06
2	BRCA	23,08	1,22	46	LUAD	7,32	0,71
3	BRCA	20,00	1,16	47	LUAD	11,63	2,41
4	BRCA	16,67	0,97	48	LUAD	25	0,89
5	BRCA	6,82	0,34	49	LUAD	7,58	1,41
6	BRCA	16,67	0,26	50	LUAD	17,24	1,40
7	BRCA	25,00	0,57	51	LUAD	32,35	2,65
8	BRCA	27,27	20,89	52	LUAD	23,81	5,34
9	BRCA	12,96	4,26	53	LUAD	28	0,58
10	CESC	26,67	62,32	54	LUAD	23,81	2,14
11	CESC	13,04	0,52	55	LUAD	27,12	0,34
12	CESC	27,78	6,03	56	LUAD	11,54	0,98
13	CESC	17,65	0,14	57	LUAD	14,29	3,08
14	CESC	12,50	13,37	58	LUAD	8,93	1,77
15	CESC	25,93	36,81	59	LUAD	9,68	0,38
16	HNSC	10,95	47,29	60	OV	9,38	0,76
17	HNSC	19,05	147,17	61	OV	13,25	0,55
18	HNSC	23,08	36,96	62	OV	56,52	0,12
19	HNSC	3,85	69,21	63	OV	3,39	4,33
20	HNSC	21,43	14,27	64	OV	18,75	1,04
21	HNSC	9,38	18,39	65	OV	26,88	0,05
22	HNSC	12,00	2,44	66	OV	13,89	1,74
23	HNSC	42,11	8,09	67	OV	23,81	1,93
24	HNSC	8,00	196,87	68	OV	11,01	0,37
25	HNSC	20,00	32,32	69	OV	30	0,17
26	HNSC	5,52	49,54	70	OV	13,33	2,88
27	HNSC	13,51	12,49	71	OV	13,04	0,65
28	HNSC	15,00	37,65	72	THCA	31,25	0,98
29	HNSC	10,26	12,77	73	THCA	8,22	0,33
30	HNSC	11,49	27,97	74	THCA	30	0,15
31	HNSC	3,57	166,72	75	THCA	14,29	0,55
32	HNSC	11,11	148,09	76	THCA	35,29	0,22
33	LGG	7,89	0,03	77	THCA	5,97	1,59
34	LGG	6,32	0,03	78	THCA	9,52	0,30
35	LGG	22,92	0,12	79	THCA	10,98	3,60
36	LGG	11,76	0,13	80	THCA	10,71	0,42
37	LGG	2,79	0,00	81	THCA	11,11	0,43
38	LGG	17,39	0,08	82	THCA	12,9	0,97
39	LGG	15,00	0,03	83	THCA	43,75	0,74
40	LGG	2,47	0,22	84	THCA	30	0,74
41	LGG	6,25	0,12	85	THCA	33,33	0,31
42	LUAD	46,15	4,15	86	THCA	11,11	0,59
43	LUAD	7,02	4,99	87	THCA	12,5	1,43
44	LUAD	9,52	1,76	88	THCA	15,38	20,97

Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]	Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]
89	THCA	19,05	1,80	112	THCA	12,50	0,38
90	THCA	14,29	0,62	113	THCA	16,67	0,07
91	THCA	6,06	2,87	114	THCA	28,57	0,90
92	THCA	25,00	0,26	115	THCA	35,71	0,57
93	THCA	11,76	0,69	116	THCA	45,45	0,03
94	THCA	38,46	2,73	117	THCA	20,00	4,29
95	THCA	11,11	0,75	118	THCA	47,62	0,53
96	THCA	28,21	0,65	119	THCA	6,06	1,01
97	THCA	20,00	0,47	120	THCA	15,38	1,97
98	THCA	4,35	0,05	121	THCA	12,08	1,16
99	THCA	23,08	0,46	122	THCA	19,61	1,52
100	THCA	15,38	0,68	123	THCA	17,12	3,01
101	THCA	31,58	0,62	124	THCA	41,18	0,83
102	THCA	23,33	2,74	125	THCA	14,52	1,75
103	THCA	17,12	0,37	126	THCA	10,00	0,42
104	THCA	12,50	0,64	127	THCA	9,26	1,88
105	THCA	13,33	2,31	128	THCA	48,61	0,11
106	THCA	6,98	0,15	129	THCA	16,00	0,70
107	THCA	4,62	0,34	130	THCA	25,00	0,41
108	THCA	9,68	0,42	131	THCA	14,29	0,44
109	THCA	16,67	0,91	132	THCA	23,08	0,73
110	THCA	36,36	0,09	133	THCA	13,79	0,63
111	THCA	15,38	0,08	134	THCA	23,08	0,85

Załącznik 5. Lista pacjentów, u których zidentyfikowano edycję tRNA-Arg-CCG-2-1 w danych sekwencyjnych tRF zdeponowanych w bazie TCGA. W tabeli podano średni poziom edycji, poziom ekspresji *APOBEC3A* oraz typ nowotworu, z którego pochodziła dana próba.

Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]	Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]
1	BRCA	15,00	1,16	45	LUAD	2,44	1,40
2	BRCA	12,5	1,67	46	LUAD	2,74	2,65
3	BRCA	11,11	0,39	47	LUAD	3,64	5,34
4	BRCA	2,54	7,74	48	LUAD	2,88	0,58
5	BRCA	6,67	0,97	49	LUAD	2,36	3,07
6	BRCA	18,18	3,03	50	LUAD	6,98	0,38
7	BRCA	7,14	0,38	51	LUAD	3,64	2,14
8	BRCA	5,88	0,34	52	LUAD	6,67	0,39
9	BRCA	2,00	4,26	53	LUAD	1,53	9,10
10	COAD	2,33	0,19	54	LUAD	4,00	3,08
11	COAD	5,71	0,17	55	LUAD	4,00	0,38
12	COAD	1,57	0,52	56	LUAD	7,69	1,27
13	COAD	5,13	0,40	57	LUSC	3,77	2,16
14	COAD	4,26	0,20	58	LUSC	1,12	2,89
15	HNSC	8,33	101,35	59	LUSC	6,06	6,16
16	HNSC	3,30	47,29	60	LUSC	2,94	3,01
17	HNSC	13,64	8,77	61	LUSC	11,11	2,64
18	HNSC	4,44	12,63	62	OV	5,26	0,55
19	HNSC	9,64	18,39	63	OV	8,33	0,12
20	HNSC	2,06	2,44	64	OV	6,98	2,55
21	HNSC	3,80	9,24	65	OV	9,84	0,05
22	HNSC	1,49	19,77	66	OV	6,00	1,74
23	HNSC	9,30	8,09	67	OV	18,18	1,93
24	HNSC	5,63	196,87	68	OV	9,09	0,17
25	HNSC	1,35	49,54	69	OV	9,09	2,94
26	HNSC	2,94	12,49	70	OV	1,98	0,65
27	HNSC	1,84	37,65	71	THCA	10,00	1,79
28	HNSC	11,11	64,07	72	THCA	3,90	0,33
29	HNSC	5,08	148,09	73	THCA	17,86	0,40
30	LGG	3,80	0,12	74	THCA	8,33	0,43
31	LGG	15,38	0,00	75	THCA	27,27	1,24
32	LGG	16,22	0,08	76	THCA	18,75	0,55
33	LGG	10,53	0,03	77	THCA	15,38	0,09
34	LGG	6,06	0,22	78	THCA	12,50	2,27
35	LGG	3,57	0,12	79	THCA	5,92	1,59
36	LGG	12,50	0,02	80	THCA	9,46	0,07
37	LUAD	3,70	0,49	81	THCA	7,14	0,30
38	LUAD	5,71	0,50	82	THCA	2,84	3,60
39	LUAD	6,67	2,88	83	THCA	11,11	0,50
40	LUAD	2,67	4,99	84	THCA	12,50	0,42
41	LUAD	4,65	5,28	85	THCA	4,88	0,97
42	LUAD	3,17	4,06	86	THCA	14,29	0,74
43	LUAD	15,38	0,38	87	THCA	7,14	0,31
44	LUAD	10,00	0,59	88	THCA	9,52	8,56

Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]	Lp.	Typ nowotworu	Średni poziom edycji [%]	Poziom ekspresji genu <i>APOBEC3A</i> [TPM]
89	THCA	2,99	0,59	111	THCA	4,55	1,57
90	THCA	10,34	20,97	112	THCA	4,11	0,38
91	THCA	6,45	1,80	113	THCA	1,68	0,90
92	THCA	8,82	0,26	114	THCA	9,52	0,15
93	THCA	3,92	0,26	115	THCA	11,76	0,41
94	THCA	3,26	0,69	116	THCA	13,33	4,29
95	THCA	3,51	0,75	117	THCA	4,00	0,53
96	THCA	7,61	0,65	118	THCA	3,17	1,01
97	THCA	3,08	0,40	119	THCA	13,33	0,77
98	THCA	4,48	1,46	120	THCA	10,74	1,16
99	THCA	1,98	4,47	121	THCA	9,38	0,45
100	THCA	3,57	0,05	122	THCA	10,00	0,32
101	THCA	6,15	0,46	123	THCA	8,14	1,52
102	THCA	7,69	0,68	124	THCA	4,98	3,01
103	THCA	4,00	0,62	125	THCA	4,00	1,75
104	THCA	18,75	0,14	126	THCA	9,38	0,42
105	THCA	13,73	0,15	127	THCA	6,25	1,88
106	THCA	9,30	0,16	128	THCA	8,00	0,11
107	THCA	5,00	0,42	129	THCA	4,76	0,70
108	THCA	10,00	0,91	130	THCA	5,26	0,63
109	THCA	15,38	0,35	131	THCA	5,00	2,43
110	THCA	9,09	0,09				

8. Bibliografia

1. Conticello, S.G., *The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators*. Genome Biol, 2008. **9**(6): p. 229.
2. McCall, K.A., C. Huang, and C.A. Fierke, *Function and mechanism of zinc metalloenzymes*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1437S-46S.
3. Iyer, L.M., et al., *Evolution of the deaminase fold and multiple origins of eukaryotic editing and mutagenic nucleic acid deaminases from bacterial toxin systems*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(22): p. 9473-97.
4. Gerber, A.P. and W. Keller, *An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1146-9.
5. Wolf, J., A.P. Gerber, and W. Keller, *tadA, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from Escherichia coli*. EMBO J, 2002. **21**(14): p. 3841-51.
6. Savva, Y.A., L.E. Rieder, and R.A. Reenan, *The ADAR protein family*. Genome Biol, 2012. **13**(12): p. 252.
7. Quin, J., et al., *ADAR RNA Modifications, the Epitranscriptome and Innate Immunity*. Trends Biochem Sci, 2021. **46**(9): p. 758-771.
8. Cervantes-Gracia, K., et al., *APOBECs orchestrate genomic and epigenomic editing across health and disease*. Trends Genet, 2021. **37**(11): p. 1028-1043.
9. Pecori, R., et al., *Functions and consequences of AID/APOBEC-mediated DNA and RNA deamination*. Nat Rev Genet, 2022. **23**(8): p. 505-518.
10. Salter, J.D., R.P. Bennett, and H.C. Smith, *The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(7): p. 578-594.
11. Salter, J.D. and H.C. Smith, *Modeling the Embrace of a Mutator: APOBEC Selection of Nucleic Acid Ligands*. Trends Biochem Sci, 2018. **43**(8): p. 606-622.
12. Lackey, L., et al., *Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination*. Cell Cycle, 2013. **12**(5): p. 762-72.
13. Rosenberg, B.R., et al., *Transcriptome-wide sequencing reveals numerous APOBEC1 mRNA-editing targets in transcript 3' UTRs*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(2): p. 230-6.
14. Muramatsu, M., et al., *Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme*. Cell, 2000. **102**(5): p. 553-63.
15. Muramatsu, M., et al., *Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18470-6.
16. Qiao, Q., et al., *AID Recognizes Structured DNA for Class Switch Recombination*. Mol Cell, 2017. **67**(3): p. 361-373 e4.
17. Chiu, Y.L. and W.C. Greene, *The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 317-53.
18. Prochnow, C., R. Bransteitter, and X.S. Chen, *APOBEC deaminases-mutases with defensive roles for immunity*. Sci China C Life Sci, 2009. **52**(10): p. 893-902.
19. Iwatani, Y., et al., *Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(21): p. 7096-108.
20. Narvaiza, I., et al., *Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000439.
21. Leong, S., H. Nasser, and T. Ikeda, *APOBEC3-Related Editing and Non-Editing Determinants of HIV-1 and HTLV-1 Restriction*. Int J Mol Sci, 2025. **26**(4).
22. Jang, G.M., et al., *Protein Interaction Map of APOBEC3 Enzyme Family Reveals Deamination-Independent Role in Cellular Function*. Mol Cell Proteomics, 2024. **23**(5): p. 100755.
23. Zhang, Y., et al., *Roles of APOBEC3 in hepatitis B virus (HBV) infection and hepatocarcinogenesis*. Bioengineered, 2021. **12**(1): p. 2074-2086.
24. Bishop, K.N., R.K. Holmes, and M.H. Malim, *Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8450-8.

25. Pollpeter, D., et al., *Deep sequencing of HIV-1 reverse transcripts reveals the multifaceted antiviral functions of APOBEC3G*. Nat Microbiol, 2018. **3**(2): p. 220-233.
26. Bieniasz, P.D., *A multimodal antiretroviral protein*. Nat Microbiol, 2018. **3**(2): p. 122-123.
27. Harris, R.S., et al., *DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection*. Cell, 2003. **113**(6): p. 803-9.
28. Mangeat, B., et al., *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 99-103.
29. Sasada, A., et al., *APOBEC3G targets human T-cell leukemia virus type 1*. Retrovirology, 2005. **2**: p. 32.
30. Milewska, A., et al., *APOBEC3-mediated restriction of RNA virus replication*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5960.
31. Domingo, E., J. Sheldon, and C. Perales, *Viral quasispecies evolution*. Microbiol Mol Biol Rev, 2012. **76**(2): p. 159-216.
32. Kim, E.Y., et al., *Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 10402-5.
33. Wood, N., et al., *HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000414.
34. Liddament, M.T., et al., *APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo*. Curr Biol, 2004. **14**(15): p. 1385-91.
35. Harris, R.S., et al., *DNA deamination: not just a trigger for antibody diversification but also a mechanism for defense against retroviruses*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 641-3.
36. Krishnan, A., et al., *Diversification of AID/APOBEC-like deaminases in metazoa: multiplicity of clades and widespread roles in immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(14): p. E3201-E3210.
37. Etard, C., U. Roostalu, and U. Strahle, *Lack of Apobec2-related proteins causes a dystrophic muscle phenotype in zebrafish embryos*. J Cell Biol, 2010. **189**(3): p. 527-39.
38. Sato, Y., et al., *Deficiency in APOBEC2 leads to a shift in muscle fiber type, diminished body mass, and myopathy*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7111-8.
39. Lorenzo, J.P., et al., *APOBEC2 safeguards skeletal muscle cell fate through binding chromatin and regulating transcription of non-muscle genes during myoblast differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024. **121**(17): p. e2312330121.
40. Rogozin, I.B., et al., *APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis*. Cell Cycle, 2005. **4**(9): p. 1281-5.
41. Meshcheryakova, A., et al., *AID and APOBECs as Multifaceted Intrinsic Virus-Restricting Factors: Emerging Concepts in the Light of COVID-19*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 690416.
42. Smith, H.C., et al., *Functions and regulation of the APOBEC family of proteins*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(3): p. 258-68.
43. Butler, K. and A.R. Banday, *APOBEC3-mediated mutagenesis in cancer: causes, clinical significance and therapeutic potential*. J Hematol Oncol, 2023. **16**(1): p. 31.
44. Petljak, M., et al., *Mechanisms of APOBEC3 mutagenesis in human cancer cells*. Nature, 2022. **607**(7920): p. 799-807.
45. Roberts, S.A., et al., *An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers*. Nat Genet, 2013. **45**(9): p. 970-6.
46. Petljak, M., et al., *Characterizing Mutational Signatures in Human Cancer Cell Lines Reveals Episodic APOBEC Mutagenesis*. Cell, 2019. **176**(6): p. 1282-1294 e20.
47. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. Nature, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
48. Alexandrov, L.B., et al., *The repertoire of mutational signatures in human cancer*. Nature, 2020. **578**(7793): p. 94-101.
49. Ito, F., et al., *Family-Wide Comparative Analysis of Cytidine and Methylcytidine Deamination by Eleven Human APOBEC Proteins*. J Mol Biol, 2017. **429**(12): p. 1787-1799.
50. Carpenter, M.A., et al., *Methylcytosine and normal cytosine deamination by the foreign DNA restriction enzyme APOBEC3A*. J Biol Chem, 2012. **287**(41): p. 34801-8.

51. Budzko, L., et al., *Mutations in human AID differentially affect its ability to deaminate cytidine and 5-methylcytidine in ssDNA substrates in vitro*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3873.
52. Schutsky, E.K., et al., *APOBEC3A efficiently deaminates methylated, but not TET-oxidized, cytosine bases in DNA*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(13): p. 7655-7665.
53. Suspene, R., et al., *Efficient deamination of 5-methylcytidine and 5-substituted cytidine residues in DNA by human APOBEC3A cytidine deaminase*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e63461.
54. Nabel, C.S., et al., *AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(9): p. 751-8.
55. Cortellino, S., et al., *Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair*. Cell, 2011. **146**(1): p. 67-79.
56. Prasad, R., T.J. Yen, and A. Bellacosa, *Active DNA demethylation-The epigenetic gatekeeper of development, immunity, and cancer*. Adv Genet (Hoboken), 2021. **2**(1): p. e10033.
57. Conticello, S.G., *Creative deaminases, self-inflicted damage, and genome evolution*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1267**: p. 79-85.
58. Conticello, S.G., et al., *Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases*. Mol Biol Evol, 2005. **22**(2): p. 367-77.
59. Kuratani, M., et al., *Crystal structure of tRNA adenosine deaminase (TadA) from Aquifex aeolicus*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 16002-8.
60. Liu, X., et al., *Crystal structure of the yeast heterodimeric ADAT2/3 deaminase*. BMC Biol, 2020. **18**(1): p. 189.
61. Dolce, L.G., et al., *Structural basis for sequence-independent substrate selection by eukaryotic wobble base tRNA deaminase ADAT2/3*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 6737.
62. Rubio, M.A., et al., *An adenosine-to-inosine tRNA-editing enzyme that can perform C-to-U deamination of DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 7821-6.
63. Prochnow, C., et al., *The APOBEC-2 crystal structure and functional implications for the deaminase AID*. Nature, 2007. **445**(7126): p. 447-51.
64. Losey, H.C., A.J. Ruthenburg, and G.L. Verdine, *Crystal structure of Staphylococcus aureus tRNA adenosine deaminase TadA in complex with RNA*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(2): p. 153-9.
65. Refsland, E.W. and R.S. Harris, *The APOBEC3 family of retroelement restriction factors*. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. **371**: p. 1-27.
66. Gao, Z., et al., *Amphioxus adenosine-to-inosine tRNA-editing enzyme that can perform C-to-U and A-to-I deamination of DNA*. Commun Biol, 2023. **6**(1): p. 744.
67. Munk, C., A. Willemsen, and I.G. Bravo, *An ancient history of gene duplications, fusions and losses in the evolution of APOBEC3 mutators in mammals*. BMC Evol Biol, 2012. **12**: p. 71.
68. Sawyer, S.L., M. Emerman, and H.S. Malik, *Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G*. PLoS Biol, 2004. **2**(9): p. E275.
69. Rogozin, I.B., et al., *Evolution and diversification of lamprey antigen receptors: evidence for involvement of an AID-APOBEC family cytosine deaminase*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 647-56.
70. Hayward, J.A., et al., *Differential Evolution of Antiretroviral Restriction Factors in Pteropid Bats as Revealed by APOBEC3 Gene Complexity*. Mol Biol Evol, 2018. **35**(7): p. 1626-1637.
71. Salas-Briceno, K., W. Zhao, and S.R. Ross, *Mouse APOBEC3 Restriction of Retroviruses*. Viruses, 2020. **12**(11).
72. Liu, M.C., et al., *AID/APOBEC-like cytidine deaminases are ancient innate immune mediators in invertebrates*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1948.
73. Maris, C., et al., *NMR structure of the apoB mRNA stem-loop and its interaction with the C to U editing APOBEC1 complementary factor*. RNA, 2005. **11**(2): p. 173-86.
74. Byeon, I.J., et al., *NMR structure of human restriction factor APOBEC3A reveals substrate binding and enzyme specificity*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1890.
75. Kouno, T., et al., *Crystal structure of APOBEC3A bound to single-stranded DNA reveals structural basis for cytidine deamination and specificity*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15024.
76. Byeon, I.J., et al., *Nuclear Magnetic Resonance Structure of the APOBEC3B Catalytic Domain: Structural Basis for Substrate Binding and DNA Deaminase Activity*. Biochemistry, 2016. **55**(21): p. 2944-59.

77. Kitamura, S., et al., *The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(10): p. 1005-10.
78. Bohn, M.F., et al., *Crystal structure of the DNA cytosine deaminase APOBEC3F: the catalytically active and HIV-1 Vif-binding domain*. Structure, 2013. **21**(6): p. 1042-50.
79. Maiti, A., et al., *Crystal Structure of a Soluble APOBEC3G Variant Suggests ssDNA to Bind in a Channel that Extends between the Two Domains*. J Mol Biol, 2020. **432**(23): p. 6042-6060.
80. Ito, F., et al., *Understanding the Structure, Multimerization, Subcellular Localization and mC Selectivity of a Genomic Mutator and Anti-HIV Factor APOBEC3H*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3763.
81. Ito, F., et al., *Structural basis for HIV-1 antagonism of host APOBEC3G via Cullin E3 ligase*. Sci Adv, 2023. **9**(1): p. eade3168.
82. Hou, S., et al., *Structural basis of substrate specificity in human cytidine deaminase family APOBEC3s*. J Biol Chem, 2021. **297**(2): p. 100909.
83. Bransteitter, R., C. Prochnow, and X.S. Chen, *The current structural and functional understanding of APOBEC deaminases*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(19): p. 3137-47.
84. Betts, L., et al., *Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex*. J Mol Biol, 1994. **235**(2): p. 635-56.
85. Harris, R.S. and M.T. Liddament, *Retroviral restriction by APOBEC proteins*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 868-77.
86. Samaranyake, M., et al., *Evaluation of molecular models for the affinity maturation of antibodies: roles of cytosine deamination by AID and DNA repair*. Chem Rev, 2006. **106**(2): p. 700-19.
87. Ko, T.P., et al., *Crystal structure of yeast cytosine deaminase. Insights into enzyme mechanism and evolution*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19111-7.
88. Ireton, G.C., M.E. Black, and B.L. Stoddard, *The 1.14 Å crystal structure of yeast cytosine deaminase: evolution of nucleotide salvage enzymes and implications for genetic chemotherapy*. Structure, 2003. **11**(8): p. 961-72.
89. Bohn, J.A., et al., *APOBEC3H structure reveals an unusual mechanism of interaction with duplex RNA*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1021.
90. Shaban, N.M., et al., *The Antiviral and Cancer Genomic DNA Deaminase APOBEC3H Is Regulated by an RNA-Mediated Dimerization Mechanism*. Mol Cell, 2018. **69**(1): p. 75-86 e9.
91. Logue, E.C., et al., *A DNA sequence recognition loop on APOBEC3A controls substrate specificity*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97062.
92. Wolfe, A.D., et al., *The structure of APOBEC1 and insights into its RNA and DNA substrate selectivity*. NAR Cancer, 2020. **2**(4): p. zcaa027.
93. Shi, K., et al., *Structural basis for targeted DNA cytosine deamination and mutagenesis by APOBEC3A and APOBEC3B*. Nat Struct Mol Biol, 2017. **24**(2): p. 131-139.
94. Rathore, A., et al., *The local dinucleotide preference of APOBEC3G can be altered from 5'-CC to 5'-TC by a single amino acid substitution*. J Mol Biol, 2013. **425**(22): p. 4442-54.
95. Budzko, L., et al., *Engineered deaminases as a key component of DNA and RNA editing tools*. Mol Ther Nucleic Acids, 2023. **34**: p. 102062.
96. Hoffa-Sobiech, K., et al., *APOBEC3A deaminase catalyzes site-specific editing of transfer RNAs*. bioRxiv, 2025.
97. Stenglein, M.D., H. Matsuo, and R.S. Harris, *Two regions within the amino-terminal half of APOBEC3G cooperate to determine cytoplasmic localization*. J Virol, 2008. **82**(19): p. 9591-9.
98. Chester, A., et al., *The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay*. EMBO J, 2003. **22**(15): p. 3971-82.
99. Ito, S., et al., *Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1975-80.
100. Patenaude, A.M., et al., *Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(5): p. 517-27.
101. Pham, P., et al., *A biochemical analysis linking APOBEC3A to disparate HIV-1 restriction and skin cancer*. J Biol Chem, 2013. **288**(41): p. 29294-304.

102. Koning, F.A., et al., *Target cell-mediated editing of HIV-1 cDNA by APOBEC3 proteins in human macrophages*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13448-52.
103. Sharma, S., et al., *APOBEC3A cytidine deaminase induces RNA editing in monocytes and macrophages*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6881.
104. Chen, H., et al., *APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons*. Curr Biol, 2006. **16**(5): p. 480-5.
105. Brown, A.L., et al., *Single-stranded DNA binding proteins influence APOBEC3A substrate preference*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 21008.
106. Mitra, M., et al., *Structural determinants of human APOBEC3A enzymatic and nucleic acid binding properties*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(2): p. 1095-110.
107. Sharma, S., et al., *Transient overexpression of exogenous APOBEC3A causes C-to-U RNA editing of thousands of genes*. RNA Biol, 2017. **14**(5): p. 603-610.
108. Silvas, T.V., et al., *Substrate sequence selectivity of APOBEC3A implicates intra-DNA interactions*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 7511.
109. Sanchez, A., et al., *Mesoscale DNA features impact APOBEC3A and APOBEC3B deaminase activity and shape tumor mutational landscapes*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 2370.
110. Sharma, S. and B.E. Baysal, *Stem-loop structure preference for site-specific RNA editing by APOBEC3A and APOBEC3G*. PeerJ, 2017. **5**: p. e4136.
111. Biela, A., et al., *The diverse structural modes of tRNA binding and recognition*. J Biol Chem, 2023. **299**(8): p. 104966.
112. Torres, A.G., et al., *Human tRNAs with inosine 34 are essential to efficiently translate eukarya-specific low-complexity proteins*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(12): p. 7011-7034.
113. Randau, L., et al., *A cytidine deaminase edits C to U in transfer RNAs in Archaea*. Science, 2009. **324**(5927): p. 657-9.
114. Alfonzo, J.D., et al., *C to U editing of the anticodon of imported mitochondrial tRNA(Trp) allows decoding of the UGA stop codon in Leishmania tarentolae*. EMBO J, 1999. **18**(24): p. 7056-62.
115. Janke, A. and S. Paabo, *Editing of a tRNA anticodon in marsupial mitochondria changes its codon recognition*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(7): p. 1523-5.
116. Zhou, W., D. Karcher, and R. Bock, *Identification of enzymes for adenosine-to-inosine editing and discovery of cytidine-to-uridine editing in nucleus-encoded transfer RNAs of Arabidopsis*. Plant Physiol, 2014. **166**(4): p. 1985-97.
117. Charriere, F., et al., *Dual targeting of a single tRNA(Trp) requires two different tryptophanyl-tRNA synthetases in Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 6847-52.
118. Kimura, S., et al., *Sequential action of a tRNA base editor in conversion of cytidine to pseudouridine*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 5994.
119. Marechal-Drouard, L., et al., *A single editing event is a prerequisite for efficient processing of potato mitochondrial phenylalanine tRNA*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(7): p. 3504-10.
120. Binder, S., A. Marchfelder, and A. Brennicke, *RNA editing of tRNA(Phe) and tRNA(Cys) in mitochondria of Oenothera berteriana is initiated in precursor molecules*. Mol Gen Genet, 1994. **244**(1): p. 67-74.
121. Marechal-Drouard, L., et al., *RNA editing of larch mitochondrial tRNA(His) precursors is a prerequisite for processing*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(16): p. 3229-34.
122. Rubio, M.A., et al., *Editing and methylation at a single site by functionally interdependent activities*. Nature, 2017. **542**(7642): p. 494-497.
123. Liu, B., et al., *Deciphering the tRNA-derived small RNAs: origin, development, and future*. Cell Death Dis, 2021. **13**(1): p. 24.
124. Fu, M., et al., *Emerging roles of tRNA-derived fragments in cancer*. Mol Cancer, 2023. **22**(1): p. 30.
125. Wijesinghe, P. and A.S. Bhagwat, *Efficient deamination of 5-methylcytosines in DNA by human APOBEC3A, but not by AID or APOBEC3G*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(18): p. 9206-17.
126. Warren, C.J., et al., *APOBEC3A functions as a restriction factor of human papillomavirus*. J Virol, 2015. **89**(1): p. 688-702.
127. Ooms, M., et al., *APOBEC3A, APOBEC3B, and APOBEC3H haplotype 2 restrict human T-lymphotropic virus type 1*. J Virol, 2012. **86**(11): p. 6097-108.

128. DeWeerd, R.A., et al., *Prospectively defined patterns of APOBEC3A mutagenesis are prevalent in human cancers*. Cell Rep, 2022. **38**(12): p. 110555.
129. Law, E.K., et al., *APOBEC3A catalyzes mutation and drives carcinogenesis in vivo*. J Exp Med, 2020. **217**(12).
130. Gehrke, J.M., et al., *An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities*. Nat Biotechnol, 2018. **36**(10): p. 977-982.
131. Vaisvila, R., et al., *Enzymatic methyl sequencing detects DNA methylation at single-base resolution from picograms of DNA*. Genome Res, 2021. **31**(7): p. 1280-1289.
132. Nakata, Y., et al., *Cellular APOBEC3A deaminase drives mutations in the SARS-CoV-2 genome*. Nucleic Acids Res, 2023. **51**(2): p. 783-795.
133. Warren, C.J., et al., *Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression*. Viruses, 2017. **9**(8).
134. Taura, M., et al., *Apobec3A maintains HIV-1 latency through recruitment of epigenetic silencing machinery to the long terminal repeat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(6): p. 2282-2289.
135. Kim, K., et al., *The roles of APOBEC-mediated RNA editing in SARS-CoV-2 mutations, replication and fitness*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 14972.
136. Bogerd, H.P., et al., *Cellular inhibitors of long interspersed element 1 and Alu retrotransposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(23): p. 8780-5.
137. Cortez, L.M., et al., *APOBEC3A is a prominent cytidine deaminase in breast cancer*. PLoS Genet, 2019. **15**(12): p. e1008545.
138. Taylor, B.J., et al., *DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis*. Elife, 2013. **2**: p. e00534.
139. Dananberg, A., et al., *APOBEC Mutagenesis in Cancer Development and Susceptibility*. Cancers (Basel), 2024. **16**(2).
140. Nair, D.T., et al., *DNA synthesis across an abasic lesion by yeast REV1 DNA polymerase*. J Mol Biol, 2011. **406**(1): p. 18-28.
141. Helleday, T., S. Eshtad, and S. Nik-Zainal, *Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(9): p. 585-98.
142. Roberts, S.A. and D.A. Gordenin, *Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(12): p. 786-800.
143. Venkatesan, S., et al., *Perspective: APOBEC mutagenesis in drug resistance and immune escape in HIV and cancer evolution*. Ann Oncol, 2018. **29**(3): p. 563-572.
144. Carpenter, M.A., et al., *Mutational impact of APOBEC3A and APOBEC3B in a human cell line and comparisons to breast cancer*. PLoS Genet, 2023. **19**(11): p. e1011043.
145. Jalili, P., et al., *Quantification of ongoing APOBEC3A activity in tumor cells by monitoring RNA editing at hotspots*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 2971.
146. Green, A.M., et al., *Cytosine Deaminase APOBEC3A Sensitizes Leukemia Cells to Inhibition of the DNA Replication Checkpoint*. Cancer Res, 2017. **77**(17): p. 4579-4588.
147. Langenbucher, A., et al., *An extended APOBEC3A mutation signature in cancer*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1602.
148. Buisson, R., et al., *Passenger hotspot mutations in cancer driven by APOBEC3A and mesoscale genomic features*. Science, 2019. **364**(6447).
149. Chan, K., et al., *An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 1067-72.
150. Huang, X., et al., *Programmable C-to-U RNA editing using the human APOBEC3A deaminase*. EMBO J, 2020. **39**(22): p. e104741.
151. Wang, X., et al., *Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion*. Nat Biotechnol, 2018. **36**(10): p. 946-949.
152. Liu, Z., et al., *Efficient and precise base editing in rabbits using human APOBEC3A-nCas9 fusions*. Cell Discov, 2019. **5**: p. 31.
153. Li, J., et al., *Efficient base editing in G/C-rich regions to model androgen insensitivity syndrome*. Cell Res, 2019. **29**(2): p. 174-176.
154. Zong, Y., et al., *Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A*. Nat Biotechnol, 2018.

155. Moore, L.D., T. Le, and G. Fan, *DNA methylation and its basic function*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(1): p. 23-38.
156. Li, Y. and T.O. Tollefsbol, *DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis*. Methods Mol Biol, 2011. **791**: p. 11-21.
157. Miyata, K., et al., *Bisulfite Sequencing for DNA Methylation Analysis of Primary Muscle Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2017. **1668**: p. 3-13.
158. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
159. Tanaka, K. and A. Okamoto, *Degradation of DNA by bisulfite treatment*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(7): p. 1912-5.
160. Shigematsu, M., et al., *YAMAT-seq: an efficient method for high-throughput sequencing of mature transfer RNAs*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(9): p. e70.
161. Petersen-Mahrt, S.K. and M.S. Neuberger, *In vitro deamination of cytosine to uracil in single-stranded DNA by apolipoprotein B editing complex catalytic subunit 1 (APOBEC1)*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19583-6.
162. Kim, K., et al., *Unraveling the Enzyme-Substrate Properties for APOBEC3A-Mediated RNA Editing*. J Mol Biol, 2023. **435**(17): p. 168198.
163. Sohail, A., et al., *Human activation-induced cytidine deaminase causes transcription-dependent, strand-biased C to U deaminations*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(12): p. 2990-4.
164. Dananberg, A. and J. Maciejowski, *Monitoring APOBEC3A protein levels in human cancer cells*. Methods Cell Biol, 2024. **182**: p. 313-327.
165. Pliatsika, V., et al., *MINTbase v2.0: a comprehensive database for tRNA-derived fragments that includes nuclear and mitochondrial fragments from all The Cancer Genome Atlas projects*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D152-D159.
166. Huang, Z.X., et al., *Position 34 of tRNA is a discriminative element for m5C38 modification by human DNMT2*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(22): p. 13045-13061.
167. Brzezicha, B., et al., *Identification of human tRNA:m5C methyltransferase catalysing intron-dependent m5C formation in the first position of the anticodon of the pre-tRNA Leu (CAA)*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(20): p. 6034-43.
168. The, R.C., et al., *RNAcentral: a comprehensive database of non-coding RNA sequences*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D128-D134.
169. Richardson, S.R., et al., *APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition*. Elife, 2014. **3**: p. e02008.
170. Barka, A., et al., *The Base-Editing Enzyme APOBEC3A Catalyzes Cytosine Deamination in RNA with Low Proficiency and High Selectivity*. ACS Chem Biol, 2022. **17**(3): p. 629-636.
171. Harjes, S., et al., *Structure-guided inhibition of the cancer DNA-mutating enzyme APOBEC3A*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 6382.
172. Love, R.P., H. Xu, and L. Chelico, *Biochemical analysis of hypermutation by the deoxycytidine deaminase APOBEC3A*. J Biol Chem, 2012. **287**(36): p. 30812-22.
173. Shlyakhtenko, L.S., et al., *Interaction of APOBEC3A with DNA assessed by atomic force microscopy*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99354.
174. Chelico, L. and M.B. Adolph, *Purification of enzymatically active APOBEC proteins from an insect cell expression system*. Methods Enzymol, 2025. **713**: p. 31-68.
175. Jones, K.F.M., et al., *APOBEC3A Catalytic Inactivity Mutation Induces Tertiary Structure Destabilization*. ACS Med Chem Lett, 2023. **14**(3): p. 338-343.
176. Stenglein, M.D., et al., *APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(2): p. 222-9.
177. Huang, G., et al., *High-throughput profiling of RNA modifications by ultra-performance liquid chromatography coupled to complementary mass spectrometry: Methods, quality control, and applications*. Talanta, 2023. **263**: p. 124697.
178. Chang, J.S., et al., *Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for the quantification of RNA and DNA methylation*. J Pharm Biomed Anal, 2021. **197**: p. 113969.

179. Zhang, Y.F., et al., *Determination of cytidine modifications in human urine by liquid chromatography - Mass spectrometry analysis*. Anal Chim Acta, 2019. **1081**: p. 103-111.
180. Sarin, L.P., et al., *Nano LC-MS using capillary columns enables accurate quantification of modified ribonucleosides at low femtomol levels*. RNA, 2018. **24**(10): p. 1403-1417.
181. Ramos, J., et al., *Formation of tRNA Wobble Inosine in Humans Is Disrupted by a Millennia-Old Mutation Causing Intellectual Disability*. Mol Cell Biol, 2019. **39**(19).
182. Rubio, M.A., et al., *C to U editing stimulates A to I editing in the anticodon loop of a cytoplasmic threonyl tRNA in Trypanosoma brucei*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 115-20.
183. Fey, J., et al., *Evolutionary and functional aspects of C-to-U editing at position 28 of tRNA(Cys)(GCA) in plant mitochondria*. RNA, 2000. **6**(4): p. 470-4.
184. Miyata, Y., et al., *RNA editing in the anticodon of tRNA Leu (CAA) occurs before group I intron splicing in plastids of a moss Takakia lepidozioides S. Hatt. & Inoue*. Plant Biol (Stuttg), 2008. **10**(2): p. 250-5.
185. Borner, G.V., et al., *RNA editing changes the identity of a mitochondrial tRNA in marsupials*. EMBO J, 1996. **15**(21): p. 5949-57.
186. Novoa, E.M., et al., *A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage*. Cell, 2012. **149**(1): p. 202-13.
187. Pan, T., *Modifications and functional genomics of human transfer RNA*. Cell Res, 2018. **28**(4): p. 395-404.
188. Paris, Z., I.M. Fleming, and J.D. Alfonzo, *Determinants of tRNA editing and modification: avoiding conundrums, affecting function*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(3): p. 269-74.
189. Sakhtemani, R., et al., *Genome-wide mapping of regions preferentially targeted by the human DNA-cytosine deaminase APOBEC3A using uracil-DNA pulldown and sequencing*. J Biol Chem, 2019. **294**(41): p. 15037-15051.
190. Thornlow, B.P., et al., *Transfer RNA genes experience exceptionally elevated mutation rates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(36): p. 8996-9001.
191. Beuning, P.J. and K. Musier-Forsyth, *Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases*. Biopolymers, 1999. **52**(1): p. 1-28.
192. Schimmel, P., et al., *An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8763-8.
193. Ribas de Pouplana, L. and P. Schimmel, *Operational RNA code for amino acids in relation to genetic code in evolution*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 6881-4.
194. Schulman, L.H. and H. Pelka, *Anticodon loop size and sequence requirements for recognition of formylmethionine tRNA by methionyl-tRNA synthetase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(22): p. 6755-9.
195. Schulman, L.H. and H. Pelka, *Anticodon switching changes the identity of methionine and valine transfer RNAs*. Science, 1988. **242**(4879): p. 765-8.
196. Schulman, L.H. and H. Pelka, *The anticodon contains a major element of the identity of arginine transfer RNAs*. Science, 1989. **246**(4937): p. 1595-7.
197. Jahn, M., M.J. Rogers, and D. Soll, *Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA(Gln) are major recognition elements for E. coli glutamyl-tRNA synthetase*. Nature, 1991. **352**(6332): p. 258-60.
198. Pallanck, L. and L.H. Schulman, *Anticodon-dependent aminoacylation of a noncognate tRNA with isoleucine, valine, and phenylalanine in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3872-6.
199. Sochacka, E., et al., *C5-substituents of uridines and 2-thiouridines present at the wobble position of tRNA determine the formation of their keto-enol or zwitterionic forms - a factor important for accuracy of reading of guanosine at the 3'-end of the mRNA codons*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(8): p. 4825-4836.
200. Lant, J.T., et al., *Genetic Interaction of tRNA-Dependent Mistranslation with Fused in Sarcoma Protein Aggregates*. Genes (Basel), 2023. **14**(2).
201. Netzer, N., et al., *Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity*. Nature, 2009. **462**(7272): p. 522-6.
202. Oh, S., et al., *Genotoxic stress and viral infection induce transient expression of APOBEC3A and pro-inflammatory genes through two distinct pathways*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4917.

203. Nibert, M.L., *Mitovirus UGA(Trp) codon usage parallels that of host mitochondria*. Virology, 2017. **507**: p. 96-100.
204. Truitt, M.L. and D. Ruggero, *New frontiers in translational control of the cancer genome*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(5): p. 288-304.
205. Goodarzi, H., et al., *Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression*. Cell, 2016. **165**(6): p. 1416-1427.
206. Ljungstrom, V., et al., *Whole-exome sequencing in relapsing chronic lymphocytic leukemia: clinical impact of recurrent RPS15 mutations*. Blood, 2016. **127**(8): p. 1007-16.
207. Schmutzer, M. and A. Wagner, *Not Quite Lost in Translation: Mistranslation Alters Adaptive Landscape Topography and the Dynamics of Evolution*. Mol Biol Evol, 2023. **40**(6).
208. Pan, T., *Adaptive translation as a mechanism of stress response and adaptation*. Annu Rev Genet, 2013. **47**: p. 121-37.
209. Bratulic, S., M. Toll-Riera, and A. Wagner, *Mistranslation can enhance fitness through purging of deleterious mutations*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15410.
210. Ahn, I. and H.S. Son, *Evolutionary analysis of human-origin influenza A virus (H3N2) genes associated with the codon usage patterns since 1993*. Virus Genes, 2012. **44**(2): p. 198-206.
211. Wong, E.H., et al., *Codon usage bias and the evolution of influenza A viruses*. Codon Usage Biases of Influenza Virus. BMC Evol Biol, 2010. **10**: p. 253.
212. Kompatscher, M., I. Gonnella, and M. Erlacher, *Studying the Function of tRNA Modifications: Experimental Challenges and Opportunities*. J Mol Biol, 2025. **437**(16): p. 168934.
213. Lecointe, F., et al., *Lack of pseudouridine 38/39 in the anticodon arm of yeast cytoplasmic tRNA decreases in vivo recoding efficiency*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30445-53.
214. Faivre, B., et al., *Dihydrouridine synthesis in tRNAs is under reductive evolution in Mollicutes*. RNA Biol, 2021. **18**(12): p. 2278-2289.
215. Rappol, T., et al., *tRNA expression and modification landscapes, and their dynamics during zebrafish embryo development*. Nucleic Acids Res, 2024. **52**(17): p. 10575-10594.
216. Suzuki, T., *The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021. **22**(6): p. 375-392.
217. Li, J., et al., *Structural determinants for tRNA selective cleavage by RNase 2/EDN*. Structure, 2024. **32**(3): p. 328-341 e4.
218. Yamasaki, S., et al., *Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression*. J Cell Biol, 2009. **185**(1): p. 35-42.
219. Lakshmanan, V., et al., *Comprehensive annotation and characterization of planarian tRNA and tRNA-derived fragments (tRFs)*. RNA, 2021. **27**(4): p. 477-495.
220. Kumar, P., et al., *Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets*. BMC Biol, 2014. **12**: p. 78.
221. Zhang, Y., et al., *Multiple regulatory roles of the transfer RNA-derived small RNAs in cancers*. Genes Dis, 2024. **11**(2): p. 597-613.
222. Xie, Y., et al., *Action mechanisms and research methods of tRNA-derived small RNAs*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 109.
223. Artika, I.M., et al., *RNA modifications and their role in gene expression*. Front Mol Biosci, 2025. **12**: p. 1537861.
224. Evke, S., et al., *Epitranscriptomic Reprogramming Is Required to Prevent Stress and Damage from Acetaminophen*. Genes (Basel), 2022. **13**(3).
225. Cui, L., et al., *RNA modifications: importance in immune cell biology and related diseases*. Signal Transduct Target Ther, 2022. **7**(1): p. 334.
226. Bohnsack, K.E., C. Hobartner, and M.T. Bohnsack, *Eukaryotic 5-methylcytosine (m(5)C) RNA Methyltransferases: Mechanisms, Cellular Functions, and Links to Disease*. Genes (Basel), 2019. **10**(2).
227. Chan, C.T., et al., *Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 937.
228. Kawarada, L., et al., *ALKBH1 is an RNA dioxygenase responsible for cytoplasmic and mitochondrial tRNA modifications*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(12): p. 7401-7415.

229. Pais de Barros, J.P., et al., *2'-O-methyl-5-formylcytidine (f5Cm), a new modified nucleotide at the 'wobble' of two cytoplasmic tRNAs Leu (NAA) from bovine liver*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(8): p. 1489-96.